



HAL
open science

L'annexine V, marqueur de réaction acrosomique et non d'apoptose? Étude préliminaire sur le spermatozoïde humain

Pierre Besnier

► To cite this version:

Pierre Besnier. L'annexine V, marqueur de réaction acrosomique et non d'apoptose? Étude préliminaire sur le spermatozoïde humain. Médecine humaine et pathologie. 2016. dumas-01416679

HAL Id: dumas-01416679

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01416679>

Submitted on 14 Dec 2016

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.

Université de Bordeaux

Année 2016

Thèse n°3148

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Obtenu après soutenance du

MEMOIRE

POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

(Conformément au décret n°90-810 du 10 septembre 1990 modifié par arrêté de 4 juillet 2003)

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT

Par

Pierre BESNIER

Né le 23 mai 1987, à Rouen

Le 12 octobre 2016

**L'ANNEXINE V, MARQUEUR DE REACTION ACROSOMIQUE ET NON
D'APOPTOSE ?
ETUDE PRELIMINAIRE SUR LE SPERMATOZOIDE HUMAIN**

Directeur de thèse :
Dr CHANSEL DEBORDEAUX Lucie

Jury

Pr. JIMENEZ Clement

Pr. SENTILHES Loic

Dr. PAPAXANTHOS Aline

Dr. DE-BARBAYRAC Bertille

Dr. CHANSEL DEBORDEAUX Lucie

Président

Membre

Membre

Membre

Membre

Remerciements

Au Docteur Chansel Debordeaux,

Merci Lucie d'avoir accepté de diriger ce travail. Merci pour tes conseils toujours si bien avisés que ce soit pour la thèse ou pour le post internat. Ta disponibilité et ta sympathie ont largement contribué à rendre ces trois semestres si agréables. Tu es pour moi un exemple que je tâcherai de suivre.

Au Professeur Jimenez,

Merci de la confiance que vous m'avez accordé en me proposant ce travail. Merci pour votre enseignement. Ce fut un grand honneur de travailler dans votre service et une grande chance d'avoir un chef si accessible. Votre bienveillance et votre soutien méritent ma plus grande reconnaissance, depuis mon premier semestre où vous avez demandé un poste d'interne supplémentaire pour pouvoir m'accueillir jusqu'à mon dernier semestre où j'ai toujours pu compter sur vous pour m'aider à trouver un poste d'assistant.

Au Docteur Papaxanthos

Merci de me faire l'honneur de juger ce travail. Je vous remercie de votre enseignement. Votre rigueur toujours bienveillante est pour moi un exemple à suivre. Ça a été un grand plaisir d'être interne à vos côtés.

Au Professeur Sentilhes

Merci d'avoir accepté de juger mon travail. C'est un honneur pour moi de vous compter parmi les membres de mon jury.

Au Docteur De-Barbeyrac

Merci d'avoir accepté de juger mon travail. J'ai fait mes premiers pas en tant qu'interne de biologie médicale avec vous en Bactériologie, je suis honoré de votre présence pour la dernière étape de mon internat.

Au Professeur Leandri

Merci d'avoir accepté d'être le rapporteur de cette thèse. Je suis très honoré par votre regard sur mon travail.

A Vincent Pitard

Merci de votre aide lors de mes premiers passages à la plateforme de cytométrie en flux.

A Evelyne Doudnikoff

Merci de votre aide pour l'utilisation du microscope à fluorescence de l'IMN.

Au service de Parasitologie du CHU de Bordeaux

Merci de m'avoir permis d'utiliser votre microscope pour mes premiers tests de marquage.

Au Docteur Soula

Merci pour ton enseignement, ça a été un plaisir de travailler avec toi.

A Monique Mercier

Merci pour tout, pour ta formation technique, pour le temps que tu nous accordes malgré la charge de travail qui t'incombe, pour ta gentillesse, pour ta bienveillance presque maternelle.

A l'ensemble du service de Biologie de la reproduction

Avec une pensée particulière pour Anna et Marianne qui animent ce service ; pour Marie-Caroline, Nicolas et Hervé ; pour Patricia, Marie-Caroline et Corinne. A Véronique, Pascale, Cathy, Maïté, Sylvie, Jean-François
Travailler dans ce service a toujours été un plaisir.

A mes cointernes de BDR

Vincent, Juliette, Mariya, Edouard, Camille, merci pour tous ces moments partagés, j'espère retrouver une ambiance de travail aussi bonne qu'avec vous.

A mes anciens cointernes

Marine, Edona, Chloé, Catherine, Laurent, Raoul, Barnabé, Bastien, Xavier.

A ma famille

Mes parents que j'espère rendre fier aujourd'hui, merci de toujours croire en moi, merci d'avoir toujours été là.

Louis et Camille, j'espère remplir mon rôle d'ainé même si souvent c'est sur vous que je prends exemple.

Ma grand mère et son soutien indéfectible, ta fierté est un moteur.

A mes colocs

Fred, Raoul, Chloé, Samy.

A Pierre Legout et Antoine Heron

Ou quand les amis répondent toujours présents pour venir donner un petit coup de main.

A mes amis, mes amis de toujours, qui ont fait de ces années d'enfance les plus belles années de ma vie.

A mes amis d'externat, qui ont fait des ces années de fac les plus belles années de ma vie.

A mes amis d'internat, qui ont fait de ces années bordelaises les plus belles années de ma vie.

A Laetitia

Merci pour ton soutien, tout ce que tu fais pour moi. Merci d'avoir été là dans cette période de thèse et d'interrogation sur notre vie.

Le bonheur que tu m'apportes est immense.

Où que l'on aille, je sais qu'avec toi, toutes ces futures années seront les plus belles années de ma vie.

Table des matières

Liste des abréviations	- 8 -
Table des figures et tableaux	- 9 -
Table des annexes	- 12 -
Introduction.....	- 13 -
I. Revue de la littérature	- 15 -
I. 1. Le spermatozoïde	- 16 -
I. 2. La spermatogenèse.....	- 18 -
I. 2. La capacitation	- 21 -
I. 3. La réaction acrosomique.....	- 23 -
I. 4. L'apoptose du spermatozoïde	- 28 -
I. 5. L'annexine V	- 32 -
I. 6. La cytométrie en flux	- 34 -

II. Etude préliminaire - 37 -

II. 1. Matériels et méthodes..... - 38 -

II. 1. 1. Critères d'inclusion - 38 -

II. 1. 2. Préparation des spermés - 39 -

II. 1. 3. Evaluation de la mobilité progressive..... - 40 -

II. 1. 4. Evaluation de la vitalité..... - 40 -

II. 1. 5. Marquage à l'annexine V..... - 41 -

II. 1. 6. Double marquage annexine V et anti-CD46 - 41 -

II. 1. 8. Marquage à l'iodure de propidium..... - 42 -

II. 1. 9. Technique TUNEL..... - 43 -

II. 1. 10. Analyse par cytométrie en flux - 44 -

II. 1. 11. Marquage à la Chlortetracycline..... - 45 -

II. 1. 12. Analyse par microscopie à fluorescence..... - 47 -

II. 1. 13. Description du protocole..... - 48 -

II. 2. Résultats	- 50 -
II. 2. 1. Vérification de la capacitation et de la réaction acrosomique par test de fluorescence à la Chlortetracycline	- 50 -
II. 2. 2. Externalisation de la PS au cours de la capacitation	- 55 -
II. 2. 3. Externalisation de la PS au cours de l'induction de la réaction acrosomique.....	- 59 -
II. 2. 4. Evaluation des marqueurs d'apoptose au cours de la capacitation et de l'induction de la réaction acrosomique	- 59 -
II. 3. Discussion	- 65 -
Conclusion.....	- 69 -
Bibliographie.....	- 70 -
Annexes	- 79 -

Liste des abréviations

- AMP : Assistance Médicale à la Procréation
- APC : Allophycocyanine
- CAD : Caspase Activated Deoxyribonucléase
- Caspase : CysteinyI aspartate-specific protease
- CTC : Chlortetracycline
- FITC : Isothionate de Fluorescéine
- HSA : Human Serum Albumin
- ICSI : Intra Cytoplasmic Sperm Injection
- IP : Iodure de Propidium
- MACS : Magnetic-Activated Cell Sorting
- PBS : Phosphate Buffered Saline
- PE : Phycoerythrine
- PFA : Paraformaldéhyde
- PS : Phosphatidylsérine
- RA : Réaction Acrosomique
- TdT : Terminal Deoxynucleotidyltransferase
- TUNEL : Terminal deoxynucleotide transferase dUTP Nick End Labeling

Table des figures et tableaux

- Figure 1. Structure du spermatozoïde mature (page 17)
- Figure 2. Représentation schématique de l'épithélium séminifère (page 20)
- Figure 3. Schéma de la réaction acrosomique (page 24)
- Figure 4 : Schéma de la fusion membranaire des gamètes (page 27)
- Figure 5. Schéma du marquage par l'annexine V de la phosphatidylserine externalisée (page 32)
- Figure 6. Schéma du principe de focalisation hydrodynamique (page 34)
- Figure 7. Schéma de la diffusion de la lumière (page 35)
- Figure 8. Schéma des trois composants d'un cytomètre en flux (page 36)
- Figure 9. Cytomètre BD FACSCANTO et software FACSDiva (page 44)
- Figure 10. Microscope Axio Imager 2 (page 47)

- Figure 11. Schéma descriptif du protocole de l'étude (page 48)
- Figure 12. Trois types de fluorescence des spermatozoïdes marquées par la CTC (page 52)
- Figure 13. Marquage des spermatozoïdes par la CTC après incubation dans le milieu global + HSA (page 53)
- Figure 14. Comparaison du marquage, après 4h d'incubation dans le global + HSA, par la CTC en fonction de l'induction ou non de la réaction acrosomique par le calcium ionophore (page 54)
- Figure 15. Cytogramme caractéristique SSC/FSC (page 55)
- Figure 16. Cytogramme caractéristique du témoin négatif (page 56)
- Figure 17. Analyse des données par le software FACSDiva (page 56)
- Figure 18. Cytogrammes caractéristiques des doubles marquages (page 57)
- Figure 19. Pourcentage de spermatozoïdes vivants avec externalisation de la PS (page 58)
- Figure 20. Cytogramme caractéristique du marquage par FITC-DEVD-FMK (page 60)

- Figure 21. Pourcentage de spermatozoïdes vivants avec présence de caspase 3 activée (page 61)
- Figure 22. Cytogramme caractéristique de selection cellulaire pour technique TUNEL (page 62)
- Figure 23. Cytogramme caractéristique de selection des spermatozoides non agrégés (page 62)
- Figure 24. Cytogrammes caractéristiques des cellules témoins pour la technique TUNEL (page 63)
- Figure 25. Cytogramme caractéristique de la fragmentation d'ADN par TUNEL (page 64)
- Tableau 1. Pourcentage de spermatozoïdes à ADN fragmenté chez deux patients après 4h d'incubation, avec ou sans induction de la RA et témoin négatif (page 64)

Table des annexes

- Annexe 1. Pourcentages de spermatozoïdes pour chaque marquage (page 80)
- Annexe 2. Consentement à la recherche (page 81)
- Annexe 3. Note d'information au patient (page 83)
- Annexe 4. Protocole de marquage des spermatozoïdes à l'annexine V (page 84)
- Annexe 5. Protocole du double marquage des spermatozoïdes à l'annexine V et à l'anti-CD46 (page 85)
- Annexe 6. Protocole de marquage des spermatozoïdes à l'inhibiteur de caspase 3 activée (page 86)
- Annexe 7. Protocole de marquage des spermatozoïdes à la chlortetracycline (page 87)
- Annexe 8. Protocole de marquage des spermatozoïdes par technique TUNEL (page 88)

Introduction

L'intérêt de la sélection des spermatozoïdes en assistance médicale à la procréation (AMP) est une question légitime, notamment avec l'injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) dans les infertilités masculines où il est possible de sélectionner des spermatozoïdes anormaux, l'évaluation étant faite essentiellement sur sa mobilité et sa morphologie. La sélection est réalisée systématiquement quelque soit la technique utilisée (insémination, fécondation in vitro, ICSI) par lavage, gradients de densité ou migration. Mais de nouvelles avancées techniques sont envisagées et en particulier la sélection des spermatozoïdes non-apoptotiques par marquage à l'annexine V et tri par cytométrie en flux : magnetic-activated cell sorting (MACS) (Lukaszuk et al., 2015; Troya and Zorrilla, 2015; Degheidy et al., 2015).

L'annexine V est une protéine de 35-36 kDA qui possède une forte affinité pour la phosphatidylserine (PS). L'annexine V peut être associée à un marqueur fluorescent et ainsi être utilisée pour marquer la présence de PS à la surface de la membrane plasmique d'une cellule (Vermes et al., 1995).

Les phospholipides constituant la double couche de la membrane plasmique ont une répartition asymétrique. La PS, comme la phosphatidyléthanolamine, est située dans le feuillet interne. Lors de l'apoptose, à un stade précoce, la PS est extériorisée sur le feuillet externe de la membrane (Van den Eijnde et al., 1997) permettant une reconnaissance de la cellule par les macrophages.

Dans la membrane des spermatozoïdes comme dans celle des cellules somatiques, la PS est située de façon asymétrique dans le feuillet interne. Sa translocation vers le feuillet externe lors d'un processus apoptotique du spermatozoïde est encore discutée (Martin et al., 2005; de Vries et al., 2003).

En effet, bien que l'apoptose des cellules germinales soit largement reconnue et nécessaire pour l'existence d'une spermatogenèse normale, elle reste controversée pour les spermatozoïdes humains matures (Lachaud et al., 2004; Oehninger et al.,

2003). Les spermatozoïdes sont des cellules hautement différenciées avec un noyau transcriptionnellement peu actif, il apparaît donc peu probable qu'ils puissent générer leur apoptose, un processus actif et programmé de mort cellulaire (Galeraud-Denis et al., 2007). D'autant plus que l'induction de l'apoptose des spermatozoïdes n'a jamais été réalisée in vitro (Mahfouz et al., 2010).

Par ailleurs, au cours de la capacitation, préalable indispensable à la réaction acrosomique (RA) et à la fécondance du spermatozoïde, la membrane plasmatique est déstabilisée induisant une réorganisation des phospholipides membranaires et une externalisation de la PS (de Vries et al., 2003; Kotwicka et al., 2002).

Dans ce travail, l'objectif est d'évaluer l'évolution du marquage à l'annexine V au cours de la capacitation et de la réaction acrosomique, en suivant en parallèle l'évolution de marqueurs spécifiques d'apoptose. Le but recherché est de montrer que l'annexine V ne peut être considéré seulement comme un marqueur d'apoptose pour les spermatozoïdes. Des spermatozoïdes, issus d'éjaculats de patients avec un spermogramme normal selon les normes de l'organisation mondiale de la santé (OMS) de 2010, ont été incubés dans des conditions capacitantes et d'induction de RA puis analysés par cytométrie en flux et microscopie à fluorescence.

I. Revue de la littérature

I. 1. Le spermatozoïde

Le spermatozoïde est le gamète mâle de la reproduction. C'est l'une des cellules les plus différenciées de l'organisme.

Sa structure contient trois parties distinctes :

La tête, constituée du noyau avec une chromatine extrêmement condensée, lui-même recouvert sur ses deux-tiers proximaux par l'acrosome. Le cytoplasme, très réduit, entoure le tiers distal du noyau.

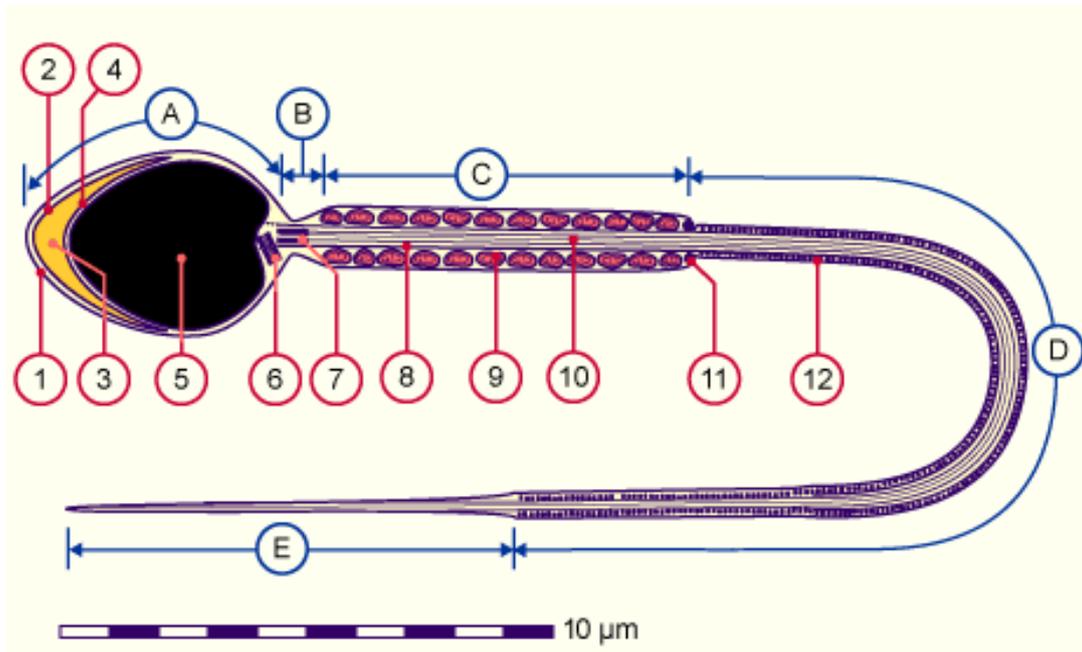
Le col, zone de jonction entre la tête et le flagelle qui contient l'appareil centriolaire.

Le flagelle qui comprend :

La pièce intermédiaire, où l'axonème, dérivé du centriole distal et constitué de 9 doublets de microtubules périphériques et d'une paire de microtubules centrale, est entouré d'un anneau de mitochondries.

La pièce principale qui ne contient plus de mitochondries et où une gaine de fibres denses externes entoure l'axonème.

La pièce terminale qui ne contient plus que les microtubules de l'axonème.



- | | |
|---|--|
| <p>A. Tête
 B. Col
 C. Pièce intermédiaire
 D. Pièce principale
 E. Pièce terminale</p> | <p>1. Membrane plasmatique
 2. Membrane acrosomiale externe
 3. Acrosome
 4. Membrane acrosomiale interne
 5. Noyau
 6. Centriole proximal
 7. Résidu du centriole distal
 8. Faisceaux longitudinaux extérieurs denses
 9. Mitochondrie
 10. Axonème
 11. Annulus
 12. Fibres denses externes</p> |
|---|--|

Figure 1. Structure du spermatozoïde mature (source : embryology.ch)

I. 2. La spermatogenèse

La spermatogenèse est un processus physiologique complexe de multiplication, de différenciation et d'apoptose. Elle débute à la puberté et reste continue tout au long de la vie chez l'homme. Elle permet d'aboutir à la formation des gamètes mâles haploïdes (à n chromosomes) à partir des cellules germinales diploïdes ($2n$ chromosomes), les spermatogonies.

La formation des spermatozoïdes a lieu dans les tubes séminifères dont l'épithélium est constitué de deux populations cellulaires distinctes :

- Des cellules somatiques, les cellules de Sertoli
- Des cellules germinales

La spermatogenèse comporte trois étapes :

- Une phase de prolifération et de différenciation des spermatogonies : Les spermatogonies Ad (dark) sont les cellules souches du testicule, elles se divisent par mitose pour régénérer la population de cellules germinales de l'épithélium séminifère. Les spermatogonies Ap (pale) peuvent se renouveler mais aussi se différencier en spermatogonies B par division mitotique. Cette entrée dans la différenciation cellulaire se fait par groupe de cellules tous les 16 jours. Les spermatogonies B se divisent à leur tour pour donner les spermatocytes I.
- Une phase de méiose : les spermatocytes I au stade préleptotène subissent une première division méiotique pour devenir spermatocytes II. La deuxième division de méiose aboutit à la formation des spermatides haploïdes. Un spermatocyte I donne quatre spermatides.
- Une phase de différenciation, la spermiogénèse : les spermatides rondes se différencient en spermatides allongés puis en spermatozoïdes.

Chez l'homme, la spermatogenèse dure 74 jours. Au sein de l'épithélium séminifère, des vagues de différenciation se déclenchent tous les 16 jours pour permettre une production continue des spermatozoïdes.

Les cellules de Sertoli ont un rôle majeur dans la spermatogénèse. Elles permettent le maintien de l'architecture des tubes séminifères, elles programment et régulent les cycles de l'épithélium. Elles jouent un rôle de protection, de nutrition et de phagocytose des cellules germinales. Elles sont reliées entre elles par des jonctions serrées qui forment une barrière hémato-testiculaire et divisent l'épithélium séminifère en deux compartiments :

- Le compartiment basal en contact avec les vaisseaux forme un microenvironnement particulier au sein de niches qui permet le maintien d'un pool de cellules souches.
- Le compartiment adluminal contient lui, entre les cellules de Sertoli, les cellules germinales depuis les spermatocytes I au stade diplotène jusqu'à la spermiation. La spermiation est la dernière étape de la spermatogénèse, la spermatide allongée expulse le corps résiduel (reste cytoplasmique phagocyté par la cellule de Sertoli) et devient un spermatozoïde qui est libéré dans la lumière du tube séminifère.

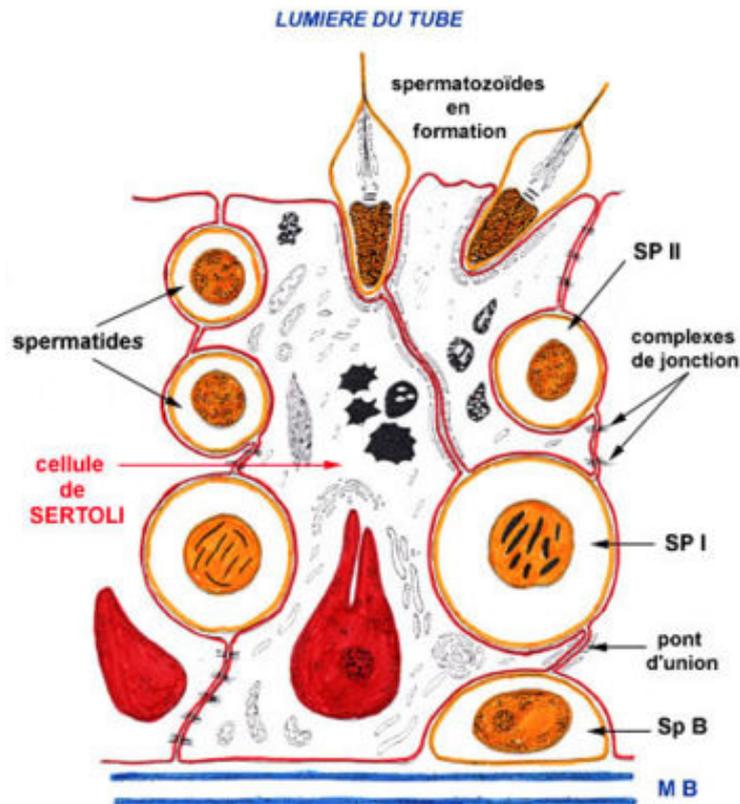


Figure 2. Représentation schématique de l'épithélium séminifère (d'après Humeau et Arnal)
 MB : membrane basale ; SpB : spermatogonie B ; SPI : spermatocyte I ; SP II : spermatocyte II

Chaque jour, l'homme produit en moyenne 200 millions de spermatozoïdes. Les spermatozoïdes libérés sont des cellules matures mais il leur reste à subir de nombreuses modifications pour devenir des gamètes mobiles et féconds.

Une fois libérés, ils sont propulsés par les contractions des fibres musculaires lisses et les mouvements des cils de l'épithélium des cônes efférents jusque dans le canal épидидymaire qui constitue un réservoir. Dans l'épididyme, les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité propre et leur membrane est stabilisée par un dépôt de glycoprotéines entraînant la décapacitation qui empêche une réaction acrosomique prématurée.

Lors de l'éjaculation, les spermatozoïdes quittent ce réservoir. Les sécrétions prostatiques apportent aux spermatozoïdes du cholestérol qui va également permettre de stabiliser la membrane (Cross, 1998) et le récepteur membranaire de la progestérone par fusion avec des microvésicules sécrétées par la prostate, les prostatomes (Park et al., 2011). Ce récepteur joue un rôle dans la capacitation et l'induction de la réaction acrosomique.

I. 2. La capacitation

Le terme de capacitation est apparu dès 1952 et était décrit comme l'acquisition de la capacité de fécondance pour les spermatozoïdes de mammifères (Austin, 1952). La capacitation est l'ensemble des modifications membranaires et cytoplasmiques qui rendent les spermatozoïdes capables de féconder l'ovocyte. Elle résulte de la suppression de facteurs stabilisants, décapacitants, du plasma séminal (glycoprotéines, cholestérol, zinc) et de l'action de facteurs capacitants du tractus génital féminin (bicarbonate, calcium, glucose, lactate, pyruvate, albumine, Seminal Plasma Protein). La capacitation est un phénomène réversible (Jonge, 2005).

In vitro, la capacitation se produit dans un délai de 1 à 4 heures (Plachot et al., 1986), mais elle n'intéresse, à un temps donné, qu'une sous-populations des spermatozoïdes (Jonge, 2005). La capacitation d'une seule partie des spermatozoïdes à la fois permet un remplacement continu pour une capacité de fécondation continue. Ce mécanisme permet de compenser dans l'espèce humaine une absence de coordination entre l'insémination et l'ovulation.

La première étape de la capacitation est la déstabilisation de la membrane plasmique.

Les facteurs décapacitants contenus dans le plasma séminal sont bloqués par la glaire cervicale et sont détachés de la surface des spermatozoïdes, notamment le cholestérol et la vitamine E (α -tocopherol). La vitamine E permet de protéger la membrane d'une altération des lipides induite par le stress oxydant et les ROS (Reactive Oxygen Species) (Feki et al., 2004).

L'utérus est également un lieu de modification de la membrane plasmique des spermatozoïdes. Les cellules endométriales sécrètent une protéine, la SABP (sialic acid-binding protein) (Banerjee and Chowdhury, 1994). Cette protéine facilite l'influx de calcium à l'intérieur du spermatozoïde (Banerjee and Chowdhury, 1995). Son récepteur n'est présent qu'à la surface des spermatozoïdes non capités, le passage utérin permettrait donc de bloquer les spermatozoïdes capités prématurément (Jonge, 2005).

Les spermatozoïdes sont ensuite préférentiellement attirés par la trompe menant au complexe cumulo-ovocytaire (Wildt et al., 1998).

L'isthme tubaire constitue un réservoir spermatique (Suarez, 2008), les spermatozoïdes sont stockés et relâchés par fractions ce qui permet d'éviter la polyspermie et de maintenir la fertilité des spermatozoïdes entre le rapport sexuel et l'ovulation en régulant la capacitation. Les molécules impliquées dans la liaison des spermatozoïdes avec l'épithélium tubaire sont des protéines ADAM mais également des protéines de la famille des annexines (annexines I, II, IV et V décrites chez les bovins) (Ignotz et al., 2007).

Les spermatozoïdes arrivants dans la trompe rencontrent des molécules accepteuses de stérol comme l'albumine. Elles captent le cholestérol de la membrane plasmique des spermatozoïdes induisant une réorganisation des phospholipides membranaires (Aitken and Nixon, 2013).

La présence de bicarbonate va stimuler l'adénylate cyclase, augmenter la concentration d'AMP cyclique. L'augmentation d'AMPc stimule à son tour la phosphokinase A qui va activer la scramblase (Harrison and Gadella, 2005).

La scramblase est une protéine membranaire qui une fois activée va réorganiser les phospholipides membranaires notamment en externalisant la phosphatidylsérine et la phosphatidylethanolamine (de Vries et al., 2003).

L'activation de la phosphokinase A conduit à la phosphorylation des canaux ioniques, des enzymes impliquées dans le métabolisme et des protéines de structures flagellaires, via la tyrosine kinase (Ficarro et al., 2003).

La déstabilisation de la membrane induit une augmentation de la fluidité membranaire (permettant l'entrée intracellulaire de bicarbonate et de calcium), l'externalisation de récepteurs et l'apparition de zones fusiogènes.

L'aboutissement est l'acquisition pour le spermatozoïde d'un mouvement hyperactivé et de la capacité à réaliser la réaction acrosomique.

La capacitation peut être induite in vitro en incubant les spermatozoïdes dans un milieu adéquat. Ce milieu doit contenir notamment de l'albumine et du bicarbonate, l'albumine facilitant l'efflux de cholestérol (Visconti et al., 1999) permettant ensuite l'entrée de bicarbonate pour activer la scramblase.

I. 3. La réaction acrosomique

La capacitation est un préalable indispensable à la RA mais ces deux phénomènes sont intriqués.

Lorsque le spermatozoïde rentre en contact avec la zone pellucide de l'ovocyte, il se fixe à des glycoprotéines spécifiques d'espèce (Noguchi et al., 1994) : ZP1, ZP2, ZP3, ZP4 chez l'homme. La fixation primaire à ZP3 et ZP4 induit la réaction acrosomique (Gupta, 2015).

Le spermatozoïde se fixe à la zone pellucide grâce à la zonadhésine, une protéine localisée sur la membrane externe de l'acrosome (Anifandis et al., 2014). La protéine sp56 était décrite comme le récepteur spermatique de la ZP3, son rôle dans l'interaction spermatozoïde - zone pellucide est depuis discuté (Muro et al., 2012).

La fixation entraîne la dépolarisation de la membrane plasmique, ce qui permet l'activation des protéines G, l'augmentation de pH intracellulaire, l'activation des phospholipases C et l'ouverture des canaux calciques (Witte and Schäfer-Somi, 2007). L'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium active les protéines SNARE (Soluble NSF Attachment Receptor) qui catalysent les réactions de fusion membranaire. La phospholipase A2 est également impliquée, elle produit des lipides qui facilitent la fusion (lysophospholipides) (Arnoult et al., 2012).

La membrane plasmique et la membrane externe de l'acrosome fusionnent, provoquant des fenestrations.

L'acrosome libère alors son contenu notamment l'acrosine qui hydrolyse ZP1. ZP2 est ainsi accessible pour la fixation secondaire qui aboutit à la fusion avec l'ovocyte.

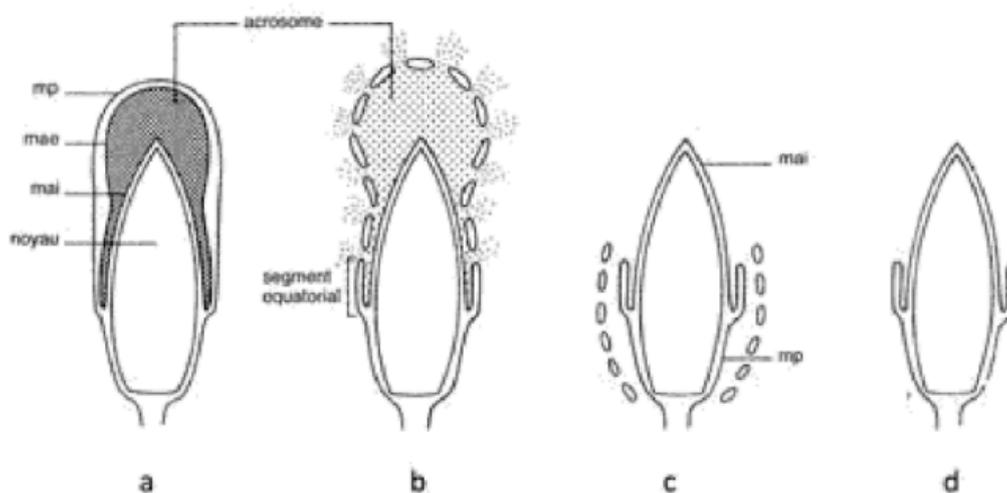


Figure 3. Schéma de la réaction acrosomique (d'après Crozet)

- a. Spermatozoïde, acrosome intact
- b. Fusion des membranes plasmique (mp) et acrosomique externe (mae), fenestration et libération du contenu acrosomique
- c. Élimination des vésicules membranaires
- d. Réaction acrosomique complète, exposition de la membrane acrosomique interne (mai)

Cependant, les spermatozoïdes peuvent également faire leur RA avant d'atteindre la zone pellucide, sans ZP3 et ZP4 (Jin et al., 2011).

La réaction acrosomique est dépendante de la présence de calcium. Elle peut se faire spontanément in vitro sans contact avec la zone pellucide pour un petit nombre de spermatozoïdes (Esteves et al., 1998). Elle peut également être induite par le calcium ionophore A23187 (Jaiswal et al., 1999; Tao et al., 1993).

Le calcium ionophore A23187 est un porteur d'ions qui forme un complexe stable avec le calcium. Il permet au calcium de traverser la membrane cellulaire et ainsi d'augmenter la concentration intra cytoplasmique de calcium. Il peut être utilisé en AMP pour induire l'activation de l'ovocyte notamment en cas de globozoospermie où l'absence d'acrosome empêche l'activation. Il permet aussi d'induire la RA.

Le spermatozoïde acrosome réagi ne possède plus de membrane plasmatique ni de membrane externe de l'acrosome sur les deux tiers antérieurs de sa tête. Il entre en contact avec l'ovocyte au niveau de la région équatoriale située juste en arrière de la membrane interne de l'acrosome.

La fusion des membranes est secondaire à la reconnaissance de la protéine IZUMO, présente au niveau de la plaque équatoriale du spermatozoïde dont la réaction acrosomique est effectuée, par le récepteur JUNO situé à la surface de l'ovocyte (Aydin et al., 2016).

La protéine spermatique IZUMO a été découverte en 2005 par une équipe japonaise qui lui a donné le nom d'un sanctuaire japonais dédié au mariage (Inoue et al., 2005). Les souris mâles avec une interruption induite du gène IZUMO étaient saines mais infertiles. Les spermatozoïdes produits par ces souris étaient morphologiquement normaux, pénétraient la zone pellucide mais étaient incapables de fusionner avec l'ovocyte. La protéine Izumo était également retrouvée chez l'homme, un anticorps anti-IZUMO rendait les spermatozoïdes humains incapables de fusionner avec des ovocytes de hamster dépellucidés.

En 2014, l'équipe du Wellcome Trust Sanger Institute menée par Enrica Bianchi, en Angleterre, a découvert le récepteur ovocytaire de la protéine IZUMO : Folr4 (folate receptor 4) qu'ils renomment JUNO en référence à la déesse de la fertilité (Bianchi et al., 2014). Les souris femelles sans récepteur JUNO étaient infertiles, les ovocytes dépourvus de JUNO étaient incapables de fusionner avec des spermatozoïdes normaux. La saturation des récepteurs JUNO par des anticorps monoclonaux anti-JUNO empêchait la liaison de protéines IZUMO marquées.

Il a également été montré que JUNO intervenait dans le blocage à la polyspermie. Après fertilisation, les récepteurs JUNO devenaient nettement moins détectables lors de la télophase II et disparaissaient avant l'apparition des pronucléi.

D'autres molécules interviennent dans l'interaction gamétique :

- CD9, protéine transmembranaire appartenant à la famille des tétraspanines, répartie sur toute la surface microvillositaire de l'ovocyte (Zhu et al., 2002)
- CD81, une autre tétraspanine interagissant avec CD9 (Evans, 2012)
- L'intégrine $\alpha 6\beta 1$, qui interagit également avec CD9 (Ziyyat et al., 2006)
- ADAM 2, dont l'action semble aussi reliée aux autres protéines (Chen et al., 1999)

La fusion membranaire commence au niveau de la partie postérieure du segment équatorial et s'étend de proche en proche jusqu'à l'incorporation de la tête spermatique puis du flagelle dans l'ooplasm.

Des fragments de la membrane de l'ovocyte sont transférés à celle du spermatozoïde. Cet échange se fait par deux mécanismes (Barraud-Lange et al., 2007):

- Par trogocytose, échange de matériel nécessitant un contact entre les deux cellules
- Par captation d'exosomes, microvésicules permettant un échange de matériel à distance

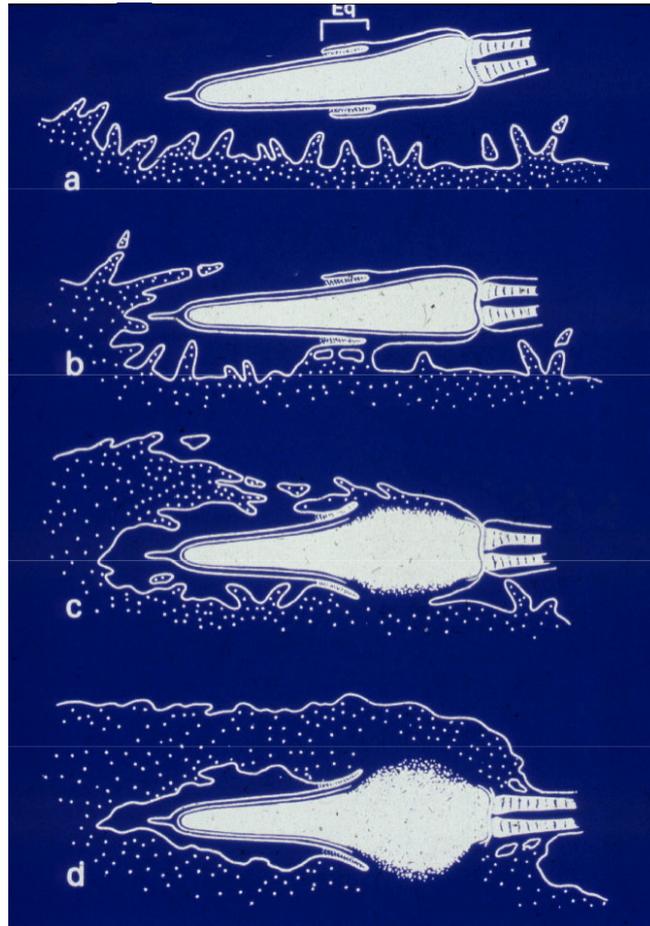


Figure 4. Schéma de la fusion membranaire des gamètes (d'après Yanagimachi)

- e. Spermatozoïde dans l'espace périvitellin**
- f. Adhésion à la membrane ovocytaire par son segment équatorial**
- g. Début de la fusion au niveau de la partie postérieure du segment équatorial**
- h. Incorporation de la tête spermatique au sein de l'ooplasm**

I. 4. L'apoptose du spermatozoïde

Kerr, Wyllie et Curie en 1972 sont les premiers à avoir défini le terme d'apoptose (Kerr et al., 1972). En opposition avec la nécrose, elle est caractérisée par une fragmentation de l'ADN régulière en oligo-nucléosomes. Les travaux d'Horvitz sur le nématode *Caenorhabditis elegans* ont décrit ce processus comme une mort cellulaire programmée active (Horvitz, 1999).

L'apoptose est un mécanisme physiologique de régulation de la mort cellulaire. Elle est indispensable pour le contrôle de la différenciation et de la maturation cellulaire. Elle est essentielle pour le développement des organes au cours de l'embryogenèse et ensuite pour l'homéostasie des tissus.

L'apoptose est classiquement opposée à la nécrose. Elle permet l'élimination d'une cellule unique sans réponse inflammatoire amplifiée (Kerr et al., 1972) par la formation de corps apoptotiques (fragments de noyau et de cytoplasme entourés de membrane plasmique) qui seront phagocytés lorsqu'ils auront été reconnus suite à l'externalisation de la phosphatidylsérine. L'ADN est fragmenté de façon régulière formant des oligonucléosomes. Au contraire, la nécrose touche un ensemble de cellules suite à une agression (ischémique, inflammatoire, infectieuse). Lors de la nécrose, la cellule gonfle et rompt sa membrane libérant des facteurs d'inflammation et des enzymes qui vont altérer les cellules voisines. La dégradation de l'ADN se fait de façon aléatoire (Bicknell and Cohen, 1995).

La séparation entre ces deux types de morts cellulaire n'est cependant pas aussi nette et il pourrait exister des altérations partageant des caractéristiques à la fois de nécrose et d'apoptose.

L'apoptose comporte schématiquement trois phases :

- Une phase d'initiation, réversible, où la cellule reçoit le stimulus d'apoptose. Les signaux inducteurs sont très divers, il peut s'agir d'un stress physique, chimique, ou de la stimulation de récepteurs de mort cellulaire. La cellule oriente sa réponse au stimulus, en fonction de son génotype et de son état physiologique, soit vers la mort par apoptose, soit vers la survie.
- Une phase d'exécution, qui n'est plus réversible, où le signal est intégré. Les voies de transduction du signal d'apoptose sont activées.
- Une phase de dégradation cellulaire, où apparaissent les modifications morphologiques induites par l'apoptose. La cellule est fragmentée en corps apoptotiques qui sont phagocytés par les cellules avoisinantes.

Les caspases (Cysteiny aspartate-specific proteinases) représentent la principale voie de transduction du signal. Ces enzymes sont présentes dans la cellule d'abord sous formes de proenzymes inactives, les procaspases (Cohen, 1997).

Les caspases s'activent entre elles entraînant une réponse en cascade. Elles inhibent les mécanismes de protection et activent les mécanismes de dégradation cellulaire (Cohen, 1997).

L'activation de l'apoptose peut se faire par des voies de signalisations distinctes, une voie extrinsèque (caspase dépendante) et une voie intrinsèque (caspases dépendante ou caspases indépendante) :

- La voie de signalisation extrinsèque est induite par l'interaction d'un signal pro-apoptotique avec un récepteur de mort cellulaire (Schulze-Osthoff et al., 1998). Ces récepteurs de la famille des TNF (Tumor Necrosis Factor) comme les récepteurs Fas ou TRAIL (Tumor-necrosis-factor Related Inducting Ligand) activent de façon irréversible la cascade des caspases.

- La voie de signalisation intrinsèque où la mitochondrie joue un rôle central d'activation et de régulation.

La perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie libère des protéines apoptogènes. Cette perméabilisation est régulée par les protéines de la famille Bcl-2 (Shimizu et al., 1999), des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 et des protéines pro-apoptotiques comme Bax. Elle provoque la libération du cytochrome c dans le cytoplasme qui s'associe avec l'Apaf-1 (Apoptotique protease activating factor-1) et la procaspase-9 pour former une structure appelée apoptosome (Twiddy et al., 2004). L'apoptosome active ensuite la caspase-3, principale enzyme effectrice du processus apoptotique.

La mitochondrie est aussi à la base de la voie caspases indépendante. L'AIF (Apoptosis Inducing Factor) et l'endonucléase G présents dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie sont libérés et vont induire la fragmentation internucléosomale de l'ADN du noyau (van Loo et al., 2002).

Différents marqueurs d'apoptose peuvent être utilisés notamment la PS, les caspases et la fragmentation d'ADN :

- La PS est un phospholipide plasmatique extériorisée sur le feuillet externe de la membrane à un stade précoce du processus apoptotique (Van den Eijnde et al., 1997) permettant une reconnaissance de la cellule pour sa phagocytose (van Engeland et al., 1998; Fadok et al., 2000).
- Les caspases, comme décrit précédemment, sont impliquées dans la transduction du message de mort cellulaire programmé (Duval et al., 2002).
- La fragmentation de l'ADN peut également être recherchée, elle est la conséquence de l'action d'une endonucléase, la CAD (caspase activated deoxyribonucléase) qui fractionne l'ADN de façon régulière en formant de multiples oligo-nucléosomes.

Chez les mammifères, l'apoptose est un élément clé de la spermatogénèse, permettant un maintien du nombre de cellules qui entrent en mitose et un rapport optimal entre les cellules germinales et les cellules de Sertoli. Elle permet d'éliminer les cellules germinales qui présentent des anomalies suite à la méiose (Blanco-Rodríguez et al., 2003). L'apoptose est aussi impliquée dans la phagocytose des corps résiduels au moment de la spermiogénèse (Tesarik et al., 2002).

La phagocytose des cellules germinales apoptotiques se fait par les cellules de Sertoli grâce à la liaison de la PS externalisée au récepteur SR-BI (récepteur de la PS présent à la surface des cellules de Sertoli) (Nakanishi and Shiratsuchi, 2004).

Le rôle de l'apoptose est reconnu au cours de la spermatogénèse, mais il est controversé en ce qui concerne les spermatozoïdes matures (Lachaud et al., 2004; Oehninger et al., 2003).

De nombreuses études ont rapporté la présence de marqueurs d'apoptose sur des spermatozoïdes matures, utilisant principalement l'annexine V et la recherche de fragmentation d'ADN (Barroso et al., 2000; Gandini et al., 2000; Muratori et al., 2000; Oosterhuis et al., 2000; Shen et al., 2002).

Cependant, le processus actif d'apoptose semble fondamentalement peu probable au sein des spermatozoïdes matures dont le noyau est extrêmement condensé et transcriptionnellement peu actif (Galeraud-Denis et al., 2007).

Pour certains auteurs, les spermatozoïdes éjaculés meurent essentiellement par nécrose, la présence de marqueurs d'apoptose pourrait être la conséquence d'un processus engagé avant l'éjaculation (Lachaud et al., 2004).

De plus, l'induction de l'apoptose des spermatozoïdes in vitro n'a jamais été démontrée.

I. 5. L'annexine V

L'annexine V est une protéine qui possède une forte affinité pour la PS. Celle-ci peut être associée à un marqueur fluorescent et ainsi être utilisée pour marquer la présence de PS à la surface de la membrane plasmatisque d'une cellule (Vermes et al., 1995).

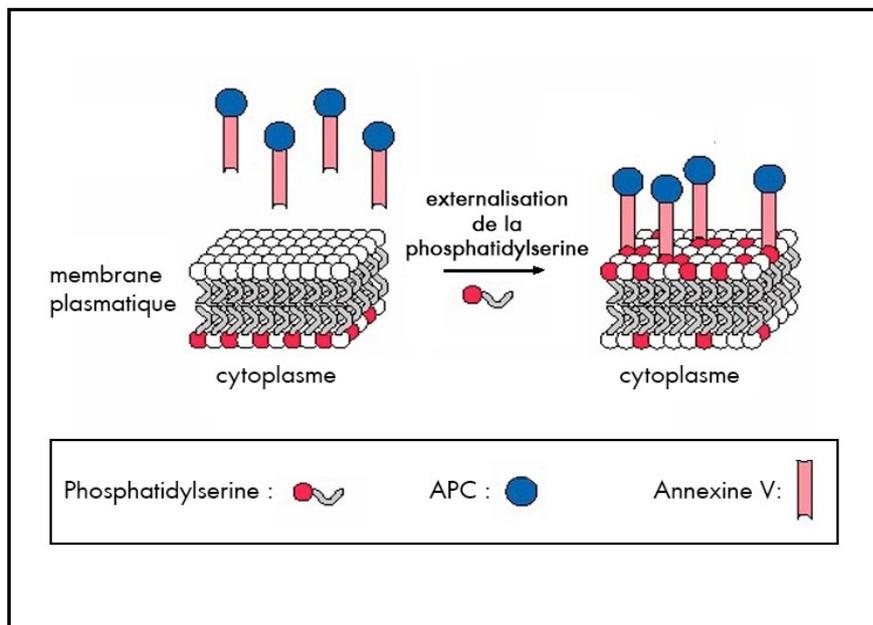


Figure 5. Schéma du marquage par l'annexine V de la phosphatidylserine externalisée (APC = Allophycocyanine) (d'après Prakken)

Dans le but d'améliorer les résultats obtenus en AMP, la sélection des spermatozoïdes est un domaine qui tend à se développer par de nouvelles techniques.

L'une des nouvelles approches pour sélectionner les spermatozoïdes est l'élimination de ceux considérés comme apoptotiques car marqués à l'annexine V, par MACS (Degheidy et al., 2015; Lukaszuk et al., 2015; Troya and Zorrilla, 2015).

Des études ont montré une augmentation de la proportion de spermatozoïdes marqués à l'annexine V chez les hommes infertiles en comparaison à des spermatozoïdes de donneurs (Barroso et al., 2000; Shen et al., 2002). Il existe une corrélation négative entre le marquage à l'annexine V et à la fois la mobilité, la vitalité et la morphologie normale des spermatozoïdes (Hoogendijk et al., 2009; Kotwicka et al., 2013; Paasch et al., 2003; Weng et al., 2002). L'utilisation du MACS aboutit à une diminution de la fragmentation d'ADN dans des spermatozoïdes de patients présentant une asthénospermie ou une tératospermie (Delbes et al., 2013).

Mais cette technique reste controversée : d'une part, l'existence d'un processus apoptotique actif concernant les spermatozoïdes matures est discutée (Lachaud et al., 2004; Oehninger et al., 2003) ; d'autre part, l'externalisation de la PS au cours de la capacitation est un phénomène reconnu (de Vries et al., 2003; Kotwicka et al., 2002). De plus, l'externalisation de la PS est restreinte dans des zones topographiques définies de la membrane plasmique des spermatozoïdes, ce qui pourrait signifier que ce phénomène a une fonction spécifique (Kotwicka et al., 2011) et les spermatozoïdes marqués à l'annexine V conservent une mobilité progressive (Kotwicka et al., 2013).

La translocation de la PS ne semble par conséquent pas liée au mécanisme d'élimination physiologique qu'est l'apoptose.

Des données contradictoires sont publiées concernant l'externalisation de la PS au cours de la capacitation : elle a été retrouvée chez le porc (Gadella and Harrison, 2002), puis chez l'homme (de Vries et al., 2003) après induction de la capacitation par du bicarbonate, sans qu'il ne soit retrouvé d'augmentation des marqueurs d'apoptose. Cependant, Muratori, en 2004, a décrit une absence d'augmentation de l'annexine V lors de la capacitation (Muratori et al., 2004).

Par ailleurs, il semblerait que l'induction de la réaction acrosomique par le calcium ionophore A23187 entraîne l'externalisation de la PS, là encore sans augmentation des marqueurs d'apoptose comme l'activation des caspases et la fragmentation d'ADN (Martin et al., 2005).

I. 6. La cytométrie en flux

L'origine de la cytométrie en flux date de 1934, Moldavan décrit alors une nouvelle méthode de numération cellulaire consistant à faire défiler les cellules dans un fin capillaire et les détecter grâce à un capteur photoélectrique (Moldavan, 1934). Dans les années 70, l'association de la fluorescence à cette technique d'analyse cellulaire a conduit à l'essor de la cytométrie en flux.

La cytométrie en flux permet une analyse multiparamétrique de cellules isolées entraînées par un flux liquide et peut étudier plusieurs centaines de cellules par seconde.

Les cellules sont individualisées en utilisant le principe de focalisation hydrodynamique. Elles sont amenées par un injecteur au centre de la chambre de flux où un liquide entraîneur dit « liquide de gaine » subit une accélération progressive entraînant l'étirement du liquide échantillon et l'alignement des cellules au centre du jet.

Une source lumineuse (laser, lampe à arc ou diode électroluminescente) frappe les cellules.

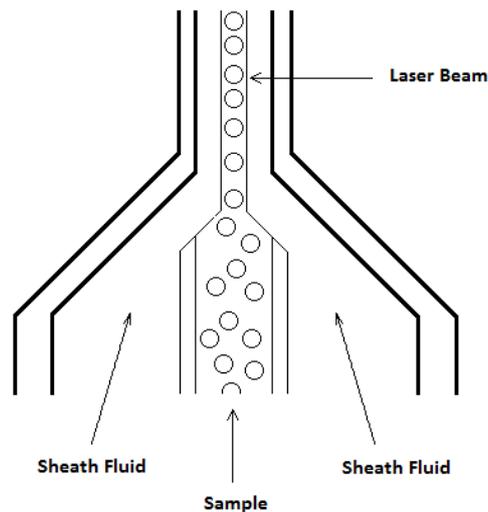


Figure 6. Schéma du principe de focalisation hydrodynamique (source : bdbiosciences.com)

La lumière émise par les cellules lorsqu'elles coupent le faisceau laser est dirigée vers des détecteurs par un ensemble de filtres et de miroirs qui composent le système optique.

Les signaux optiques recueillis sont relatifs :

- Aux propriétés optiques intrinsèques des cellules : l'excitation lumineuse du laser est diffusée par la cellule. Une partie du faisceau est déviée dans l'axe du faisceau laser avec des petits angles et donne une indication sur la taille de la cellule (Forward Scatter ou FSC). Une autre partie est déviée avec des grands angles et donne une indication sur la structure interne de la cellule (Side Scatter ou SSC).
- Aux propriétés optiques induites en utilisant des marqueurs fluorescents qui possèdent des plages d'excitation et d'émission caractéristiques.

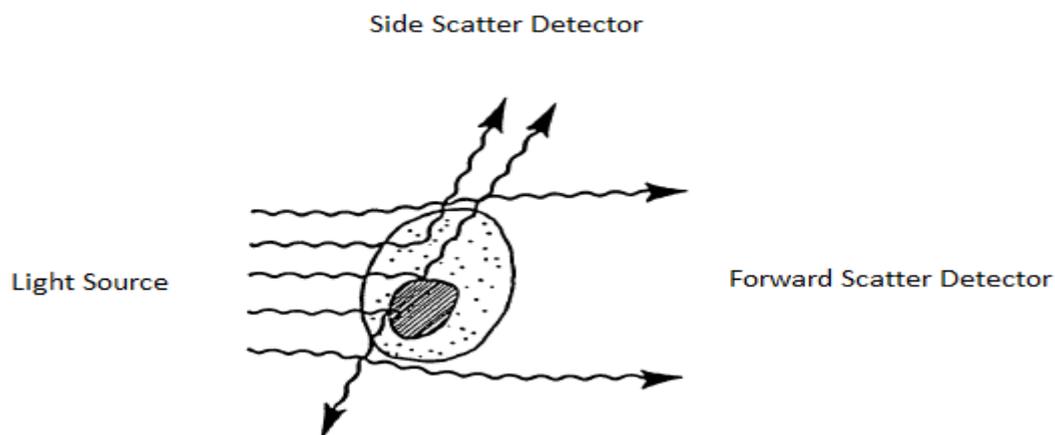


Figure 7. Schéma de la diffusion de la lumière. FSC (Forward Scatter) dépend de la taille de la cellule, SSC (Side Scatter) dépend de la granularité cellulaire (source : bdbiosciences.com)

La lumière qui traverse le système optique est convertie en un signal électrique permettant l'acquisition et l'analyse des données.

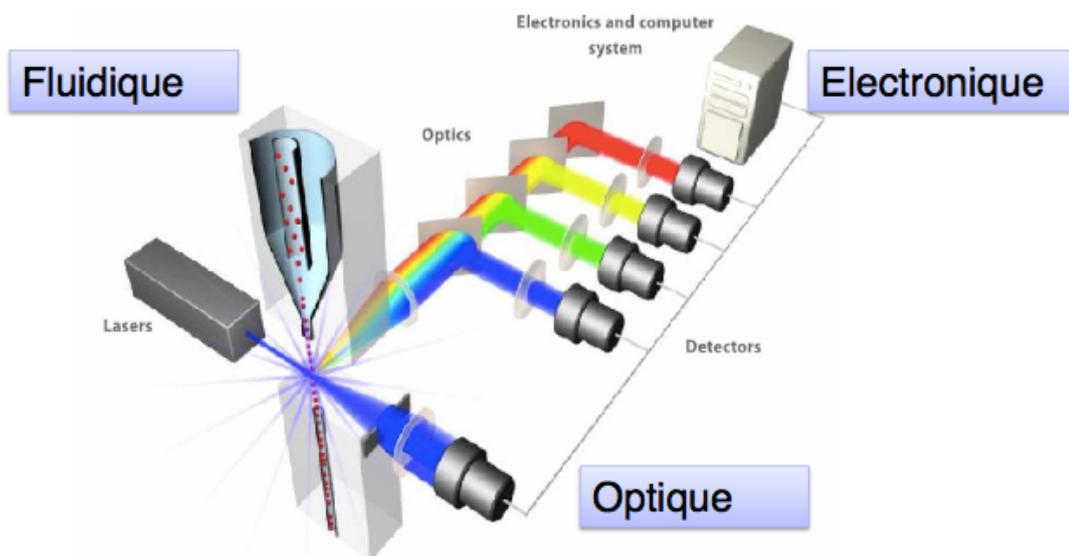


Figure 8. Schéma des trois composants d'un cytomètre en flux : un composant fluide, un composant optique et un composant électronique (source : univ-reims.fr)

II. Etude préliminaire

II. 1. Matériels et méthodes

II. 1. 1. Critères d'inclusion

Les patients sélectionnés pour l'étude étaient des hommes se présentant au laboratoire d'AMP du CHU de Bordeaux avec une prescription pour un spermogramme-spermocytogramme et ayant signé un consentement à la recherche. Les spermatozoïdes analysés provenaient du reliquat de sperme non utilisé pour la réalisation des analyses prescrites.

Le volume de l'éjaculat devait être supérieur ou égale à 3 mL.

La mobilité et la vitalité devaient être normales selon les normes OMS de 2010.

Les spermés avec plus d'un million de cellules rondes étaient exclus.

Le nombre de spermatozoïdes nécessaires pour l'ensemble des analyses réalisées pour un patient était de 12 millions. Pour un volume estimé à 0,4 mL, la concentration minimale nécessaire après sélection sur gradient était de 30 millions de spermatozoïdes par millilitre.

II. 1. 2. Préparation des spermés

Les éjaculats ont été obtenus par masturbation au laboratoire après une période d'abstinence de 2 à 7 jours. Ils ont été placés à 37°C pendant 20 min pour liquéfaction. Le volume nécessaire était utilisé pour les analyses prescrites, le volume restant était déposé sur des gradients à 3 fractions (3F). Chaque gradient était constitué de 3 fractions de 1 mL de densité différente, obtenu par dilution de PureSperm (Nidacon, Suède) dans du Fercult IVF medium (FertiPro NV, Belgique) à 90, 75 et 50%.

Après avoir déposé maximum 1 mL de sperme liquéfié sur chaque gradient, les tubes étaient centrifugés pendant 15 min à 300 g. La fraction 90% était récupérée, lavée avec du Fercult IVF, puis centrifugée à nouveau pendant 15 min à 300 g. Après élimination du surnageant, le culot était remis en suspension dans 400 µL de Fercult IVF.

La concentration après sélection sur gradient étaient évaluée sur cellule de Makler en microscopie optique, puis ajustée si besoin en ajoutant du Fercult IVF pour obtenir une concentration finale à 30 millions de spermatozoïdes par millilitre.

4 tubes à fond conique contenant 1 mL de milieu Global (LifeGlobal Group, Guilford, Etats-Unis) supplémenté en albumine (HSA) à 8% étaient préalablement équilibrés 24 h à 37°C, 5% de CO₂. 100 µL de préparation finale du sperme était ajoutés à chacun des tubes de Global + HSA (marqués avec le numéro d'identification du patient + t0, t4, t4+A23187, ou t24), placés ensuite à 37°C, 5% de CO₂ pour capacitation.

Le milieu Global + HSA 8% est le milieu utilisé en routine au CHU de Bordeaux pour la mise en contact des gamètes lors des fécondations in vitro. Ce milieu contient les éléments nécessaires à la capacitation et à la survie des spermatozoïdes, notamment de l'albumine, du bicarbonate, de glucose, du lactate et du pyruvate.

A t=0 h, le tube t0 était sorti de l'étuve et centrifugé 10 min à 1500 g. Après élimination du surnageant, le culot était remis en suspension dans 100 µL de PBS (solution tampon, phosphate buffered saline), l'ensemble des analyses pouvait alors être réalisé.

A t=3 h 30, un inducteur de la RA, le Calcium ionophore A23187 (Sigma-aldrich, Etats-Unis), était ajouté au tube t4+A23187 pour une concentration de 10 µmol/L et le tube était remis 37°C pour 30 min.

A t=4 h, les tubes t4 et t4+A23187 étaient traités comme le tube t0.

A t=24 h, le tube t24 était traité de la même manière.

II. 1. 3. Evaluation de la mobilité progressive

10 µL de la préparation finale étaient déposés sur une cellule de Makler. 200 cellules étaient étudiées au microscope optique. La mobilité progressive correspondait aux types a + b.

II. 1. 4. Evaluation de la vitalité

10 µL de la préparation finale étaient déposés sur une lame, 10 µL d'éosine (kit Vita-éosine, RAL Diagnostics, Martillac, France) étaient ajoutés. L'ensemble était homogénéisé puis recouvert d'une lamelle. 200 cellules étaient évaluées au microscope optique. Les spermatozoïdes colorés en rouge étaient considérés comme morts, ceux sans coloration, blancs, étaient considérés comme vivants.

II. 1. 5. Marquage à l'annexine V

Le kit Annexin V Apoptosis Detection APC (eBioscience, San Diego, Etats-Unis) était utilisé pour détecter la translocation de la PS du feuillet interne au feuillet externe de la membrane plasmatique des spermatozoïdes. Dans ce kit, l'annexine V est couplée à l'allophycocyanine (APC).

600.000 spermatozoïdes (20 μ L de la préparation finale) étaient ajoutés dans un tube conique contenant 100 μ L de solution tampon (fournie par le kit) avec 5 μ L d'annexine V-APC. Le tube était agité puis incubé à température ambiante, dans le noir, pendant 20 min. 500 μ L de solution tampon étaient ajoutés pour lavage. Le tube était ensuite centrifugé 10 min à 1500 g. Après élimination du surnageant, le culot était remis en suspension dans 200 μ L de solution tampon. La solution finale était transvasée dans un tube à fond rond, conservé à température ambiante, dans le noir. L'analyse au cytomètre était faite dans les 15 min.

En parallèle, un tube témoin était réalisé dans les mêmes conditions, sans ajouter l'annexine V-APC.

II. 1. 6. Double marquage annexine V et anti-CD46

Le CD46 est une protéine transmembranaire présente au sein de la membrane interne de l'acrosome, son marquage n'est possible que si la réaction acrosomique est complète (Jaiswal et al., 1999; Tao et al., 1993).

L'anticorps monoclonal anti-human CD46 PE (eBioscience, San Diego, Etats-Unis) était utilisé pour marquer les spermatozoïdes ayant subi la RA.

1 μ L d'anti-CD46 PE était ajouté au départ avec 5 μ L d'annexine V-APC dans 100 μ L de solution tampon. Le même protocole que pour l'annexine V seule était suivi, avec 600.000 spermatozoïdes évalués.

II. 1. 7. Marquage à l'inhibiteur de caspase 3 activée

Les caspases sont les enzymes impliquées dans la transduction du message de mort cellulaire programmé. D'abord synthétisées sous forme inactive, elles sont activées par clivage endo-protéique lors du processus apoptotique. Le DEVD-FMK est un inhibiteur spécifique irréversible de la caspase 3 activée capable de traverser la membrane plasmique. Couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), il constitue un marqueur spécifique du processus apoptotique (Duval et al., 2002).

Le kit CaspGLOW Fluoresceine Active Caspase-3 (eBioscience, San Diego, Etats-Unis) était utilisé pour détecter les caspases 3 activées.

600.000 spermatozoïdes étaient ajoutés dans un tube conique contenant 500 μ L de PBS avec 1 μ L de FITC-DEVD-FMK. Le tube était agité puis incubé à température ambiante, dans le noir, pendant 20 min. Les spermatozoïdes étaient ensuite lavés deux fois en ajoutant 2 mL de PBS et puis centrifugés 10 min à 1500 g. Après élimination du surnageant, le culot était remis en suspension dans 300 μ L de PBS. La solution finale était transvasée dans un tube à fond rond, conservé à température ambiante, dans le noir. L'analyse au cytomètre était faite dans les 15 min.

II. 1. 8. Marquage à l'iodure de propidium

L'iodure de propidium (IP) est un agent intercalant fluorescent. Lorsque les membranes cellulaires sont altérées, l'IP peut atteindre le noyau. Il est utilisé comme marqueur de mortalité cellulaire.

L'iodure de propidium utilisé était fourni avec le kit Annexin V Apoptosis Detection APC (eBioscience, San Diego, Etats-Unis).

Après passage au cytomètre des tubes témoin, annexine V et anti-caspase-3, 2 μ L d'IP leur étaient ajoutés. Les tubes étaient agités et incubés 10 min à température

ambiante, dans le noir. Ils étaient ensuite analysés une seconde fois par cytométrie en flux afin d'estimer la vitalité et d'obtenir les doubles marquages annexine V-APC/IP et FITC-DEVD-FMK/IP. La fluorescence de l'IP était analysée sur le canal de la Phycoerythrine (PE).

II. 1. 9. Technique TUNEL

Lors de l'apoptose, l'ADN est fragmenté par une endonucléase, la CAD (caspase activated deoxyribonucléase). Elle fractionne l'ADN de façon régulière en formant de multiples oligo-nucléosomes.

Le kit Apo-BrdU Apoptosis Detection (eBioscience, San Diego, Etats-Unis) était utilisé pour détecté les spermatozoïdes à ADN fragmenté.

La technique TUNEL (Terminal deoxynucleotide transferase dUTP Nick End Labeling) est basée sur l'incorporation, aux extrémités libres 3'hydroxyles des fragments d'ADN, d'uridine marquée par FITC à l'aide de l'enzyme Terminal Deoxynucleotidyltransferase (TdT). La perméabilisation des spermatozoïdes est nécessaire pour permettre la réaction enzymatique.

Cette technique permet d'analyser la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes (Domínguez-Fandos et al., 2007).

1,2 million de spermatozoïdes étaient fixés et perméabilisés dans de l'éthanol à 70% à -20°C pendant 30 min. Les spermatozoïdes étaient lavés avec 2 mL de Wash buffer (fourni par le kit), centrifugés 10 min à 3000 g. Après élimination du surnageant et assèchement du culot, 50 µL de DNA labeling solution (contenant l'uridine et la Tdt) étaient ajoutés. Le tube était incubé 1 h à 37°C et agité toutes les 15 min pour permettre la réaction enzymatique.

Après lavage, centrifugation (10 min à 3000 g), élimination du surnageant, 100 µL d'Antibody solution (anticorps anti-uridine couplé au FITC) étaient ajoutés.

Pour chaque patient, un contrôle négatif était réalisé en omettant l'Antibody solution.

Les tubes étaient incubés 30 min, à température ambiante, dans le noir. 500 µL de Propidium Iodide/RNase solution étaient ajoutés. La solution finale était transvasée dans un tube à fond rond, conservé pendant 30 min à température ambiante, dans le noir. L'analyse au cytomètre était ensuite réalisée dans les 15 min.

La qualité du marquage était contrôlée par deux lots de cellules témoins fournies dans le kit, un témoin négatif et un témoin positif. Ces cellules étaient issues d'une lignée cellulaire de lymphome humain. Le protocole était le même et il était réalisé en même temps, dans les mêmes conditions.

II. 1. 10. Analyse par cytométrie en flux

L'acquisition des tubes a été faite sur un cytomètre analyseur BD FACSCanto (BD Biosciences, San Jose, Etats-Unis) du service commun de cytométrie en flux de la SFR TransBioMed (Structure Fédérative de Recherche « Biologie fondamentale et appliquée à la médecine ») de l'Université Bordeaux Segalen. L'analyse des données était réalisée grâce au logiciel FACSDiva Software.



Figure 9. Cytomètre BD FACSCANTO et software FACSDiva (source : bdbiosciences.com)

Les fluorochromes étaient excités avec un laser de longueur d'onde à 488 nm pour le FITC et le PE et 633 nm pour l'APC. La fluorescence du FITC était détectée à travers un filtre de 530/30 nm, celle du PE à travers un filtre de 585/42 nm et celle de l'APC à travers un filtre de 660/20 nm.

Les spermatozoïdes étaient repérés sur le cytogramme FSC/SSC (taille/structure) par leur répartition caractéristique en forme de flammèche (Muratori et al., 2000, 2003). 10.000 spermatozoïdes étaient analysés pour chaque marquage et comparés avec le témoin négatif passé en premier lieu.

II. 1. 11. Marquage à la Chlortetracycline

La chlortetracycline (CTC) est un antibiotique naturellement fluorescent qui, lorsqu'il se complexe à un cation divalent, émet une fluorescence nettement augmentée.

Sur la tête du spermatozoïde les charges ioniques sont réparties de façon hétérogène et leur répartition est modifiée lors de la capacitation et de la réaction acrosomique. La CTC se lie au calcium et se fixe aux protéines de la membrane plasmique du spermatozoïde. Elle émet une forte fluorescence dont la répartition topographique varie selon que le spermatozoïde est non capacité avec un acrosome intact, capacité ou acrosome réagi (DasGupta et al., 1993).

Le protocole utilisé était une adaptation de celui décrit par les auteurs ayant élaboré la technique chez l'homme (DasGupta et al., 1993) et avant chez la souris (Ward and Storey, 1984).

La Chlortetracycline (Sigma-aldrich, Saint Louis, Etats-Unis) était ajoutée à la solution de base le jour du marquage des spermatozoïdes pour une concentration de 750 $\mu\text{mol/L}$. La solution de base était composée de 130 mmol/L de NaCl, de 5 mmol/L de cystéine et de 20 mmol/L de Tris-HCl, elle était gardée à 4°C à l'abri de la lumière.

600.000 spermatozoïdes étaient ajoutés à 50 μL de la solution de CTC et agités. 4 μL de PFA à 12,5 % étaient ensuite ajoutés.

La solution était agitée puis 10 μL étaient déposés sur une lame avec une goutte de DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane) (Sigma-aldrich, Saint Louis, Etats-Unis) pour retarder l'extinction de la fluorescence. Le tout était homogénéisé et recouvert d'une lamelle sur laquelle était exercée une forte pression pour évacuer l'excès de liquide et essayer de placer les spermatozoïdes dans le même plan. La lamelle était alors luttée pour éviter l'évaporation.

Les lames étaient stockées à 4°C dans le noir, en attendant la lecture. Elles étaient lues au maximum 48 h après leur réalisation.

II. 1. 12. Analyse par microscopie à fluorescence

Le marquage par CTC était analysé grâce au microscope à épi-fluorescence Axio Imager 2 (Zeiss, Jena, Allemagne) de l'Institut des maladies neurodégénératives de l'Université Bordeaux Segalen.



Figure 10. Microscope Axio Imager 2 (source : zeiss.com)

Les spermatozoïdes étaient d'abord repérés en contraste de phase, puis la visualisation de la fluorescence était faite par Alexa Fluor 488, au grossissement x63 sous huile. Une caméra permettait l'acquisition d'images.

II. 1. 13. Description du protocole

Pour cinq patients, l'ensemble des analyses suivantes ont été réalisées (après incubation des spermatozoïdes dans le milieu Global + HSA) à temps = 0h, temps = 4h et temps = 24h :

Mobilité progressive, Vitalité, Annexine V, Anti-CD46, Inhibiteur de la caspase 3 activée, Iodure de propidium, et Chlortetracycline.

A temps = 3h30 le calcium ionophore A23187 était ajouté aux spermatozoïdes.

A temps = 4h, les mêmes analyses ont été réalisées sur des spermatozoïdes du même patient ayant été exposés au calcium ionophore pendant 30min.

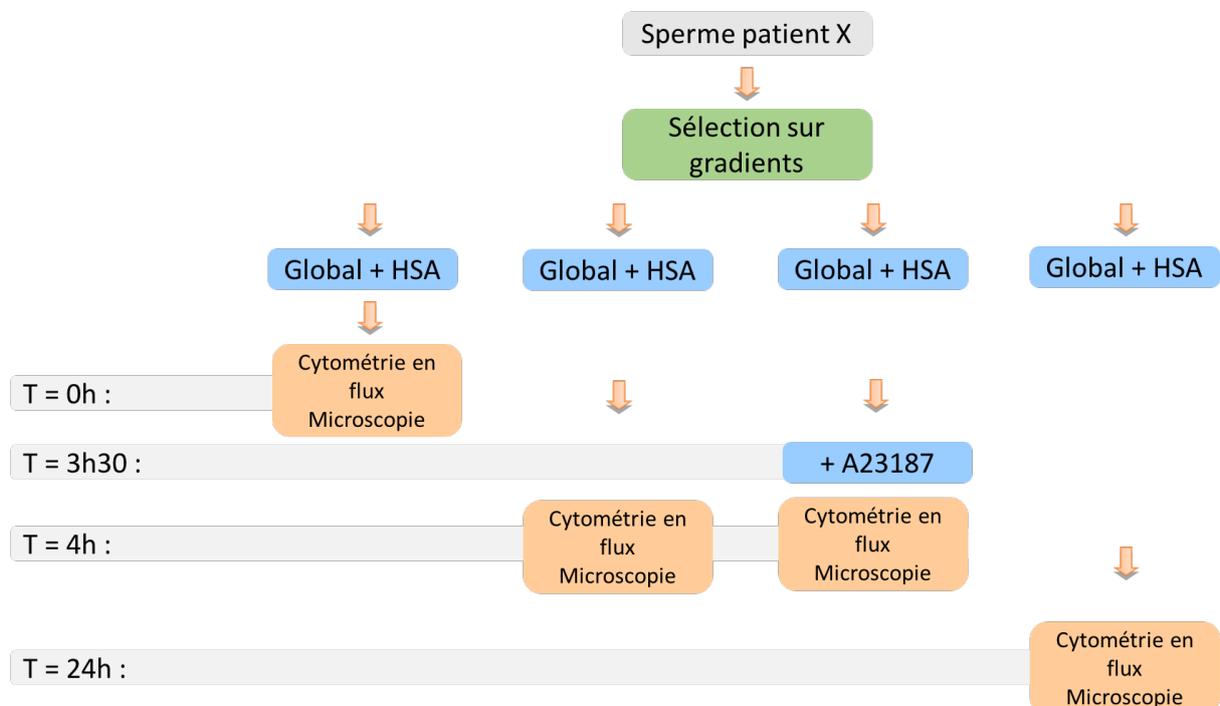


Figure 11. Schéma descriptif du protocole de l'étude

En complément du marquage de la caspase 3 activée, la fragmentation d'ADN des spermatozoïdes a été étudiée chez deux patients pour explorer un éventuel processus apoptotique.

L'analyse par technique TUNEL a été réalisée à temps = 4h, en comparant les spermatozoïdes exposés ou non au calcium ionophore A23187 pendant 30min. Le marquage à l'annexine V était fait en parallèle dans les mêmes conditions.

II. 2. Résultats

Il s'agit d'une étude préliminaire ayant permis la mise en place et l'ajustement des différentes techniques. Les premiers résultats sont encourageants et laissent apparaître des tendances nettes. Ils sont présentés en intégralité (en pourcentage de spermatozoïdes) dans le tableau en annexe 1. Les résultats sont détaillés pour chaque patient et exprimés en moyenne +/- écart type pour chaque temps.

Le double marquage annexine V / IP à 4 h pour le patient 4 n'a pas pu être exploité. En effet, les spermatozoïdes n'ont pas été retrouvés lors du passage au cytomètre, le culot ayant probablement été aspiré lors du lavage et de l'élimination du surnageant. Dans cette étude préliminaire, l'effectif était limité, il ne permettait pas une puissance suffisante pour une analyse statistique, les résultats ont donc été interprétés de manière descriptive.

II. 2. 1. Vérification de la capacitation et de la réaction acrosomique par test de fluorescence à la Chlortetracycline

Après coloration à la CTC, trois catégories de spermatozoïdes ont été distinguées en fonction de leur différence de répartition de la fluorescence sur la tête. Les distinctions observées étaient les mêmes que celles déjà décrites chez l'homme (DasGupta et al., 1993) et chez la souris (Ward and Storey, 1984).

La même classification a donc été utilisée en distinguant trois formes :

- « F » : spermatozoïdes non capités avec acrosome intact, une fluorescence uniforme recouvre toute la tête.
- « B » : spermatozoïdes capités avec toujours l'acrosome intact, la région acrosomale est fluorescente alors que la région post-acrosomale est terne.
- « AR » : spermatozoïdes ayant effectué leur réaction acrosomique, toute la tête est terne sans fluorescence.

Pour tous les spermatozoïdes, une fluorescence de la pièce intermédiaire était observée.

Des acquisitions d'images typiques sont présentés sur la figure 12.

Le pourcentage des différentes formes était établi à partir d'un compte de 100 cellules pour chaque lame.

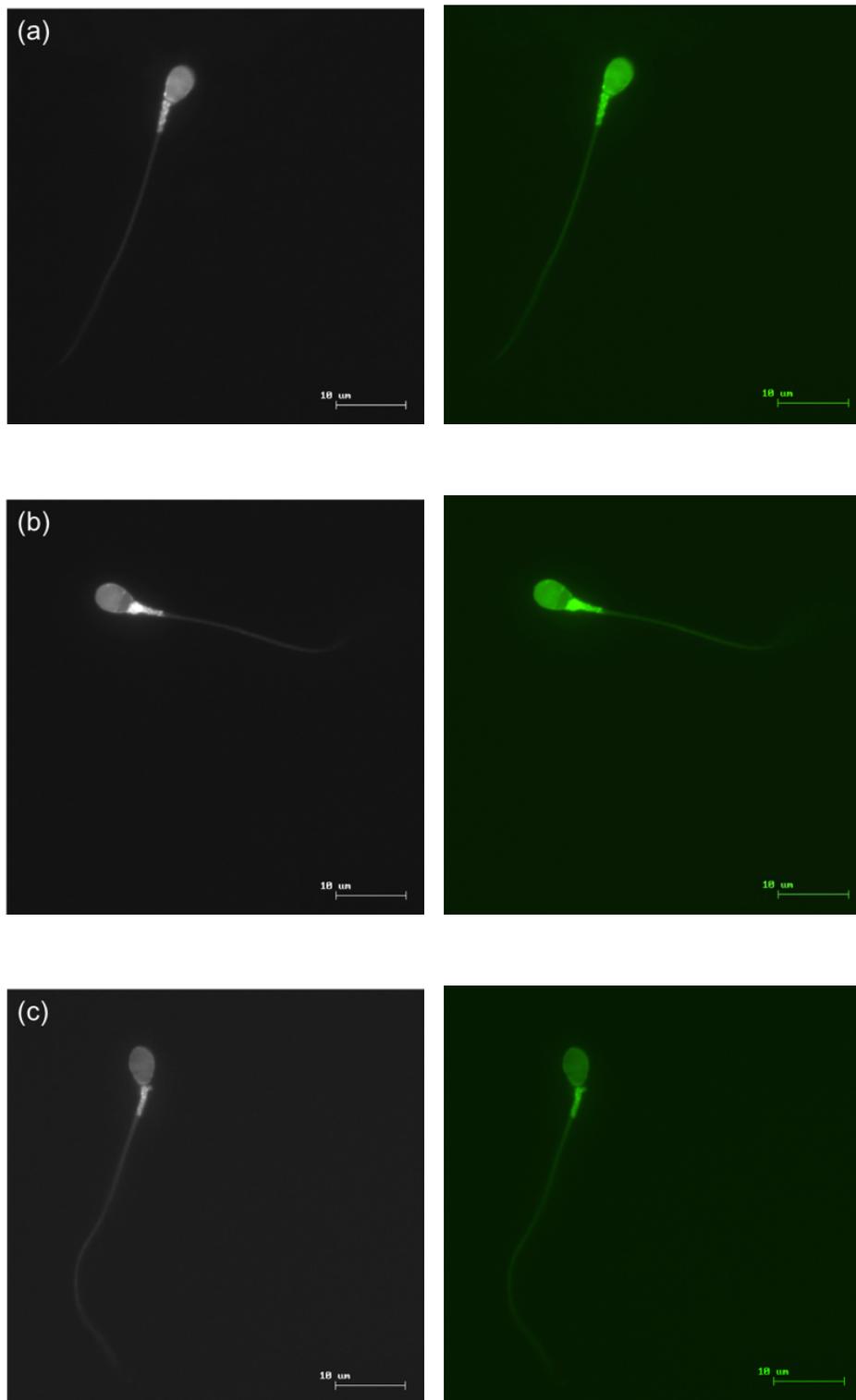


Figure 12. Trois types de fluorescence des spermatozoïdes marquées par la CTC :
a) forme « F », non capacité ; b) forme « B », capacité ; c) forme « AR », acrosome réagi

L'état des spermatozoïdes était évalué par la CTC après sélection sur gradients de densité et incubation dans du milieu global + HSA.

Dès le départ, à temps = 0h, la majorité était de type B avec une moyenne de 56,6 +/- 11,8%. Plus de la moitié des spermatozoïdes semblaient donc déjà capités. 42 +/- 12,6% étaient de type F, non capités et 1,4 +/- 1,1 étaient de type AR, acrosome réagi.

Au cours de l'incubation, la proportion de types F a diminuée, au profit d'une augmentation de types B et dans une faible mesure de type AR (figure 13). Le pourcentage de spermatozoïdes capités a donc augmenté, passant de 56,6 +/- 11,8% à 0h, à 72 +/- 7% à 4h puis à 80 +/- 3,4% à 24h.

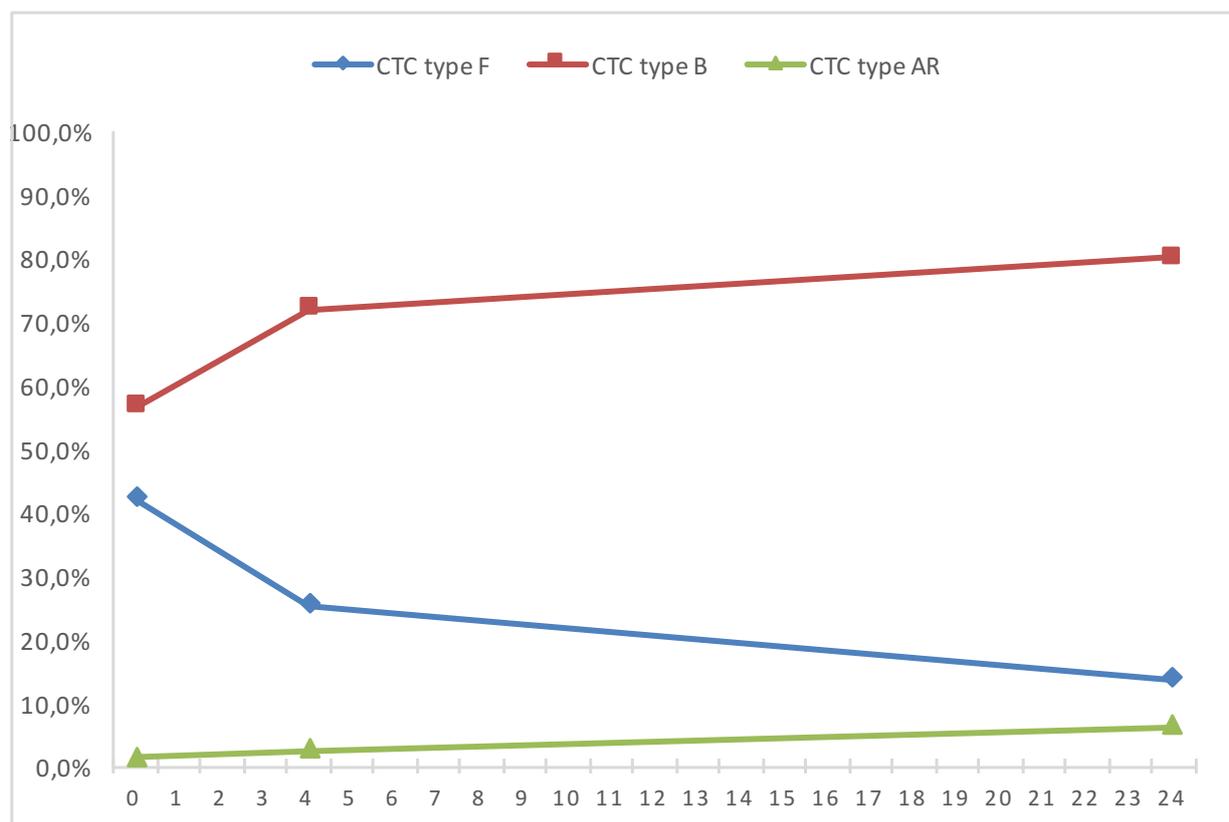


Figure 13. Marquage des spermatozoïdes par la CTC après incubation dans le milieu global + HSA avec le temps (en heures) en abscisse et le pourcentage de spermatozoïdes en ordonné

A temps = 4h, la proportion des différents types de marquage à la CTC a également été comparée entre deux groupes de spermatozoïdes ayant subi ou non une induction de la réaction acrosomique par le calcium ionophore A23187, pour chaque patient (figure 14).

Le contact avec le calcium ionophore a induit une nette augmentation des spermatozoïdes de type AR, 57 +/- 20,2% contre 2,6 +/- 1,1% sans calcium ionophore. Le pourcentage de forme B a, lui, diminué (72% contre 27,8% respectivement).

La coloration à la CTC a mis en évidence l'induction de la réaction acrosomique par le calcium ionophore A23187.

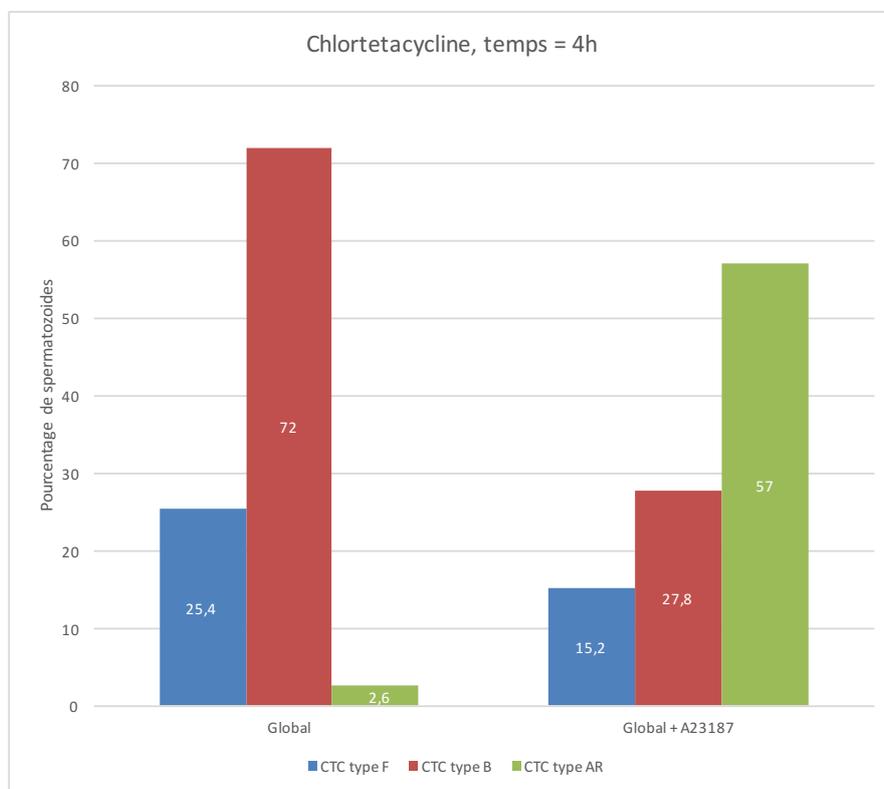


Figure 14 : Comparaison du marquage, après 4h d'incubation dans le global + HSA, par la CTC en fonction de l'induction ou non de la réaction acrosomique par le calcium ionophore

II. 2. 2. Externalisation de la PS au cours de la capacitation

L'externalisation de la PS était visualisée en cytométrie en flux par le marquage des spermatozoïdes à l'annexine V couplée à l'APC.

Pour évaluer si elle était associée au processus de capacitation, les spermatozoïdes sélectionnés sur gradients étaient incubés dans du milieu global + HSA à 37°C, 5% de CO₂ puis marqués par l'annexine V à 0h, 4h et 24h.

En plus de l'annexine V, un autre marqueur fluorescent était ajouté pour réaliser des doubles marquages :

- L'iodure de propidium était utilisé pour distinguer les vivants et les morts.
- L'anti-CD46 était utilisé pour visualiser les spermatozoïdes ayant subi la réaction acrosomique.

Un premier cytogramme permettait de sélectionner la population de spermatozoïdes à étudier en excluant les débris. En fonction de leur taille (SSC) et de leur granularité (FSC) les spermatozoïdes étaient repérés en entourant leur zone de répartition caractéristique en forme de flammèche (figure 15).

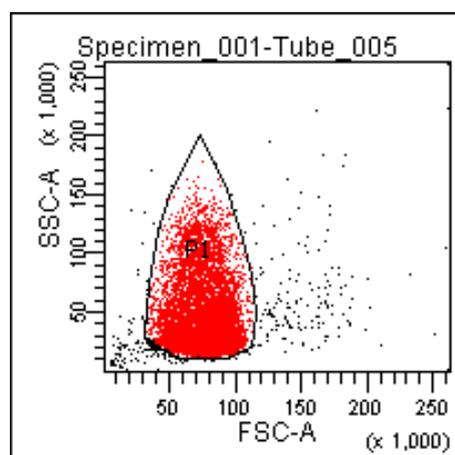


Figure 15. Cytogramme caractéristique SSC/FSC (SSC = taille, FSC = granularité), P1 représente la population des spermatozoïdes répartie en forme de flammèche

Un tube contenant des spermatozoïdes seuls, sans aucun marquage était ensuite passé au cytomètre. Ce témoin négatif permettait de définir les bornes de positivité (figure 16).

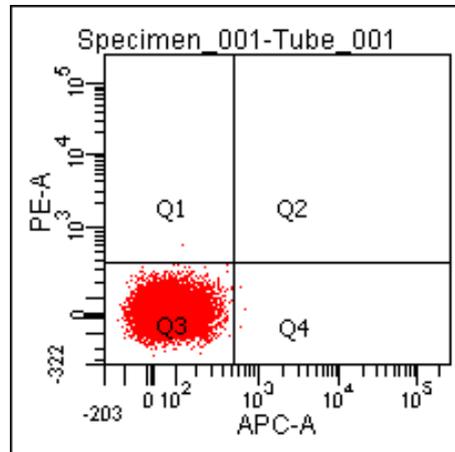


Figure 16. Cytogramme caractéristique du témoin négatif

(spermatozoïdes sans annexine V - APC, ni IP, ni anti-CD46) avec détection en abscisse de la fluorescence correspondant à la longueur d'onde de l'APC et de la fluorescence correspondant à la longueur d'onde du PE en ordonnée.

Les bornes sont déplacées de manière à ce que le quadrant Q3 contienne l'ensemble des points. Q3 correspond à l'absence de fluorescence : PAC négatif et PE négatif.

Le pourcentage de spermatozoïdes contenu dans chacun des quadrants était obtenu grâce au logiciel FACSDiva Software (figure 17).

Tube: Tube_001		
Population	#Events	%Parent
■ All Events	10,000	####
■ P1	9,475	94.8
☒ Q1	1	0.0
☒ Q2	0	0.0
☒ Q3	9,471	100.0
☒ Q4	3	0.0

Figure 17. Analyse des données par le software FACSDiva

Les doubles marquages des spermatozoïdes pouvaient alors être analysés
 Les cytogrammes caractéristiques du double marquage annexine V / IP et du double marquage annexine V / anti-CD46 sont présentés dans la figure 18.

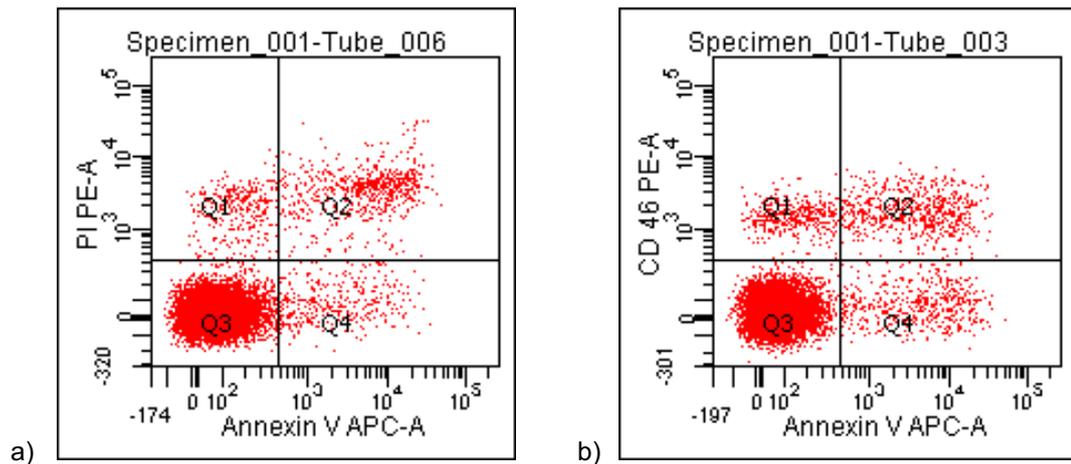


Figure 18. Cytogrammes caractéristiques :

a) Double marquage annexine V / IP,

- Q1 = spermatozoïdes morts sans exposition de PS
- Q2 = spermatozoïdes morts avec exposition de PS
- Q3 = spermatozoïdes vivants sans exposition de PS
- Q4 = spermatozoïdes vivants avec exposition de PS

b) Double marquage annexine V / anti-CD46,

- Q1 = spermatozoïdes sans exposition de PS ayant subi leur réaction acrosomique
- Q2 = spermatozoïdes avec exposition de PS ayant subi leur réaction acrosomique
- Q3 = spermatozoïdes sans exposition de PS sans réaction acrosomique
- Q4 = spermatozoïdes avec exposition de PS sans réaction acrosomique

Le pourcentage de spermatozoïdes vivants exposant la PS n'a pas augmenté entre 0h, 4h et 24h pour aucun des patients testés (figure 19). La moyenne pour ces patients passant respectivement de 4,9 +/- 2%, à 3,1 +/- 1% puis à 4,9 +/- 2% (annexe 1).

Dans le même temps, la mobilité progressive diminuait (90,8 +/- 4%, puis 77,6 +/- 7,3% et 69 +/- 9,7% respectivement), accompagnée d'une légère augmentation de la mortalité évaluée à la fois par l'IP (8,6 +/- 2,1%, puis 11,6 +/- 6,7% et 15,1 +/- 4,3%) et par le test à l'éosine.

Le marquage à l'anti-CD46 montrait une légère augmentation des spermatozoïdes ayant subi la réaction acrosomique à 24h (2,7 +/- 0,8, puis 2,5 +/- 0,7 et 9,2 +/- 3,2 respectivement). Les spermatozoïdes marqués à l'annexine V était majoritairement non marqués à l'anti-CD46.

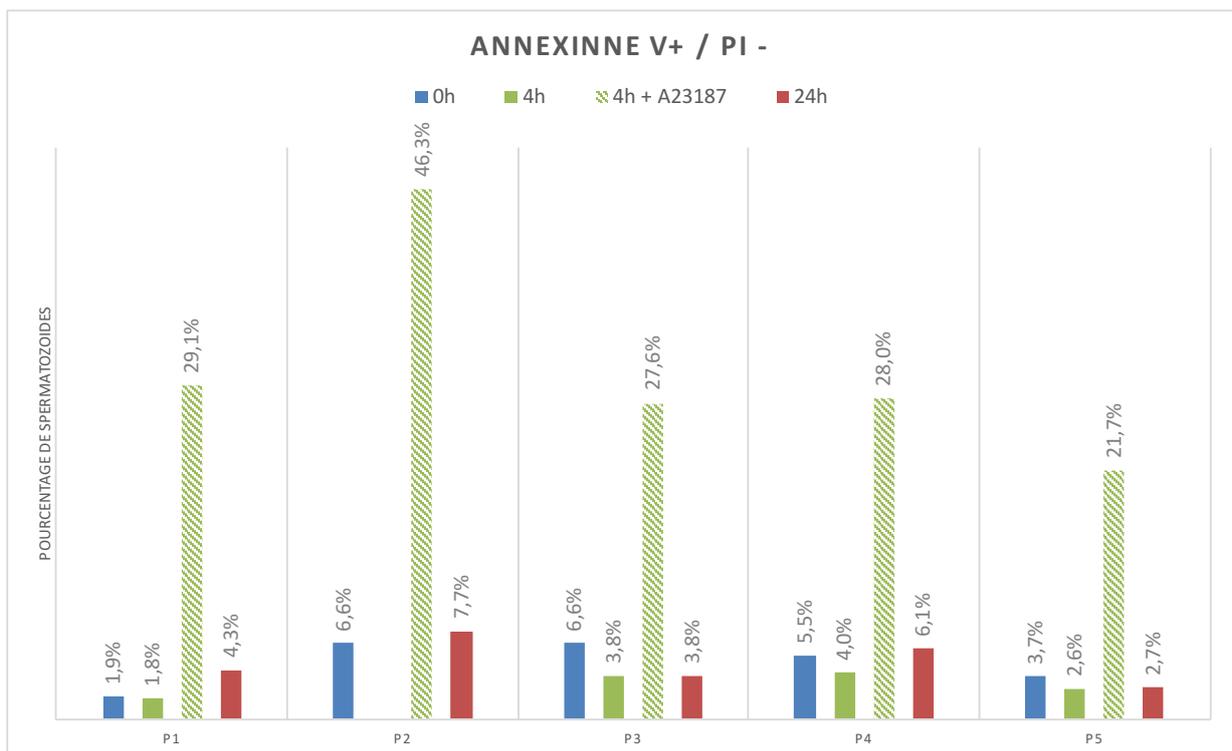


Figure 19. Pourcentage de spermatozoïdes vivants (iodure de propidium -) avec externalisation de la PS (annexine V +) à 0h, 4h avec et sans induction de la RA, et 24h, pour chaque patient (P1, P2, P3, P4 et P5)

II. 2. 3. Externalisation de la PS au cours de l'induction de la réaction acrosomique

Après 4h dans des conditions capacitantes, seul 3,1 +/- 1% des spermatozoïdes exposaient leur PS en restant vivants. Mais si leur réaction acrosomique était induite par 30min de contact avec le calcium ionophore A23187, cette proportion augmentait largement et passait à 30,5 +/- 9,3% en moyenne. Cette augmentation était marquante chez tous les patients testés (figure 19).

Cette augmentation de l'externalisation de la PS était accompagnée d'une augmentation majeure du marquage à l'anti-CD46 (38,4 +/- 5,4% contre 2,5 +/- 0,7%) mais aussi d'une large augmentation de la mortalité, visualisée par le marquage à l'IP (40,7 +/- 6,5% contre 11,6 +/- 6,7%) et confirmée par le test à l'éosine et la baisse importante de la mobilité progressive.

II. 2. 4. Evaluation des marqueurs d'apoptose au cours de la capacitation et de l'induction de la réaction acrosomique

Pour évaluer si l'externalisation de la PS était liée à un processus apoptotique, un marquage des caspases 3 activées était réalisé en même temps que le marquage à l'annexine V.

Une fluorescence non spécifique gênait en partie l'interprétation en décalant le nuage de point sur la droite, mais, malgré cela, deux populations de spermatozoïdes clairement distinctes pouvaient être individualisés : spermatozoïdes sans caspase 3 activée et spermatozoïdes avec caspase 3 activée dont la fluorescence était distinctement plus importante.

Un cytogramme caractéristique du marquage au FITC-DEVD-FMK est présenté dans la figure 20.

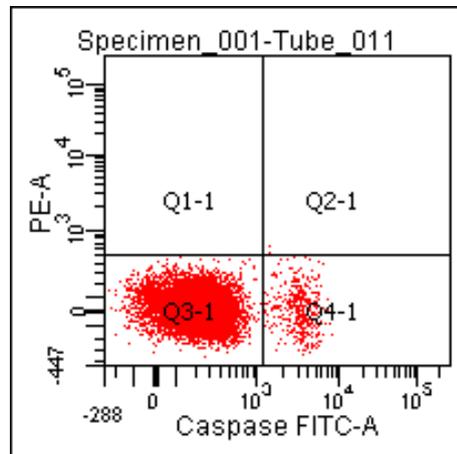


Figure 20. Cytogramme caractéristique du marquage par FITC-DEVD-FMK

Q3-1 = spermatozoïdes sans caspases 3 activées

Q4-1 = spermatozoïdes avec caspases 3 activées

Il n'a pas été remarqué d'augmentation du marquage au cours de l'incubation dans le milieu global + HSA (figure 21).

Mais le pourcentage de spermatozoïdes vivants marqués au FITC-DEVD-FMK a augmenté lorsqu'ils étaient mis en contact avec le calcium ionophore A23187 (3,8 +/- 1,7% contre 1,0 +/- 0,4%).

En grande majorité, les spermatozoïdes marqués au FITC-DEVD-FMK étaient des spermatozoïdes morts.

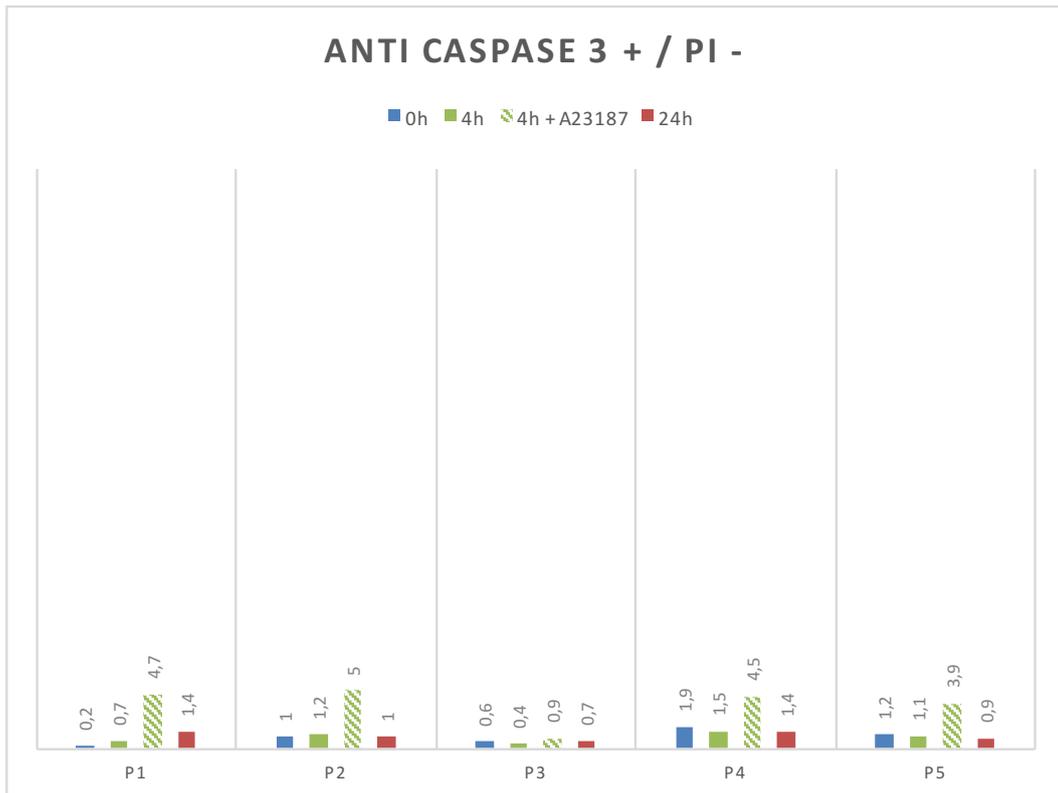


Figure 21. Pourcentage de spermatozoïdes vivants (iodure de propidium -) avec présence de caspase 3 activée à 0h, 4h avec et sans induction de la RA, et 24h, pour chaque patient (P1, P2, P3, P4 et P5)

Pour vérifier cette observation, la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes a été étudiée par la technique TUNEL avec et sans induction de la réaction acrosomique.

Après 4h d'incubation, des spermatozoïdes en contact avec du milieu global + HSA seul étaient comparés à d'autres du même patient ayant été exposés au calcium ionophore A23187 pendant les 30 dernières minutes. La fragmentation de l'ADN était analysée en parallèle du marquage à l'annexine V.

Une franche augmentation de l'annexine V était à nouveau observée lorsque la réaction acrosomique avait été induite (44,3% contre 3,6% sans calcium ionophore).

L'analyse en cytométrie en flux était réalisée en sélectionnant d'abord la population cellulaire totale (P1) sur le cytogramme FSC/SSC (figure 22).

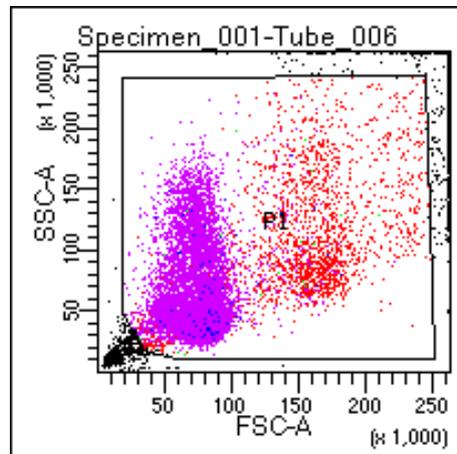


Figure 22. Cytogramme caractéristique de selection cellulaire pour technique TUNEL
P1 représente la population cellulaire totale sélectionnée

Puis, un second cytogramme analysait le marquage des noyaux par l'IP avec la largeur du signal de fluorescence en abscisse et l'aire du signal en ordonné (figure 23). Celui-ci permettait de sélectionner la sous-population de cellules non agrégées (P2).

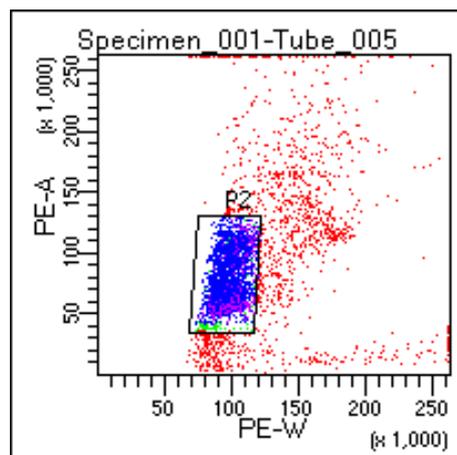


Figure 23. Cytogramme caractéristique de selection des spermatozoides non agrégés
PE-W est la largeur du signal de fluorescence, PE-A est l'aire sous la courbe
P2 représente la population de cellules non agrégées

P2 était ensuite étudiée sur un troisième cytogramme avec le marquage des noyaux par l'IP en abscisse et le marquage de la fragmentation par le FITC en ordonné. Il était alors possible de distinguer la population de cellules sans fragmentation (P3) et la population de cellules à ADN fragmenté (P4).

La qualité du marquage avait été vérifiée grâce aux cellules témoins fournies par le kit : le témoin négatif ne montrait pas de fragmentation d'ADN (0,1%), le témoin positif montrait 24,1% de cellules à ADN fragmenté (figure 24).

L'analyse par TUNEL réalisée sur les spermatozoïdes a montré une très faible proportion de spermatozoïdes avec ADN fragmenté et n'a mis en évidence aucune différence selon que la réaction acrosomique était induite ou non. Les cytogrammes sont présentés dans la figure 25, les résultats dans le tableau 1.

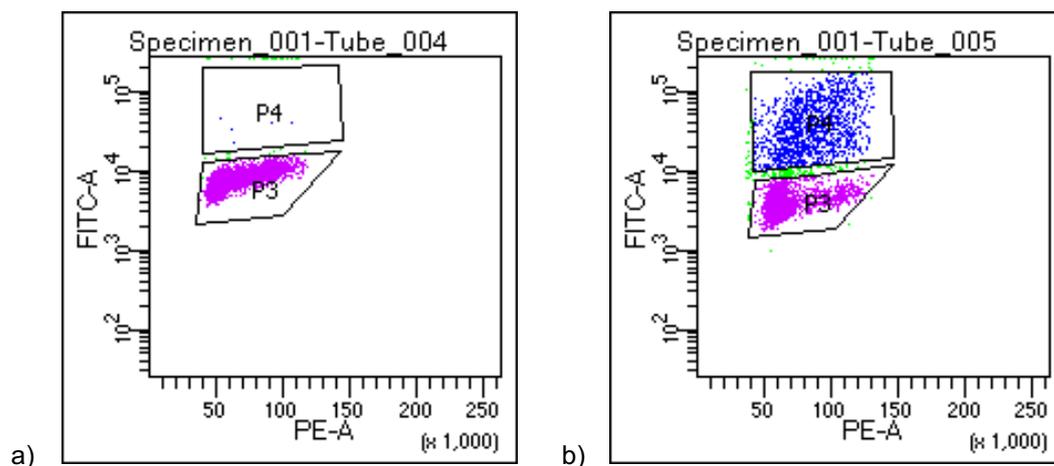


Figure 24. Cytogrammes caractéristiques des cellules témoins pour la technique TUNEL :

a) témoin négatif

b) témoin positif

P3 = cellules sans ADN fragmenté

P4 = cellules avec fragmentation de l'ADN

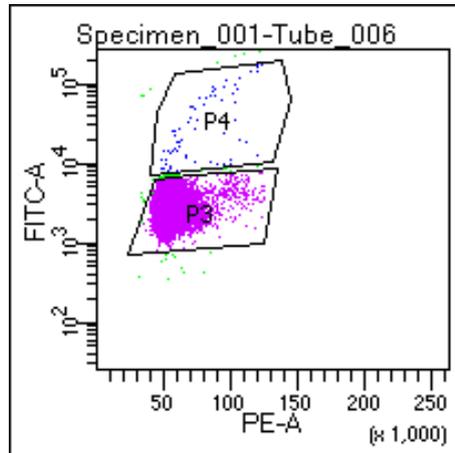


Figure 25. Cytogramme caractéristique de la fragmentation d'ADN par TUNEL
P3 = spermatozoïdes sans ADN fragmenté
P4 = spermatozoïdes avec fragmentation de l'ADN

	t4h sans FITC	t4h	t4h + A23187
P1	0,7%	0,5%	0,7%
P2	1,4%	1,9%	1,5%

Tableau 1. Pourcentage de spermatozoïdes à ADN fragmenté chez deux patients (P1 et P2) après 4h d'incubation, avec ou sans induction de la RA et témoin négatif sans FITC

II. 3. Discussion

Pour qu'un spermatozoïde puisse féconder un ovocyte, il faut qu'il soit vivant, capable, et capable de réaliser sa réaction acrosomique. Ces phénomènes nécessitent une modification de la structure de la membrane plasmique.

La translocation de la PS du feuillet interne au feuillet externe est l'un des changements de conformation observés et étudiés notamment grâce au marquage par l'annexine V.

L'utilisation de l'annexine V comme marqueur d'apoptose a été extrapolée aux spermatozoïdes pour sélectionner par tri en cytométrie en flux (MACS) les spermatozoïdes non apoptotiques. Ce principe est controversé (Lachaud et al., 2004; Oehninger et al., 2003; Aleraud-Denis et al., 2007; Mahfouz et al., 2010).

Cette étude préliminaire montre que l'induction de la réaction acrosomique par le calcium ionophore A23187 entraîne une augmentation importante de la translocation de la PS. Celle-ci ne peut pas être reliée uniquement à l'apoptose.

Une augmentation du marquage à l'annexine V au cours de la capacitation a été retrouvée chez le porc (Gadella and Harrison, 2002), puis chez l'homme (de Vries et al., 2003). Dans ces deux études la capacitation était induite par une concentration importante de bicarbonate (15 mmol/L). Mais il a ensuite été montré le contraire chez l'homme (Muratori et al., 2004). Cette contradiction pourrait être expliquée par la différence de milieux utilisés pour l'incubation des spermatozoïdes et notamment par la présence ou l'absence d'une supplémentation en bicarbonate.

Dans cette étude le milieu utilisé était le global supplémenté en HSA. Ce milieu est reconnu pour induire la capacitation et est utilisé en AMP pour la fécondation in vitro. Les ovocytes et les spermatozoïdes sont incubés dans le global + HSA, la capacitation est alors indispensable pour la réaction acrosomique et la fécondation.

Il n'a pas été observé d'augmentation du marquage à l'annexine V dans ces conditions, ni après 4h ni après 24h d'incubation.

Lors de la mise en place des techniques, des tests ont été réalisés en augmentant la concentration d'albumine et la concentration de bicarbonate en supplémentant le milieu global, sans qu'il ne soit observé d'augmentation du marquage à l'annexine V (les résultats ne sont pas présentés). Il pourrait être envisager lors de la poursuite de cette étude d'examiner à nouveau l'évolution de l'annexine V au cours de la capacitation en changeant le milieu d'incubation. Il serait intéressant notamment de tester une supplémentation en calcium, élément également important pour l'activation de la scramblase.

S'il est finalement retrouvé une augmentation de l'externalisation de la PS lors de la capacitation, il faudrait essayer de remettre les spermatozoïdes capacités dans des conditions décapacitantes, en les replaçant dans du liquide séminal par exemple. La capacitation étant un phénomène réversible (Bedu-Addo et al., 2005), on pourrait s'attendre à une diminution secondaire du marquage à l'annexine V.

Il apparaît par contre clairement dans cette étude préliminaire une augmentation du marquage à l'annexine V après induction de la RA par le calcium ionophore A23187. Cette observation est en accord avec les données existantes de la littérature (Martin et al., 2005) et mérite d'être confirmée sur un plus large effectif.

Après induction de la RA, une partie des spermatozoïdes ayant fait leur RA, ceux marqués par l'anti-CD46, sont marqués par l'annexine V (34,7% en moyenne).

Mais on retrouve également, dans une proportion presque équivalente (29,9% en moyenne) des spermatozoïdes marqués par l'annexine V mais pas par l'anti-CD46, c'est à dire qu'ils n'ont pas encore fait leur réaction acrosomique.

Ceci pourrait être en faveur d'une translocation de la PS se déroulant avant que la RA ne soit réalisée. La PS s'externaliserait à la fin du processus de capacitation juste avant l'achèvement de la RA, ces deux phénomènes étant fortement intriqués.

La séquence après induction par le calcium ionophore pourrait être : capacitation - externalisation de la PS – RA -mort cellulaire en l'absence de fusion avec un ovocyte (sans limites clairement définies entre ces phénomènes).

Il serait intéressant de réaliser les mêmes marquages avec différents temps d'incubation avec le calcium ionophore.

On peut alors penser que la PS pourrait jouer un rôle dans l'interaction spermatozoïde-ovocyte. D'autant plus que l'externalisation de la PS se fait dans des régions délimitées de la tête du spermatozoïde, ce qui pourrait signifier que ce phénomène a une fonction spécifique (Kotwicka et al., 2011). Il pourrait être intéressant de rechercher des récepteurs spécifiques de la PS sur l'ovocyte, comme le phosphatidylserine receptor (PSR) décrit dans l'interaction entre PS et phagocyte (Moreira and Barcinski, 2004) ou le class B scavenger receptor type 1 (SR-BI) responsable de l'interaction entre les cellules de Sertoli et la PS externalisée par les cellules germinales en apoptose (Kawasaki et al., 2002).

Une autre hypothèse pourrait être que l'externalisation de la PS sert à l'interaction spermatozoïde - épithélium tubaire au niveau du réservoir isthmique. En effet il a été retrouvé la présence d'annexine V au sein de l'épithélium tubaire de bovins (Igotz et al., 2007). Cette interaction pourrait permettre de retenir les spermatozoïdes qui ont démarré leur réaction acrosomique prématurément.

L'induction de la RA par le calcium ionophore A23187 a eu pour conséquence une augmentation massive de la mortalité. Cette réaction avait déjà été observée (Martin et al., 2005).

La mortalité des spermatozoïdes était évaluée par deux techniques : le test à l'éosine et le marquage du noyau par l'iodure de propidium.

Le pourcentage de mortalité évalué avec l'éosine était systématiquement plus important que celui évalué par l'IP. Cette observation peut être expliquée par le fait que le premier marqueur est cytoplasmique alors que le second est nucléaire. L'IP nécessite la perméabilité de la membrane plasmique, comme pour l'éosine, mais aussi celle de la membrane nucléaire. Lachaud décrivait la même observation (Lachaud et al., 2004).

Il n'était pas possible de réaliser un double marquage IP/anti-CD46 car les deux fluorochromes sont détectés par des longueurs d'ondes équivalentes. On ne peut donc pas savoir si les spermatozoïdes morts avaient achevé leur RA. Mais on peut supposer qu'une fois la RA réalisée, en l'absence de fusion avec un ovocyte, le spermatozoïde

entre en nécrose. Il est possible également que le calcium ionophore A23187 induise à la fois la RA et la mort cellulaire de façon indépendante (Martin et al., 2005).

Dans cette étude préliminaire il n'a pas été retrouvé d'augmentation franche des marqueurs d'apoptose, comparé à l'augmentation majeure de l'annexine V. L'externalisation de la PS semble être indépendante du processus d'apoptose.

Dans la littérature, à chaque fois qu'était visualisé une augmentation du marquage à l'annexine V, que ce soit après induction de la capacitation ou après induction de la RA, il n'y avait pas d'augmentation des marqueurs d'apoptose (Martin et al., 2005; de Vries et al., 2003; Gadella and Harrison, 2002).

De nombreux auteurs ont cependant montré une diminution des marqueurs d'apoptose (caspases activées, fragmentation d'ADN) lorsque les spermatozoïdes étaient triés par MACS, en éliminant via des billes magnétiques ceux marqués par l'annexine V (Grunewald et al., 2001; Paasch et al., 2005; Said et al., 2008).

Parmi les cellules éliminées, marquées par l'annexine V, on pourrait retrouver des cellules immatures ayant échappé au processus apoptotique au cours de la spermatogénèse, processus engagé avant l'éjaculation (Lachaud et al., 2004), ce qui expliquerait la présence de marqueurs d'apoptose.

Mais il pourrait aussi s'agir de spermatozoïdes ayant réalisé leur RA. En effet, les marqueurs d'apoptoses n'étaient pas retrouvés dans toutes les cellules triées positives pour le marquage à l'annexine V.

Said en 2006 a décrit une meilleure capacité de pénétration d'ovocyte de hamster lorsque les spermatozoïdes étaient triés par MACS, mais une décondensation de la chromatine spermatique après ICSI équivalente (Said et al., 2006). Cette observation va aussi dans le sens d'une externalisation de la PS au cours de la RA, les spermatozoïdes ayant réalisés leur RA ne pouvant pas pénétrer à l'intérieur de l'ovocyte mais pouvant décondenser leur chromatine une fois micro-injectés.

Le marquage par l'annexine V n'est donc pas uniquement un marqueur d'apoptose. La translocation de la PS pourrait jouer un rôle lors de la réaction acrosomique et de l'interaction spermatozoïde-ovocyte.

Conclusion

Cette étude préliminaire a permis de mettre en place de nouvelles techniques qui n'existaient pas dans le laboratoire de biologie de la reproduction du CHU de Bordeaux. Grâce à ces techniques de marquage il a été possible d'étudier l'externalisation de la PS au cours de la capacitation et de la réaction acrosomique chez des patients sains.

En accord avec d'autres auteurs, il semble que le marquage par l'annexine V augmente lorsque la réaction acrosomique est induite par le calcium ionophore A23187, avec en parallèle une absence d'augmentation de la fragmentation d'ADN.

Ces premiers résultats sont prometteurs et méritent d'être approfondis par la poursuite de cette étude à plus grande échelle. L'augmentation de l'effectif permettra d'obtenir un poids statistique suffisant pour pouvoir affirmer la véracité de ces conclusions.

Il apparaît néanmoins que la PS joue probablement un rôle lors de la RA. Il semble que l'on puisse infirmer le fait que l'utilisation du MACS couplé au marquage par l'annexine V élimine des spermatozoïdes apoptotiques. Cependant le tri par cytométrie en flux des spermatozoïdes marqués à l'annexine V pourrait avoir un intérêt puisqu'il permettrait d'écarter ceux en cours de réaction acrosomique prématurée. En ne gardant que les spermatozoïdes capités qui n'ont pas encore externalisé la phosphatidylsérine, les taux de fécondations pourraient être augmentés.

Bibliographie

- Aitken, R.J., and Nixon, B. (2013). Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. *Mol. Hum. Reprod.* *19*, 785–793.
- Anifandis, G., Messini, C., Dafopoulos, K., Sotiriou, S., and Messinis, I. (2014). Molecular and Cellular Mechanisms of Sperm-Oocyte Interactions Opinions Relative to in Vitro Fertilization (IVF). *Int. J. Mol. Sci.* *15*, 12972–12997.
- Arnoult, C., Escoffier, J., Munch, L., Pierre, V., Hennebicq, S., Lambeau, G., and Ray, P. (2012). [Do phospholipases, key enzymes in sperm physiology, represent therapeutic challenges?]. *Médecine Sci. MS* *28*, 512–518.
- Austin, C.R. (1952). The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* *170*, 326.
- Aydin, H., Sultana, A., Li, S., Thavalingam, A., and Lee, J.E. (2016). Molecular architecture of the human sperm IZUMO1 and egg JUNO fertilization complex. *Nature* *534*, 562–565.
- Banerjee, M., and Chowdhury, M. (1994). Purification and characterization of a sperm-binding glycoprotein from human endometrium. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *9*, 1497–1504.
- Banerjee, M., and Chowdhury, M. (1995). Induction of capacitation in human spermatozoa in vitro by an endometrial sialic acid-binding protein. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *10*, 3147–3153.
- Barraud-Lange, V., Naud-Barriant, N., Bomsel, M., Wolf, J.-P., and Ziyat, A. (2007). Transfer of oocyte membrane fragments to fertilizing spermatozoa. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *21*, 3446–3449.
- Barroso, G., Morshedi, M., and Oehninger, S. (2000). Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *15*, 1338–1344.

- Bedu-Addo, K., Lefièvre, L., Moseley, F.L.C., Barratt, C.L.R., and Publicover, S.J. (2005). Bicarbonate and bovine serum albumin reversibly “switch” capacitation-induced events in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* *11*, 683–691.
- Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D., and Wright, G.J. (2014). Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilisation. *Nature* *508*, 483–487.
- Bicknell, G.R., and Cohen, G.M. (1995). Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *207*, 40–47.
- Blanco-Rodríguez, J., Martínez-García, C., and Porras, A. (2003). Correlation between DNA synthesis in the second, third and fourth generations of spermatogonia and the occurrence of apoptosis in both spermatogonia and spermatocytes. *Reprod. Camb. Engl.* *126*, 661–668.
- Chen, M.S., Tung, K.S., Coonrod, S.A., Takahashi, Y., Bigler, D., Chang, A., Yamashita, Y., Kincade, P.W., Herr, J.C., and White, J.M. (1999). 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.* *96*, 11830–11835.
- Cohen, G.M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* *326 (Pt 1)*, 1–16.
- Cross, N.L. (1998). Role of Cholesterol in Sperm Capacitation. *Biol. Reprod.* *59*, 7–11.
- DasGupta, S., Mills, C.L., and Fraser, L.R. (1993). Ca(2+)-related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J. Reprod. Fertil.* *99*, 135–143.
- Degheidy, T., Abdelfattah, H., Seif, A., Albuz, F.K., Gazi, S., and Abbas, S. (2015). Magnetic activated cell sorting: an effective method for reduction of sperm DNA fragmentation in varicocele men prior to assisted reproductive techniques. *Andrologia* *47*, 892–896.
- Delbes, G., Herrero, M.B., Troeung, E.-T., and Chan, P.T.K. (2013). The use of complimentary assays to evaluate the enrichment of human sperm quality in asthenoteratozoospermic and teratozoospermic samples processed with Annexin-V magnetic activated cell sorting. *Andrology* *1*, 698–706.

Domínguez-Fandos, D., Camejo, M.I., Balleascà, J.L., and Oliva, R. (2007). Human sperm DNA fragmentation: correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* *71*, 1011–1018.

Duval, R., Bellet, V., Delebassée, S., and Bosgiraud, C. (2002). Implication of caspases during maedi-visna virus-induced apoptosis. *J. Gen. Virol.* *83*, 3153–3161.

Van den Eijnde, S.M., Boshart, L., Reutelingsperger, C.P., De Zeeuw, C.I., and Vermeij-Keers, C. (1997). Phosphatidylserine plasma membrane asymmetry in vivo: a pan-cellular phenomenon which alters during apoptosis. *Cell Death Differ.* *4*, 311–316.

van Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., Schutte, B., and Reutelingsperger, C.P. (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* *31*, 1–9.

Esteves, S.C., Sharma, R.K., Thomas, A.J., and Agarwal, A. (1998). Effect of in vitro incubation on spontaneous acrosome reaction in fresh and cryopreserved human spermatozoa. *Int. J. Fertil. Womens Med.* *43*, 235–242.

Evans, J.P. (2012). Sperm-egg interaction. *Annu. Rev. Physiol.* *74*, 477–502.
Fadok, V.A., Bratton, D.L., Rose, D.M., Pearson, A., Ezekewitz, R.A., and Henson, P.M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* *405*, 85–90.

Feki, N.C., Théron, P., Couturier, M., Liméa, G., Legrand, A., Jouannet, P., and Auger, J. (2004). Human sperm lipid content is modified after migration into human cervical mucus. *Mol. Hum. Reprod.* *10*, 137–142.

Ficarro, S., Chertihin, O., Westbrook, V.A., White, F., Jayes, F., Kalab, P., Marto, J.A., Shabanowitz, J., Herr, J.C., Hunt, D.F., et al. (2003). Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation. *J. Biol. Chem.* *278*, 11579–11589.

Gadella, B.M., and Harrison, R. a. P. (2002). Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol. Reprod.* *67*, 340–350.

Galeraud-Denis, I., Lambard, S., and Carreau, S. (2007). Relationship between chromatin organization, mRNAs profile and human male gamete quality. *Asian J. Androl.* *9*, 587–592.

Gandini, L., Lombardo, F., Paoli, D., Caponecchia, L., Familiari, G., Verlengia, C., Dondero, F., and Lenzi, A. (2000). Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *15*, 830–839.

Grunewald, S., Paasch, U., and Glander, H.J. (2001). Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell Tissue Bank.* *2*, 127–133.

Gupta, S.K. (2015). Role of zona pellucida glycoproteins during fertilization in humans. *J. Reprod. Immunol.* *108*, 90–97.

Harrison, R.A.P., and Gadella, B.M. (2005). Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology* *63*, 342–351.

Hoogendijk, C.F., Kruger, T.F., Bouic, P.J.D., and Henkel, R.R. (2009). A novel approach for the selection of human sperm using annexin V-binding and flow cytometry. *Fertil. Steril.* *91*, 1285–1292.

Horvitz, H.R. (1999). Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res.* *59*, 1701s – 1706s.

Ignotz, G.G., Cho, M.Y., and Suarez, S.S. (2007). Annexins Are Candidate Oviductal Receptors for Bovine Sperm Surface Proteins and Thus May Serve to Hold Bovine Sperm in the Oviductal Reservoir. *Biol. Reprod.* *77*, 906–913.

Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A., and Okabe, M. (2005). The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* *434*, 234–238.

Jaiswal, B.S., Eisenbach, M., and Tur-Kaspa, I. (1999a). Detection of partial and complete acrosome reaction in human spermatozoa: which inducers and probes to use? *Mol. Hum. Reprod.* *5*, 214–219.

Jaiswal, B.S., Eisenbach, M., and Tur-Kaspa, I. (1999b). Detection of partial and complete acrosome reaction in human spermatozoa: which inducers and probes to use? *Mol. Hum. Reprod.* *5*, 214–219.

Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S.A., Chiba, K., and Hirohashi, N. (2011). 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.* *108*, 4892–4896.

Jonge, C.D. (2005). Biological basis for human capacitation. *Hum. Reprod. Update* *11*, 205–214.

Kawasaki, Y., Nakagawa, A., Nagaosa, K., Shiratsuchi, A., and Nakanishi, Y. (2002). Phosphatidylserine binding of class B scavenger receptor type I, a phagocytosis receptor of testicular sertoli cells. *J. Biol. Chem.* *277*, 27559–27566.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* *26*, 239–257.

Kotwicka, M., Jendraszak, M., and Warchoń, J.B. (2002). Plasma membrane translocation of phosphatidylserine in human spermatozoa. *Folia Histochem. Cytobiol. Pol. Acad. Sci. Pol. Histochem. Cytochem. Soc.* *40*, 111–112.

Kotwicka, M., Jendraszak, M., and Jedrzejczak, P. (2011). Phosphatidylserine membrane translocation in human spermatozoa: topography in membrane domains and relation to cell vitality. *J. Membr. Biol.* *240*, 165–170.

Kotwicka, M., Jendraszak, M., Skibinska, I., Jedrzejczak, P., and Pawelczyk, L. (2013). Decreased motility of human spermatozoa presenting phosphatidylserine membrane translocation-cells selection with the swim-up technique. *Hum. Cell* *26*, 28–34.

Lachaud, C., Tesarik, J., Cañadas, M.L., and Mendoza, C. (2004). Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *19*, 607–610.

van Loo, G., Saelens, X., van Gurp, M., MacFarlane, M., Martin, S.J., and Vandenberghe, P. (2002). The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ.* *9*, 1031–1042.

Lukaszuk, K., Wcislo, M., Liss, J., Stachowicz, A., Jakiel, G., Lukaszuk, M., Pastuszek, E., Woclawek-Potocka, I., Galvao, A., and Bialobrzeska, D. (2015). First Pregnancy, Somatic and Psychological Status of a 4-Year-Old Child Born following Annexin V TESA Sperm Separation. *AJP Rep.* *5*, e105–e108.

- Mahfouz, R.Z., Plessis, S.S. du, Aziz, N., Sharma, R., Sabanegh, E., and Agarwal, A. (2010). Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. *Fertil. Steril.* *93*, 814–821.
- Martin, G., Sabido, O., Durand, P., and Levy, R. (2005). Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *20*, 3459–3468.
- Moldavan, A. (1934). PHOTO-ELECTRIC TECHNIQUE FOR THE COUNTING OF MICROSCOPICAL CELLS. *Science* *80*, 188–189.
- Moreira, M.E.C., and Barcinski, M.A. (2004). Apoptotic cell and phagocyte interplay: recognition and consequences in different cell systems. *An. Acad. Bras. Ciênc.* *76*, 93–115.
- Muratori, M., Piomboni, P., Baldi, E., Filimberti, E., Pecchioli, P., Moretti, E., Gambera, L., Baccetti, B., Biagiotti, R., Forti, G., et al. (2000). Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J. Androl.* *21*, 903–912.
- Muratori, M., Maggi, M., Spinelli, S., Filimberti, E., Forti, G., and Baldi, E. (2003). Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. *J. Androl.* *24*, 253–262.
- Muratori, M., Porazzi, I., Luconi, M., Marchiani, S., Forti, G., and Baldi, E. (2004). AnnexinV binding and merocyanine staining fail to detect human sperm capacitation. *J. Androl.* *25*, 797–810.
- Muro, Y., Buffone, M.G., Okabe, M., and Gerton, G.L. (2012). Function of the acrosomal matrix: zona pellucida 3 receptor (ZP3R/sp56) is not essential for mouse fertilization. *Biol. Reprod.* *86*, 1–6.
- Nakanishi, Y., and Shiratsuchi, A. (2004). Phagocytic removal of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells: mechanisms and consequences. *Biol. Pharm. Bull.* *27*, 13–16.
- Noguchi, S., Yonezawa, N., Katsumata, T., Hashizume, K., Kuwayama, M., Hamano, S., Watanabe, S., and Nakano, M. (1994). Characterization of the zona pellucida glycoproteins from bovine ovarian and fertilized eggs. *Biochim. Biophys. Acta* *1201*, 7–14.

Oehninger, S., Morshedi, M., Weng, S.-L., Taylor, S., Duran, H., and Beebe, S. (2003). Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa. *Reprod. Biomed. Online* 7, 469–476.

Oosterhuis, G.J., Mulder, A.B., Kalsbeek-Batenburg, E., Lambalk, C.B., Schoemaker, J., and Vermes, I. (2000). Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertil. Steril.* 74, 245–250.

Paasch, U., Grunewald, S., Fitzl, G., and Glander, H.-J. (2003). Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. *J. Androl.* 24, 246–252.

Paasch, U., Grunewald, S., Wuendrich, K., Jope, T., and Glander, H.-J. (2005). Immunomagnetic removal of cryo-damaged human spermatozoa. *Asian J. Androl.* 7, 61–69.

Park, K.-H., Kim, B.-J., Kang, J., Nam, T.-S., Lim, J.M., Kim, H.T., Park, J.K., Kim, Y.G., Chae, S.-W., and Kim, U.-H. (2011). Ca²⁺ signaling tools acquired from prostasomes are required for progesterone-induced sperm motility. *Sci. Signal.* 4, ra31.

Plachot, M., Junca, A.M., Mandelbaum, J., Cohen, J., Salat-Baroux, J., and Da Lage, C. (1986). Timing of in-vitro fertilization of cumulus-free and cumulus-enclosed human oocytes. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 1, 237–242.

Said, T., Agarwal, A., Grunewald, S., Rasch, M., Baumann, T., Kriegel, C., Li, L., Glander, H.-J., Thomas, A.J., and Paasch, U. (2006). Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. *Biol. Reprod.* 74, 530–537.

Said, T.M., Agarwal, A., Zborowski, M., Grunewald, S., Glander, H.-J., and Paasch, U. (2008). Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J. Androl.* 29, 134–142.

Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., and Peter, M.E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem. FEBS* 254, 439–459.

Shen, H.-M., Dai, J., Chia, S.-E., Lim, A., and Ong, C.-N. (2002). Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 17, 1266–1273.

Shimizu, S., Narita, M., and Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, 483–487.

Suarez, S.S. (2008). Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 455–462.

Tao, J., Du, J., Critser, E.S., and Critser, J.K. (1993). Assessment of the acrosomal status and viability of human spermatozoa simultaneously using flow cytometry. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 8, 1879–1885.

Tesarik, J., Martinez, F., Rienzi, L., Iacobelli, M., Ubaldi, F., Mendoza, C., and Greco, E. (2002). In-vitro effects of FSH and testosterone withdrawal on caspase activation and DNA fragmentation in different cell types of human seminiferous epithelium. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 17, 1811–1819.

Troya, J., and Zorrilla, I. (2015). Annexin V-MACS in infertile couples as method for separation of sperm without DNA fragmentation. *JBRA Assist. Reprod.* 19, 66–69.

Twiddy, D., Brown, D.G., Adrain, C., Jukes, R., Martin, S.J., Cohen, G.M., MacFarlane, M., and Cain, K. (2004). Pro-apoptotic proteins released from the mitochondria regulate the protein composition and caspase-processing activity of the native Apaf-1/caspase-9 apoptosome complex. *J. Biol. Chem.* 279, 19665–19682.

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* 184, 39–51.

Visconti, P.E., Galantino-Homer, H., Ning, X., Moore, G.D., Valenzuela, J.P., Jorgez, C.J., Alvarez, J.G., and Kopf, G.S. (1999). 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.* 274, 3235–3242.

de Vries, K.J., Wiedmer, T., Sims, P.J., and Gadella, B.M. (2003). Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. *Biol. Reprod.* 68, 2122–2134.

Ward, C.R., and Storey, B.T. (1984). Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev. Biol.* *104*, 287–296.

Weng, S.-L., Taylor, S.L., Morshedi, M., Schuffner, A., Duran, E.H., Beebe, S., and Oehninger, S. (2002). Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol. Hum. Reprod.* *8*, 984–991.

Wildt, L., Kissler, S., Licht, P., and Becker, W. (1998). Sperm transport in the human female genital tract and its modulation by oxytocin as assessed by hysterosalpingoscintigraphy, hysteronography, electrohystero-graphy and Doppler sonography. *Hum. Reprod. Update* *4*, 655–666.

Witte, T.S., and Schäfer-Somi, S. (2007). Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* *102*, 181–193.

Yanagimachi, R. (1978). Sperm-egg association in animals. *Curr. Top. Dev. Biol.* *12*, 83–105.

Zhu, G.-Z., Miller, B.J., Boucheix, C., Rubinstein, E., Liu, C.C., Hynes, R.O., Myles, D.G., and Primakoff, P. (2002). Residues SFQ (173-175) in the large extracellular loop of CD9 are required for gamete fusion. *Dev. Camb. Engl.* *129*, 1995–2002.

Ziyyat, A., Rubinstein, E., Monier-Gavelle, F., Barraud, V., Kulski, O., Prenant, M., Boucheix, C., Bomsel, M., and Wolf, J.-P. (2006). CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin alpha 6 beta 1, which are involved in human and mouse gamete fusion. *J. Cell Sci.* *119*, 416–424.

Annexes

	Mobilité progressive	Vitalité	Annexine V+	anti-CD46+	Annexine V+/PI-	Annexine V+/CD-46-	Annexine V+/CD-46+	IP+	Caspase +	Caspaset/PI+	Caspaset/PI-	CTC "F"	CTC "B"	CTC "AR"
P1 t0h	85	88	5,3	2,6	1,9	4,4	1,2	9,3	1,6	1	0,2	45	54	1
P2 t0h	92	95	12,1	2,5	6,6	13,5	1,8	10,1	3,6	2	1	29	69	2
P3 t0h	90	90	11,5	1,6	6,6	9,6	1,2	5,9	3,4	2	0,6	30	67	3
P4 t0h	96	97	14,4	3,8	5,5	11,2	2,9	10,6	5,1	3,4	1,9	59	40	1
P5 t0h	91	91	10,9	2,8	3,7	9,8	2,1	6,9	2,7	1,8	1,2	47	53	0
M t0h	90,8	92,2	10,8	2,7	4,9	9,7	1,8	8,6	3,3	2,0	1,0	42,0	56,6	1,4
σ t0h	4,0	3,7	3,4	0,8	2,0	3,3	0,7	2,1	1,3	0,9	0,6	12,6	11,8	1,1
P1 t4h	74	79	6,5	2,8	1,8	5,2	1,5	7,8	4,1	2,8	0,7	29	70	1
P2 t4h	82	85	7,8	2		6,3	1,5	22,6	7	5,8	1,2	20	77	3
P3 t4h	87	87	7,2	1,8	3,8	5,7	1,3	6	4,7	3,8	0,4	16	80	4
P4 t4h	68	77	13	3,5	4	10,1	2,6	13,2	3,3	2,2	1,5	36	62	2
P5 t4h	77	77	6,8	2,2	2,6	5,3	1,3	8,4	2,5	1,4	1,1	26	71	3
M t4h	77,6	81,0	8,3	2,5	3,1	6,5	1,6	11,6	4,3	3,2	1,0	25,4	72,0	2,6
σ t4h	7,3	4,7	2,7	0,7	1,0	2,0	0,5	6,7	1,7	1,7	0,4	7,8	7,0	1,1
P1 t4h + A23187	28	28	63,4	40,6	29,1	25,8	36	36,8	20,1	14,5	4,7	22	54	24
P2 t4h + A23187	7	10	87,2	42,6	46,3	46,8	40,8	45,5	16,7	13,5	5	22	16	62
P3 t4h + A23187	38	41	57,7	33	27,6	27,5	29,2	40,8	5,7	4,7	0,9	7	17	76
P4 t4h + A23187	1	2	68,9	43,5	28	29,7	38,8	48,1	16,6	11,7	4,5	15	31	54
P5 t4h + A23187	8	8	47,9	32,3	21,7	19,6	28,8	32,1	8,9	5,8	3,9	10	21	69
M t4h + A23187	16,4	17,8	65,0	38,4	30,5	29,9	34,7	40,7	13,6	10,0	3,8	15,2	27,8	57,0
σ t4h + A23187	15,8	16,2	14,6	5,4	9,3	10,2	5,5	6,5	6,0	4,5	1,7	6,8	15,8	20,2
P1 t24h	66	67	13,3	12,7	4,3	5,8	7,8	12,7	4,3	2,9	1,4	19	75	6
P2 t24h	82	82	20,6	10	7,7	11	8	19,5	6,3	5,3	1	8	84	8
P3 t24h	76	80	12,5	5,3	3,8	9,3	4,2	11,2	4,4	3,9	0,7	10	80	10
P4 t24h	62	68	20,4	11,4	6,1	11,9	7,9	20,1	3,1	2,8	1,4	19	79	2
P5 t24h	59	71	10,4	6,6	2,7	4,7	4,6	12	2,7	2	0,9	13	82	5
M t24h	69,0	73,6	15,4	9,2	4,9	8,5	6,5	15,1	4,2	3,4	1,1	13,8	80,0	6,2
σ t24h	9,7	6,9	4,7	3,2	2,0	3,2	1,9	4,3	1,4	1,3	0,3	5,1	3,4	3,0

Annexe 1. Pourcentages de spermatozoïdes pour chaque marquage, avec moyenne et écart type pour chaque temps d'incubation. (P1 à P5 pour chaque patient, M et σ pour la moyenne et l'écart type des 5 patients)

L'ANNEXINE V : MARQUEUR DE REACTION ACROSOMIQUE ET NON D' APOPTOSE POUR LE SPERMATOZOÏDE HUMAIN ?

INVESTIGATEUR COORDONNATEUR

Pr Clément JIMENEZ, PU-PH

Service de Biologie de la Reproduction-CECOS, Centre Aliénor d'Aquitaine-Hôpital Pellegrin

Place Amélie RabaP Léon 33 000 Bordeaux

CONSENTEMENT A LA RECHERCHE

Monsieur,

Vous avez pris rendez-vous dans notre Laboratoire pour réaliser des examens sur votre sperme dans le cadre d'un bilan de fertilité.

Habituellement la partie du sperme non utilisée pour les examens prévus n'est pas conservée. Nous souhaiterions pouvoir utiliser cette partie non conservée pour des travaux de recherche qui ont pour but de mieux connaître le fonctionnement du spermatozoïde et les mécanismes de mort cellulaire.

Toutes ces recherches seront réalisées dans le strict respect de la Loi de Bioéthique (Loi n° 2004-800 du 6 Août 2004, JORF n° 182 du 7 Août 2004).

A tout moment, vous pourrez retirer votre consentement sur simple demande et toutes les données vous concernant seront détruites.

Monsieur (Nom, Prénom)..... né le.....

Reconnais avoir été informé du protocole, des buts de cette recherche et accepte que son sperme soit utilisé pour des travaux de recherche du Laboratoire de Biologie de la Reproduction du CHU de Bordeaux.

Oui Non

Bordeaux le :

Signature précédée de la mention « lu et approuvé » :

Annexe 2. Consentement à la recherche

Note d'information au patient

Titre de l'étude : « L'ANNEXINE V : MARQUEUR DE REACTION ACROSOMIQUE ET NON D'APOPTOSE POUR LE SPERMATOZOÏDE HUMAIN ? »

Investigateur scientifique : Service de biologie de la reproduction-CECOS, Hôpital Pellegrin-Centre Aliénor d'Aquitaine, CHU de Bordeaux.

Monsieur,

Vous avez pris rendez-vous dans notre Laboratoire pour réaliser des examens sur votre sperme dans le cadre d'un bilan de fertilité. Nous souhaiterions pouvoir exploiter la partie du sperme non utilisée pour ces examens et habituellement éliminée, pour des travaux de recherche.

Pourquoi cette étude ?

Différents mécanismes physiologiques du spermatozoïde sont toujours peu ou mal connus. Cette étude est réalisée sur le sperme après réalisation totale des analyses prescrites par votre médecin. Elle vise à mieux connaître le fonctionnement du spermatozoïde humain et notamment les mécanismes de mort cellulaire du spermatozoïde ; ce type d'étude est donc nécessaire pour améliorer les connaissances de la communauté scientifique.

Vos spermatozoïdes seront analysés le jour même du recueil puis conservés par congélation au sein du laboratoire pour d'éventuels analyses ultérieures. Tous les échantillons seront anonymisés par un code et ne seront en aucun cas utilisés en vue de fécondation.

Que cela implique t'il de participer à cette étude ?

Rien ne change à votre prise en charge au laboratoire, vous effectuez classiquement votre recueil dans le cadre de la réalisation du spermogramme. Seul le surplus du sperme sera utilisé au lieu d'être détruit.

Quels sont vos droits ?

Vous pouvez refuser de participer à cette collection. Le refus de participer à cette étude, quel qu'en soit le motif, n'affectera en rien la prise en charge au sein de notre laboratoire.

Vous pourrez également modifier votre consentement à tout moment et demander que les analyses entreprises vous concernant soient interrompues. Toutes les données vous concernant seront alors détruites.

Votre participation à cette étude est totalement volontaire. La confidentialité des informations vous concernant est garantie par mise sous anonymat. Conformément aux dispositions de la loi relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, vous disposez à tout moment d'un droit d'accès et de rectification des données informatisées vous concernant (loi n°2004-801 du 6 août 2004 modifiant la loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés). Vous disposez également d'un droit d'opposition à la transmission des données couvertes par le secret professionnel susceptibles d'être utilisées dans le cadre de cette recherche et d'être traitées. Vous pouvez également accéder directement ou par l'intermédiaire du médecin de votre choix à l'ensemble de vos données médicales en application des dispositions de l'article L1111-7 du code de la santé publique. Ces droits s'exercent auprès du médecin ou du biologiste qui vous suit dans le cadre de la recherche et qui connaît votre identité.

Après avoir lu cette note d'information, n'hésitez pas à poser toutes les questions que vous désirez. Après un délai de réflexion, si vous acceptez de participer à cette recherche, vous devez compléter et signer le formulaire de consentement de participation.

En vous remerciant de votre collaboration.

Protocole de marquage des spermatozoïdes à l'annexine V

Préparation :

- Diluer le Binding Buffer au 10^{ème} : 300µl de Binding Buffer + 2700µl d'eau distillée (par patient)
- Préparer un tube conique avec 100µl de Binding Buffer dilué + 5µl de Fluorochrome-conjugated Annexin V
- Préparer un tube conique avec 100µl de Binding Buffer dilué

En parallèle préparer un tube témoin :

- Prendre 500.000 spermatozoïdes (20µl), les ajouter au tube préparé Binding Buffer dilué, suivre la procédure du marquage sans ajouter d'annexine V

Marquage :

- Prendre 500.000 spermatozoïdes (20µl)
- Les ajouter au tube préparé Binding Buffer dilué + Fluorochrome-conjugated Annexin V
- Laisser 20 min dans le noir à température ambiante
- Ajouter 500µl de Binding Buffer dilué
- Centrifuger 10min à 1500g
- Jeter le surnageant et garder le culot
- Ajouter 200µl de Binding Buffer dilué
- Transvaser dans un tube à fond rond pour le cytomètre
- Garder dans l'obscurité à température ambiante

Passer au cytomètre

- Ajouter 2 µl de Propidium Iodide Staining Solution
- Laisser 10 min dans le noir à température ambiante

Repasser au cytomètre

Protocole du double marquage des spermatozoïdes à l'annexine V et à l'anti-CD46

Préparation :

- Diluer le Binding Buffer au 10^{ème} : 300µl de Binding Buffer + 2700µl d'eau distillée (par patient)
- Préparer un tube conique avec 100µl de Binding Buffer dilué + 5µl de Fluorochrome-conjugated Annexin V + 1µl d'anti-CD46

Marquage :

- Prendre 500.000 spermatozoïdes (20µl)
- Les ajouter au tube préparé Binding Buffer dilué + Fluorochrome-conjugated Annexin V + anti-CD46
- Laisser 20 min dans le noir à température ambiante
- Ajouter 500µl de Binding Buffer dilué
- Centrifuger 10min à 1500g
- Jeter le surnageant et garder le culot
- Ajouter 200µl de Binding Buffer dilué
- Transvaser dans un tube à fond rond pour le cytomètre
- Garder dans l'obscurité à température ambiante

Passer au cytomètre

Protocole de marquage des spermatozoïdes à l'inhibiteur de caspase 3 activée

Préparation :

- Préparer un tube conique de 300µl de PBS + 1µl de FITC-DEVD-FMK

Marquage :

- Prendre 500.000 spermatozoïdes (20µl)
- Les ajouter au tube de PBS + FITC-DEVD-FMK
- Laisser 20 min dans le noir à température ambiante
- Ajouter 2ml de PBS
- Centrifuger 10min à 1500g
- Jeter le surnageant et garder le culot
- Ajouter 2ml de PBS
- Centrifuger 10min à 1500g
- Jeter le surnageant et garder le culot
- Ajouter 300µl de PBS
- Transvaser dans un tube à fond rond pour le cytomètre
- Garder dans l'obscurité à température ambiante

Passer au cytomètre

- Ajouter 2 µl de Propidium Iodide Staining Solution
- Laisser 10 min dans le noir à température ambiante

Repasser au cytomètre

Protocole de marquage des spermatozoïdes à la chlortétracycline

Préparation :

- Préparer la solution de base CTC : 130mmol/l NaCl + 5mmol/l Cystéine + 20mmol/l Tris-HCl (peut se conserver 1 mois à 4°C dans le noir)
- Le jour même, ajouter 750µmol/l de CTC à la solution de base (conservation 24h à 4°C dans le noir)
- Préparer du PFA à 12.5%
- Lame et lamelle

Marquage :

- Prendre 500.000 spermatozoïdes (20µl)
- Les ajouter dans un tube contenant 50µl de solution de CTC préparée
- Homogénéiser
- Ajouter 4µl de PFA préparé
- Homogénéiser
- Sur une lame, déposer 10µl de la solution finale + 1 goutte de DABCO (0.22mol/l)
- Homogénéiser, déposer une lamelle, presser légèrement, lutter avec du vernis transparent
- Peut être lue dans les 4-5 jours

Protocole de marquage des spermatozoïdes par technique TUNEL

Préparation :

- Préparer un tube conique avec 1ml d'éthanol 70% froid (-20°C)
- Préparer l'Antibody solution : 25µl de FITC-antiBrdU + 475µl de Rinse Buffer
- Préparer la DNA labeling solution : 50 µl de TdT Reaction Buffer + 3,75 µl de TdT Enzyme + 40 µl de Br-dUTP + 161,25 µl d'eau distillée
- PBS

Marquage :

- Prendre 1.10^6 spermatozoïdes (40µl)
- Les ajouter au tube d'éthanol (resuspendre à la pipette)
- Laisser 30min à -20°C

Stockage possible à -20°C plusieurs jours

- Ajouter 2ml de Wash buffer (bouchon bleu)
- Centrifuger 10min à 3000g
- Jeter le surnageant et garder le culot (bien assécher le culot)
- Ajouter 50µl de DNA labeling solution (valable 24h)
- Laisser 1h à 37°C en agitant toutes les 15min
- Ajouter 1ml de Rinse buffer

Séparer en deux tubes de 500 µl : un des tubes servira de contrôle négatif (sans Antibody solution), poursuivre de la même façon pour les deux tubes, en omettant l'étape « Ajouter 100µl d'Antibody solution » pour le tube contrôle.

- Centrifuger 10min à 3000g
- Jeter le surnageant et garder le culot
- Ajouter 100µl d'Antibody solution
- Garder 30min dans l'obscurité à température ambiante
- Ajouter 500µl de PI/RNase A solution
- Transvaser dans un tube à fond rond pour le cytomètre
-
- Garder 30min dans l'obscurité à température ambiante
- Passer au cytomètre dans les 15 min

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque.

Résumé

Introduction

Le marquage à l'annexine V et tri par cytométrie en flux est une nouvelle technique utilisée pour éliminer les spermatozoïdes considérés comme apoptotiques dans le but d'améliorer la prise en charge en AMP. L'annexine V sert à marquer la présence de phosphatidylsérine à la surface des cellules, hors il est reconnu que ce phospholipide est externalisé au cours de la capacitation. L'objectif de l'étude était d'évaluer l'évolution du marquage à l'annexine V lors de l'induction de la capacitation et de la réaction acrosomique de spermatozoïdes humains.

Matériels et méthodes

Les spermatozoïdes provenaient d'éjaculats de patients avec un spermogramme normal. Le marquage à l'annexine V était réalisé à différents temps de capacitation et après induction de la réaction acrosomique par le calcium ionophore A23187. En parallèle, des marqueurs de capacitation, de réaction acrosomique et d'apoptose étaient évalués par cytométrie en flux et microscopie à fluorescence.

Résultats

Une importante augmentation du marquage par l'annexine V était visualisée après induction de la réaction acrosomique (30,5 +/- 9,3% vs 3,1 +/- 1%), sans augmentation comparable des marqueurs d'apoptose (activation des caspases 3 et fragmentation d'ADN).

Conclusion

Cette étude préliminaire suggère que l'externalisation de la PS serait liée au mécanisme de réaction acrosomique plutôt qu'à un processus apoptotique.

Mots clés : annexine V/phosphatidylsérine/réaction acrosomique/apoptose/capacitation

Abstract

Introduction

Selection of nonapoptotic spermatozoa using annexin V-binding and flow cytometry is a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes. Annexin V is a protein that binds very selectively to phosphatidylserine. A translocation of phosphatidylserine is occurring during capacitation. Annexin V binding was measured after capacitation and acrosome reaction induction of human sperm.

Materials and methods

Sperm samples were from patients with normal semen parameters. Annexin V binding was compared with other probes related to apoptosis after capacitation and acrosome reaction induction by calcium ionophore A23187.

Results

Acrosome reaction induction led to an important increase in the proportion of sperm with annexin V binding (30,5 +/- 9,3% vs 3,1 +/- 1%), without any increase of apoptosis probes.

Conclusion

This preliminary investigation suggests that PS exposure could be related to acrosome reaction rather than to apoptosis.

Key words : annexin V/phosphatidylserine/acrosome reaction/apoptosis/capacitation

Laboratoire de Biologie de la Reproduction et CECOS
Centre Aliénor d'Aquitaine – CHU de Bordeaux
Pr Clément JIMENEZ – Université de Bordeaux