



HAL
open science

Expression et localisation de la phospholipase C zeta (PLC ζ) dans les spermatozoïdes d'hommes fertiles et infertiles

Réda Benmansour

► **To cite this version:**

Réda Benmansour. Expression et localisation de la phospholipase C zeta (PLC ζ) dans les spermatozoïdes d'hommes fertiles et infertiles . Médecine humaine et pathologie. 2017. dumas-01657512

HAL Id: dumas-01657512

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01657512>

Submitted on 6 Dec 2017

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.

Thèse Pour l'obtention du
DIPLÔME d'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE
Discipline : Biologie médicale

Présentée et soutenue publiquement par :

Réda BENMANSOUR

Né le 30/10/1988 à Casablanca (MAROC)

Le 29 septembre 2017

**EXPRESSION ET LOCALISATION DE LA
PHOSPHOLIPASE C ZETA (PLC ζ) DANS LES
SPERMATOZOÏDES D'HOMMES FERTILES ET
INFERTILES**

Directeur de thèse :

Dr Lucie CHANSEL-DEBORDEAUX

Jury

Pr Clément JIMENEZ : Président

Pr Jean PARINAUD : Examineur

Dr Roger LEANDRI : Rapporteur et examinateur

Dr Clotilde RIVES-LANGE : Examineur

Remerciements

Au président du Jury, le professeur Clément JIMENEZ

C'est un honneur pour moi que vous acceptiez de présider ce jury. J'ai eu la chance de vous côtoyer et d'apprendre à vos côtés pendant six mois et j'en suis très fier. Vous avez été un chef de service très accessible et toujours à l'écoute de vos internes. Soyez assuré de ma plus profonde gratitude.

A ma directrice de thèse, le docteur Lucie CHANSEL-DEBORDEAUX

Merci d'avoir accepté de me diriger pendant ces mois de préparation. Tu as été la première à m'accueillir dans le service durant mon tout premier semestre d'internat pour répondre à mes questions. Merci pour ta patience, ta disponibilité et tes relectures bienveillantes. Tes précieux conseils m'ont aidé à avancer tant sur le plan technique que dans la rédaction de ce manuscrit.

Au professeur Jean PARINAUD

Je suis très honoré de vous compter parmi les membres de mon jury. Merci de m'avoir permis de faire mes premiers pas en biologie de la reproduction dans votre service. Votre pédagogie et votre disponibilité m'ont permis de progresser et de me passionner pour cette discipline. Soyez assuré de mon profond respect.

Au docteur Roger LEANDRI

C'est pour moi un immense plaisir de te compter parmi les membres de mon jury. Merci d'avoir accepté de juger mon travail. Ce fut très enrichissant de t'accompagner en consultation et d'apprendre à tes côtés durant mon semestre à Toulouse. Sois convaincu de ma plus grande reconnaissance.

Au docteur Clotilde RIVES-LANGE

Merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Je te suis très reconnaissant de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné autant de responsabilités pendant mes deux semestres à Jean Villar. Ta rigueur et tes conseils m'ont été très utiles tout au long de ma formation. Sois assurée de toute mon amitié.

Cette thèse n'aurait pas été la même sans le soutien de ma famille. Je pense très particulièrement à mes parents pour leur soutien et leur présence depuis le début de mon cursus. Ce travail n'est rien comparé aux sacrifices que vous avez consentis pour moi. Je vous dois tout.

Je pense aussi à ma sœur Selma et à mon frère Mohamed qui je suis sûr sera à cette même place dans quelques années.

Mes pensées vont également à toutes celles et ceux qui m'ont soutenu ou accompagné toutes ces années, et particulièrement pendant ces derniers mois de préparation. J'adresse alors mes remerciements :

A l'équipe du laboratoire de biologie de la reproduction de la polyclinique Jean Villar et tout particulièrement :

- A Alexandra Chiron : merci infiniment pour ton accueil et ta formation. Les six mois passés dans le laboratoire m'ont permis d'acquérir une autonomie indispensable pour la suite de ma carrière.
- Aux techniciens FIV : Stéphane, Virginie et Brigitte et tous les autres
- A Martine et Annie pour votre bienveillance.

A l'équipe du laboratoire de biologie de la reproduction du CHU de Bordeaux et tout particulièrement :

- Au Dr Aline Papaxanthos: travailler à vos côtés vous accompagner en consultation a été un plaisir. Merci pour tout.
- A Juliette Chauvel pour ta formation technique personnalisée et ton aide précieuse pour le recrutement des témoins !
- A mes co-internes : Edouard Bradley et Mohamed-Jeremy Zizi
- A Nicolas pour ton éternelle bonne humeur : « c'est-à-dire que...c'était...excellent ! »
- A Anna et Marianne pour l'énergie positive que vous apportez au laboratoire. Vous êtes indispensables !
- A Pascale qui gardera éternellement mon post-it en souvenir des beaux jours
- A Monique Mercier pour ta bienveillance et pour le temps que tu accordes à la formation des internes.

A Evelyne Doudnikoff pour avoir pris le temps de me former à l'utilisation du microscope à fluorescence.

A l'équipe du laboratoire de biologie de la reproduction du CHU de Toulouse et tout particulièrement :

-A Nicolas Gatimel : Un grand merci pour ta formation, ton accompagnement et ta disponibilité. Je te souhaite beaucoup de réussite pour la suite de ta carrière universitaire.

-A Carole Teston et à mes co-internes Christophe, Julie, Pauline, Clélia et Hélène.

-Aux techniciens FIV Lynda, Floriane, Edwige et Gérard pour votre gentillesse et votre implication dans la formation des internes.

A toute la promotion du Master 2 de biologie de la reproduction : bon courage pour vos thèses respectives et pour la suite de vos carrières.

A mes anciens co-internes :

-Ines et Pierre Yves même s'ils ont lâchement quitté Bordeaux

-Anne-Laure, Alexandre, Bastien, Pierre, Xavier, Ludovic, Samantha, JB, Benoît, Nicolas, Adrien, Camille, Cindy...

A mes amis proches :

-Reda: citoyen du monde et éternel vadrouilleur.

-Saad pour avoir entretenu ma combativité reptilienne et mon mental sur les cours de tennis

-Hamza Iraqi pour ton oreille attentive et les conversations passionnantes qu'on peut avoir.

-Omar Bouraks : surfeur, écrivain, cinéaste, mais surtout acolyte parisien pour le meilleur et pour le pire.

-Au XV du Maroc et à son noyau dur : Othmane, Smail, Adil, Jawad, Hamza et Carlos La Guidime! Vivement le prochain voyage annuel.

-A Nabil et Camilia

-A mes anciens potes de paris aujourd'hui retranchés à Casa : Ismail, Omar, Allal, Simo, Abdes...

-A Lisa et Louis, amis depuis mes premières heures à la fac de médecine et excellents organisateurs de soirées à Bordeaux, et à toute la bande des bordelais : Maxime, Matthieu, Aurélien, Vanessa...

Et enfin à toi Selma, et à cette année 2017. Le meilleur reste à venir...

Table des matières

Remerciements	2
Liste des abréviations	9
Liste des figures et tableaux	11
Introduction	13
Contexte et généralités	14
1- L’infertilité idiopathique	15
1.1-Epidémiologie	15
1.2-Diagnostic.....	15
1.3-Causes possibles.....	16
1.4- Prise en charge en AMP.....	17
2-L’échec de fécondation en FIV	18
2.1- La morphologie ovocytaire	19
2.2- Les anomalies cytoplasmiques.....	19
2.3- Les anomalies nucléaires.....	20
2.4- L’interaction ovocyte-spermatozoïde.....	20
3-L’activation ovocytaire	22
3.1-Physiologie	22
3.2-Théorie-du ligand-récepteur.....	24
3.3-Théorie du facteur spermatique.....	24
4-La Phospholipase C zêta	25
4.1-Généralités.....	25
4.2-Structure de la protéine	26
4.2.1. Domaines « EF hands ».....	27
4.2.2. Domaines X et Y catalytiques.....	27
4.2.3. Région « XY linker ».....	27
4.2.4. Domaine C2	27
4.3-Localisation	28
4.3.1-Dans le spermatozoïde.....	28
4.3.2-Dans l’ovocyte	29

4.4-Son rôle dans l'activation ovocytaire	29
5-De la physiologie à la pathologie : le déficit en PLCζ.....	30
5.1-Déficit quantitatif	30
5.2-Déficit qualitatif	31
6-Un potentiel outil diagnostique et thérapeutique ?	33
6.1- Evaluation pronostique des chances de fécondation	33
6.2- La PLC ζ comme outil thérapeutique potentiel	33
<i>Protocole de recherche.....</i>	35
<i>Matériels et méthodes.....</i>	36
1-Consentement.....	36
2-Population étudiée	36
2.1-Critères d'inclusion et d'exclusion.....	36
2.1.1- Groupe des témoins fertiles.....	36
2.1.2- Infertilités idiopathiques.....	36
2.1.3- Echecs ou pauci-fécondation en FIV/ICSI.....	37
3-Recueil de sperme et analyse des paramètres spermatiques	37
3.1- Modalités de recueil et pré-analytique	37
3.2- Evaluation macroscopique	37
3.3- Numération des spermatozoïdes.....	37
3.4- Evaluation de la mobilité.....	38
3.5- Evaluation de la vitalité.....	38
3.6- Test de migration des spermatozoïdes	38
3.7- Congélation et réchauffement des spermatozoïdes	38
4-Expression de la PLC zêta en immunofluorescence	39
4.1- Protocole technique	39
4.2- Lecture des lames	39
5- Analyse statistique	41
<i>Résultats</i>	42
1-Caractéristiques des patients de l'étude :.....	42
1.1- Caractéristiques démographiques.....	42
1.2- Paramètres spermatiques	43

2-Analyse en Immunofluorescence :	44
2.1-Distribution de la PLC ζ chez les témoins fertiles	44
2.2- distribution de la PLC ζ chez les patients infertiles	47
3- Etude comparative :	49
4-Prise en charge des couples des groupes ID et EF	52
4.1- Issues des tentatives pour les couples du groupe ID	52
4.2- Issues des tentatives pour les couples du groupe EF.....	52
<i>Discussion</i>	53
<i>Conclusion</i>	59
<i>Références bibliographiques</i>	60
<i>Annexes</i>	67
-Consentement à la recherche	68
-Note d'information au patient.....	69
-Protocole d'immunofluorescence: mode opératoire	71
<i>Serment d'Hippocrate</i>	72

Liste des abréviations

A : Acrosomique
ADN : Acide désoxyribonucléique
AMH: Anti-mullerian hormone
AMP: Assistance médicale à la procréation
AOA: Activateur ovocytaire artificiel
ARN: Acide ribonucléique
ATP: Adénosine triphosphate
BSA : Bovine serum albumin
CHU : Centre hospitalo-universitaire
DAG : Diacylglycérol
E : Equatoriale
EF : Echec de fécondation
FIV : Fécondation *in vitro*
HSG : Hystérosalpingographie
IAC : Insémination avec sperme du conjoint
ICSI : Intra cytoplasmic sperm injection
ID : infertilités idiopathiques
IgG : Immunoglobuline G
IIU : Insémination intra-utérine
IMC : Indice de masse corporelle
IMSI : Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection
IP₃ : Inositol triphosphate
IP₃-R: Inositol triphosphate receptor
MOAT: Mouse oocyte activation test
MPF: Metaphase promoting factor
NA : Non applicable
NK: Natural Killer
OMS : Organisation mondiale de la santé
PA : Post-acrosomique

PAWP : Post-acrosomal sheath WW binding protein

PBS : Phosphate buffered saline

PH : Domaines homologues de la pleckstrine

PIP₂ : Phosphatidyl inositol biphosphate

PKC : Protéine kinase C

PLC α 2 : Phospholipase C alpha 2

PLC δ : Phospholipase C delta

PLC ζ : Phospholipase C zêta

PLC ζ -rh : Phospholipase C zêta recombinante humaine

TMS : Test de migration-survie

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Liaison de plusieurs spermatozoïdes autour d'un ovocyte à la suite d'une FIV	21
Figure 2 : Ovocyte humain fécondé (zygote).....	22
Figure 3 : Profils d'oscillations calciques lors de l'activation ovocytaire.	23
Figure 4 : Représentation schématique des deux principales théories expliquant le mécanisme d'activation ovocytaire	25
Figure 5 : Structure des différentes isoformes de phospholipase C.....	26
Figure 6 : Structure de la PLC ζ	28
Figure 7 : Localisation du PIP ₂ dans le cytoplasme ovocytaire des mammifères et mode d'action de la PLC ζ	29
Figure 8 : Représentation schématique des mécanismes d'action de la PLC ζ	30
Figure 9 : Modélisation informatique des domaines Y des formes normale et mutée (H398P) de PLC ζ	31
Figure 10 : Modélisation informatique des domaines X des formes normale et mutée (H233L) de PLC ζ	32
Figure 11 : Microscope à épi-fluorescence Axio Imager 2.....	40
Figure 12 : Localisation de la PLC ζ dans la tête du spermatozoïde.	46
Figure 13 : Expression équatoriale de la PLC ζ	46
Figure 14 : Distribution de la PLC ζ dans les spermatozoïdes des témoins fertiles.	47
Figure 15 : Distribution de la PLC ζ chez les patients du groupe ID.....	48
Figure 16 : Distribution de la PLC ζ chez les patients du groupe EF	48
Figure 17 : Proportion de spermatozoïdes exprimant la PLC ζ dans les trois groupes.....	50
Figure 18 : Profils de localisation de la PLC ζ dans les trois groupes.	51
Tableau 1 : Pourcentages d'homologie entre les isoformes de phospholipase C	26
Tableau 2 : Données cliniques et caractéristiques démographiques des 17 témoins fertiles..	42
Tableau 3 : Résumé des tentatives précédant l'inclusion des patients du groupe EF.....	43

Tableau 4 : Comparatif des paramètres spermatiques des témoins fertiles et des patients inclus dans l'étude.	44
Tableau 5 : Expression et distribution de la PLC ζ dans les spermatozoïdes des témoins fertiles	45
Tableau 6 : Expression et distribution de la PLC ζ dans les spermatozoïdes des patients infertiles	49
Tableau 7 : Proportion de spermatozoïdes exprimant la PLC ζ avant et après congélation	51
Tableau 8 : Issues de la tentative suivante pour les patients du groupe EF	52

Introduction

Chez l'homme, à l'image des autres mammifères, l'activation ovocytaire est une étape indispensable pour obtenir un développement embryonnaire et une grossesse. Ce processus est initié par le relargage d'un facteur spermatique dans le cytoplasme ovocytaire lors de la fusion des gamètes : la phospholipase C zêta (PLC ζ). Cette protéine a un poids moléculaire de 70kD chez l'homme et est exprimée dans les régions acrosomique, équatoriale et post-acrosomique de la tête du spermatozoïde humain (1). C'est grâce à cette enzyme que la cascade de signalisation se déclenche, permettant ainsi, *via* des variations calciques au sein du cytoplasme ovocytaire, le blocage de la polyspermie grâce à l'exocytose des granules corticaux, la reprise de la méiose et l'apparition des deux *pronuclei*. L'expression de cette protéine par immunofluorescence a été analysée dans certaines situations d'infertilité masculine notamment chez les patients atteints de globozoospermie (2) ou dans les échecs de fécondation en ICSI (3). Dans ces deux situations, la proportion de spermatozoïdes exprimant la PLC ζ était significativement diminuée. Cet examen semble alors présenter un intérêt diagnostique pour dépister un déficit chez des couples pour lesquels les taux de fécondation sont diminués suite à une tentative de FIV. D'autre part, il n'existe à ce jour aucune donnée dans la littérature concernant le lien éventuel entre le déficit en PLC ζ et l'infertilité idiopathique. Celle-ci concerne environ 10% des couples consultant dans les centres d'assistance médicale à la procréation, les exposant à un risque plus élevé d'échec de fécondation à la suite d'une tentative de FIV (4).

L'objectif principal de notre étude était d'analyser l'expression de la PLC ζ dans deux situations pathologiques : infertilité idiopathique et pauci-fécondation (taux de fécondation $\leq 20\%$) en FIV/ICSI et de comparer cette expression à celle retrouvée chez des hommes fertiles. En effet, l'activation par calcium ionophore a montré son intérêt chez les patients présentant un déficit en PLC ζ avec des résultats probants en termes de taux de fécondation et de grossesse (5). Plus récemment, une équipe coréenne a synthétisé et purifié une PLC ζ recombinante permettant ainsi un traitement plus physiologique et donc plus adapté en cas de déficit (6). Cette alternative intéressante n'est pour l'instant qu'expérimentale, nécessitant des efforts supplémentaires concernant la purification de cette protéine dans le but d'améliorer son efficacité.

Contexte et généralités

1- L'infertilité idiopathique

De nombreux couples consultant pour infécondité ont un bilan d'infertilité strictement normal sans pour autant parvenir à concevoir naturellement. Malgré les difficultés des équipes médicales à trouver des causes à ces infertilités inexplicées, il serait possible que dans certains cas, un défaut de fécondation soit en cause. Ce défaut pourrait être dû à des anomalies du spermatozoïde non dépistées par les analyses de routine, ou à des anomalies de l'ovocyte, comme un durcissement de la zone pellucide ou une des anomalies durant la méiose (7). Les techniques d'assistance médicale à la procréation ont démontré leur efficacité chez les couples présentant une infertilité idiopathique. Cependant, il est important de noter que chez ces couples, 5 à 25% des cycles de FIV conventionnelle aboutissent à un échec complet de fécondation (4).

1.1-Epidémiologie

Chaque centre d'AMP a sa propre définition de l'infertilité inexplicée, en fonction du bilan plus ou moins poussé qui est réalisé pour l'explorer. Il est donc difficile d'évaluer leur proportion globale. Thonneau et *al* rapportent une proportion de 8% (8), une autre étude menée dans 12 centres canadiens retrouve des taux allant de 8% à 37% (9). Il est globalement admis qu'environ 10% des couples consultant dans les centres d'AMP présentent une infertilité inexplicée.

1.2-Diagnostic

Il s'agit en réalité d'une absence de diagnostic. On parle d'infertilité inexplicée ou idiopathique lorsque le bilan clinique, biologique et radiologique d'exploration de l'infécondité ne retrouve aucune anomalie.

L'interrogatoire et l'examen clinique de ces couples ne retrouve pas d'antécédent ou de facteur de risque d'infertilité. Les rapports sexuels sont réguliers, la femme a des cycles réguliers de 26 à 31 jours. Les trompes sont perméables et le bilan de réserve ovarienne comprenant un bilan hormonal et une échographie pelvienne (tous deux réalisés en début de phase folliculaire) est également normal pour l'âge. Le spermogramme réalisé chez le partenaire est strictement normal.

1.3-Causes possibles

Il existe de nombreux aspects de la reproduction qui ne sont pas évalués en routine chez les couples consultant pour infertilité.

Par exemple chez la femme, le bilan de routine ne donne aucune indication sur la qualité ovocytaire, ni sur la réceptivité de l'endomètre. L'hystérosalpingographie renseigne sur la perméabilité des trompes mais ne donne aucune indication sur leur caractère fonctionnel.

Pour le versant masculin, aucun test ne permet d'évaluer en routine la capacitation des spermatozoïdes, leur capacité à effectuer la réaction acrosomique, à traverser la zone pellucide ou encore à activer l'ovocyte (7).

Toute anomalie touchant l'un de ces aspects de la fertilité passe alors inaperçue en première intention, et l'infertilité du couple est considérée comme idiopathique.

En plus de ces aspects, d'autres hypothèses ont été avancées pour tenter d'étiqueter les infertilités inexplicables :

Le rôle de causes immunologiques et l'implication de facteurs comme les anticorps anti phospholipides, anticorps anti-nucléaires, ou les anticorps antithyroïdiens ont été étudiés. Cependant, les études les plus pertinentes n'ont retrouvé aucun rapport de cause à effet (10). Il n'y aurait donc pas d'intérêt au dépistage de ces anticorps.

Le lien entre la présence de cellules Natural Killer (NK) périphériques et résultats en FIV a également été évoqué avec des résultats contradictoires dans la littérature. Selon Thum, les femmes avec un taux de cellules NK périphériques >12% n'ont pas de taux de grossesses diminués ni un nombre plus important de fausses couches (11). Une autre étude rapporte que l'augmentation des cellules NK périphériques est un facteur de risque d'échec d'implantation dans les infertilités inexplicables (12). Le traitement par immunoglobulines intraveineuses par exemple n'a pas montré d'amélioration des taux de naissances chez les patients présentant des infertilités idiopathiques ou des échecs répétés en FIV (13). En l'absence de traitement efficace, l'intérêt de diagnostiquer une « infertilité immunologique » reste alors discutable.

Enfin, l'âge de la femme est un élément fondamental dont il faut tenir compte dans le diagnostic des infertilités idiopathiques. En effet, la qualité ovocytaire s'altérant avec l'âge, certaines infertilités étiquetées inexplicables sont en réalité des infertilités liées à l'âge. La question est de savoir où placer le curseur pour savoir jusqu'à quel âge parler d'infertilité

idiopathique. Certains éléments d'anamnèse comme un antécédent de grossesse ou de fausse couche dans le passé orienteront plutôt le diagnostic vers une cause liée à l'âge. Cependant, il n'existe pas à ce jour de marqueur fiable pour ce type d'infertilité, et les marqueurs de la réserve ovarienne utilisés en routine (AMH et CFA) renseignent seulement sur la quantité et non la qualité des ovocytes (14).

1.4- Prise en charge en AMP

Le recours direct à la fécondation *in vitro* (FIV) ou le recours préalable aux inséminations intra-utérines (IIU) sont discutés dans la littérature en cas d'infertilité inexplicée et la prise en charge des couples est assez variable selon les centres. Une méta-analyse n'a montré aucun intérêt du traitement par citrate de clomifène dans ce contexte (15) avec un rapport bénéfice/risque en défaveur de ce traitement.

Par contre, les données de la littérature sont unanimes quant à l'intérêt d'un traitement par IIU associé à une stimulation ovarienne comparé à une stimulation simple avec rapports programmés. Une revue de la Cochrane de 2012 retrouve par exemple une augmentation des taux de grossesses et de naissances vivantes après IIU associée à une stimulation ovarienne (16). Cette prise en charge en IIU est optimale en début de parcours, tant au niveau de son efficacité que de son coût. Cependant, il faut savoir s'orienter vers la fécondation *in vitro* dans des délais raisonnables en cas d'échec. Une étude a en effet montré que l'efficacité optimale des IIU concernait les trois premiers cycles avec des taux cumulés de grossesse atteignant 39.2% sur les trois premiers cycles et seulement de 5.2% sur les deux derniers (17).

Dans ces études, deux critères fondamentaux n'ont pas été pris en compte : l'âge de la femme et la durée d'infertilité. En effet, quelques cycles d'inséminations sont indiqués en cas d'infertilité courte, mais les infertilités longues requièrent une prise en charge en FIV (7). Une autre étude rapporte une diminution de 50% des taux de grossesse en IIU après 6 ans d'infertilité (18).

Le passage en FIV est souvent nécessaire dans la prise en charge des infertilités idiopathiques en cas d'échec des IIU, ou en cas d'âge féminin avancé ou d'infertilités longues. Malgré son côté invasif et son coût, la FIV reste la technique la plus efficace. Une revue de la Cochrane a montré une augmentation des taux de grossesses par rapport à une attitude abstentionniste (16). Cependant, en première intention, les essais randomisés ne montrent pas de supériorité de la FIV par rapports aux IIU (19,20). Chez les femmes de plus de 40 ans, une étude rapporte

des taux de grossesses en IIU inférieurs à 5%, recommandant le passage en FIV après deux cycles d'IIU (21).

La question qui subsiste est celle de la technique de fécondation *in vitro* à utiliser dans les infertilités inexplicables. Un essai randomisé canadien ne retrouvait pas de différences significatives en termes de taux de fécondation, d'implantation, de grossesses et de naissances entre les deux techniques (22). Cette étude présentait cependant un biais de confusion. En effet le fait de randomiser les couples ne permettait pas de s'affranchir de certains critères de confusion comme l'âge de la patiente, le protocole de stimulation et la qualité du sperme ou des ovocytes. Johnson publie en 2013 une méta analyse comparant l'efficacité de l'ICSI en terme de taux de fécondation par rapport à la FIV classique. Cette fois ci, seulement les études où les ovocytes ont été randomisés ont été retenues. Les résultats montrent une amélioration significative des taux de fécondation en ICSI par ovocyte injecté/inséminé, mais aussi par ovocyte ponctionné, ainsi qu'une diminution considérable des échecs complets de fécondation grâce à l'ICSI (4). Cependant, la grande variabilité des données entre les séries n'a pas permis l'analyse des résultats en termes de taux de grossesses et de naissances dans cette étude. Tout centre d'AMP devrait alors disposer d'un algorithme de prise en charge des infertilités idiopathiques tenant compte des critères précédemment cités. Cette prise en charge optimisée permettrait d'offrir le maximum de chances de grossesse tout en limitant les risques pour les couples.

2-L'échec de fécondation en FIV

Selon les auteurs, une absence totale d'embryon après un cycle de fécondation *in vitro* survient dans 5 à 20% des cas lorsqu'il s'agit d'une FIV classique, avec comme principaux facteurs explicatifs des défauts de fixation et de pénétration de la zone pellucide (23,24).

Le test de fixation à la zone pellucide (hémi zona test), réalisé dans certains centres d'AMP, permet dans ces situations d'affirmer le défaut d'interaction, en évaluant le pouvoir des spermatozoïdes du patient à se fixer sur des ovocytes témoins.

Lorsqu'il s'agit d'une ICSI, les taux d'échec complet de fécondation avoisinent les 5%, avec comme principales causes des défauts d'activation ou de maturation ovocytaire. En effet, Baltaci a montré que 60 à 70% des ovocytes matures non fécondés en ICSI contiendraient un noyau mâle décondensé confirmant l'injection effective du spermatozoïde mais une incapacité pour l'ovocyte à reprendre sa méiose (25).

Dans les deux cas (FIV ou ICSI), la survenue d'un échec complet de fécondation est corrélée au nombre d'ovocytes ponctionnés et d'ovocytes matures (26,27).

2.1- La morphologie ovocytaire

La manière la plus simple de déterminer la qualité d'un ovocyte est l'évaluation de sa morphologie. Un certain nombre d'ovocytes recueillis après stimulation de l'ovulation présentent des anomalies de taille, de forme ou de structure telles que des inclusions cytoplasmiques, granulations ou vacuoles (28). L'origine de ces anomalies est mal connue et peut être multiple. Il existerait par exemple un lien entre dysmorphie ovocytaire et caractéristiques biochimiques du liquide folliculaire (29). Ces anomalies morphologiques pourraient également être associées à l'administration d'un traitement inducteur de l'ovulation, à l'environnement hormonal propre de la patiente ou à des anomalies chromosomiques (29).

L'aspect morphologique de 1900 ovocytes a été étudié dans une étude multicentrique de 2004, afin d'établir une corrélation avec la fécondabilité. Dans cette étude, l'ovocyte idéal devait présenter les critères suivants : cytoplasme clair, homogène et réfringent, espace péri vitellin réduit, zone pellucide claire d'environ 15µm d'épaisseur et un globule polaire intact, rond ou légèrement ovale. Environ 2/3 des ovocytes présentaient un aspect différent de celui-ci. Deux types d'ovocytes avaient un taux de fécondation significativement diminué : ceux ayant un espace péri vitellin augmenté - ce qui évoque un début de dégénérescence ovocytaire - et ceux présentant des anomalies multiples. Aucune dysmorphie n'était associée à un échec complet de fécondation (30).

2.2- Les anomalies cytoplasmiques

En 2001, Reynier a comparé plusieurs groupes d'ovocytes issus d'échecs de fécondation, afin d'analyser leur contenu en ADN mitochondrial. La réplication de cet ADN mitochondrial permettant *via* des phosphorylations, de fournir l'énergie à l'ovocyte sous forme d'ATP.

Dans cette étude, les ovocytes non fécondés provenant de cohorte avec un taux de fécondation normal présentaient un taux d'ADN mitochondrial plus élevé que les ovocytes provenant de cohortes avec un échec de fécondation. De plus, les ovocytes issus de cohorte avec échec de fécondation et sperme déficient présentaient un taux d'ADN mitochondrial plus élevé que ceux des cohortes avec échec de fécondation et sperme normal. La quasi-totalité (6/7) des

ovocytes contenant de très faibles taux d'ADN mitochondrial (<50000 copies) étaient issus de cohorte avec échec complet de fécondation (31).

La quantité d'ADN mitochondrial semble alors jouer un rôle dans la fécondabilité des ovocytes. Ces différences reflètent des variations dans le degré de maturation cytoplasmique.

2.3- Les anomalies nucléaires

Il est important de noter que 8 à 59 % des ovocytes n'ayant pas été fécondés ont des anomalies chromosomiques (32). Ce taux d'anomalies chromosomiques avoisine les 50% à partir de 40 ans et concerne la quasi-totalité des ovocytes à partir de 45 ans.

Concernant le fuseau méiotique, le constat est le même. Chez une femme de 25 ans, la majorité des ovocytes ont un fuseau normal. Par contre, la majeure partie des ovocytes d'une femme de plus de 40 ans présente des anomalies de ce fuseau.

Pellestor a montré qu'à partir de 38 ans, plus de 50 % des ovocytes étaient aneuploïdes (33). Verlinsky a quant à lui rapporté que près de 2/3 des ovocytes sont porteurs d'aneuploïdie. Son étude portait sur les chromosomes 13, 16, 18, 21 et 22 (34).

Ces données soulignent l'importance de l'intégrité génétique de l'ovocyte et donc de l'âge dans le processus de fécondation.

2.4- L'interaction ovocyte-spermatozoïde

Cette étape est cruciale pour obtenir une fécondation en FIV classique. Une étude s'est intéressée à la liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide des ovocytes non fécondés (35). Les auteurs ont défini 4 groupes d'ovocytes non fécondés en fonction du taux de fécondation. Les résultats ont montré que dans les cohortes avec échec complet de fécondation, 70 % des ovocytes avaient moins de 5 spermatozoïdes fixés sur la zone pellucide alors que ce taux n'était que de 17 % dans le groupe où le taux de fécondation était supérieur à 50%. L'incubation des ovocytes du premier groupe avec des spermatozoïdes de témoins permet d'obtenir un taux de fixation normal, suggérant une anomalie au niveau spermatique.

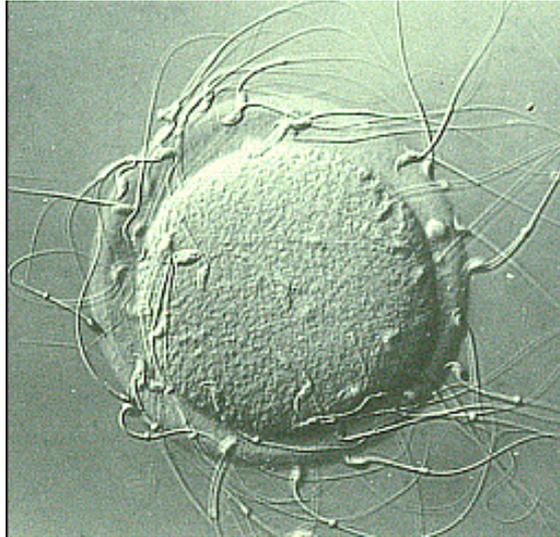


Figure 1: Liaison de plusieurs spermatozoïdes autour d'un ovocyte à la suite d'une FIV
(D'après www.fivfrance.com)

En 2005, une équipe japonaise met en évidence pour la première fois la protéine *Izumo*. Exprimée à la surface du spermatozoïde acrosome réagi, cette protéine est impliquée dans la fusion des membranes du spermatozoïde et de l'ovocyte. En effet, Ils constataient que les souris mâles *Izumo* *-/-* étaient stériles et que leurs spermatozoïdes étaient capables de franchir la zone pellucide mais incapables de fusionner avec l'ovocyte. Sur les spermatozoïdes humains, l'addition d'un anticorps anti-*Izumo* empêchait la fusion avec des ovocytes de hamster (36).

Plus récemment, le récepteur ovocytaire de la protéine *Izumo* a été identifié. Il s'agit du récepteur *Folr4* ou *Juno*. L'équipe ayant réalisé ce travail a montré que l'interaction *Juno-Izumo* était conservée chez plusieurs espèces de mammifères dont l'Homme. Les femelles n'exprimant pas *Juno* étaient infertiles et leurs ovocytes étaient incapables de fusionner avec des spermatozoïdes normaux (37).

La découverte de ce couple ligand-récepteur a permis une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la fusion des gamètes chez les mammifères. Les études futures montreront si des cas d'échecs de fécondation en FIV sont associés à des anomalies de structure ou de fonction de ces protéines.

3-L'activation ovocytaire :

3.1-Physiologie

Avant d'être fécondés, les ovocytes matures sont bloqués en métaphase de seconde division méiotique. Ce blocage en phase G2/M du cycle cellulaire est rendu possible grâce à la stabilisation d'un facteur initiateur de la division cellulaire : le M-phase promoting factor (MPF).

Lors de la fusion des gamètes, il se produit une série d'évènements permettant la transformation de l'ovocyte en un zygote totipotent. Cette activation ovocytaire est médiée par une cascade de signalisation au sein du cytoplasme ovocytaire responsable d'une mobilisation de calcium dans le réticulum endoplasmique. Ce sont ces « oscillations calciques » qui sont responsables de l'exocytose des granules corticaux empêchant la polyspermie, de l'activation du MPF et donc de la reprise de la méiose avec expulsion du second globule polaire, mais également de la formation des deux pro-noyaux mâle et femelle.



Figure 2: Ovocyte humain fécondé (zygote)

Sur cette image, on observe la présence des 3 signes morphologiques de fécondation : expulsion du 2^e globule polaire, présence de deux *pronuclei* et halo cytoplasmique
(D'après atlas.eshre.eu)

De nombreuses études ont montré que chez les mammifères, l'ovocyte produisait une série d'oscillations calciques caractéristiques. Ce signal est considéré comme l'élément déclencheur universel de l'activation ovocytaire. En effet, la simple injection de calcium à des ovocytes de souris a conduit à un développement embryonnaire. L'amplitude, la fréquence et la durée de ces oscillations sont quant à elles spécifiques d'espèce (38) (figure 3).

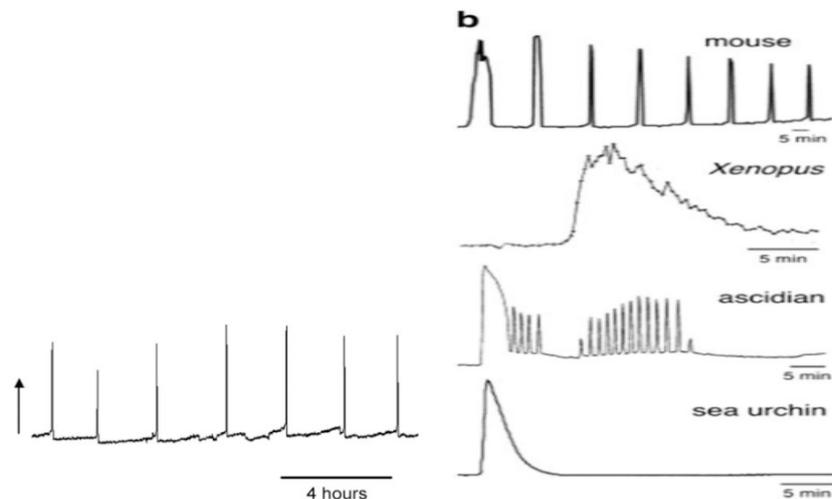


Figure 3: Profils d'oscillations calciques lors de l'activation ovocytaire.

A gauche : chez l'homme. A droite : chez différentes espèces animales

(D'après Rogers et al, 2004 ; et Miyazaki, 2006)

Ces variations calciques dans l'ovocyte sont le résultat d'une cascade de réactions faisant intervenir l'IP₃. Celui-ci se fixe sur son récepteur (IP₃-R) au niveau du réticulum endoplasmique permettant ainsi la sortie d'ions Ca²⁺.

Les travaux de Miyazaki ont montré qu'en bloquant ou en diminuant l'expression des IP₃-R, il était impossible d'obtenir un développement embryonnaire chez la souris ou le hamster (39).

Les ovocytes sont très sensibles à la fréquence et à l'amplitude des oscillations calciques. L'augmentation initiale du calcium intracellulaire apparaît déterminante pour l'initiation des étapes précoces et tardives de l'activation ovocytaire. Certains événements de l'activation ovocytaire n'interviennent pas au moment du pic initial de calcium mais se mettent en place dans un ordre bien précis dans le temps. Cette chronologie semble avoir un lien avec la régulation temporelle des oscillations calciques (40).

Plusieurs théories ont tenté d'expliquer comment un spermatozoïde fécondant pouvait provoquer une mobilisation de calcium dans l'ovocyte.

3.2-Théorie-du ligand-récepteur

Un de ces modèles décrit une interaction entre le spermatozoïde et la membrane plasmique de l'ovocyte, qui à son tour stimule le relargage d'ions calcium soit *via* une cascade liée à une protéine G ou *via* une activité tyrosine kinase. Ce modèle constitua la théorie dominante pendant plusieurs années (41). Cependant, aucun récepteur ovocytaire de cette nature n'a été identifié à ce jour (42). De plus, depuis l'avènement de l'ICSI, cette théorie fut de plus en plus controversée du fait que cette technique, dans laquelle l'interaction gamétique est court-circuitée, permet une activation ovocytaire tout à fait normale.

3.3-Théorie du facteur spermatique

Un autre modèle suppose qu'un facteur spermatique soluble, une fois relargué dans le cytoplasme ovocytaire après la fusion des gamètes, interagirait avec celui-ci, conduisant à la décharge calcique. En effet, chez de nombreuses espèces animales, des oscillations calciques et une activation ovocytaire ont été obtenues après l'injection d'extraits spermatiques dans les ovocytes (38). Des résultats similaires ont été obtenus en injectant des extraits spermatiques de grenouille, de poulets ou de poissons dans les ovocytes de souris suggérant l'existence d'un mécanisme commun entre les différentes espèces (43,44). Un certain nombre de recherches ont suggéré que la nature IP_3 dépendante de l'activation ovocytaire était liée à un mécanisme médié par une phospholipase C, spécifique du spermatozoïde et responsable de l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) en IP_3 et diacylglycerol (DAG). Ceci entraîne l'activation de voies de signalisation impliquant des protéines kinases, comme la protéine kinase C (PKC) (40,45).

Il est généralement admis que ce facteur soluble est spécifique du spermatozoïde dans la mesure où l'injection d'extraits d'autres tissus dans les ovocytes n'entraîne pas d'oscillations calciques ni d'activation ovocytaire (46).

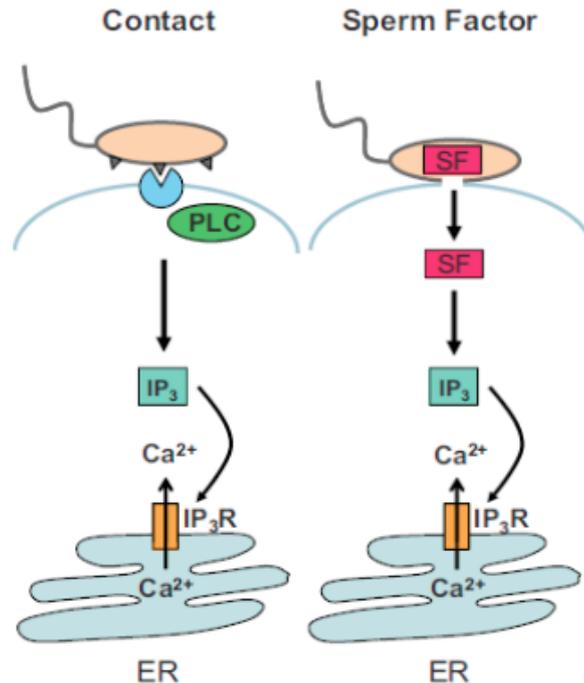


Figure 4: Représentation schématique des deux principales théories expliquant le mécanisme d'activation ovocytaire

(d'après Nomikos *et al*, 2012)

ER = Endoplasmic reticulum SF=Sperm factor

4-La Phospholipase C zêta :

4.1-Généralités

En 2002, Saunders identifie pour la première fois chez la souris une protéine spermatique de 74kD, intervenant dans l'activation ovocytaire: la PLC ζ . Ses expériences consistaient à inhiber le gène codant pour cette protéine. Dans ces conditions, aucune oscillation calcique, et par conséquent aucun développement embryonnaire ne se produisait.

A l'inverse, lorsque de l'ARN de PLC ζ était injecté dans des ovocytes de souris, un profil d'oscillations calciques caractéristique était observé (45).

Des résultats comparables ont été obtenus en utilisant des ovocytes humains (47). Des études similaires sont venues confirmer ces résultats chez différentes espèces de mammifères (48).

L'activité de cette protéine est régulée positivement par les taux de calcium dans l'ovocyte (49). Le gène qui code pour la protéine PLC ζ est présent chez au moins 8 espèces différentes

de mammifères : humain, porc, macaque, lapin, hamster, souris, cheval et bovin. De même, la PLC ζ a été identifiée chez deux espèces de non mammifères : le poulet et une espèce de poisson (50,51). Il s'agit d'une protéine à expression exclusivement testiculaire et post-méiotique, qui s'exprime à partir des spermatides rondes chez l'homme et spermatides en élongation chez la souris (52).

4.2-Structure de la protéine

La PLC ζ est la plus petite isoforme connue de la famille des phospholipases C (figure 5).

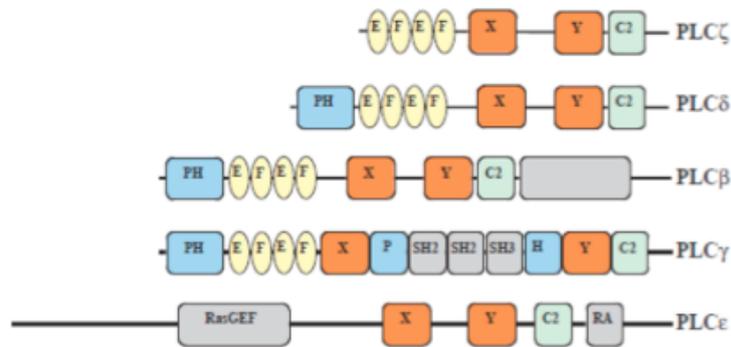


Figure 5: Structure des différentes isoformes de phospholipase C
(D'après Saunders et al, 2002)

Elle présente donc une structure plus simple que celle des autres isoformes tout en conservant une certaine homologie structurale avec celles-ci (45) (tableau 1 et figure 5).

PLC	β	γ	δ	ϵ	ζ
β	100	30	29	19	25
γ	19	100	31	17	25
δ	20	20	100	15	47
ϵ	11	10	9	100	14
ζ	17	16	33	9	100

Tableau 1: Pourcentages d'homologie (rouge) entre les isoformes de phospholipase C
(Saunders et al, 2002)

4.2.1. Domaines « EF hands »

La partie N-terminale de la PLC ζ contient deux domaines dits « EF hands », chacun étant composé de quatre motifs hélice-boucle-hélice. Ces domaines sont responsables de la sensibilité de la protéine aux taux de calcium dans l'ovocyte avec une sensibilité bien supérieure à celle des autres isoformes notamment la PLC δ (53), lui permettant ainsi d'être active même avec des taux de calcium relativement bas.

La délétion d'un seul des deux domaines EF aboutit à une abolition totale des oscillations calciques dans l'ovocyte (54).

4.2.2. Domaines X et Y catalytiques

L'activité catalytique de toutes les PLC s'effectue au sein de deux domaines X et Y, très conservés entre les isoformes. La présence et l'intégrité de ces deux domaines est indispensable au bon fonctionnement de la protéine. Des mutations sur les séquences d'ADN codant pour ces deux domaines ont été décrites, ayant pour conséquence une absence d'expression de la protéine se traduisant cliniquement par des échecs répétés de fécondation en ICSI (2,55).

4.2.3. Région « XY linker »

Entre les deux domaines X et Y, une région dite « XY linker » semble jouer un rôle dans la régulation de l'activité enzymatique. Cependant, il semble y avoir des différences biochimiques et structurales notables entre les isoformes, lui conférant des rôles différents. En effet, dans la PLC ζ , la richesse en résidus chargés positivement dans cette région, permettrait à la protéine d'être adressée à son substrat - le PIP $_2$ - chargé négativement (56).

De plus, c'est cette région qui contient le signal de localisation nucléaire (NLS), permettant l'incorporation de la protéine au sein des *pronucléi* afin d'inhiber son activité (51).

4.2.4. Domaine C2

Même si son rôle précis n'a pas encore été élucidé, ce domaine semble être indispensable pour le fonctionnement normal de la protéine. En effet, l'inactivation du domaine C2 de la PLC ζ conduit à une perte de l'activité enzymatique. Les expériences de Nomikos consistant à

micro injecter des transcrits de PLC ζ sans domaine C2 ont montré l'absence d'oscillations calciques dans les ovocytes de souris (57).

Le domaine C2 pourrait aussi avoir un rôle dans la régulation de l'activité enzymatique de la protéine comme le démontrent les travaux de Kouchi dans lesquels la présence du domaine C2 et d'IP $_3$ inhibait l'hydrolyse du PIP $_2$ in vitro (54).

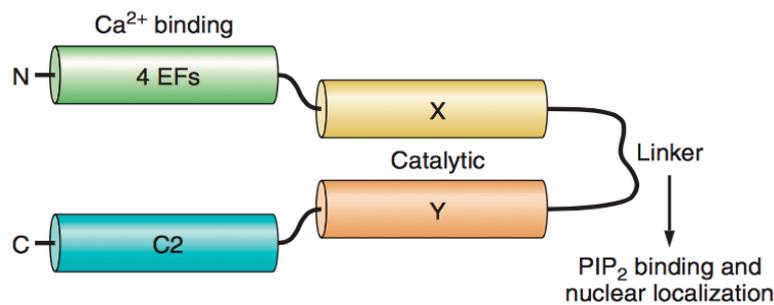


Figure 6: Structure de la PLC ζ

(D'après Swann et Lai, 2016)

4.3-Localisation

4.3.1-Dans le spermatozoïde

La PLC ζ a été identifiée chez de nombreux mammifères, et semble avoir en fonction des espèces, des profils de localisation spécifiques dans les spermatozoïdes. De façon générale, la protéine est localisée dans la thèque péri-nucléaire et permet une diffusion aisée dans le cytoplasme ovocytaire après la fusion des gamètes (45).

Chez la souris, la protéine a été identifiée en région acrosomique et post-acrosomique (58).

Chez le cheval, la PLC ζ a été mise en évidence au niveau du segment équatorial, et de la pièce intermédiaire du flagelle (59).

Dans les spermatozoïdes humains, la PLC ζ a été identifiée dans trois régions de la tête du spermatozoïdes : acrosomique, équatoriale et post-acrosomique ; avec des associations possibles définissant sept profils de localisation (60). Il existe actuellement peu de données dans la littérature concernant la distribution de la PLC ζ chez l'homme fertile et infertile.

Cependant, en tenant compte de la physiologie de l'interaction gamétique, les localisations équatoriales et post-acrosomiques seraient celles qui permettraient un passage rapide de la protéine dans le cytoplasme ovocytaire (60).

4.3.2-Dans l'ovocyte

La PLC ζ ne possède pas de domaine homologue de la pleckstrine (PH) contrairement aux autres isoformes. Ces domaines sont impliqués dans la liaison des protéines à la membrane plasmique. Par conséquent, il semblerait que l'activité de la PLC ζ soit cytosolique.

Des analyses en immunofluorescence indirecte montrent une distribution de la protéine de façon uniforme dans le cytoplasme ovocytaire de souris (61) et plus précisément dans des petites vésicules intracellulaires contenant du PIP₂ (Figure7).

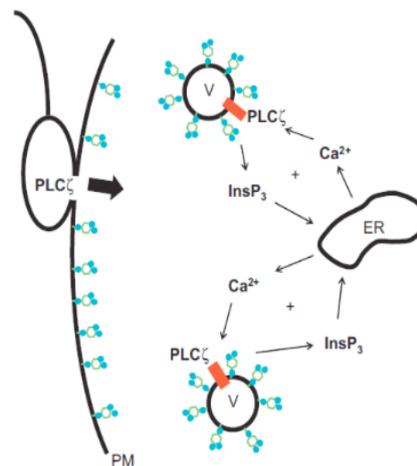


Figure 7: Localisation du PIP₂ dans le cytoplasme ovocytaire des mammifères et mode d'action de la PLC ζ (D'après Swann *et al.*, 2013)

ER= réticulum endoplasmique, V= vésicule, PM= membrane plasmique

4.4-Son rôle dans l'activation ovocytaire

Après la fusion des gamètes, la PLC ζ est libérée dans le cytoplasme de l'ovocyte où elle va se lier à son substrat : le PIP₂, situé dans des vésicules au sein du cytoplasme ovocytaire pour l'hydrolyser en IP₃ et DAG. Ce dernier active la voie de la protéine kinase C (PKC) *via* la calmoduline kinase II pendant que l'IP₃ se lie à son récepteur IP₃-R sur la membrane du réticulum endoplasmique entraînant une libération cyclique de calcium. Ces oscillations calciques vont déclencher le processus d'activation ovocytaire précédemment décrit.

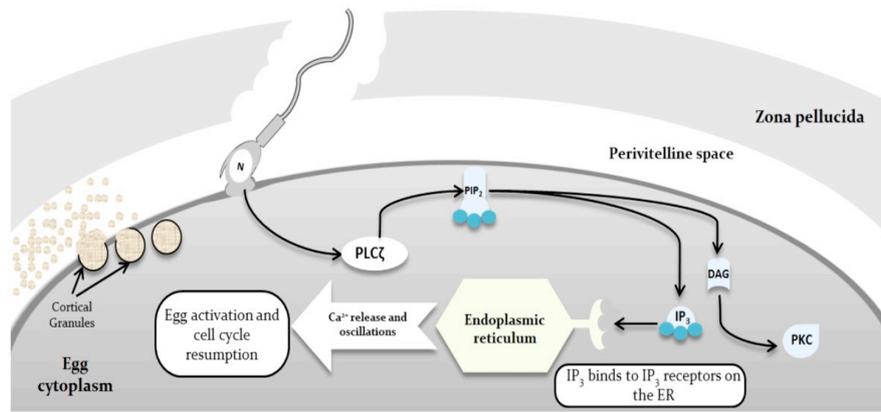


Figure 8: Représentation schématique des mécanismes d'action de la PLCζ.
(D'après Ramadan *et al*, 2012)

5-De la physiologie à la pathologie : le déficit en PLCζ

5.1-Déficit quantitatif

De nombreuses études ont mis en évidence une diminution d'expression de la PLCζ en immunofluorescence et/ou en western blot dans les spermatozoïdes d'hommes infertiles. En immunofluorescence, la majorité de ces études évaluaient l'expression de la protéine de trois façons : en mesurant l'intensité de la fluorescence, la proportion de spermatozoïdes exprimant la protéine, et la localisation de la protéine dans la tête du spermatozoïde.

En 2010, Taylor a rapporté le cas d'un patient de 28 ans présentant une globozoospermie complète. Ce patient ne présente aucun antécédent familial d'infertilité, son caryotype est de type 46XY et la recherche de micro délétions du chromosome Y était négative. Un échantillon de sperme a été analysé chez ce patient. Les résultats en immunofluorescence montrent une absence d'expression de la PLCζ. Pour le western blot, le sperme du patient a été comparé à celui d'un témoin avec spermogramme normal. Une bande typique de 70kD a été observée chez le témoin mais pas chez le patient (5).

Un an plus tôt, Heytens publie une série de 9 patients ayant un antécédent d'échec de fécondation en ICSI confirmé par un test d'activation d'ovocytes de souris (Mouse oocyte activation test ou MOAT). 5 de ces patients présentaient une globozoospermie totale. L'analyse en immunofluorescence et en western blot a montré une absence de PLCζ dans leurs spermatozoïdes (2).

Plus récemment, une équipe française a mis en évidence une diminution d'expression de la PLC ζ – en immunofluorescence et western blot - chez les patients globozoospermiques présentant une délétion du gène *DPY19L2*. Dans cette même étude, une absence totale d'expression de la PLC ζ était observée chez des souris knock-out *DPY19L2*^{-/-} (62).

Il semblerait y avoir également un lien entre stress oxydatif et expression de la PLC ζ . En effet, une corrélation négative entre l'expression de la PLC ζ et taux de fragmentation de l'ADN a été mise en évidence dans une étude récente (63). La même équipe a pu mettre en évidence un déficit en PLC ζ chez les patients infertiles présentant une varicocèle. Le stress oxydatif était encore une fois considéré comme le facteur causal (64).

5.2-Déficit qualitatif

Dans la série d'Heytens, un échantillon salivaire a été prélevé chez patients et témoins. Ainsi, les exons du gène de la PLC ζ ont pu être amplifiés par PCR, puis séquencés. Une mutation hétérozygote a été retrouvée chez un patient non globozoosperme. Il s'agit d'une substitution d'une cytosine → adénine en position 1193 entraînant une substitution d'une histidine pour une proline en position 398 sur la séquence d'acides aminés (mutation H398P). Cette histidine semble conservée chez toutes les espèces de mammifères (2).

Un logiciel de modélisation 3D a permis de reconstituer et d'étudier la structure fine de la PLC ζ . Il semblerait que la mutation H398P se situe au sein du domaine Y catalytique, site d'hydrolyse du PIP₂ en IP₃ (figure 9).

L'injection d'ARN_c dérivé de la PLC ζ ^{H398P} dans des ovocytes de souris n'a abouti à aucune oscillation calcique (2).

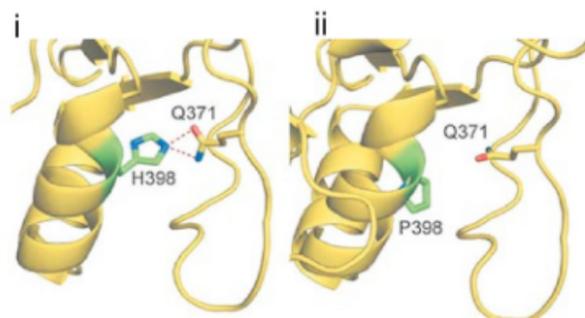


Figure 9: Modélisation informatique des domaines Y des formes normale et mutée (H398P) de PLC ζ

(D'après Kashir *et al*, 2012b)

Les auteurs étaient cependant intrigués par le fait qu'une mutation hétérozygote, qui normalement devrait affecter 50% des cellules haploïdes, puisse affecter l'ensemble des spermatozoïdes chez ce patient avec une absence totale d'expression de la PLC ζ . Ceux-ci avaient alors avancé l'hypothèse d'un effet dominant négatif de la mutation.

Ce n'est que trois ans plus tard que Kashir a pu mettre en évidence une seconde mutation chez ce même patient affectant le domaine X catalytique. Il s'agit cette fois-ci d'une substitution Histidine→Leucine en position 233 (H233L). Cette mutation aboutit également à une protéine de structure anormale (Figure 10). Contrairement à H398P, l'injection d'ARNc de PLC ζ ^{H233L} à des ovocytes de souris a pu aboutir à des oscillations calciques mais selon un profil temporel différent de la forme sauvage (55).

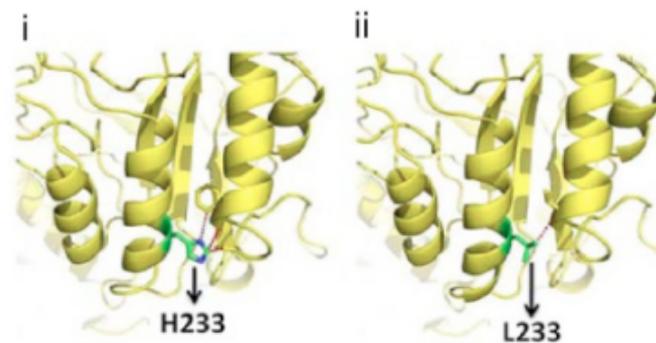


Figure 10: Modélisation informatique des domaines X des formes normale et mutée (H233L) de PLC ζ
(D'après Kashir et al, 2012b)

La mise en évidence de cette seconde mutation a permis d'expliquer la sévérité du phénotype chez ce patient hétérozygote composite. Le séquençage du gène de la PLC ζ chez les parents a permis de montrer que les deux mutations H398P et H233L ont été héritées respectivement du père et de la mère. A travers cette étude, il a été démontré pour la première fois qu'une infertilité masculine pouvait être transmise par la lignée germinale maternelle.

Plus récemment, une autre mutation hétérozygote touchant le domaine X a été mise en évidence chez un patient avec un antécédent d'échec de fécondation en ICSI. Il s'agit cette fois-ci d'une mutation au niveau de l'exon 6 entraînant une substitution d'une arginine pour une histidine en position 197 sur la séquence d'acides aminés. Cependant, aucune étude fonctionnelle n'a été réalisée afin d'évaluer l'impact de cette mutation sur le fonctionnement de la protéine (65).

Enfin, dans une étude très récente, une mutation touchant le domaine C2 a également été mise en évidence. Cette fois ci, c'est une isoleucine qui est substituée par une phénylalanine en position 489 (I489P). L'injection d'ARN de cette forme mutée à taux physiologique ne provoquait aucune oscillation calcique. Par contre, l'activation des ovocytes était rendue possible par l'injection de taux supra physiologiques d'ARN PLC ζ ^{I489P}. (66).

6-Un potentiel outil diagnostic et thérapeutique ?

6.1- Evaluation pronostique des chances de fécondation

Dans l'état actuel des connaissances, le seul test permettant d'évaluer l'activation ovocytaire est le test de Hamster. Il consiste à micro injecter les spermatozoïdes à tester dans des ovocytes de hamster et d'évaluer les taux de fécondation. Cette technique couteuse, nécessite du matériel de pointe et une qualification technique des opérateurs la rendant difficilement applicable en routine. De plus, ce test est peu spécifique et ne permet pas de quantifier le déficit en PLC ζ .

L'analyse par immunofluorescence constitue une alternative intéressante car elle pourrait être applicable en routine dans un laboratoire de spermologie et permettrait d'évaluer le déficit en PLC ζ . La proportion de spermatozoïdes exprimant la PLC ζ semble corrélée positivement aux taux de fécondation en ICSI (3). Ainsi, l'analyse en immunofluorescence pourrait permettre de dépister un éventuel déficit, et ainsi anticiper un échec ou une pauci-fécondation en ICSI en envisageant une thérapeutique adaptée.

6.2- La PLC ζ comme outil thérapeutique potentiel

Actuellement, la seule option thérapeutique proposée en cas d'échec(s) de fécondation en ICSI est l'utilisation d'activateurs ovocytaire artificiels (AOA) et principalement le calcium ionophore, aboutissant à des taux de fécondation normaux, et des grossesses rapportées dans la littérature, même dans les déficits avérés en PLC ζ (5).

Cependant, l'utilisation du calcium ionophore est plus ou moins règlementée selon les pays. En France par exemple, son utilisation n'est pas autorisée en routine. De plus, le doute persiste concernant les potentiels effets cytotoxiques et mutagènes de ce produit sur l'embryon. En effet, l'activation ovocytaire par calcium ionophore induit un pic unique de

calcium, différent du profil typique d'oscillations calciques observé physiologiquement. En pratique, aucun effet délétère n'a été rapporté jusqu'à présent.

Comme évoqué précédemment, une alternative plus physiologique en cas de déficit avéré en PLC ζ serait d'apporter la protéine de manière exogène. Ainsi, les premières études dans ce sens ont consisté à micro injecter de l'ARN_c de PLC ζ à des ovocytes humains. Les auteurs ont pu ainsi obtenir un profil d'oscillations calciques identique au profil physiologique, mais aussi un développement embryonnaire normal (67). Cependant, l'utilisation d'ARN_c de PLC ζ n'est pas recommandée en pratique clinique notamment à cause du risque de retro transcription de l'ARN_c en ADN_c pouvant s'incorporer au génome embryonnaire (68). Après des essais de purification de PLC ζ murine, Yoon fut le premier à synthétiser et purifier une PLC ζ humaine recombinante (6), obtenant des résultats encourageants. Plus récemment, Nomikos a généré une forme active et purifiée de PLC ζ recombinante humaine, induisant des oscillations calciques identiques à celles observées physiologiquement (69). Ces études confirment le potentiel de cette molécule comme agent thérapeutique dans les situations de défaut d'activation ovocytaire.

Protocole de recherche

Matériels et méthodes

1-Consentement

Tous les participants ont reçu une information orale et écrite concernant les objectifs et les modalités de l'étude et ont signé un consentement écrit permettant l'utilisation de leur prélèvement de sperme à des fins de recherche (Documents en annexe).

2-Population étudiée

L'étude a été menée entre Décembre 2016 et Juillet 2017 au CHU de Bordeaux .Trois groupes de population ont été recrutés sur deux sites : Service de biologie de la reproduction de l'hôpital Pellegrin (CHU de Bordeaux) et polyclinique Jean Villar (Bruges) puis analysés.

2.1-Critères d'inclusion et d'exclusion

2.1.1- Groupe des témoins fertiles

Pour le groupe contrôle (groupe TF), nous avons recruté dans la population générale des hommes fertiles ayant conçu en dehors de toute assistance médicale à la procréation dans un délai inférieur à un an. Leurs caractéristiques sont résumées dans le tableau 2.

2.1.2- Infertilités idiopathiques

Pour les couples présentant une infertilité idiopathique (groupe ID), les critères d'inclusion étaient la présence d'une infertilité primaire depuis au moins 1 an. Les hommes devaient avoir des paramètres spermatiques normaux selon les normes de l'OMS 2010 avec un test de migration retrouvant plus de 1 million de spermatozoïdes mobiles. La présence de cellules rondes avec un taux significatif de leucocytes (≥ 1 million/ml) était considérée comme un critère d'exclusion. Les patients présentant une globozoospermie étaient également exclus de l'étude.

Les femmes devaient avoir des cycles réguliers de 26 à 31 jours, un bilan hormonal de réserve ovarienne réalisé au troisième jour du cycle avec : $FSH \leq 10$ UI/l, $AMH \geq 1$ ng/ml, et

une échographie pelvienne mettant en évidence au moins 10 follicules antraux. L'hystérosalpingographie (HSG) devait montrer une perméabilité tubaire bilatérale et une cavité utérine normale. En cas d'HSG douteuse, une coelioscopie exploratrice avec épreuve au bleu était exigée et devait être normale. La présence de dysménorrhées, de dyspareunies ou un IMC \geq 30 étaient considérés comme des critères d'exclusion.

2.1.3- Echecs ou paucifécondation en FIV/ICSI

Pour le groupe de patients présentant un défaut de fécondation (groupe EF), ont été inclus dans l'étude tous les couples pour lesquels un taux de fécondation \leq 20% a été obtenu en FIV classique ou en ICSI. Les tentatives avec moins de 3 ovocytes inséminés en FIV classique ou micro injectés en ICSI ont été écartées.

3-Recueil de sperme et analyse des paramètres spermatiques

3.1- Modalités de recueil et pré-analytique

Un prélèvement de sperme a été réalisé par auto masturbation après un délai d'abstinence de 2 à 7 jours et une toilette génitale appropriée, dans un récipient identifié et pesé.

Après un délai de liquéfaction de 30 minutes à température ambiante, les paramètres spermatiques ont été évalués selon les recommandations de l'OMS de 2010.

3.2- Evaluation macroscopique

Une évaluation de l'aspect macroscopique, de la viscosité, ainsi qu'une mesure du volume et du pH étaient réalisées sur l'échantillon.

3.3- Numération des spermatozoïdes

La numération des spermatozoïdes était effectuée en déposant 10 μ l de sperme liquéfié dans deux cellules de Makler®. Le résultat était exprimé en millions/ml en calculant une moyenne sur deux comptes.

3.4- Evaluation de la mobilité

Deux gouttes de 10µl de sperme étaient déposées entre lame et lamelle et observées au microscope optique (objectif x20). Un compte du pourcentage de spermatozoïdes mobiles progressifs et non progressifs était effectué.

3.5- Evaluation de la vitalité

10µl de sperme étaient déposés sur une lame et mélangés à 10µl d'une solution d'éosine puis recouverts d'une lamelle. Le pourcentage de spermatozoïdes vivants était ainsi calculé au microscope à contraste de phase (objectif x40).

3.6- Test de migration des spermatozoïdes

Un test de migration par gradient de densité était ensuite réalisé. Brièvement, 1ml de sperme était déposé dans un tube contenant trois couches de gradient de densité : 50%, 75%, 90% (Puresperm®, Nidacon, Suède) et centrifugé à 300G pendant 15min. La fraction à 90% était ensuite récupérée, diluée dans du Feticult Flushing medium® (FertiPro, Belgique) tamponné à l'Hepes, et centrifugée de nouveau à 300G pendant 15min. Un volume de 100µl du culot de centrifugation était ensuite repris dans 200µl de Feticult Flushing medium®. La numération et la mobilité des spermatozoïdes étaient évaluées sur cette fraction en cellule de Makler®.

3.7- Congélation et réchauffement des spermatozoïdes

Une congélation de sperme a été réalisée sur les échantillons des trois premiers témoins (TF1, TF2, TF3) avant la réalisation du TMS. Pour ce faire, 700µl de cryoprotecteur (SpermFreeze, FertiPro, Belgique) étaient ajoutés à 1ml de sperme, puis le mélange était conditionné en 3 paillettes haute sécurité de 300µl (CryoBioSystem, IMV technologies, France). Les paillettes étaient ensuite identifiées puis congelées à l'aide d'un automate (Freezal®, Air Liquide, France) selon un protocole de descente en température prédéfini. Les paillettes étaient ensuite conservées dans une cuve d'azote liquide à -196°C.

Pour décongeler les échantillons, ceux-ci étaient sortis de la cuve puis placés sur une platine chauffante à 37°C pendant 2 minutes. Les paillettes étaient ensuite sectionnées et le sperme déposé dans un tube pour la réalisation du TMS.

4-Expression de la PLC zêta en immunofluorescence

4.1- Protocole technique

L'expression de la PLC ζ a été évaluée selon un protocole d'immunofluorescence décrit par Grasa et repris dans un grand nombre d'études (1). Brièvement, la suspension de spermatozoïdes était fixée dans du PBS contenant 4% de paraformaldehyde (Sigma Aldrich, USA), centrifugée à 800G pendant 10 min puis lavée dans du PBS. Un volume de 50 μ L du culot de centrifugation était étalé sur une lame Superfrost®Plus. Les échantillons étaient ensuite perméabilisés dans 0.5% de Triton X-100 (Sigma Aldrich, USA) pendant 30 minutes, puis incubés une heure à température ambiante dans une solution de PBS contenant 3% de BSA. Les lames étaient ensuite incubées toute une nuit en chambre humide à +4°C avec l'anticorps anti-PLC ζ humaine (Covalab, France) à 25 μ g/ml dans une solution de PBS avec 0,05% de BSA. Le lendemain matin, la suite des manipulations était réalisée à l'abri de la lumière : les échantillons étaient incubés pendant 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti-lapin IgG Alexa Fluor 488 (Invitrogen, UK) à 5 μ g/ml. Le marquage des noyaux était ensuite réalisé en incubant les lames avec une solution de HOESCHT 33342 à 2 μ g/ml (Sigma Aldrich, USA) pendant 15min (Protocole détaillé en annexe).

Afin de garantir un confort de lecture durable, les lames étaient ensuite montées avec une solution de Prolong™ Gold antifade (Life Technologies, USA) entre lame et lamelle.

4.2- Lecture des lames

Les noyaux des spermatozoïdes, la proportion de spermatozoïdes exprimant la PLC ζ ainsi que les profils de localisation de la protéine ont été analysés par microscopie à épi-fluorescence Axio Imager 2 (Zeiss, Jena, Allemagne) de l'institut des maladies neurodégénératives de l'Université de Bordeaux (figure 11).



Figure 11 : Microscope à épi-fluorescence Axio Imager 2

Le contraste de phase permettait de repérer les spermatozoïdes, puis la lecture était effectuée au grossissement x63 sous huile. Le logiciel MorphoStrider® (Explora Nova, France) connecté au microscope, permettait l'acquisition des images.

Toutes les lames ont été comptées en aveugle. Un spermatozoïde était considéré positif lorsqu'une fluorescence était présente en région acrosomique (A)/équatoriale (E) et/ou post-acrosomique (PA) de la tête du spermatozoïde (figures 12 et 13). Deux comptes de 100 spermatozoïdes étaient effectués pour chaque lame. Lorsque plus de 10% d'écart était observé entre deux comptes pour un même échantillon, l'analyse était refaite. Les profils de localisation ont été analysés d'après la publication de Kashir. Sept profils de localisation ont été pris en compte : A, E, PA, A+E, A+E+PA, A+PA, E+PA (60).

Les résultats ont été exprimés en tenant compte de ces sept profils, mais également en termes d'expression globale des trois localisations principales (total A, total E et total PA). Par exemple, le pourcentage de localisations équatoriales (total E) correspond à la proportion de spermatozoïdes exprimant la PLC ζ en région équatoriale associée ou non à d'autres localisations.

5- Analyse statistique

Les analyses statistiques et les études comparatives ont été réalisées en utilisant le logiciel Microsoft Excel 2011. Un *t-test* de student a été réalisé pour les calculs de significativité à l'aide du logiciel BiostaTGV. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SD.

Résultats

1- Caractéristiques des patients de l'étude :

1.1- Caractéristiques démographiques

Dans notre étude, les 17 témoins fertiles étaient âgés de 24 à 39 ans. Tous avaient au moins un enfant conçu naturellement dans un délai nécessaire à concevoir de moins de 6 mois (DNC ≤ 6mois). 14 d'entre eux avaient un enfant de moins de deux ans ou une grossesse en cours au moment de l'étude (tableau 2).

	Age	Nombre d'enfants	Age du dernier enfant	DNC (mois)	Tabac
1	38	2	5 mois	3mois	non
2	35	3	Grossesse en cours	2 mois	oui
3	29	1	1 an	3mois	non
4	24	1	7 mois	6mois	non
5	25	2	1 an	4mois	oui
6	32	0	Grossesse en cours	6mois	oui
7	29	1	16 mois	3mois	non
8	39	3	8 ans	4 mois	non
9	27	2	2 ans	3mois	non
10	28	0	Grossesse en cours	1mois	non
11	31	2	1 an	2mois	oui
12	39	3	3 ans	2mois	non
13	37	1	2 ans	1mois	non
14	38	2	7 ans	1mois	oui
15	31	0	Grossesse en cours	2mois	oui
16	30	1	2 semaines	6mois	non
17	35	2	1 an	3mois	oui
Moyenne	32,2	1,5	NA	3,1	NA
SD	4,9	1,0	NA	1,7	NA

Tableau 2 : Données cliniques et caractéristiques démographiques des 17 témoins fertiles
(DNC : délai nécessaire à concevoir, NA : non applicable, SD : écart-type)

Les 7 patients présentant une infertilité idiopathique étaient âgés de 26 à 43 ans. 6 d'entre eux ont été recrutés au CHU de Bordeaux, le septième patient a été recruté au centre d'AMP de la clinique Jean Villar.

L'âge des 6 patients du groupe EF variait de 33 à 45ans. Quatre d'entre eux ont été recrutés au CHU de Bordeaux pour antécédent d'échec ou de pauci-fécondation en FIV conventionnelle. Les deux autres patients nous ont été adressés du centre d'AMP de la clinique Jean Villar pour échec complet de fécondation en FIV puis en ICSI.

	Technique	Ovocytes	Ovocytes matures	Embryons	Taux de fécondation
EF1	ICSI	6	4	0	0%
EF2	ICSI	7	5	0	0%
EF3	FIV	6	6	1	17%
EF4	FIV	5	5	1	20%
EF5	FIV	9	9	1	11%
EF6	FIV	4	4	0	0%

Tableau 3 : Résumé des tentatives précédant l'inclusion des patients du groupe EF

1.2- Paramètres spermatiques

Les témoins fertiles présentaient de meilleurs paramètres spermatiques que les patients des deux autres groupes en termes de concentration et mobilité progressive des spermatozoïdes (tableau 4).

	Age	Abstinence (jours)	Volume (ml)	Numération (Millions/ml)	Mobilité a+b (%)	Vitalité (%)	TMS (millions)
Témoins fertiles (TF)							
Moyenne	30,6	2,8	3,2	86,2	52,4	70,5	28,3
SD	4,9	0,9	1,1	62,5	7,3	7,1	25,3
Médiane	31	3	3,2	60	55	70	21,9
Min	25	2	1,5	16	38	59	3,4
Max	39	4	5,3	210	63	83	78,8
Infertilités idiopathiques (ID)							
Moyenne	34,3	3,6	4,2	42,1 *	48	71,9	14,9
SD	5,1	1	1,4	19,2	11,7	7,8	13,6
Médiane	34	4	4,6	40	44	71	12,1
Min	26	2	2,4	20	32	63	1,9
Max	43	5	5,8	72	68	85	44
Comparaison(p)	NS	NS	NS	<0,05	NS	NS	NS
Echecs de fécondation (EF)							
Moyenne	37,5	3,5	3,5	40,7 *	43,7 *	67,7	15,3
SD	5,5	0,55	1,23	34	7,8	6,1	13,6
Médiane	35	3,5	3,85	40	46	67,5	14,2
Min	33	3	1,7	4	30	59	2,1
Max	45	4	4,7	120	52	75	31
Comparaison(p)	NS	NS	NS	<0,05	<0,05	NS	NS

Tableau 4 : Comparatif des paramètres spermatiques des témoins fertiles et des patients inclus dans l'étude.

Le signe « * » indique une différence significative par rapport au groupe TF ($p \leq 0,05$)

(NS= non significatif)

2-Analyse en Immunofluorescence :

2.1-Distribution de la PLC ζ chez les témoins fertiles

Chez les 17 hommes fertiles ayant participé à l'étude, la PLC ζ était exprimée en moyenne par 82% des spermatozoïdes avec des taux allant de 76 à 93% selon les témoins (tableau 5).

	A	A+E	A+E+PA	A+PA	E	E+PA	PA	Total (%)
1	11	2	15	10	15	15	6	93
2	12	7	1	5	21	11	20	77
3	12	18	13	18	14	7	5	87
4	9	15	5	11	25	10	7	82
5	2	18	2	6	16	21	19	84
6	17	10	3	4	26	11	8	79
7	11	17	5	11	18	7	13	82
8	11	9	5	4	18	15	20	82
9	33	28	11	9	1	0	2	84
10	9	8	8	7	17	26	11	86
11	5	10	4	6	21	16	15	77
12	9	13	9	12	16	18	9	83
13	7	1	3	3	22	20	12	78
14	18	10	3	11	17	9	10	78
15	10	8	4	5	18	19	13	76
16	25	11	5	7	19	5	9	81
17	9	10	5	9	17	15	15	80
Moyenne	11,9	11,9	6,2	8,4	17,6	13,3	11,2	82
SD	7,4	7,0	4,3	4,1	6,0	6,8	5,7	4,5

Tableau 5 : Expression et distribution de la PLC ζ dans les spermatozoïdes des témoins fertiles (groupe TF)

Concernant la localisation de la protéine dans la tête du spermatozoïde, l'analyse en immunofluorescence a permis de mettre en évidence une fluorescence dans les régions acrosomique, équatoriale, et post-acrosomique, avec de possibles associations définissant sept profils de localisation (figures 12 et 13).

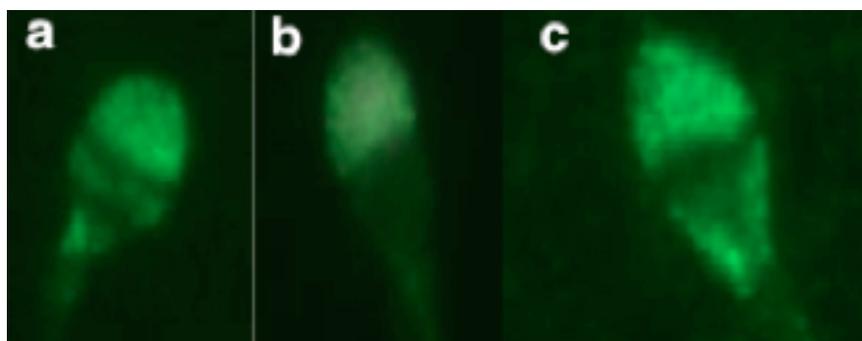


Figure 12 : Localisation de la PLC ζ dans la tête du spermatozoïde. a) A+E+PA. b) A. c) A+PA. (objectif x63)
(Fluorescence verte : Anticorps-anti PLC ζ ,)

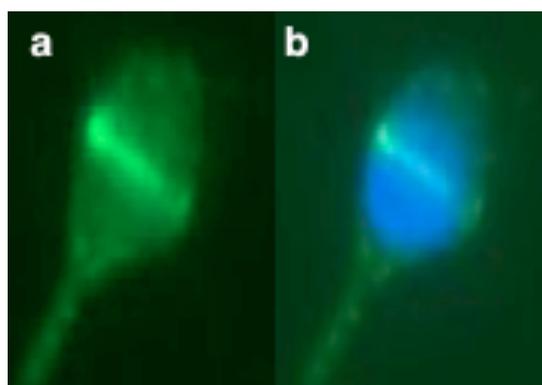


Figure 13 : Expression équatoriale de la PLC ζ a) Marquage équatoriale après utilisation de l'anticorps anti- PLC ζ . b) Image de superposition anticorps anti- PLC ζ + DAPI (objectif x63)
(Fluorescence verte : Anticorps-anti PLC ζ , fluorescence bleue : HOESCHT)

L'analyse des résultats sur les 17 témoins selon les sept profils de localisation décrits par Kashir a montré une prédominance de formes équatoriales isolées (17,6 +/- 6%) avec une grande variabilité à l'échelle individuelle ne permettant pas de mettre en évidence un profil typique (Tableau 5)

L'analyse du pourcentage global d'expression des formes A, E et PA montre une prédominance des formes équatoriales (isolées ou associées à d'autres formes) chez 13/17

témoins. De plus, un taux supérieur ou égal à 39% de formes équatoriales a été mis en évidence chez tous les témoins (figure 14)

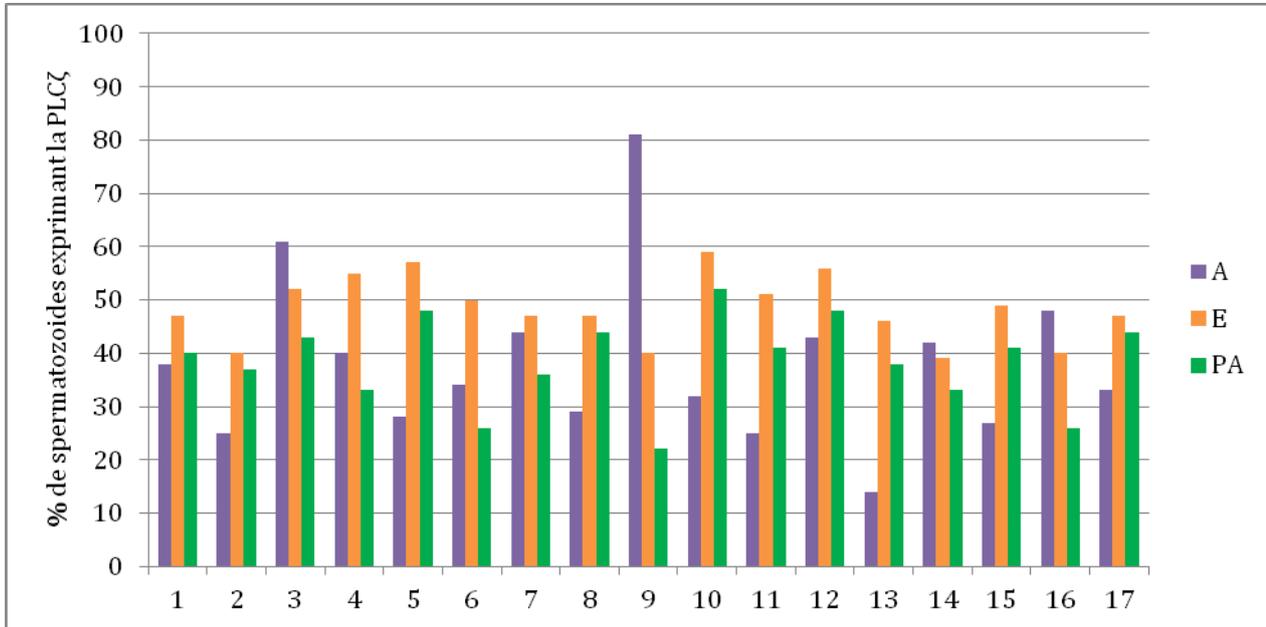


Figure 14 : Distribution de la PLCζ dans les spermatozoïdes des témoins fertiles (groupe TF)

2.2- distribution de la PLCζ chez les patients infertiles

Chez les 7 patients présentant une infertilité idiopathique, la PLCζ était exprimée dans 79% des spermatozoïdes en moyenne (72-89%). 5 patients sur 6 avaient une prédominance de formes équatoriales avec un minimum de 47%. Le patient restant (ID5) présentait quant à lui une prédominance de formes acrosomiques mais 30% de ses spermatozoïdes exprimaient néanmoins la protéine en région équatoriale (figure 15).

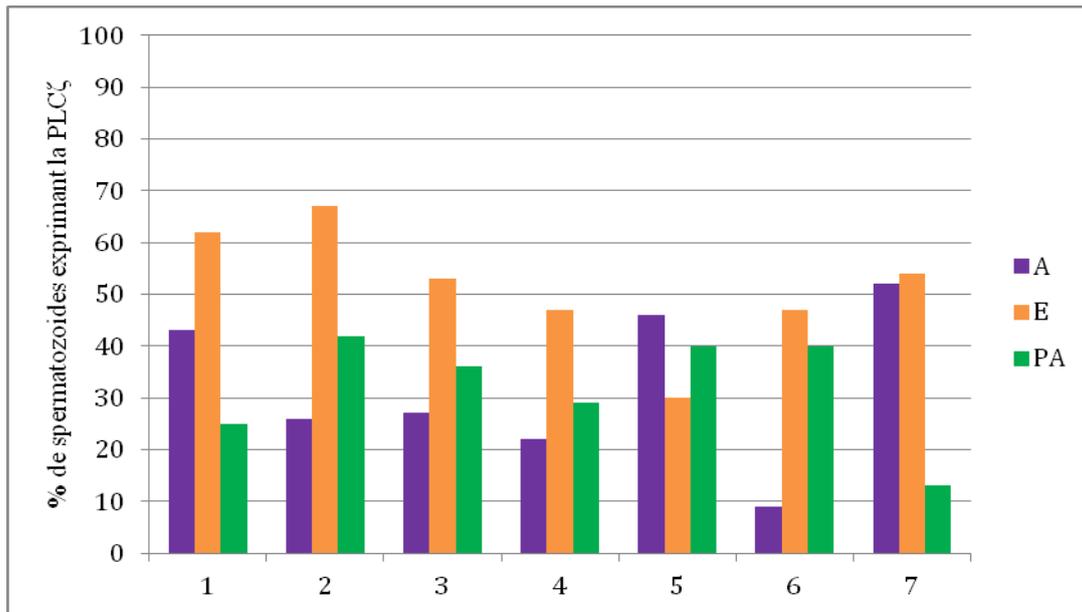


Figure 15 : Distribution de la PLCζ chez les patients du groupe ID

Chez les 6 patients du groupe EF, en moyenne 76% des spermatozoïdes exprimaient la PLCζ (68-92%). Les deux patients ayant un antécédent d'échec complet de fécondation en ICSI (EF1, EF2) présentaient une prédominance de formes équatoriales. Chez les 4 patients ayant un antécédent d'échec ou de paucifécondation en FIV classique, la forme acrosomique prédominait. 3 d'entre eux (EF3, EF4 et EF6) présentaient un déficit en formes équatoriales ($\leq 30\%$), dont 2 sévères ($\leq 10\%$) (Figure 16).

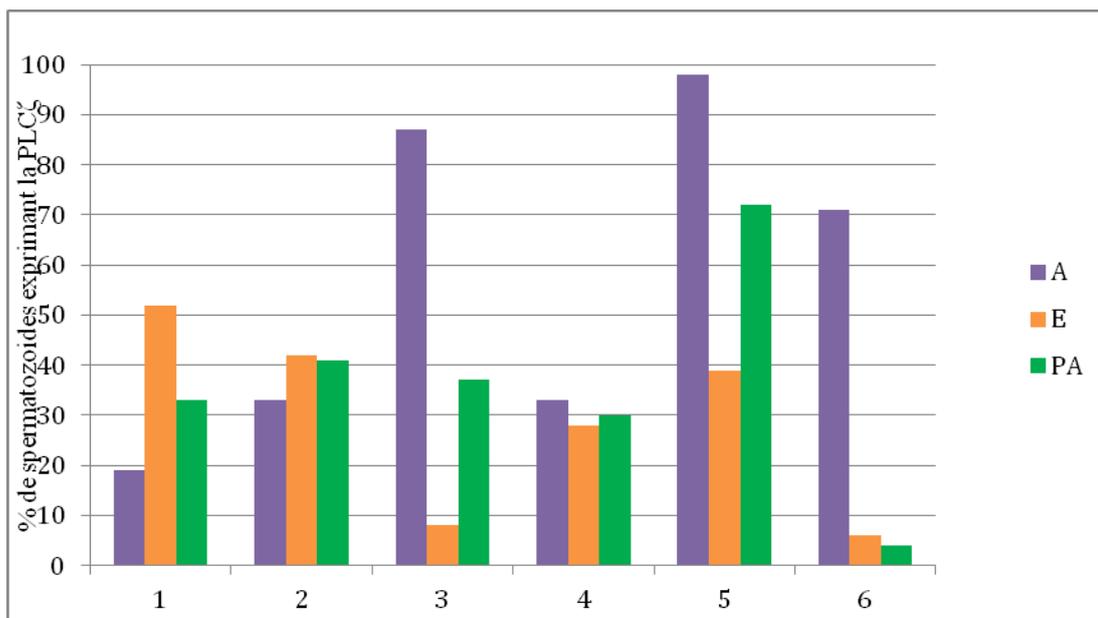


Figure 16 : Distribution de la PLCζ chez les patients du groupe EF

	A	A+E	A+E+PA	A+PA	E	E+PA	PA	Total
ID1	15	21	3	4	26	12	6	87%
ID2	7	13	5	1	26	23	13	89%
ID3	8	11	2	6	22	18	10	77%
ID4	11	8	0	3	26	13	13	73%
ID5	17	8	4	17	12	6	13	77%
ID6	3	3	2	1	25	17	20	72%
ID7	24	19	7	2	26	2	2	82%
Moyenne	12,4	10,2	3,6	4,8	23,0	12,2	12,2	79%
SD	7,6	5,4	2,5	6,2	5,5	7,9	5,8	6%
EF1	3	6	5	5	30	11	12	72%
EF2	5	7	10	11	15	10	10	68%
EF3	49	5	1	32	1	1	3	92%
EF4	17	4	4	8	11	9	9	62%
EF5	27	5	11	55	0	1	5	84%
EF6	66	2	0	3	3	1	0	75%
Moyenne	27,8	4,8	5,2	19,0	10,0	5,5	6,5	76%
SD	25,1	1,7	4,5	20,5	11,5	5,0	4,6	10,9%

Tableau 6 : Expression et distribution de la PLC ζ dans les spermatozoïdes des patients infertiles

3- Etude comparative :

L'analyse de la proportion de spermatozoïdes exprimant la PLC ζ ne montrait pas de différence significative entre les deux groupes de patients et le groupe contrôle (figure 17). En moyenne 82% des spermatozoïdes exprimaient la protéine chez les sujets du groupe TF contre 79% chez les patients du groupe ID ($p=0,45$) et 76% chez les patients du groupe EF ($p= 0,22$).

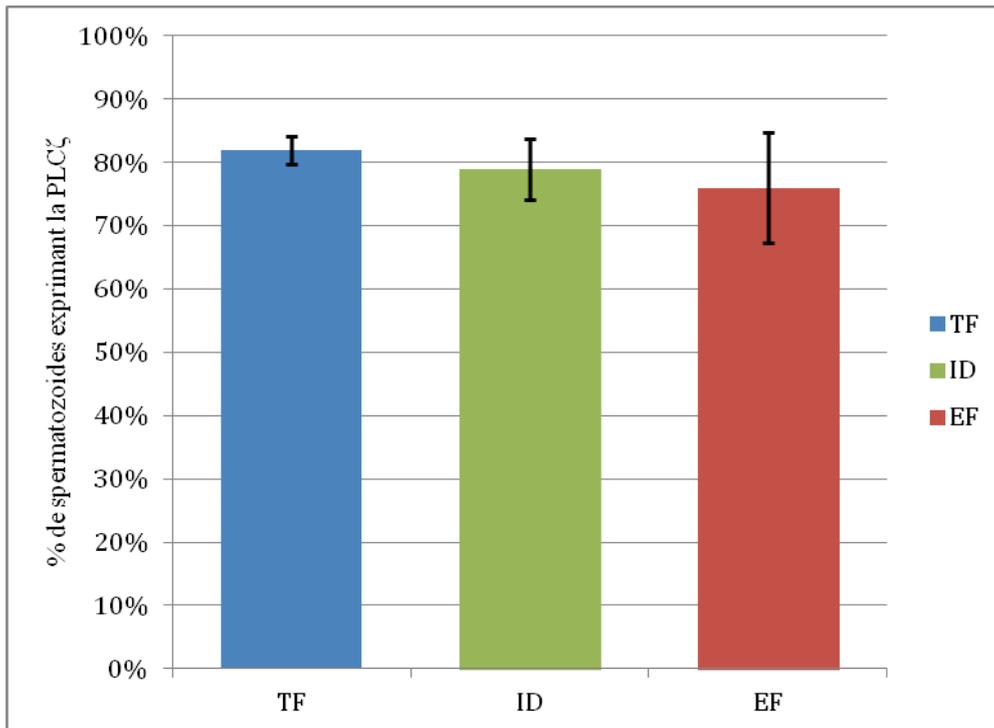


Figure 1 : Proportion de spermatozoïdes exprimant la PLCζ dans les trois groupes

L'analyse comparative des profils de localisation de la PLCζ montre une distribution comparable entre les témoins et les patients du groupe ID avec une prédominance de formes équatoriales (figure 18).

Le profil de localisation de la protéine chez les patients du groupe EF montre une diminution significative des formes équatoriales comparativement aux témoins ($p \leq 0,05$). Les différences mises en évidence au niveau des autres localisations n'étaient pas statistiquement significatives.

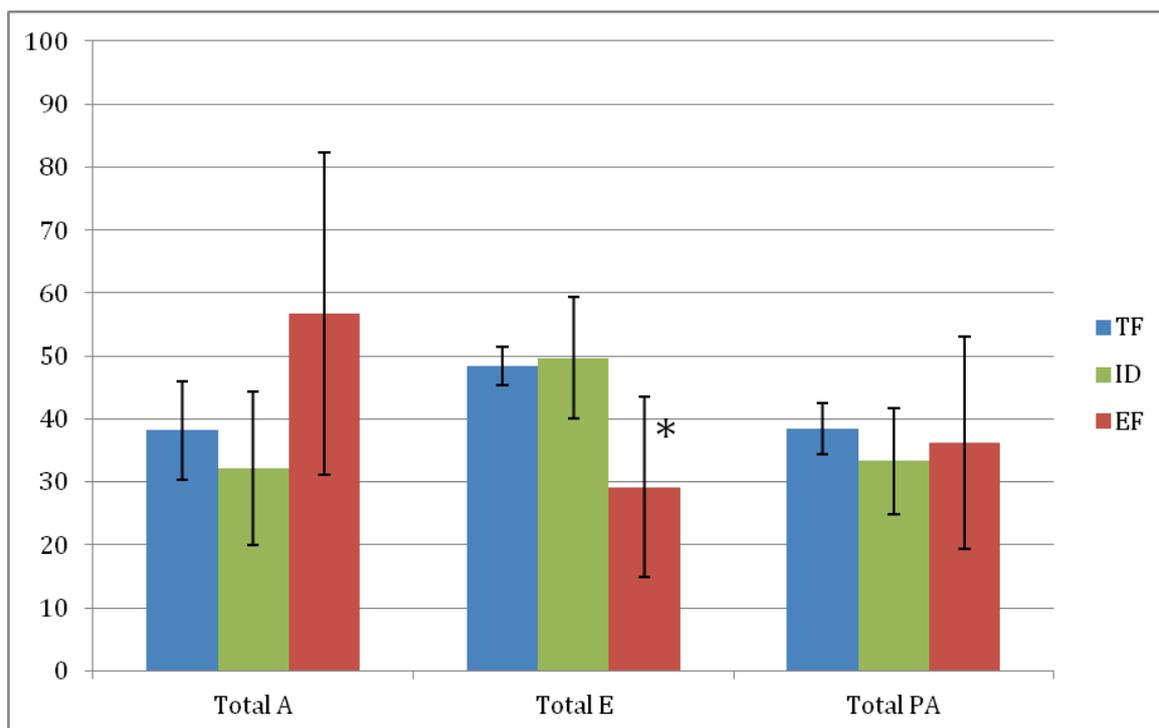


Figure 28 : Profils de localisation de la PLC ζ dans les trois groupes.
(L'astérisque noir indique une différence significative par rapport au groupe TF ($p \leq 0,05$))

Toutes les analyses en immunofluorescence ont été réalisées sur sperme frais. Initialement, l'utilisation de sperme congelé avait été envisagée pour des raisons pratiques d'organisation. Cependant, l'analyse comparative avant / après congélation chez trois témoins tests a montré une diminution importante de la proportion de spermatozoïdes exprimant la PLC ζ , ainsi que de l'intensité de la fluorescence rendant impossible l'analyse des localisations (tableau 6).

	Avant congélation	Après congélation
TF1	93%	51%
TF2	77%	58%
TF3	87%	64%

Tableau 6 : Proportion de spermatozoïdes exprimant la (PLC ζ) avant et après congélation

4-Prise en charge des couples des groupes ID et EF

4.1- Issues des tentatives pour les couples du groupe ID

Parmi les 7 couples inclus dans ce groupe, deux ont été pris en charge en IAC, la première tentative n'ayant pas donné de grossesse. Un couple a été pris en charge en FIV, aboutissant à un taux de fécondation de 69%. Les autres couples étaient toujours en attente de prise en charge.

4.2- Issues des tentatives pour les couples du groupe EF

Parmi les 6 couples inclus dans ce groupe, 4 avaient un antécédent d'échec ou de paucifécondation en FIV classique. Deux de ces couples ont bénéficié d'une tentative d'ICSI par la suite, ayant permis d'obtenir des taux de fécondation optimaux (100%), et une grossesse débutante chez un d'entre eux (EF3). Les deux couples restants avaient un antécédent de pauci-fécondation en FIV et en ICSI au moment de l'étude. La réalisation d'une IMSI lors de la tentative suivante n'a pas permis d'améliorer les taux de fécondation (Tableau 7).

	Technique	Taux de fécondation	Issue
EF1	IMSI	0%	-
EF2	IMSI	0%	-
EF3	ICSI	100%	Grossesse débutante
EF4	ICSI	100%	Pas de grossesse
EF5	En attente de programmation		
EF6	En attente de programmation		

Tableau 1 : Issues de la tentative suivante pour les patients du groupe EF

Discussion

Plusieurs études ont montré qu'une diminution significative de l'expression ou la présence de formes anormales de la PLC ζ étaient associées à des cas d'infertilité masculine (2,3,60,70).

Ces études viennent confirmer l'importance de la PLC ζ , non seulement comme agent thérapeutique potentiel pour le traitement de ces infertilités, mais également comme marqueur pronostique de la capacité du spermatozoïde à activer l'ovocyte.

Dans la littérature, la PLC ζ semble s'exprimer principalement au niveau du segment équatorial de la tête du spermatozoïde humain, avec une expression moins importante dans les régions acrosomique et post-acrosomique (1). Une étude n'a retrouvé aucun profil dominant dans le groupe contrôle mais une prédominance de formes post-acrosomiques dans le groupe des échecs complets de fécondation en ICSI (60). De plus, une étude récente de la même équipe a montré une corrélation entre la localisation de la PLC ζ et les faibles taux de fécondation en ICSI (3). Cependant, le lien entre ces différentes localisations et la fertilité ou l'infertilité n'est toujours pas clair.

Principaux résultats de l'étude :

Dans notre étude, nous avons tout d'abord cherché à définir la proportion de spermatozoïdes exprimant la PLC ζ chez l'homme fertile. Il s'agit à notre connaissance de la première étude évaluant l'expression de cette protéine sur le sperme frais d'une population constituée exclusivement d'hommes ayant fait preuve de leur fertilité. L'analyse en immunofluorescence a permis d'établir qu'en moyenne 82% des spermatozoïdes sélectionnés après TMS exprimaient cette protéine.

Ce taux semble cohérent avec les résultats de la littérature (60,71).

Nous n'avons cependant pas mis en évidence de différence statistiquement significative en termes de proportion de spermatozoïdes exprimant la PLC ζ entre tes témoins et nos deux groupes de patients.

Concernant la localisation de la PLC ζ dans le spermatozoïde, nous n'avons pas retrouvé de distribution typique chez les témoins fertiles selon les sept profils de localisation décrits par Kashir. Cependant, en analysant les résultats en termes d'expression globale des trois localisations typiques (acrosomique, équatoriale et post-acrosomique), il semble que la localisation équatoriale prédomine chez la majorité des témoins (13/17). Les quatre autres

témoins présentait néanmoins plus de 39% de formes équatoriales. Nous avons observé une distribution similaire dans le groupe des infertilités inexplicables (groupe ID). Par contre, dans le groupe EF, la moitié des patients (3/6) présentait un déficit en formes équatoriales ($\leq 30\%$) dont deux sévères ($\leq 10\%$). On pourrait donc envisager qu'un déficit en formes équatoriales soit associé à une diminution du potentiel fécondant du spermatozoïde. Il a d'une part été démontré que le segment équatorial du spermatozoïde demeurait intact après la réaction acrosomique (72). De plus, avant la fusion des gamètes, le spermatozoïde se fixe sur l'ovocyte tangentiellement par sa région équatoriale, les formes équatoriales de PLC ζ seraient donc celles qui auraient l'accès le plus rapide au cytoplasme de l'ovocyte et joueraient donc un rôle crucial dans l'activation de celui-ci (62). La prédominance de formes équatoriales chez les témoins et le déficit - parfois sévère - chez les patients du groupe ayant présenté un échec de fécondation en FIV classique sont deux résultats de notre étude qui vont dans le sens de cette hypothèse. Un résultat similaire avait été observé dans une autre étude (60).

Absence d'évaluation de l'intensité de fluorescence :

Nous avons fait le choix de ne pas utiliser l'intensité de fluorescence comme critère d'évaluation de l'expression de la PLC ζ dans notre étude. Une série de 2013 portant sur 16 témoins montrait en effet une grande variabilité dans l'intensité de fluorescence entre les sujets avec une intensité parfois très faible malgré une proportion de spermatozoïdes positifs conservée (60). Dans une étude récente, Kashir a proposé d'ajouter une étape supplémentaire au protocole d'immunofluorescence consistant à démasquer les sites antigéniques de la PLC ζ , rendant la protéine plus accessible à l'anticorps (73). Les résultats montrent une nette amélioration de l'intensité de fluorescence mais toujours autant de variabilité entre les sujets. La proportion de spermatozoïdes positifs ainsi que les profils de localisations semblaient par contre plus homogènes et performants pour évaluer l'expression de la protéine (60).

Expression de la PLC ζ après congélation :

Comme nous l'avons expliqué précédemment, les résultats obtenus sur les trois échantillons après congélation nous ont obligés à travailler uniquement sur sperme frais. Kashir a montré une diminution de l'intensité de fluorescence après congélation (71), mais aucune donnée n'a pour l'instant été publiée sur la proportion de spermatozoïdes exprimant la PLC ζ ni sur les profils de localisation dans ce contexte. Compte tenu des résultats obtenus chez nos trois

témoins, il serait intéressant d'étudier l'expression et les profils de localisation de la PLC ζ après congélation sur de plus grandes cohortes.

Fluorescence des flagelles :

Nous avons observé de façon assez fréquente une fluorescence - de faible intensité - au niveau des flagelles, associée ou non aux localisations précédemment décrites. D'autres études ont rapporté des résultats similaires, évoquant notamment un manque de spécificité de l'anticorps anti-PLC ζ utilisé du à sa nature polyclonale (1,55). Le développement d'un anticorps monoclonal plus spécifique constitue un enjeu majeur de la recherche en ce qui concerne le développement d'un outil diagnostique fiable et performant permettant le dépistage des déficits en PLC ζ . Ceci permettra également de comprendre si cette fluorescence au niveau du flagelle est effectivement artefactuelle ou si, à l'instar de certaines espèces animales, le flagelle constitue chez l'homme un réservoir de PLC ζ (59).

Le rôle de l'ovocyte dans les échecs de fécondation :

Nous nous sommes intéressés dans cette étude à la responsabilité du spermatozoïde dans les échecs de fécondation. En effet, environ 40% des échecs d'ICSI sont attribuables à un défaut d'activation ovocytaire (24,74), mais un échec de fécondation en ICSI peut être multifactoriel, et peut avoir en partie une origine ovocytaire. La qualité ovocytaire joue en effet un rôle important dans les processus de fécondation et d'activation ovocytaire. La machinerie cellulaire doit être intacte pour que la PLC ζ puisse jouer son rôle. Une anomalie de toute autre molécule impliquée dans la cascade de signalisation de l'activation ovocytaire comme l'IP₃-R pourrait avoir les mêmes conséquences qu'un déficit en PLC ζ .

Une étude a d'ailleurs montré que la vitrification ovocytaire avait un impact sur la distribution des récepteurs à l'IP₃ avec un effet délétère sur l'activité oscillatoire calcique et le développement embryonnaire. Ceci pourrait expliquer les mauvais taux de blastulation après ICSI utilisant des ovocytes vitrifiés (75).

Le fait que les deux patients ayant un antécédent d'échec complet de fécondation en ICSI (EF1 et EF2) aient une expression normale de la PLC ζ , comparable aux témoins - tant en termes de proportion de spermatozoïdes qu'en termes de localisation - conforte l'idée selon laquelle un défaut d'activation ovocytaire n'est pas seulement imputable au spermatozoïde.

De plus, un échec de fécondation en FIV classique est souvent un évènement isolé. La tentative suivante permettra d'obtenir un nombre suffisant d'embryons dans 70% des cas (76). En pratique, le passage en ICSI par mesure de précaution permet en général d'obtenir des taux de fécondation normaux.

La majorité des études évaluant le rôle de la PLC ζ dans les échecs de fécondation présentent un biais de confusion dû à l'utilisation des ovocytes du couple lors des tentatives d'ICSI, ne permettant pas de s'affranchir d'un éventuel facteur ovocytaire. Il est en effet difficile d'affirmer avec certitude la responsabilité du spermatozoïde dans l'échec de fécondation sans avoir aucune indication sur la qualité des ovocytes de la conjointe. L'idéal serait de confirmer le défaut d'activation ovocytaire par un test de hamster par exemple avant de rechercher un déficit en PLC ζ (2).

Limites de l'étude :

La principale limite de notre étude a été le nombre de sujets inclus.

Il est en effet difficile de tirer des conclusions sur des petits effectifs et d'extrapoler les résultats aux populations de patients fertiles et infertiles. Dans les infertilités inexplicées, nous savons que l'incidence des échecs complets de fécondation est plus importante, atteignant parfois 25% selon les séries (4). Le fait de dépister un déficit en PLC ζ chez ces couples permettrait d'anticiper ces situations. Cependant, la probabilité de dépister un déficit chez un couple ayant 25% de risque d'échec de fécondation, et que cet échec soit imputable à un déficit ou à une anomalie de la PLC ζ est relativement faible. Il faudrait alors un grand nombre de patients pour arriver à mettre en évidence des anomalies. Néanmoins, les résultats obtenus pourront servir de données préliminaires à la réalisation d'études multicentriques permettant l'inclusion d'un plus grand nombre de témoins et de patients.

Dans sa série de 2009, Heytens décrivait un déficit en formes équatoriales chez le patient présentant les mutations H398P et H233L. Dans notre étude, nous n'avons pas réalisé d'analyse génétique à la recherche de mutations pouvant être associées aux anomalies d'expression de la protéine. De plus, il se pourrait que des mutations dans la séquence du gène de la PLC ζ conduisent à la synthèse d'une protéine non fonctionnelle et donc à un déficit purement qualitatif qui passerait inaperçu en immunofluorescence. Des études analysant le gène de la PLC ζ chez les patients pour qui un défaut d'activation ovocytaire est suspecté permettraient d'étayer cette hypothèse.

D'autre part, il aurait été intéressant d'évaluer le statut acrosomique des spermatozoïdes analysés. Il semblerait que la capacitation et la réaction acrosomique aient un impact sur la localisation de la PLC ζ . Grasa observait en effet une modification du profil de localisation de la PLC ζ lorsqu'il induisait la capacitation et la réaction acrosomique *in-vitro*, avec une nette diminution des formes acrosomiques au profit des formes équatoriales et post-acrosomiques (1). Nous pourrions alors supposer que cette augmentation de la proportion des formes acrosomiques chez certains patients de notre étude serait en lien avec un défaut de capacitation ou de réaction acrosomique et non à un déficit en formes équatoriales de PLC ζ . L'obtention ultérieure de taux de fécondation normaux en ICSI chez les patients EF3 et EF4 va aussi dans le sens de cette hypothèse. La section du flagelle avant l'ICSI permet en effet d'induire la réaction acrosomique.

La population de PLC ζ acrosomique pourrait d'ailleurs jouer un rôle dans la réaction acrosomique comme le laissent à penser certaines études (1,52). Aghajanzpour suggérait que cette localisation acrosomique était indépendante de l'ARNm de PLC ζ (77). La réduction de l'expression de l'ARNm PLC ζ chez les patients globozoospermiques aurait donc une autre cause que l'absence d'acrosome (72). Cependant, compte tenu du fait que la réaction acrosomique se produit en amont de la fusion des gamètes, des investigations spécifiques sont nécessaires avant d'affirmer avec certitude le rôle de la PLC ζ acrosomique dans la fécondation (78).

Perspectives :

Les nombreux travaux de recherche concernant la PLC ζ qui ont été menés ces dernières années viennent confirmer l'importance de cette protéine non seulement comme agent thérapeutique potentiel pour le traitement de ces infertilités, mais également comme marqueur pronostique de la capacité du spermatozoïde à activer l'ovocyte.

La compréhension des rôles respectifs des différentes populations de PLC ζ est une étape indispensable avant d'envisager l'utilisation de cette protéine à des fins thérapeutiques, et devrait constituer un des enjeux majeurs de la recherche sur la PLC ζ .

La « PLC ζ de sauvetage » après échec de fécondation en ICSI nécessite des investigations supplémentaires pour s'assurer de l'innocuité de cette technique et de l'absence de risque concernant le développement embryonnaire. Cette approche semble prometteuse, notamment depuis des travaux récents dans lesquels un développement embryonnaire jusqu'au stade

blastocyste a été obtenu grâce à cette technique (79). En parallèle de cela, l'impact d'une co-injection spermatozoïde/ PLC ζ -rh devrait être comparé à une ICSI conventionnelle chez les couples ayant des antécédents d'échec ou de pauci-fécondation en ICSI dans l'espoir d'améliorer les taux de fécondation.

Conclusion

En conclusion, nous avons montré que chez l'homme fertile, la PLC ζ était exprimée en moyenne par 82% des spermatozoïdes et principalement en région équatoriale avec au minimum 39% des spermatozoïdes exprimant la protéine dans cette région. Chez les patients présentant une infertilité inexplicée, l'expression de la protéine semble comparable à celle des témoins dans la limite du nombre de patients inclus. L'échec de fécondation en FIV peut être associé à des anomalies de localisation de la PLC ζ notamment par un déficit en formes équatoriales, empêchant une diffusion correcte de la protéine au sein du cytoplasme ovocytaire. Ces résultats montrent l'importance d'étudier précisément la localisation de la PLC ζ en plus de son niveau d'expression. Cependant, il est difficile de tirer des conclusions sur de faibles effectifs et seules des investigations faites sur de plus larges cohortes pourront confirmer ces résultats.

Références bibliographiques

1. Grasa P, Coward K, Young C, Parrington J. The pattern of localization of the putative oocyte activation factor, phospholipase C zeta, in uncapacitated, capacitated, and ionophore-treated human spermatozoa. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2008 Nov;23(11):2513–22.
2. Heytens E, Parrington J, Coward K, Young C, Lambrecht S, Yoon S-Y, et al. Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLCzeta) in spermatozoa from infertile men. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2009 Oct;24(10):2417–28.
3. Yelumalai S, Yeste M, Jones C, Amdani SN, Kashir J, Mounce G, et al. Total levels, localization patterns, and proportions of sperm exhibiting phospholipase C zeta are significantly correlated with fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2015 Sep;104(3):561–568.e4.
4. Johnson LNC, Sasson IE, Sammel MD, Dokras A. Does intracytoplasmic sperm injection improve the fertilization rate and decrease the total fertilization failure rate in couples with well-defined unexplained infertility? A systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2013 Sep;100(3):704–11.
5. Taylor SL, Yoon SY, Morshedi MS, Lacey DR, Jellerette T, Fissore RA, et al. Complete globozoospermia associated with PLC ζ deficiency treated with calcium ionophore and ICSI results in pregnancy. *Reprod Biomed Online*. 2010 Apr;20(4):559–64.
6. Yoon S-Y, Eum JH, Lee JE, Lee HC, Kim YS, Han JE, et al. Recombinant human phospholipase C zeta 1 induces intracellular calcium oscillations and oocyte activation in mouse and human oocytes. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2012 Jun;27(6):1768–80.
7. Ray A, Shah A, Gudi A, Homburg R. Unexplained infertility: an update and review of practice. *Reprod Biomed Online*. 2012 Jun;24(6):591–602.
8. Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod Oxf Engl*. 1991 Jul;6(6):811–6.
9. Collins JA, Rowe TC. Age of the female partner is a prognostic factor in prolonged unexplained infertility: a multicenter study. *Fertil Steril*. 1989 Jul;52(1):15–20.
10. Kallen CB, Arici A. Immune testing in fertility practice: truth or deception? *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2003 Jun;15(3):225–31.
11. Thum MY, Bhaskaran S, Bansal AS, Shehata H, Ford B, Sumar N, et al. Simple enumerations of peripheral blood natural killer (CD56+ NK) cells, B cells and T cells have no predictive value in IVF treatment outcome. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2005 May;20(5):1272–6.
12. Matsubayashi H, Hosaka T, Sugiyama Y, Suzuki T, Arai T, Kondo A, et al. Increased natural killer-cell activity is associated with infertile women. *Am J Reprod Immunol N Y N*

1989. 2001 Nov;46(5):318–22.

13. Stephenson MD, Fluker MR. Treatment of repeated unexplained in vitro fertilization failure with intravenous immunoglobulin: a randomized, placebo-controlled Canadian trial. *Fertil Steril*. 2000 Dec;74(6):1108–13.
14. Somigliana E, Paffoni A, Busnelli A, Filippi F, Pagliardini L, Vigano P, et al. Age-related infertility and unexplained infertility: an intricate clinical dilemma. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2016 Jul;31(7):1390–6.
15. Hughes EG. The effectiveness of ovulation induction and intrauterine insemination in the treatment of persistent infertility: a meta-analysis. *Hum Reprod*. 1997 Sep 1;12(9):1865–72.
16. Pandian Z, Gibreel A, Bhattacharya S. In vitro fertilisation for unexplained subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Apr 18;(4):CD003357.
17. Aboulghar M, Mansour R, Serour G, Abdrazek A, Amin Y, Rhodes C. Controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination for treatment of unexplained infertility should be limited to a maximum of three trials. *Fertil Steril*. 2001 Jan 1;75(1):88–91.
18. Nuojuua-Huttunen S, Tomas C, Bloigu R, Tuomivaara L, Martikainen H. Intrauterine insemination treatment in subfertility: an analysis of factors affecting outcome. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1999 Mar;14(3):698–703.
19. Crosignani PG, Walters DE, Soliani A. The ESHRE multicentre trial on the treatment of unexplained infertility: a preliminary report. *European Society of Human Reproduction and Embryology*. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1991 Aug;6(7):953–8.
20. Goverde AJ, McDonnell J, Vermeiden JP, Schats R, Rutten FF, Schoemaker J. Intrauterine insemination or in-vitro fertilisation in idiopathic subfertility and male subfertility: a randomised trial and cost-effectiveness analysis. *The Lancet*. 2000 Jan 1;355(9197):13–8.
21. Tsafirir A, Simon A, Margalioth EJ, Laufer N. What should be the first-line treatment for unexplained infertility in women over 40 years of age - ovulation induction and IUI, or IVF? *Reprod Biomed Online*. 2009;19 Suppl 4:4334.
22. Foong SC, Fleetham JA, O’Keane JA, Scott SG, Tough SC, Greene CA. A prospective randomized trial of conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in unexplained infertility. *J Assist Reprod Genet*. 2006 Mar 1;23(3):137–40.
23. Combelles CMH, Morozumi K, Yanagimachi R, Zhu L, Fox JH, Racowsky C. Diagnosing cellular defects in an unexplained case of total fertilization failure. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2010 Jul;25(7):1666–71.
24. Mahutte NG, Arici A. Failed fertilization: is it predictable? *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2003 Jun;15(3):211–8.
25. Baltaci V, Ayvaz OU, Unsal E, Aktaş Y, Baltaci A, Turhan F, et al. The effectiveness

of intracytoplasmic sperm injection combined with piezoelectric stimulation in infertile couples with total fertilization failure. *Fertil Steril*. 2010 Aug;94(3):900–4.

26. Kinzer DR, Barrett CB, Powers RD. Prognosis for clinical pregnancy and delivery after total fertilization failure during conventional in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2008 Aug;90(2):284–8.

27. Peultier A-S, Fréour T, Cazenave N, Barrière P. Les échecs de fécondation en FIV et en ICSI. /data/revues/03682315/v44i4/S0368231514001963/ [Internet]. 2015 Mar 18 [cited 2017 Jul 21]; Available from: <http://www.em-consulte.com/en/article/962720>

28. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2011 Jun;26(6):1270–83.

29. Plachot M. Echec total de fécondation. Comment l'interpréter ? Comment y remédier ? *lesjta*. 2004;

30. Plachot M, Selva J, Wolf JP, Bastit P, de Mouzon J. [Consequences of oocyte dysmorphism on the fertilization rate and embryo development after intracytoplasmic sperm injection. A prospective multicenter study]. *Gynecol Obstet Fertil*. 2002 Oct;30(10):772–9.

31. Reynier P, May-Panloup P, Chrétien MF, Morgan CJ, Jean M, Savagner F, et al. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Mol Hum Reprod*. 2001 May;7(5):425–9.

32. Boiso I, Veiga A, Edwards RG. Fundamentals of human embryonic growth in vitro and the selection of high-quality embryos for transfer. *Reprod Biomed Online*. 2002 Dec;5(3):328–50.

33. Pellestor F, Andréo B, Arnal F, Humeau C, Demaille J. Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. *Hum Genet*. 2003 Feb;112(2):195–203.

34. Verlinsky Y, Lerner S, Illkevitch N, Kuznetsov V, Kuznetsov I, Cieslak J, et al. Is there any predictive value of first polar body morphology for embryo genotype or developmental potential? *Reprod Biomed Online*. 2003 Oct;7(3):336–41.

35. Liu DY, Baker HW. Defective sperm-zona pellucida interaction: a major cause of failure of fertilization in clinical in-vitro fertilization. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2000 Mar;15(3):702–8.

36. Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*. 2005 Mar 10;434(7030):234–8.

37. Bianchi E, Doe B, Goulding D, Wright GJ. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature*. 2014 Apr 24;508(7497):483–7.

38. Stricker SA. Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Dev Biol*. 1999 Jul 15;211(2):157–76.

39. Miyazaki S, Shirakawa H, Nakada K, Honda Y. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev Biol*. 1993 Jul;158(1):62–78.
40. Swann K, Yu Y. The dynamics of calcium oscillations that activate mammalian eggs. *Int J Dev Biol*. 2008;52(5–6):585–94.
41. Jaffe LA. First messengers at fertilization. *J Reprod Fertil Suppl*. 1990;42:107–16.
42. Parrington J, Davis LC, Galione A, Wessel G. Flipping the switch: how a sperm activates the egg at fertilization. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat*. 2007 Aug;236(8):2027–38.
43. Dong JB, Tang TS, Sun FZ. *Xenopus* and chicken sperm contain a cytosolic soluble protein factor which can trigger calcium oscillations in mouse eggs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Feb 24;268(3):947–51.
44. Coward K, Ponting CP, Chang H-Y, Hibbitt O, Savolainen P, Jones KT, et al. Phospholipase C ζ , the trigger of egg activation in mammals, is present in a non-mammalian species. *Reprod Camb Engl*. 2005 Aug;130(2):157–63.
45. Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, et al. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca^{2+} oscillations in eggs and embryo development. *Dev Camb Engl*. 2002 Aug;129(15):3533–44.
46. Swann K. A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Dev Camb Engl*. 1990 Dec;110(4):1295–302.
47. Cox LJ, Larman MG, Saunders CM, Hashimoto K, Swann K, Lai FA. Sperm phospholipase C ζ from humans and cynomolgus monkeys triggers Ca^{2+} oscillations, activation and development of mouse oocytes. *Reprod Camb Engl*. 2002 Nov;124(5):611–23.
48. Yoneda A, Kashima M, Yoshida S, Terada K, Nakagawa S, Sakamoto A, et al. Molecular cloning, testicular postnatal expression, and oocyte-activating potential of porcine phospholipase C ζ . *Reprod Camb Engl*. 2006 Sep;132(3):393–401.
49. Ramadan WM, Kashir J, Jones C, Coward K. Oocyte activation and phospholipase C zeta (PLC ζ): diagnostic and therapeutic implications for assisted reproductive technology. *Cell Commun Signal CCS*. 2012 Jul 9;10(1):12.
50. Kashir J, Nomikos M, Lai FA, Swann K. Sperm-induced Ca^{2+} release during egg activation in mammals. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Aug 1;450(3):1204–11.
51. Swann K, Lai FA. Egg Activation at Fertilization by a Soluble Sperm Protein. *Physiol Rev*. 2016 Jan 1;96(1):127–49.
52. Young C, Grasa P, Coward K, Davis LC, Parrington J. Phospholipase C zeta undergoes dynamic changes in its pattern of localization in sperm during capacitation and the acrosome reaction. *Fertil Steril*. 2009 May;91(5 Suppl):2230–42.

53. Nomikos M, Elgmati K, Theodoridou M, Calver BL, Nounesis G, Swann K, et al. Phospholipase C ζ binding to PtdIns(4,5)P₂ requires the XY-linker region. *J Cell Sci.* 2011 Aug 1;124(Pt 15):2582–90.
54. Kouchi Z, Shikano T, Nakamura Y, Shirakawa H, Fukami K, Miyazaki S. The role of EF-hand domains and C2 domain in regulation of enzymatic activity of phospholipase C ζ . *J Biol Chem.* 2005 Jun 3;280(22):21015–21.
55. Kashir J, Konstantinidis M, Jones C, Lemmon B, Lee HC, Hamer R, et al. A maternally inherited autosomal point mutation in human phospholipase C zeta (PLC ζ) leads to male infertility. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2012 Jan;27(1):222–31.
56. Nomikos M, Elgmati K, Theodoridou M, Georgilis A, Gonzalez-Garcia JR, Nounesis G, et al. Novel regulation of PLC ζ activity via its XY-linker. *Biochem J.* 2011 Sep 15;438(3):427–32.
57. Nomikos M, Blayney LM, Larman MG, Campbell K, Rossbach A, Saunders CM, et al. Role of phospholipase C-zeta domains in Ca²⁺-dependent phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis and cytoplasmic Ca²⁺ oscillations. *J Biol Chem.* 2005 Sep 2;280(35):31011–8.
58. Fujimoto S, Yoshida N, Fukui T, Amanai M, Isobe T, Itagaki C, et al. Mammalian phospholipase C ζ induces oocyte activation from the sperm perinuclear matrix. *Dev Biol.* 2004 Oct 15;274(2):370–83.
59. Bedford-Guaus SJ, McPartlin LA, Xie J, Westmiller SL, Buffone MG, Roberson MS. Molecular Cloning and Characterization of Phospholipase C Zeta in Equine Sperm and Testis Reveals Species-Specific Differences in Expression of Catalytically Active Protein. *Biol Reprod.* 2011 Jul 1;85(1):78–88.
60. Kashir J, Jones C, Mounce G, Ramadan WM, Lemmon B, Heindryckx B, et al. Variance in total levels of phospholipase C zeta (PLC- ζ) in human sperm may limit the applicability of quantitative immunofluorescent analysis as a diagnostic indicator of oocyte activation capability. *Fertil Steril.* 2013 Jan;99(1):107–17.
61. Yu Y, Nomikos M, Theodoridou M, Nounesis G, Lai FA, Swann K. PLC ζ causes Ca²⁺ oscillations in mouse eggs by targeting intracellular and not plasma membrane PI(4,5)P₂. *Mol Biol Cell.* 2012 Jan 15;23(2):371–80.
62. Escoffier J, Yassine S, Lee HC, Martinez G, Delaroche J, Coutton C, et al. Subcellular localization of phospholipase C ζ in human sperm and its absence in DPY19L2-deficient sperm are consistent with its role in oocyte activation. *Mol Hum Reprod.* 2015 Feb;21(2):157–68.
63. Tavalae M, Kiani-Esfahani A, Nasr-Esfahani MH. Relationship between Potential Sperm Factors Involved in Oocyte Activation and Sperm DNA Fragmentation with Intra-Cytoplasmic Sperm Injection Clinical Outcomes. *Cell J Yakhteh.* 2017;18(4):588–96.
64. Janghorban-Laricheh E, Ghazavi-Khorasgani N, Tavalae M, Zohrabi D, Abbasi H,

Nasr-Esfahani MH. An association between sperm PLC ζ levels and varicocele? *J Assist Reprod Genet.* 2016 Dec;33(12):1649–55.

65. Ferrer-Vaquero A, Barragan M, Freour T, Vernaev V, Vassena R. PLC ζ sequence, protein levels, and distribution in human sperm do not correlate with semen characteristics and fertilization rates after ICSI. *J Assist Reprod Genet.* 2016 Jun;33(6):747–56.

66. Nomikos M, Stamatiadis P, Sanders JR, Beck K, Calver BL, Buntwal L, et al. Male infertility-linked point mutation reveals a vital binding role for the C2 domain of sperm PLC ζ . *Biochem J.* 2017 Mar 7;474(6):1003–16.

67. Rogers NT, Hobson E, Pickering S, Lai FA, Braude P, Swann K. Phospholipase C ζ causes Ca $^{2+}$ oscillations and parthenogenetic activation of human oocytes. *Reprod Camb Engl.* 2004 Dec;128(6):697–702.

68. Spadafora C. Endogenous reverse transcriptase: a mediator of cell proliferation and differentiation. *Cytogenet Genome Res.* 2004;105(2–4):346–50.

69. Nomikos M, Yu Y, Elgmati K, Theodoridou M, Campbell K, Vassilakopoulou V, et al. Phospholipase C ζ rescues failed oocyte activation in a prototype of male factor infertility. *Fertil Steril.* 2013 Jan;99(1):76–85.

70. Yoon S-Y, Jellerette T, Salicioni AM, Lee HC, Yoo M, Coward K, et al. Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca $^{2+}$ release and are unable to initiate the first step of embryo development. *J Clin Invest.* 2008 Nov 3;118(11):3671–81.

71. Kashir J, Heynen A, Jones C, Durrans C, Craig J, Gadea J, et al. Effects of cryopreservation and density-gradient washing on phospholipase C zeta concentrations in human spermatozoa. *Reprod Biomed Online.* 2011 Aug;23(2):263–

72. Wolkowicz MJ, Shetty J, Westbrook A, Klotz K, Jayes F, Mandal A, et al. Equatorial Segment Protein Defines a Discrete Acrosomal Subcompartment Persisting Throughout Acrosomal Biogenesis. *Biol Reprod.* 2003 Sep 1;69(3):735–45.

73. Kashir J, Buntwal L, Nomikos M, Calver BL, Stamatiadis P, Ashley P, et al. Antigen unmasking enhances visualization efficacy of the oocyte activation factor, phospholipase C zeta, in mammalian sperm. *Mol Hum Reprod.* 2017 Jan;23(1):54–67.

74. Amdani SN, Jones C, Coward K. Phospholipase C zeta (PLC ζ): oocyte activation and clinical links to male factor infertility. *Adv Biol Regul.* 2013 Sep;53(3):292–308.

75. Kim BY, Yoon S-Y, Cha SK, Kwak KH, Fissore RA, Parys JB, et al. Alterations in calcium oscillatory activity in vitrified mouse eggs impact on egg quality and subsequent embryonic development. *Pflugers Arch.* 2011 May;461(5):515–26.

76. Barlow P, Englert Y, Puissant F, Lejeune B, Delvigne A, Van Rysselberge M, et al. Fertilization failure in IVF: why and what next? *Hum Reprod Oxf Engl.* 1990 May;5(4):451–6.

77. Aghajanianpour, Ghaedi K, Salamian A, Deemeh MR, Tavalaei M, Moshtaghian J, et al. Quantitative expression of phospholipase C zeta, as an index to assess fertilization potential of

a semen sample. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2011 Nov;26(11):2950–6.

78. Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba SA, et al. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 22;108(12):4892–6.

79. Sanusi R, Yu Y, Nomikos M, Lai FA, Swann K. Rescue of failed oocyte activation after ICSI in a mouse model of male factor infertility by recombinant phospholipase C ζ . *Mol Hum Reprod*. 2015 Oct;21(10):783–91.

Annexes

**EXPRESSION ET PROFILS DE LOCALISATION DE LA
PHOSPHOLIPASE C ZETA (PLC ζ) DANS LES SPERMATOZOÏDES
D'HOMMES FERTILES ET INFERTILES**

INVESTIGATEURS COORDONNATEURS

Pr Clément JIMENEZ, PU-PH

Dr Lucie CHANSEL-DEBORDEAUX PHC,

Réda BENMANSOUR, Interne

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

Place Amélie Raba-Léon 33 000 Bordeaux

Tel : 05 56 79 56 81

E-mail : reda.benmansour@chu-bordeaux.fr

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 projet de recherche qui a pour but de mieux connaître le fonctionnement du spermatozoïde et les causes de l'infertilité masculine. Ces recherches comportent l'analyse de caractéristiques protéiques en rapport avec le pouvoir fécondant du spermatozoïde.

Toutes ces recherches seront réalisées dans le strict respect de la loi Jardé relative aux recherches impliquant la personne humaine (décret n° 2016-1537 du 16 novembre 2016, publié JORF le 17 novembre 2016).

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 » :

Note d'information au patient

Titre de l'étude : « Expression et profil de localisation de la *Phospholipase C zêta* dans les spermatozoïdes d'hommes fertiles et infertiles ».

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

Monsieur,

Vous avez rendez-vous dans notre centre pour réaliser un recueil de sperme dans le cadre d'un projet de recherche. Nous souhaiterions analyser précisément vos spermatozoïdes pour en évaluer le pouvoir fécondant.

Pourquoi cette étude ?

La Phospholipase C zêta est une protéine du spermatozoïde impliquée dans l'activation de l'ovocyte. Sa présence est donc nécessaire pour la fécondation et le développement d'un embryon après la fusion des gamètes.

Le déficit en *Phospholipase C zêta* a été associé à plusieurs cas d'infertilité masculine dans la littérature médicale.

Le but de notre étude est d'évaluer l'expression de cette protéine dans deux contextes particuliers : les infertilités idiopathiques (sans cause identifiée) et les situations où peu d'embryons ont été obtenus après une tentative de fécondation in vitro avec ou sans ICSI.

Si des déficits sont mis en évidence dans ces deux populations, l'analyse de l'expression de la *Phospholipase C zêta* pourrait avoir un intérêt diagnostique pour cibler les patients concernés, et envisager des mesures thérapeutiques permettant de pallier à ce déficit.

Qu'implique cette étude pour vous ?

Vous devez simplement remplir et signer le consentement ci-joint afin de donner votre accord pour l'utilisation de votre prélèvement de sperme dans le cadre de l'étude. Ces spermatozoïdes ne seront en aucun cas utilisés pour féconder des ovocytes ou créer des embryons.

L'anonymat de tous les prélèvements sera respecté tout au long de l'étude.

Vous pouvez à tout moment revenir sur votre décision et sortir de l'étude. Les paillettes de spermatozoïdes congelées seront automatiquement détruites.

Quels sont vos droits ?

Vous pouvez refuser de participer à cette collection. Le refus de participer à cette étude, quel qu'un 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.

Mode opératoire: Mise en évidence de la PLC ζ dans les spermatozoïdes

- Effectuer un Test de Migration sur gradient
- Diluer la fraction finale (0,3 ml) de sperme Dans une solution de PFA 4% pour obtenir une numération autour de 2 millions de spermatozoïdes mobiles.
- Déposer entre lame et lamelle :
 - 50 μ L de sperme préparé (dilué dans le PFA)
 - Immerger les lames 30 min à température ambiante dans 0.5% de Triton X-100 (dilué dans PBS)
- Laver 3 x 5min au PBS
 - Immerger les lames dans une solution de BSA 3% dans du PBS et laisser incuber 1h à température ambiante.

NE PAS RINCER !

- Préparer une dilution au 40eme de l'anticorps primaire :
 - Anticorps anti- PLC ζ 1mg/mL (solution mère)
 - BSA 0.05%
→ **Solution finale à 25 μ g/mL**
 - Incuber en chambre humide entre lame et lamelle à +4°C pendant la nuit (17h→9h)
- Laver 3 fois 5 min au PBS (Laver le témoin négatif séparément)
- Incuber 45min entre lame et lamelle à température ambiante avec l'anticorps anti-lapin à 5 μ g/mL (dilué au 400^{ème})
- Laver 3 x5min au PBS
- Incuber 15 min entre lame et lamelle à 37°C avec 10 μ L de HOECHST 33342 à 2 μ g/mL
- Laver 3x5min au PBS
- Monter avec 10 μ L de d'antifade
- Couvrir d'une lamelle

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. »