



**HAL**  
open science

# Marquage du spermatozoïde humain par l'Annexine V, quelle signification ?

Édouard Bradley

► **To cite this version:**

Édouard Bradley. Marquage du spermatozoïde humain par l'Annexine V, quelle signification ?. Médecine humaine et pathologie. 2017. dumas-01674957

**HAL Id: dumas-01674957**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01674957v1>**

Submitted on 3 Jan 2018

**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.



# Marquage du spermatozoïde humain par l'Annexine V, quelle signification ?

Edouard Bradley

► **To cite this version:**

Edouard Bradley. Marquage du spermatozoïde humain par l'Annexine V, quelle signification ?. Médecine humaine et pathologie. 2017. <dumas-01674957>

**HAL Id: dumas-01674957**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01674957>**

Submitted on 3 Jan 2018

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

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

Université de Bordeaux  
U.F.R des Sciences Médicales

Année 2017

Thèse n° 3209

Thèse pour l'obtention du  
**DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE**  
Discipline : Biologie médicale

Présentée et soutenue publiquement par :

**Edouard BRADLEY**

Né le 21/09/1987 Luxeuil-Les-Bains (70)

Le 10 novembre 2017

# **Marquage du spermatozoïde humain par l'Annexine V, quelle signification ?**

Directeur de thèse

**Dr Lucie CHANSEL-DEBORDEAUX**

Rapporteur

**Pr Rachel LEVY**

Jury

**Pr Clément JIMENEZ** : Président

**Pr Loïc SENTILHES** : Examineur

**Dr Sandrine DABERNAT** : Examineur

**Dr Aline PAPAXANTHOS** : Examineur

**Dr Lucie CHANSEL-DEBORDEAUX** : Directeur de thèse

## Remerciements :

**Monsieur le Professeur Clément JIMENEZ**, merci d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse et de m'avoir proposé ce travail. Vous avez été un chef de service proche de ses internes. Vous avez été d'un grand soutien aussi bien pour l'internat que pour notre post-internat et je tiens à vous exprimer toute ma gratitude. Ce fut un honneur de travailler avec vous et de pouvoir bénéficier de vos enseignements.

**Monsieur le Professeur Loïc SENTIHLES**, merci d'avoir accepté d'être membre de mon jury et de juger ce travail de thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de ma plus profonde reconnaissance.

**Madame le Docteur Sandrine DABERNAT**, merci d'avoir accepté de juger mon travail de thèse, ainsi que pour vos conseils et votre aide dans le service de biochimie.

**Madame le Docteur Aline PAPAXANTHOS**, merci d'avoir accepté de juger ce travail. Vous avez toujours été disponible et à l'écoute de mes questionnements. Tout au long de mes 3 semestres en biologie de la reproduction, vous avez su transmettre vos connaissances et me prodiguer vos conseils. Permettez-moi de vous exprimer toute mon estime.

**Madame le Docteur CHANSEL-DEBORDEAUX**, merci d'avoir accepté d'être ma directrice de thèse. Ta présence et ta disponibilité m'ont été précieuses, tes réflexions et tous tes conseils ont été essentielles à ce travail. En plus du suivi de ma thèse, tu m'as fait bénéficier de ton enseignement et de ta joie d'exercer cette spécialité. Tu es un pour moi exemple de réussite aussi bien professionnelle que personnelle. Tu as été une directrice formidable.

**Madame le Professeur Rachel LEVY**, merci d'avoir accepté d'être le rapporteur de cette thèse. Veuillez croire en ma très grande reconnaissance.

**A Vincent PITARD**, merci pour vos conseils et votre aide pour mon utilisation de la plateforme de cytométrie en flux.

**A Evelyne DOUDNIKOFF**, merci votre formation et votre aide à l'utilisation du microscope à fluorescence de l'IMN.

**Au Docteur SOULA**, merci pour ton enseignement et ta disponibilité. Toujours présente pour me conseiller lors de la lecture des embryons.

**A Monique MERCIER**, merci pour tout le temps que tu as su trouver pour me former. Toujours bienveillante, de bonne humeur et prête à tout pour nous, merci de tout cœur.

**A Juliette CHAUVEL**, merci pour tout. D'abord co-interne puis assistante mais toujours la même. Tu as su partager avec moi toutes tes compétences et tous tes conseils aussi bien sur le versant technique qu'humain, le tout dans la bonne humeur que te caractérise. Je suis fier d'avoir pu travailler avec toi et sur le plan personnel j'espère que l'on restera en contact.

**A toute l'équipe du service de biologie de la reproduction de Bordeaux :**

- Anna, merci pour ta joie de vivre et ta gentillesse sans limite. Toujours prête à égayer ma journée et regarder mes photos de Louis
- Nicolas, tu nous as quitté mais on continuera à se voir et il reste toujours la « quête 80 »
- Marianne, tes mots fléchés et ton imitation légendaire du biniou
- Pascale, Véroles et Cathy toujours présentent pour répondre à me question sur le CECOS
- Patricia, Marie-Caroline et Coco, même quand je viens chercher des dossiers vous avez toujours le sourire et êtes prête à m'aider
- Sylvie, Herve, Marie-Caroline, Maité, Jean-François pour votre formation et tous les petits conseils que vous m'avez prodigués
- Jérôme pour toujours répondre à mes interrogations et ta bonne humeur
- Delphine et Audrey pour tous vos petits gâteaux et votre gentillesse
- Didier pour ta formation

**A mes co-interne BDR:**

- Mariya et Pierre pour m'avoir pris sous votre aile dès mon arrivé
- Réda et Mohamed pour tous nos délires et baby, vous êtes des vrais amis
- Mathilde et Adeline pour toute votre aide durant ce dernier semestre et votre bonne humeur, à vous la suite
- Marie et Camille, nos gynéco-méd favorites

**A mes 1<sup>er</sup> co-internes :** Sam, Cécile, Inès et Pierre-Yves, les 1<sup>er</sup>, les meilleurs.

**A Clotilde et Alexandra**, merci de m'avoir accepté pour mon premier semestre en biologie de la reproduction. Vous avez confirmé mon attrait pour cette spécialité et fait bénéficier de vos précieux conseils.

**A Manon RIVIERE**, ma meilleure amie. Tu es toujours là pour moi. Tes conseils et ton avis sont très important pour moi. Merci copine.

**A Justine et Aurélie**, que de souvenir depuis le lycée et tellement à venir.

**A mes parents**, merci d'avoir toujours été là pour moi. Tout ceci n'aurait pu être possible sans vous, votre soutien indéfectible et sans failles. Vous avez toujours cru en moi. Je suis heureux d'être votre fils.

**A mon frère**, j'espère que tu es aussi fier de moi que je le suis de toi. A ton tour pour la thèse maintenant.

**A ma Marie-Hélène**, pour élever une fille aussi formidable, il fallait une mère formidable. Merci pour tout.

**A Clément, Anne, Antoine et Elody**, merci de me soutenir et de m'accueilli parmi vous. Vous êtes de vrai frères et sœurs.

**A Louis**, mon loulou d'amour. Tu es ma plus grande réussite. Tu remplis ma vie de bonheur.

**A Marion**, merci de m'encourager et de me pousser toujours plus haut. Par ta présence et ton amour, tu donnes du sens à ma vie et me combles de bonheur. A tous les merveilleux moments passés ensemble et à tous ceux avenir. Je t'aime.

# Table des matières

<b>TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>- 5 -</b>
<b>TABLE DES FIGURES .....</b>	<b>- 6 -</b>
<b>TABLES DES ANNEXES .....</b>	<b>- 8 -</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>- 9 -</b>
<b>1. REVUE DE LA LITTERATURE .....</b>	<b>- 11 -</b>
1.1 ANNEXINE V.....	- 12 -
1.2 MACS.....	- 14 -
1.3 APOPTOSE.....	- 16 -
1.4 NECROSE .....	- 17 -
1.5 CAPACITATION.....	- 19 -
1.6 REACTION ACROSOMIQUE .....	- 22 -
<b>2. ETUDE.....</b>	<b>- 26 -</b>
2.1 MATERIELS ET METHODES .....	- 27 -
2.1.1 <i>Critères d'inclusions</i> .....	- 27 -
2.1.2 <i>Préparation des spermés</i> .....	- 27 -
2.1.3 <i>Evaluation de la mobilité progressive</i> .....	- 29 -
2.1.4 <i>Evaluation de la vitalité</i> .....	- 29 -
2.1.5 <i>Marquage de l'annexine V</i> .....	- 29 -
2.1.6 <i>Double marquage annexine V et anti-CD46</i> .....	- 30 -
2.1.7 <i>Marquage à l'inhibiteur de caspase 3 activée</i> .....	- 30 -
2.1.8 <i>Marquage à l'iodure de propidium</i> .....	- 31 -
2.1.9 <i>Analyse par cytométrie en flux</i> .....	- 32 -
2.1.10 <i>Marquage à la chlortetracycline</i> .....	- 33 -
2.1.11 <i>Analyse par microscopie à fluorescence</i> .....	- 36 -
2.1.12 <i>Description du protocole</i> .....	- 37 -
2.1.13 <i>Analyse statistique</i> .....	- 38 -
2.2 RESULTATS.....	- 39 -
2.2.1 <i>Externalisation de la phosphatidylsérine</i> .....	- 39 -
2.2.2 <i>Capacitation et réaction acrosomique</i> .....	- 42 -
2.2.3 <i>Marqueurs d'apoptose/nécrose</i> .....	- 47 -
2.3 DISCUSSION.....	- 51 -
2.4 CONCLUSION.....	- 56 -
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>- 57 -</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>- 64 -</b>

# Liste des abréviations

- AMP : Assistance Médicale à la Procréation
- APC : Allophycocyanine
- CAD : Caspase Activated Deoxyribonucléase
- Caspase: Cysteiny l aspartate-specific protease
- CTC: Chlortetracycline
- FITC: Isothionate de Fluorescéine
- HAS: Human Serum Albumin
- ICSI: Intra Cytoplasmic Sperm Injection
- MACS : Magnetic-Activated Cell Sorting
- PBS : Phosphate Buffered Saline
- PE : Phycoérythrine
- PI : Iodure de Propidium
- PFA : Paraformaldéhyde
- PS : Phosphatidylsérine
- RA : Réaction Acrosomique
- SOCCs: store operate calcium chanel

## Liste des figures et tableaux

- **Figure 1** : Schéma du marquage de la phosphatidylsérine par l'annexine V associée à un fluorochrome.
- **Figure 2** : Schéma du tri cellulaire par MACS en utilisant des microbilles marquées à l'annexine V.
- **Figure 3** : Principales différences des modification morphologiques entre l'apoptose et la nécrose.
- **Figure 4** : Schéma des évènements majeurs lors de la capacitation.
- **Figure 5** : Schéma de la fusion membranaire des gamètes.
- **Figure 6** : Cytomètre BD FACSCANTO et logiciel FACSDiva Software.
- **Figure 7** : Cytogramme des spermatozoïdes selon SSC/FSC.
- **Figure 8** : Localisation de la fluorescence de la chlortetracycline.
- **Figure 9** : Microscope Axio Imager 2.
- **Figure 10** : Schéma descriptif du protocole.
- **Figure 11** : Cytogrammes typiques du marquage par annexine V-APC/ PI-PE après 4h d'incubation avec et sans calcium ionophore A23187.
- **Figure 12** : Analyse des spermatozoïdes marqués par annexine V-APC après incubation.
- **Figure 13** : Analyse des spermatozoïdes marqués par annexine V-APC à T0 et T4 avec et sans A23187.

- **Figure 14** : Analyse des spermatozoïdes marqués par annexine V-APC/PI-PE à 0h et à 4h d'incubation avec ajout A23187.
- **Figure 15** : Analyse de la fluorescence des spermatozoïdes par la chlortetracycline après incubation.
- **Figure 16** : Analyse de la fluorescence des spermatozoïdes par la chlortetracycline après 4h d'incubation avec ajout de A23187.
- **Figure 17** : Analyse de la fluorescence des spermatozoïdes par la chlortetracycline après 4h d'incubation sans ajout de A23187.
- **Figure 18** : Cytogrammes typiques du marquage par annexine V-APC/ CD46-PE à T0 et T4 avec ou sans A23187.
- **Figure 19** : Analyse des spermatozoïdes marqués par annexine CD46-PE et V-APC/CD6-PE après incubation.
- **Figure 20** : Analyse des spermatozoïdes marqués par CD46-PE et CD46-PE/annexine V-APC après incubation de 0h et 4h avec et sans ajout de A23187.
- **Figure 21** : Cytogrammes typiques du marquage par Caspase 3-FITC/ PI-PE à T4 avec et sans calcium ionophore A23187.
- **Figure 22** : Analyse des spermatozoïdes marquées par caspase 3 FITC-DEVD-FMK / PI-PE après incubation à T0 et T4 avec ou sans ajout de A23187.
- **Figure 23** : Analyse des spermatozoïdes marqués par PI-PE et du test à l'éosine après 4h d'incubation avec et sans A23187.
- **Tableau 1** : Principales différences entre l'apoptose et la nécrose.

# Tables des annexes

- **Annexe 1** : Pourcentages de spermatozoïdes par marquage pour chaque patient à T0.
- **Annexe 2** : Pourcentages de spermatozoïdes par marquage pour chaque patient à T4 avec calcium ionophore A23187.
- **Annexe 3** : Pourcentages de spermatozoïdes par marquage pour chaque patient à T4 sans calcium ionophore A23187.
- **Annexe 4** : Pourcentages de spermatozoïdes par marquage pour chaque patient à T24.
- **Annexe 5** : Consentement à la recherche.
- **Annexe 6** : Note d'information au patient.
- **Annexe 7** : Protocole de marquage des spermatozoïdes à l'annexine V.
- **Annexe 8** : Protocole de double marquage des spermatozoïdes à l'annexine V et à l'anti-CD46.
- **Annexe 9** : Protocole de marquage des spermatozoïdes à l'inhibiteur de caspase 3 activée.
- **Annexe 10** : Protocole de marquage des spermatozoïdes à la chlortetracycline.

# Introduction

La sélection de spermatozoïdes est effectuée pour toutes les techniques d'AMP (Assistance Médicale à la Procréation) et notamment en Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI) où il y a un risque d'injection d'un spermatozoïde anormal. Elle consiste essentiellement en un lavage, gradient de densité ou une migration avec une évaluation de la mobilité et de la numération. Ces caractéristiques spermatiques ne suffisent pas à elles seules à garantir l'intégrité et les fonctions du spermatozoïde essentielles à la fécondation (Flesch and Gadella, 2000). L'amélioration des connaissances sur la physiologie du spermatozoïde est donc fondamentale et permet de développer de nouvelles méthodes de sélection des spermatozoïdes.

L'annexine V est une protéine qui peut se lier à la phosphatidylsérine (PS). A l'état basal la PS se trouve sur le feuillet interne de la membrane plasmique du spermatozoïde. La translocation de la PS intervient à un stade précoce lors de l'apoptose et permet la reconnaissance par les macrophages (Van den Eijnde *et al.*, 1997). Il a donc été proposé de sélectionner les spermatozoïdes non marqués par l'annexine V par : Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS) (Said *et al.*, 2008; Lukaszuk *et al.*, 2015; Troya and Zorrilla, 2015) et donc de pouvoir exclure les spermatozoïdes considérés apoptotiques (marqués par l'annexine V). Cette sélection a été proposée dans le but d'améliorer les résultats suboptimaux en AMP, pouvant être dus à la présence de spermatozoïdes apoptotiques.

Il a été montré que l'utilisation du MACS améliorait la qualité de la chromatine et l'intégrité de l'ADN (Delbes *et al.*, 2013). Une diminution des marqueurs d'apoptose, tel que les caspases activées et la fragmentation de l'ADN, a aussi été reportée (Grunewald *et al.*, 2001; Paasch *et al.*, 2005; Said *et al.*, 2008). Mais l'existence des phénomènes apoptotiques chez le spermatozoïde humain mature est débattu (Oehninger *et al.*, 2003; Lachaud *et al.*, 2004) et la translocation de la PS

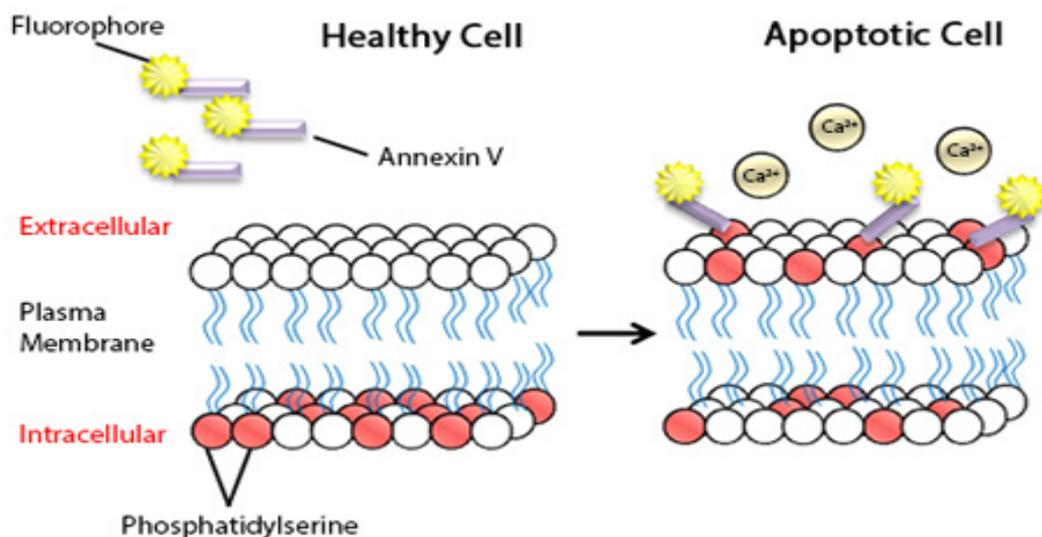
vers des domaines spécifiques de la membrane semble avoir une spécificité fonctionnelle (Kotwicka *et al.*, 2011)

L'objectif de cette étude a été d'évaluer l'exposition de la PS en parallèle de la capacitation/RA et des marqueurs d'apoptose, avec et sans calcium A23187, à différents temps.

# **1. Revue de la littérature**

## 1.1 Annexine V

L'annexine V est une protéine de 35-36 kDa que se lie de manière calcium dépendant aux phospholipides (Raynal and Pollard, 1994). L'annexine V se lie préférentiellement à la PS, qui est à l'état basal absente du feuillet membranaire externe. Associée à un fluorochrome (figure 1), l'annexine permet de marquer la translocation de la PS sur le feuillet externe (Vermes *et al.*, 1995).



**Figure 1** : Schéma du marquage de la phosphatidylsérine par l'annexine V associée à un fluorochrome ("Annexine V de BioLegend," n.d.). A gauche (cellule non apoptotique), l'absence d'externalisation de la phosphatidylsérine (PS) ne permet pas à l'annexine V d'être liée et donc il n'y a pas de fluorescence. A droite en cas de cellule apoptotique, la PS est sur le feuillet membranaire externe, permettant ainsi à l'annexine V de se lier.

L'altération de l'intégrité de la membrane se caractérise par une translocation de la PS du feuillet interne au feuillet externe (Vermes *et al.*, 1995).

La translocation de la PS sur le feuillet membranaire externe permet la reconnaissance par les macrophages (Van den Eijnde *et al.*, 1997). Cette translocation est un des signes les plus précoces d'apoptose et un stimulus majeur

pour la phagocytose de la cellule. Les événements moléculaires comme l'apoptose sont négligés en routine, ce qui peut avoir un impact négatif sur les résultats d'AMP. Une nouvelle technique basée sur la sélection des spermatozoïdes n'exposant pas la PS, et donc non apoptotique, a donc vu le jour : le Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS) (Said *et al.*, 2008; Lukaszuk *et al.*, 2015; Troya and Zorrilla, 2015).

Mais la technique MACS est controversée, l'apoptose du spermatozoïde humain mature est débattu (Oehninger *et al.*, 2003; Lachaud *et al.*, 2004). De plus, l'explication de ce phénomène ne peut pas se limiter à des mécanismes physiologiques d'apoptose car la translocation de la PS semble donc avoir une spécificité fonctionnelle liée à sa localisation (Kotwicka *et al.*, 2011).

La relation entre la capacitation et la translocation de la PS reste encore à être clarifiée. Certaines études retrouvent une augmentation du marquage par l'annexine V sans augmentation des marqueurs d'apoptose chez l'homme (Kotwicka *et al.*, 2002; de Vries *et al.*, 2003) alors que Muratori *et al.*, 2004, n'ont pas retrouvé cette augmentation du marquage par l'annexine V. A cela, s'ajoute l'augmentation du marquage par l'annexine V retrouvée après induction de la RA par le calcium ionophore A23187 (Martin, 2005).

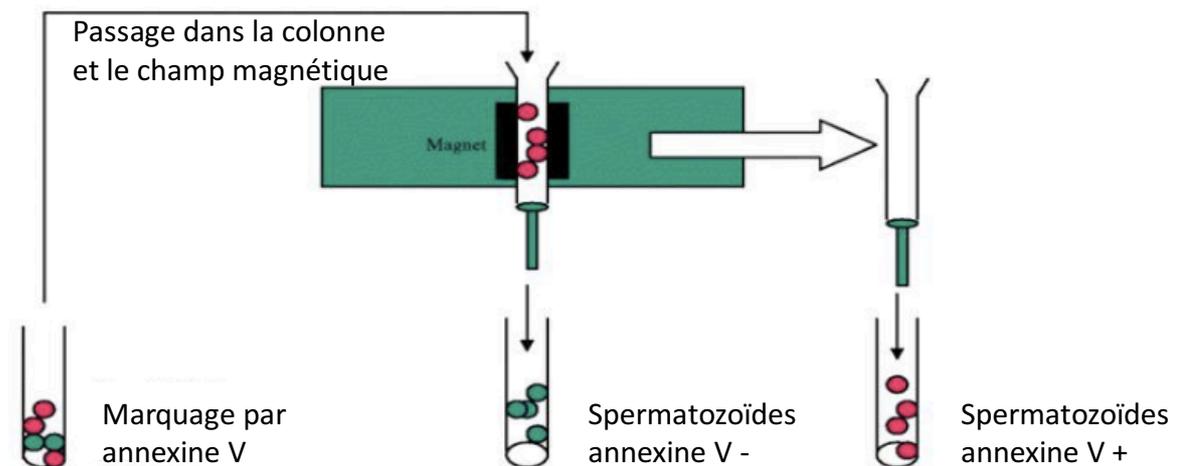
Chez l'homme infertile, la proportion de spermatozoïdes marqués par l'annexine V est plus importante que chez les donneurs (Barroso *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2002). Une corrélation entre le marquage à l'annexine V et les paramètres spermatiques est toujours débattue (Oosterhuis *et al.*, 2000; Ricci *et al.*, 2002; Kotwicka *et al.*, 2013), même s'il semble y avoir une corrélation négative avec la mobilité (Shen *et al.*, 2002).

## 1.2 MACS

Le tri cellulaire par MACS est une technique pouvant être utilisée pour la préparation du sperme en AMP. Il permettrait la séparation des spermatozoïdes apoptotiques, qui peuvent être à l'origine d'échec en AMP, même si les paramètres spermatiques sont normaux. Le MACS se base sur l'utilisation d'un champ magnétique généré par un aimant et de microbilles magnétiques.

La technologie MACS utilise des microbilles magnétiques de 50 nm conjuguées à l'annexine V. Ces microbilles servent à séparer les spermatozoïdes non apoptotiques de ceux avec une membrane plasmique altérée, avec externalisation de la PS. Les microbilles sont composées d'une matrice biodégradable et il n'est donc pas nécessaire de les retirer des spermatozoïdes marqués après le processus de tri. De par leur petite taille, les microbilles ne modifient pas la structure, la fonction ou l'activité des spermatozoïdes marqués.

Comme mentionné précédemment, l'externalisation de PS est un processus précoce lors de l'apoptose. L'annexine V a une affinité élevée pour la PS et n'a pas la capacité de passer la membrane du spermatozoïde intacte. Ainsi la liaison de l'annexine V aux spermatozoïdes est caractéristique d'une altération de l'intégrité de la membrane. L'annexine V permet donc l'identification de cellules avec des altérations de l'intégrité de la membrane, supposées apoptotiques, à un stade antérieur aux autres marquages (fragmentation de l'ADN, microscopie optique) (Vermees *et al.*, 1995). Basé sur cette liaison, le tri cellulaire par MACS permet d'obtenir deux fractions : annexine V négatifs (non marqués, non apoptotiques, aux membranes intact) de ceux annexine V positifs (marqués, avec une altération de leur membrane) (Figure 2).



**Figure 2** : Schéma du tri cellulaire par MACS en utilisant des microbilles marquées à l'annexine V (d'après Dermatol Br. J., Blackwell Publishing, www.medscape.com 2005). En vert les spermatozoïdes non marqués et en rouge les spermatozoïdes qui exposent la phosphatidylsérine. Les spermatozoïdes marqués par l'annexine V sont retenus dans le champ magnétique de la colonne.

Pour réaliser le tri cellulaire par MACS, les spermatozoïdes sont incubés en présence d'annexine V conjugué aux microbilles pendant 15 minutes à température ambiante. La suspension ainsi obtenue est chargée dans une colonne de séparation contenant des sphères ferromagnétiques. Un champ magnétique allant de 0.5 T à 1,5 T peut être appliqué aux sphères ferromagnétiques de la colonne. Les cellules marquées par des microbilles sont retenues dans la colonne MACS alors que les cellules non marquées passent à travers. Ainsi grâce à la technologie MACS, à la fois la fraction cellulaire marquée et non marquée peuvent être facilement isolées. Les spermatozoïdes marqués retenus dans la colonne peuvent ensuite être élués en utilisant une solution tampon. L'ensemble de la procédure de sélection et de séparation prend moins de 30 min et les spermatozoïdes peuvent être utilisés immédiatement après.

## 1.3 Apoptose

L'apoptose se définit comme un processus physiologique actif de mort cellulaire programmée mettant en jeu des changements morphologiques et biochimiques spécifiques (Steller, 1995). Elle est indispensable lors du contrôle de l'homéostasie et du développement des tissus de l'organisme.

L'apoptose est caractérisée par 3 étapes : une initiation par un stimulus puis une phase d'exécution avec l'intégration et la transduction du signal puis enfin une phase de dégradation cellulaire par condensation et fragmentation de la chromatine, une altération de la membrane mitochondriale et plasmatique.

La physiologie de l'apoptose permet donc d'utiliser comme marqueur la PS ou les caspases. La liaison de l'annexine V à la PS est considéré comme un marqueur précoce de l'apoptose dû à l'altération des membranes (Fadok *et al.*, 1992; Van den Eijnde *et al.*, 1997).

Les caspases (Cysteinyll aspartate-specific protease), une famille de cystéines protéases, sont connues pour être hautement impliquées dans le processus apoptotique (Alnemri *et al.*, 1996; Salvesen and Dixit, 1997; Pop and Salvesen, 2009). Les caspases sont des enzymes primordiales dans la voie de transduction du signal d'apoptose (Cohen, 1997) lors de la phase d'exécution. Ces protéases sont synthétisées initialement en proenzymes inactives pour ensuite être activées par clivage spécifique sur un résidu aspartate (Nicholson and Thornberry, 1997). Par une cascade de protéolyse, des caspases activent d'autres caspases. Au final les substrats clé vont être clivés et vont produire le phénotype de l'apoptose : rétractation cellulaire, rupture de la membrane mitochondriale, condensation de la chromatine, fragmentation de l'ADN puis formation de fragments cellulaires ou corps apoptotiques (Kerr *et al.*, 1972). Ces corps cellulaires sont ensuite phagocytés grâce à leur reconnaissance *via* l'externalisation de la PS. Lors de l'apoptose, des endonucléases calcium-magnésium dépendantes clivent de manière régulière l'ADN entre les unités nucléosomales pour former des oligonucléosomes. Au contraire lors

de la nécrose, l'ADN est dégradé de manière aléatoire par des endonucléases cytosoliques et lysosomales (Bicknell and Cohen, 1995).

Chez les mammifères, l'apoptose a été observée au niveau testiculaire pour les spermatocytes, spermatides et les spermatogonies (Hikim *et al.*, 1998; Lue *et al.*, 1999) car elle est essentielle lors de la spermatogénèse pour éliminer les cellules germinales présentant des anomalies (Blanco-Rodríguez *et al.*, 2003). Elle est aussi importante pour la phagocytose du corps résiduel (Tesarik *et al.*, 2002). Les cellules de Sertoli permettent la phagocytose de cellules germinales apoptotiques via la liaison entre la PS et le récepteur SR-BI (Nakanishi and Shiratsuchi, 2004).

Des marqueurs d'apoptose ont aussi été retrouvés chez le spermatozoïde mature (Barroso *et al.*, 2000; Gandini *et al.*, 2000; Muratori *et al.*, 2000; Oosterhuis *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2002) mais la présence de ces marqueurs a besoin d'être clarifiée. En effet, le spermatozoïde mature ayant un noyau condensé et une absence d'activité transcriptionnelle (Galeraud-Denis *et al.*, 2007). La présence de ces marqueurs pourrait être rapportée à un processus apoptotique précédemment engagé (Lachaud *et al.*, 2004).

## **1.4 Nécrose**

La nécrose, contrairement à l'apoptose, est un processus passif qui se dispense de la participation active de la cellule. Elle n'est pas déterminée par des facteurs intrinsèques mais survient suite à un dommage, à des perturbations du milieu extérieur. C'est un mécanisme passif, rapide et non spécifique.

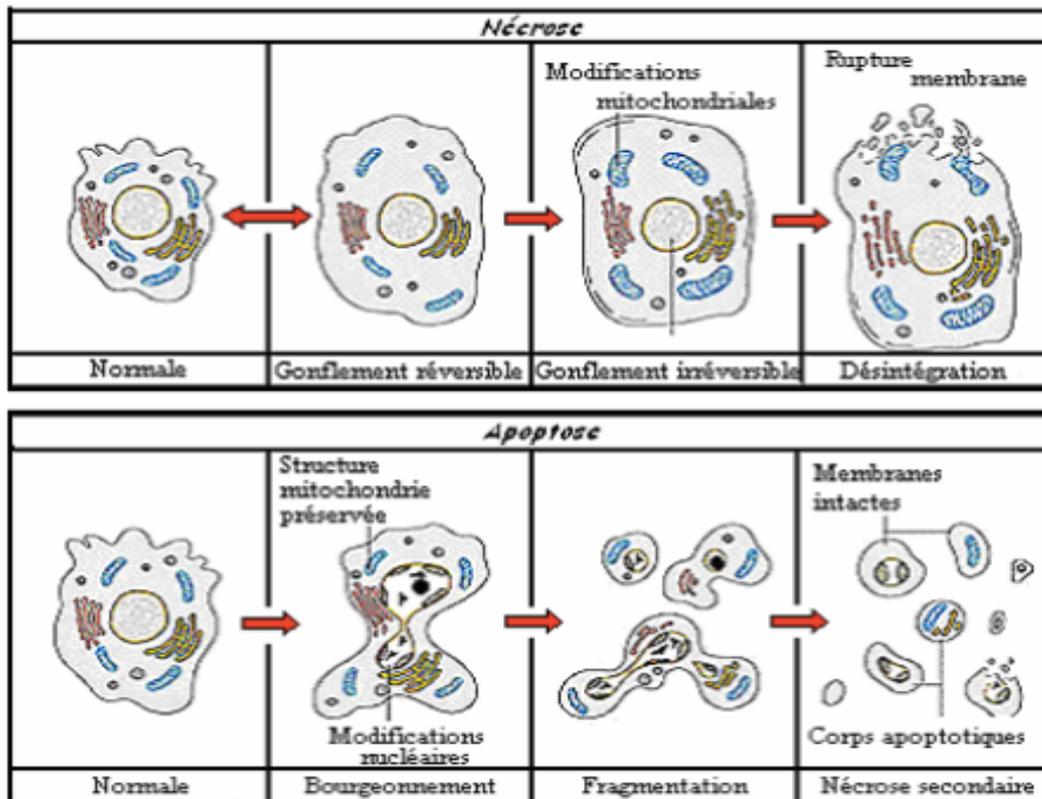
Elle se caractérise par une perte rapide des potentiels membranaires de la cellule. La perte précoce du contrôle des flux ioniques au niveau membranaire conduit au gonflement cellulaire dû à l'entrée massive d'eau. Les organelles cellulaires vont alors gonfler (Schweichel and Merker, 1973; Leist and Jäätelä,

2001). Il va y avoir une modification de la perméabilité des membranes interne et externe mitochondriales par augmentation de la concentration en calcium. Les lysosomes vont se rompre et libérer des enzymes hydrolytiques dans le cytoplasme. L'ADN cellulaire est clivé de manière aléatoire par des endonucléases activées, notamment par des sérines protéases (Bicknell and Cohen, 1995). La membrane plasmique va se rompre et libérer le contenu cellulaire dans le milieu environnant. Cette libération conduit à une inflammation locale due à la présence de débris qui vont être phagocytés.

La nécrose intervient à la suite d'un traumatisme ou d'une agression cellulaire. Beaucoup de stimuli induisent une apoptose à faible dose et une nécrose à forte dose. La nécrose étant dans ce cas une mort cellulaire mise en œuvre quand le processus apoptotique est débordé. Le tableau 1 et la figure 3 résument les différences entre apoptose et nécrose.

<b>Nécrose</b>	<b>Apoptose</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mort anormale des cellules</li> <li>- Spontanée, ne nécessite pas d'énergie</li> <li>- Bourgeonnement cellulaire</li> <li>- Fragments ADN de taille aléatoire</li> <li>- Perte de l'intégrité membranaire du fait de la lyse</li> <li>- Contenu cellulaire libéré dans l'environnement : inflammation</li> <li>- Phagocytose des débris cellulaires par les macrophages</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mort cellulaire programmée</li> <li>- Contrôlée, requiert de l'énergie (ATP)</li> <li>- Rétrécissement des cellules</li> <li>- Fragmentation régulière de l'ADN</li> <li>- Membrane plasmique bourgeonne mais reste intacte</li> <li>- Bourgeonnement des corps apoptotiques (contenu cellulaire encapsulé)</li> <li>- Phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages</li> </ul>

**Tableau 1:** Principales différences entre l'apoptose et la nécrose (d'après Arden and Betenbaugh, 2006).

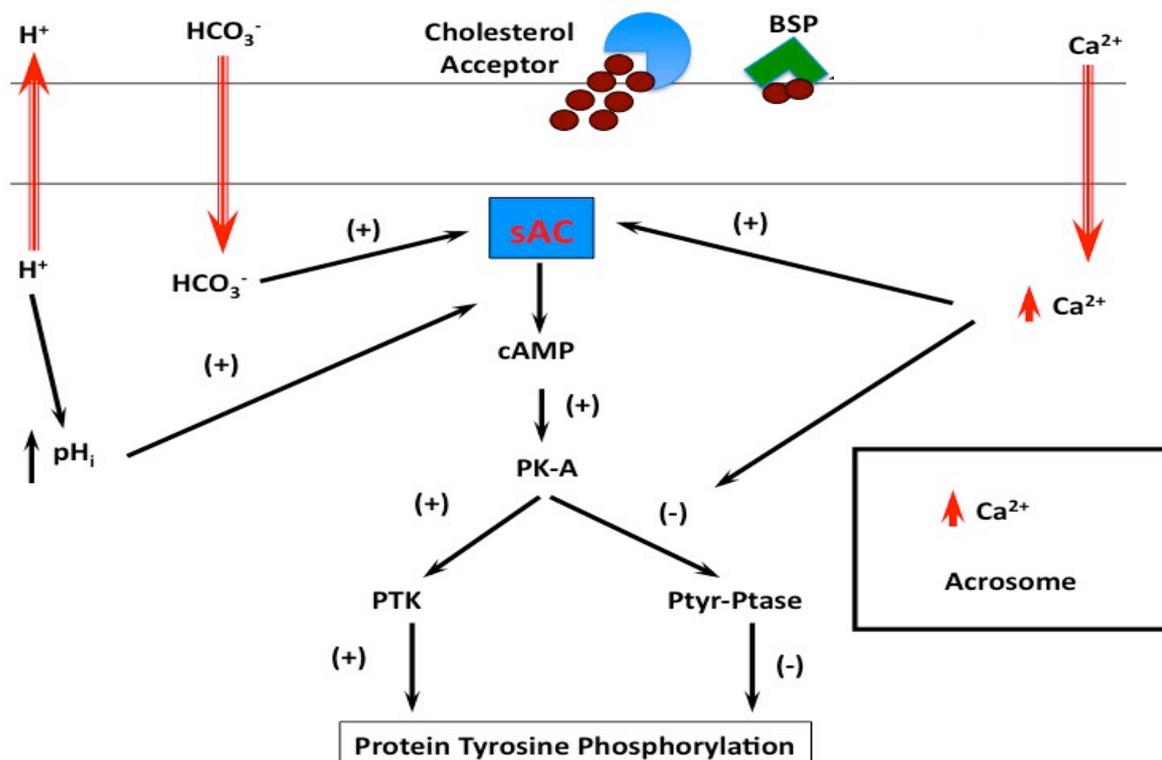


**Figure 3** : Principales différences des modifications morphologiques entre l'apoptose et la nécrose (d'après Apoptosis and Cell Proliferation, Roche).

## 1.5 Capacitation

La capacitation correspond à l'ensemble des modifications membranaires et cytoplasmiques qui, chez le mammifère, rendent le spermatozoïde capable de féconder l'ovocyte. La capacitation est un phénomène réversible (De Jonge, 2017). La capacitation ne concerne qu'une sous population de spermatozoïdes à un temps donné (De Jonge, 2017). Cela permet de maintenir une capacité de fécondation au cours du temps et de passer outre l'absence de synchronisation entre rapport sexuel et l'ovulation.

L'initiation de la capacitation implique trois événements majeurs (Visconti *et al.*, 2002). En premier lieu, un efflux du cholestérol membranaire va augmenter la fluidité membranaire. Cela va permettre une modification des concentrations ioniques intracellulaires et notamment celles du bicarbonate et du calcium. Le processus se poursuit par une activation des tyrosine-kinases pour induire la phosphorylation au niveau des tyrosines des protéines spermatiques. La figure 4 résume ces événements.



**Figure 4 :** Schéma des évènements majeurs lors de la capacitation (d'après le Département des sciences animal de l'université du Wisconsin). L'efflux du cholestérol, grâce aux accepteurs de stérols, va permettre l'augmentation de la concentration en  $\text{HCO}_3^-$  et  $\text{Ca}^{2+}$  et l'activation de l'adénylate cyclase soluble (sAC). S'en suit une augmentation de l'AMPc qui active la phosphokinase A et la cascade de phosphorylation. Dans un même temps, il y a augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau de l'acrosome.

Les modifications membranaires durant la capacitation résultent de l'augmentation de la fluidité membranaire. Cette fluidité passe par un efflux de cholestérol, causant une modification du ratio cholestérol/phospholipide. L'efflux du cholestérol a lieu lors de la suppression des facteurs décapacitants du plasma séminal et la présence des facteurs capacitants du tractus génital féminin. Le cholestérol va être pris en charge par des accepteurs de stéroïdes comme l'albumine et le HDL présents dans le tractus génital féminin (Cross, 1998). Une autre famille de protéines, les BSP stimulent aussi l'efflux lipidique lors de la capacitation (Lefebvre *et al.*, 2007). Ainsi ces modifications membranaires vont augmenter la perméabilité de certains ions (Visconti *et al.*, 2002).

Avec le passage des spermatozoïdes du liquide séminal vers le fluide du tractus génital féminin, les concentrations en ions et l'osmolarité du milieu varient. Ces modifications du milieu extracellulaire entraînent une modification de la composition intracellulaire et du potentiel de membrane du spermatozoïde (Visconti *et al.*, 2002).

Le milieu intracellulaire va se concentrer en bicarbonate et il va y avoir augmentation du pH. Le bicarbonate va activer l'adénylate cyclase soluble qui va synthétiser de l'AMPc (Visconti and Kopf, 1998).

Le calcium est requis pour la capacitation et l'induction de la réaction acrosomique. La concentration en calcium intracellulaire va augmenter grâce aux canaux calcium voltage-dépendant, l'inactivation des calcium-ATPase et les pompes sodium/calcium (Florman *et al.*, 1992). La sialic acid-binding protein produite par les cellules endométriales va faciliter l'influx intra cellulaire de calcium (Banerjee and Chowdhury, 1995). Tout comme le bicarbonate et le pH, le calcium a un rôle important dans l'activation de l'adénylate cyclase soluble (Jin and Yang, 2016).

La phosphorylation des protéines est une modification post traductionnelle agissant comme un mécanisme régulateur. Elle consiste en l'addition de groupement phosphate. Ainsi la phosphorylation des tyrosines est un important régulateur des événements associés avec la capacitation du spermatozoïde. L'augmentation de la phosphorylation des tyrosines dans le spermatozoïde est dépendante de la présence d'albumine, de calcium et de bicarbonate (Jin and Yang, 2016). Cette augmentation

de la phosphorylation est régulée par un cycle dépendant de l'AMPc impliquant la phosphokinase A. L'activité de la phosphokinase A est liée à celle de l'adénylate cyclase et de la phosphodiesterase via l'AMPc.

La phosphokinase A va permettre l'activation de la scramblase (Harrison and Gadella, 2005). Il va ensuite y avoir une déstabilisation de la membrane grâce à la scramblase qui va réorganiser les lipides membranaires dont la PS (de Vries *et al.*, 2003; Harrison and Gadella, 2005). La déstabilisation de la membrane permet ainsi des mouvements des protéines membranaires avec pour conséquence l'apparition de zones membranaires fusiogènes et l'externalisation de récepteurs membranaires.

Au final le spermatozoïde capacité acquiert un mouvement d'hyperactivation et la capacité de réaliser la réaction acrosomique.

Parmi les spermatozoïdes qui vont se diriger vers l'isthme tubaire, une partie va être stockée et libérée maintenant ainsi une capacité de fécondation au cours du temps. Ce réservoir spermatique met en jeu des liaisons via des protéines de la famille des ADAM mais aussi de la famille des annexines et notamment l'annexine V retrouvée chez les bovins (Ignotz *et al.*, 2007).

## **1.6 Réaction acrosomique**

Lors de la réaction acrosomique (RA), la membrane externe de l'acrosome et la membrane plasmique fusionnent. Suite à la RA, seul la membrane interne de l'acrosome et la portion du segment équatorial demeurent. Cette fusion permet la décharge du contenu acrosomal. La RA rend le spermatozoïde compétent à interagir avec l'ovocyte. Elle nécessite qu'il y ait eu capacitation au préalable, ces deux phénomènes étant intimement liés.

La RA permet de faciliter la pénétration de la zone pellucide et la fusion avec la membrane plasmique de l'ovocyte. La zone pellucide est une matrice extracellulaire épaisse et complexe qui entoure l'ovocyte. Elle est le principal médiateur de la RA. Pour traverser cette matrice, le spermatozoïde doit s'y fixer, subir la RA, pénétrer la zone pellucide et enfin fusionner avec la membrane plasmique de l'ovule. Les glycoprotéines de la zone pellucide possèdent des branchements sucrés multiples et hétérogènes. Ces résidus sucrés sont le support de la spécificité d'espèce de la reconnaissance gamétique (Noguchi *et al.*, 1994). Le spermatozoïde va donc venir se lier aux glycoprotéines espèce spécifique ZP1, ZP2, ZP3 et ZP4.

L'exocytose qui a lieu lors de la RA est sous le contrôle d'une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. Le calcium nécessaire provient de deux sources, le milieu extérieur et le réservoir calcique interne. Les transferts et mouvements calcique se font par les canaux calciques.

Il y a d'abord fixation primaire avec ZP3 et ZP4 induisant la RA (Gupta, 2015). La membrane externe de l'acrosome du spermatozoïde peut alors se fixer sur la zone pellucide via la zonadhésine (Anifandis *et al.*, 2014). Il va y avoir activation des protéines G entraînant une augmentation du pH et une dépolarisation membranaire (Witte and Schäfer-Somi, 2007). Cette dépolarisation déclenche l'activation de canaux calciques voltage dépendants situés au niveau de la membrane plasmique, les canaux de type T (Florman, 1994). Ces canaux sont primordiaux, ils sont les premiers à être activés et leur inhibition bloque la réaction acrosomique. L'ouverture de ces canaux va permettre un influx calcique transitoire.

La protéine G va aussi entraîner l'activation de la phospholipase C. La phospholipase C entraîne une hydrolyse du phosphatidyl-inositol diphosphate, présent au niveau de la membrane plasmique, afin de produire le diacylglycérol et l'inositol triphosphate. Ce dernier se lie à son récepteur, qui va permettre la libération massive du  $Ca^{2+}$  accumulé dans l'acrosome. L'efflux de  $Ca^{2+}$ , en provenance des réservoirs intracellulaires, active les canaux SOCCs (store operate calcium chanel) sensibles au niveau de remplissage des stocks calciques (Prakriya and Lewis, 2015). Ces canaux sont situés sur la membrane plasmique et permettent l'entrée massive

de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du milieu extérieur. Cette entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  permet une élévation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire plus soutenue. On nomme ce phénomène l'entrée capacitive de calcium (Putney, 2007).

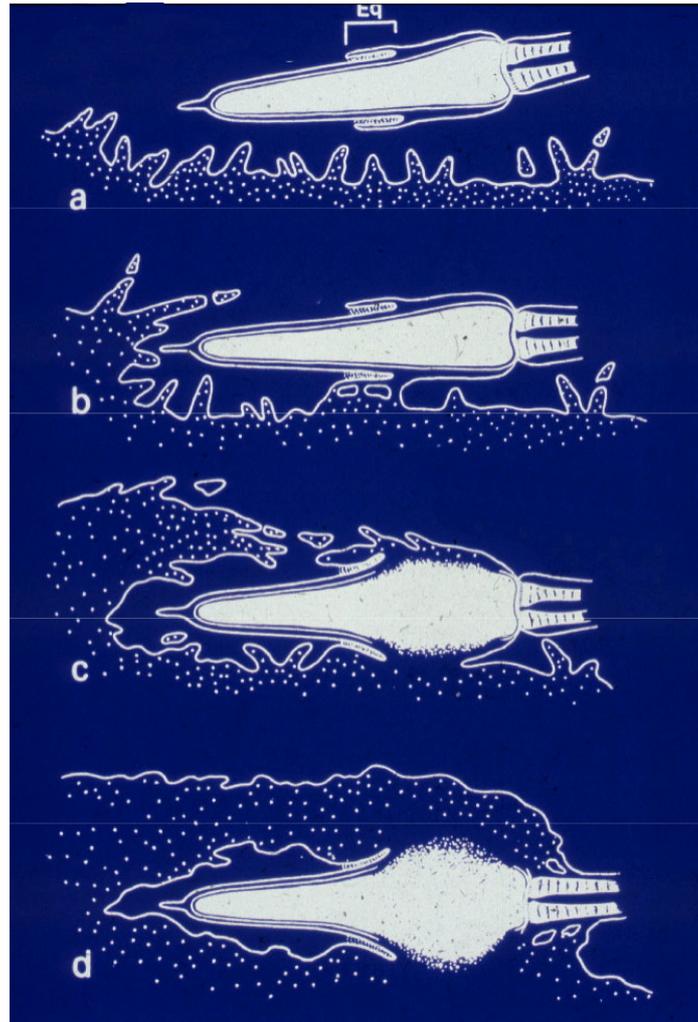
Cet afflux de  $\text{Ca}^{2+}$  va activer les protéines SNARE (Soluble NSF Attachment Receptor) qui vont catalyser la fusion membranaire. Dans un même temps, la phospholipase A produit des lysophospholipides pour faciliter cette fusion membranaire (Arnoult *et al.*, 2012). Finalement la membrane plasmique et la membrane externe de l'acrosome fusionnent.

L'acrosome libère alors des enzymes hydrolytique et protéolytique. L'acrosine hydrolyse ZP1 et libère les filaments ZP2-ZP3, diminuant la résistance de la zone pellucide. Ceci permet la fixation secondaire à ZP2. La  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase permet la rupture des liaisons ZP2 et ZP3 entre le spermatozoïde et la zone pellucide. La hyaluronidase détruit l'acide hyaluronique localisé entre les mailles de la zone pellucide.

Le spermatozoïde et l'ovocyte fusionnent au niveau de la région équatoriale. Cette fusion se fait grâce à la modification des protéines des régions équatoriale et post acrosomique, notamment *via* le couple JUNO/IZUMO. La protéine IZUMO se trouve sur le spermatozoïde acrosome réagi au niveau de la plaque équatoriale et le récepteur JUNO sur l'ovocyte (Aydin *et al.*, 2016). Mais ils existent de nombreuses autres molécules d'interaction gamétique :

- Les intégrines  $\alpha 6\beta 1$  (Ziyyat *et al.*, 2006)
- Les protéines ADAM (Chen *et al.*, 1999)
- Les tétraspanines : CD9 (Zhu *et al.*, 2002) et CD81 (Evans, 2012)

La fusion s'initie au niveau de la partie postérieure du segment équatorial et s'étend ensuite de proche en proche, avec inclusion du noyau du spermatozoïde et inclusion du flagelle dans l'ooplasm (Figure 5). Il y a échange de fragment membranaire entre le spermatozoïde et l'ovocyte par trogocytose et formation d'exosomes.



**Figure 5 :** Schéma de la fusion membranaire des gamètes (Yanagimachi, 1978). Le spermatozoïde se retrouve dans l'espace périvitellin (a), il va y avoir adhésion par le segment équatorial (b), début de la fusion au niveau de la région post-acrosomique (c) et enfin fusion des membranes gamétiques (d).

Les spermatozoïdes peuvent aussi faire leur RA spontanément, sans liaison à la zone pellucide (Esteves *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 2011). La RA peut ainsi être induite non seulement par la zone pellucide mais aussi *in vitro* par le calcium A23187 (Tao *et al.*, 1993; Jaiswal *et al.*, 1999).

Le calcium A23187 est un porteur d'ions qui peut former un complexe avec le calcium et ainsi lui permettre de traverser la membrane cellulaire. Il permet donc d'induire la RA. En AMP, il sert notamment en cas de globozoospermie pour induire l'activation ovocytaire en absence d'acrosome (Yang *et al.*, 2015).

## **2. Etude**

## **2.1 Matériels et méthodes**

### **2.1.1 Critères d'inclusions**

Les spermatozoïdes analysés provenaient du reliquat de sperme non utilisé pour la réalisation des analyses prescrites lors d'un spermogramme et signature d'un consentement à la recherche. Le volume de l'éjaculat devait être supérieur ou égale à 3 ml, la mobilité et la vitalité devaient être normales selon les normes OMS de 2010. Les spermés avec plus d'un million de cellules rondes étaient exclus. Le nombre de spermatozoïdes nécessaires pour l'ensemble des analyses réalisées pour un patient était de 12 millions. Pour un volume estimé à 0,4 ml, la concentration minimale nécessaire après sélection sur gradient était de 30 millions de spermatozoïdes par millilitre.

### **2.1.2 Préparation des spermés**

Les éjaculats ont été obtenus par masturbation au laboratoire après une période d'abstinence de 2 à 7 jours. Ils ont été placés à 37°C pendant 20 min pour liquéfaction. Le volume nécessaire était utilisé pour les analyses prescrites, le volume restant était déposé sur des gradients à 3 fractions (3F). Chaque gradient était constitué de 3 fractions de 1 ml de densité différente, obtenu par dilution de PureSperm (Nidacon, Suède) dans du Fercult IVF medium (FertiPro NV, Belgique) à 90, 75 et 50%. Après avoir déposé maximum 1 ml de sperme liquéfié sur chaque gradient, les tubes étaient centrifugés pendant 15 min à 300 g. La fraction 90% était récupérée, lavée avec du Fercult IVF, puis centrifugée à nouveau pendant 15 min à 300 g. Après élimination du surnageant, le culot était remis en suspension dans 400 µl de Fercult IVF. La concentration après sélection sur gradient était évaluée sur

cellule de Makler en microscopie optique, puis ajustée si besoin en ajoutant du Fercult IVF pour obtenir une concentration finale à 30 millions de spermatozoïdes par millilitre. 4 tubes à fond conique contenant 1 ml de milieu Global (LifeGlobal Group, Guilford, Etats-Unis) supplémenté en albumine (HSA) à 8% étaient préalablement équilibrés 24 h à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. 100 µl de préparation finale du sperme étaient ajoutés à chacun des tubes de Global + HSA (marqués avec le numéro d'identification du patient + t0, t4, t4+A23187, ou t24), placés ensuite à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> pour capacitation.

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

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

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

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

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

### **2.1.3 Evaluation de la mobilité progressive**

10 µl de la préparation finale étaient déposés sur une cellule de Makler, la mobilité était évaluée d'après les recommandations de l'OMS 2010. 200 cellules étaient étudiées au microscope optique. La mobilité progressive correspondait aux types a + b.

### **2.1.4 Evaluation de la vitalité**

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

### **2.1.5 Marquage de l'annexine V**

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

600.000 spermatozoïdes (20µL de la préparation finale) étaient ajoutés dans un tube conique contenant 100 µl de solution tampon (fournie par le kit) avec 5 µl d'annexine V-APC. Le tube était agité puis incubé à température ambiante, dans le noir, pendant 20 min. 500 µl de solution tampon étaient ajoutés pour lavage. Le tube

était ensuite centrifugé 10 min à 1500 g. Après élimination du surnageant, le culot était remis en suspension dans 200 µl de solution tampon. La solution finale était transvasée dans un tube à fond rond, conservée à température ambiante, dans le noir. L'analyse au cytomètre était faite dans les 15 min. En parallèle, un tube témoin était réalisé dans les mêmes conditions, sans ajouter l'annexine V-APC.

### **2.1.6 Double marquage annexine V et anti-CD46**

Le CD46 est une protéine transmembranaire présente au sein de la membrane interne de l'acrosome, son marquage n'est possible que si la réaction acrosomique est complète. L'anticorps monoclonal anti-human CD46 PE (eBioscience, San Diego, Etats-Unis) était utilisé pour marquer les spermatozoïdes ayant subi la RA.

600.000 spermatozoïdes étaient ajoutés dans un tube conique contenant 1 µl d'anti-CD46 PE, 5 µl d'annexine V-APC et 100 µl de solution tampon. Le même protocole que pour l'annexine V seule était ensuite réalisé.

### **2.1.7 Marquage à l'inhibiteur de caspase 3 activée**

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

Fluoresceine Active Caspase-3 (eBioscience, San Diego, Etats-Unis) était utilisé pour détecter les caspases 3 activées. 600.000 spermatozoïdes étaient ajoutés dans un tube conique contenant 500 µl de PBS avec 1 µl de FITC-DEVD-FMK. Le tube était agité puis incubé à température ambiante, dans le noir, pendant 20 min. Les spermatozoïdes étaient ensuite lavés deux fois en ajoutant 2 ml de PBS et centrifugés 10 min à 1500 g. Après élimination du surnageant, le culot était remis en suspension dans 300 µl de PBS. La solution finale était transvasée dans un tube à fond rond, conservée à température ambiante, dans le noir. L'analyse au cytomètre était faite dans les 15 min.

### **2.1.8 Marquage à l'iodure de propidium**

L'iodure de propidium (IP) est un agent intercalant fluorescent qui lorsque les membranes cellulaires sont altérées, peut atteindre le noyau. Il est utilisé comme marqueur de mortalité cellulaire. L'iodure de propidium utilisé était fourni avec le kit Annexin V Apoptosis Detection APC (eBioscience, San Diego, Etats-Unis).

Après passage au cytomètre des tubes témoins, annexine V et anti-caspase 3, 2 µl d'IP leur étaient ajoutés. Les tubes étaient agités et incubés 10 min à température ambiante, dans le noir. Ils étaient ensuite analysés une seconde fois par cytométrie en flux afin d'estimer la vitalité et d'obtenir les doubles marquages annexine V-APC/IP et FITC-DEVD-FMK/IP. La fluorescence de l'IP était analysée sur le canal de la Phycoérythrine (PE).

## 2.1.9 Analyse par cytométrie en flux

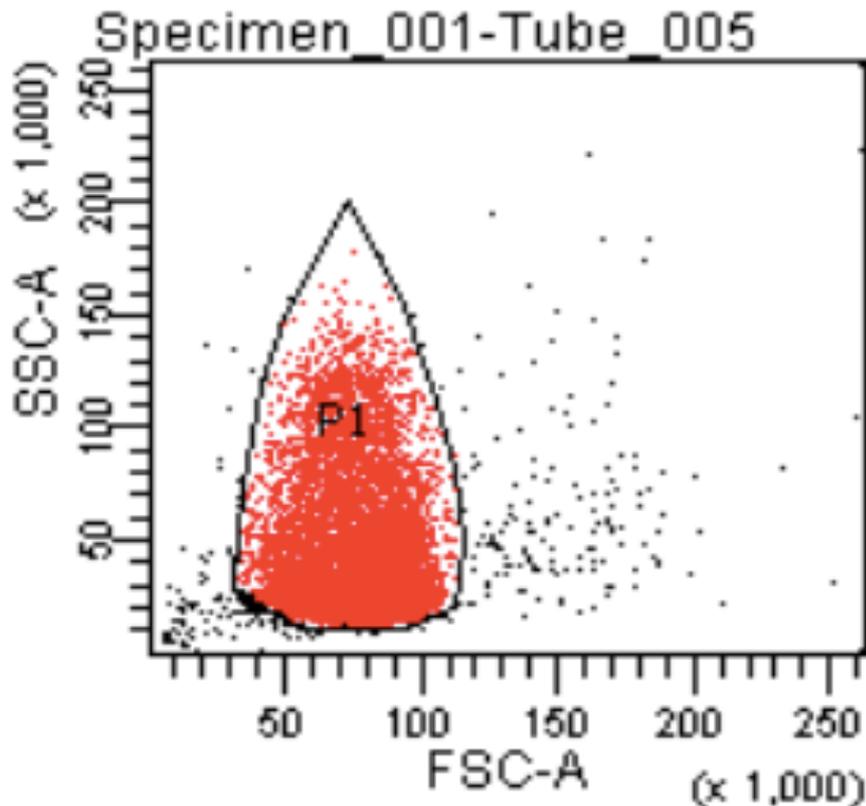
L'acquisition des tubes a été faite sur un cytomètre analyseur BD FACSCANTO (BD Biosciences, San Jose, Etats-Unis) (Figure 6) du service commun de cytométrie en flux de la SFR TransBioMed (Structure Fédérative de Recherche « Biologie fondamentale et appliquée à la médecine ») de l'Université de Bordeaux Segalen. L'analyse des données était réalisée grâce au logiciel FACSDiva Software.



**Figure 6 :** Cytomètre BD FACSCANTO (à gauche) et logiciel FACSDiva Software (affiché à l'écran) (bdbiosciences.com)

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

Les spermatozoïdes étaient repérés sur le cytogramme FSC/SSC (taille/structure) par leur répartition caractéristique en forme de flammèche. 10.000 spermatozoïdes étaient analysés pour chaque marquage et comparés avec le témoin négatif passé en premier lieu (Figure 7).



**Figure 7 :** Sélection des spermatozoïdes en excluant les débris et agrégats. Cytogramme SSC/FSC (SSC : taille, FSC : granulosité) caractéristique, en forme de flammèche, permettant de sélectionner la population de spermatozoïdes P1.

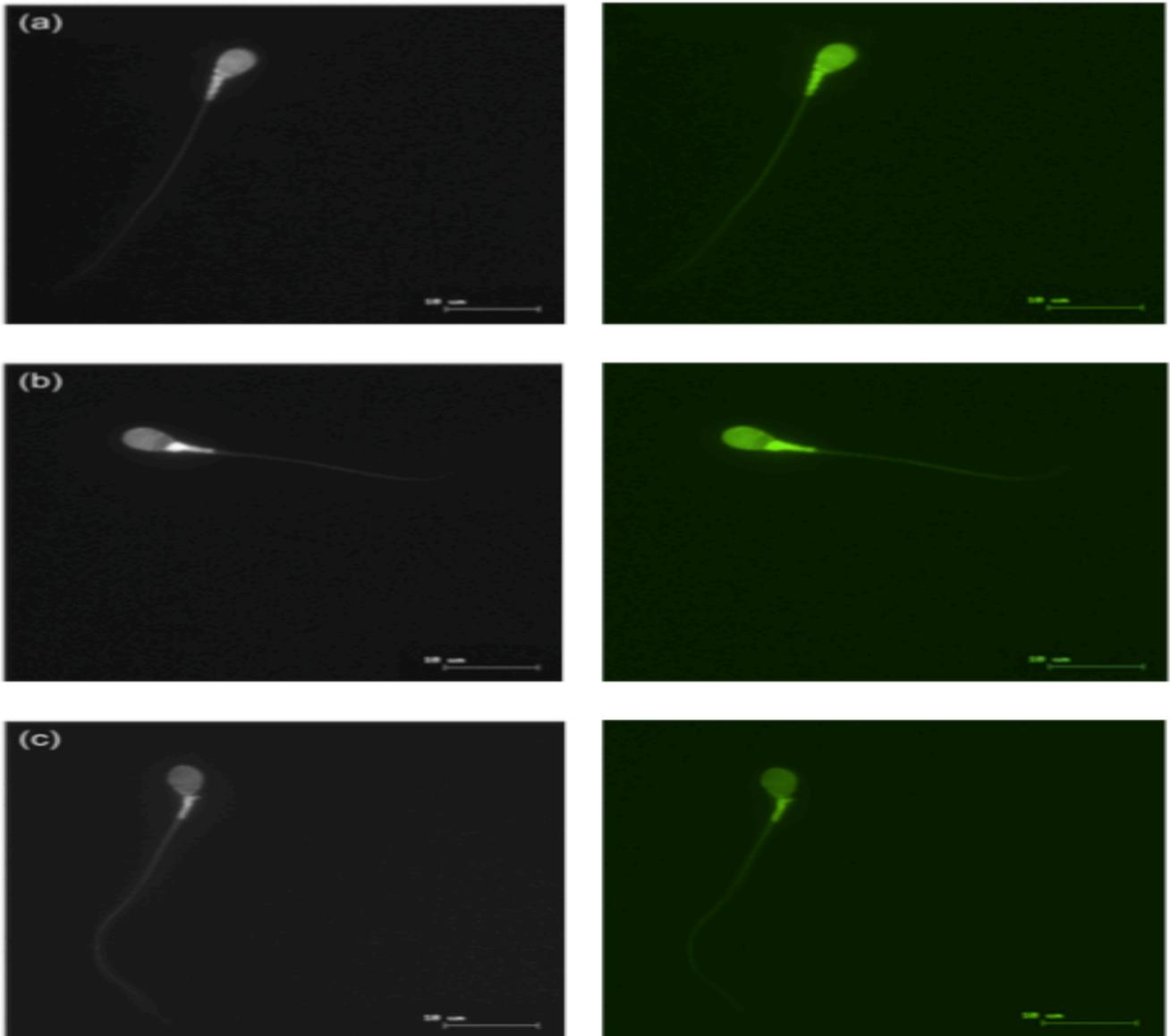
### **2.1.10 Marquage à la chlortetracycline**

La chlortetracycline (CTC) est un antibiotique naturellement fluorescent qui, lorsqu'il se complexe à un cation divalent, émet une fluorescence nettement augmentée. Sur la tête du spermatozoïde, les charges ioniques sont réparties de façon hétérogène et leur répartition est modifiée lors de la capacitation et de la réaction acrosomique. La CTC se lie au calcium et se fixe aux protéines de la membrane plasmique du spermatozoïde. Elle émet une forte fluorescence dont la répartition topographique varie selon que le spermatozoïde est non capacité avec un acrosome intact, capacité ou acrosome réagi (DasGupta *et al.*, 1993). Le protocole

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

La Chlortetracycline (Sigma Aldrich, Saint Louis, Etats-Unis) était ajoutée à la solution de base le jour du marquage des spermatozoïdes pour une concentration de 750  $\mu\text{mol/L}$ . La solution de base était composée de 130  $\text{mmol/L}$  de NaCl, de 5  $\text{mmol/L}$  de cystéine et de 20  $\text{mmol/L}$  de TrisFHCl, elle était gardée à 4°C à l'abri de la lumière. 600.000 spermatozoïdes étaient ajoutés à 50  $\mu\text{l}$  de la solution de CTC et agités. 4  $\mu\text{l}$  de PFA à 12,5 % étaient ensuite ajoutés. La solution était agitée puis 10  $\mu\text{l}$  étaient déposés sur une lame avec une goutte de DABCO (1,4-diazabicyclo [2.2.2] octane) (Sigma-aldrich, Saint Louis, Etats-Unis) pour retarder l'extinction de la fluorescence. Le tout était homogénéisé et recouvert d'une lamelle sur laquelle était exercée une forte pression pour évacuer l'excès de liquide et placer les spermatozoïdes dans le même plan. La lamelle était alors luttée pour éviter l'évaporation. Les lames étaient stockées à 4°C dans le noir, en attendant la lecture. Elles étaient lues au maximum 48 h après leur réalisation et classifiées en selon trois formes (Figure 8) :

- F : avec une fluorescence uniforme sur toute la tête du spermatozoïde, correspondant à un spermatozoïde non capacité avec acrosome intact
- B : avec une fluorescence au niveau de la région acrosomique alors que la région post-acrosomique ne l'est pas, correspondant à un spermatozoïde capacité acrosome intact
- AR : sans fluorescence, correspondant à un spermatozoïde ayant effectué sa réaction acrosomique



**Figure 8** : Localisation de la fluorescence de la chlortétracycline (CTC) chez le spermatozoïde humain. La fluorescence est localisée :

- Sur toute la tête du spermatozoïde pour les formes F, intacts (a)
- Au niveau de la région acrosomique pour les formes B, capacités (b)
- Sans fluorescence pour les formes AR, acrosomes réagis (c)

## 2.1.11 Analyse par microscopie à fluorescence

Le marquage par CTC était analysé grâce au microscope à épi-fluorescence Axio Imager 2 (Zeiss, Jena, Allemagne) (Figure 9) de l'Institut des maladies neurodégénératives de l'Université de Bordeaux.



**Figure 9** : Microscope Axio Imager 2 (zeiss.com)

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

## 2.1.12 Description du protocole

30 patients ont été inclus entre juillet 2016 et juillet 2017 au sein laboratoire d'AMP du CHU de Bordeaux, dont un patient qui a retiré son consentement au cours de l'étude.

L'ensemble des analyses suivantes ont été réalisées à temps = 0h, temps = 4h et temps = 24h : Mobilité progressive, Vitalité, Annexine V, Anti-CD46, Inhibiteur de la caspase 3 activée, Iodure de propidium, et Chlortetracycline.

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

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

La figure 10 résume le protocole.

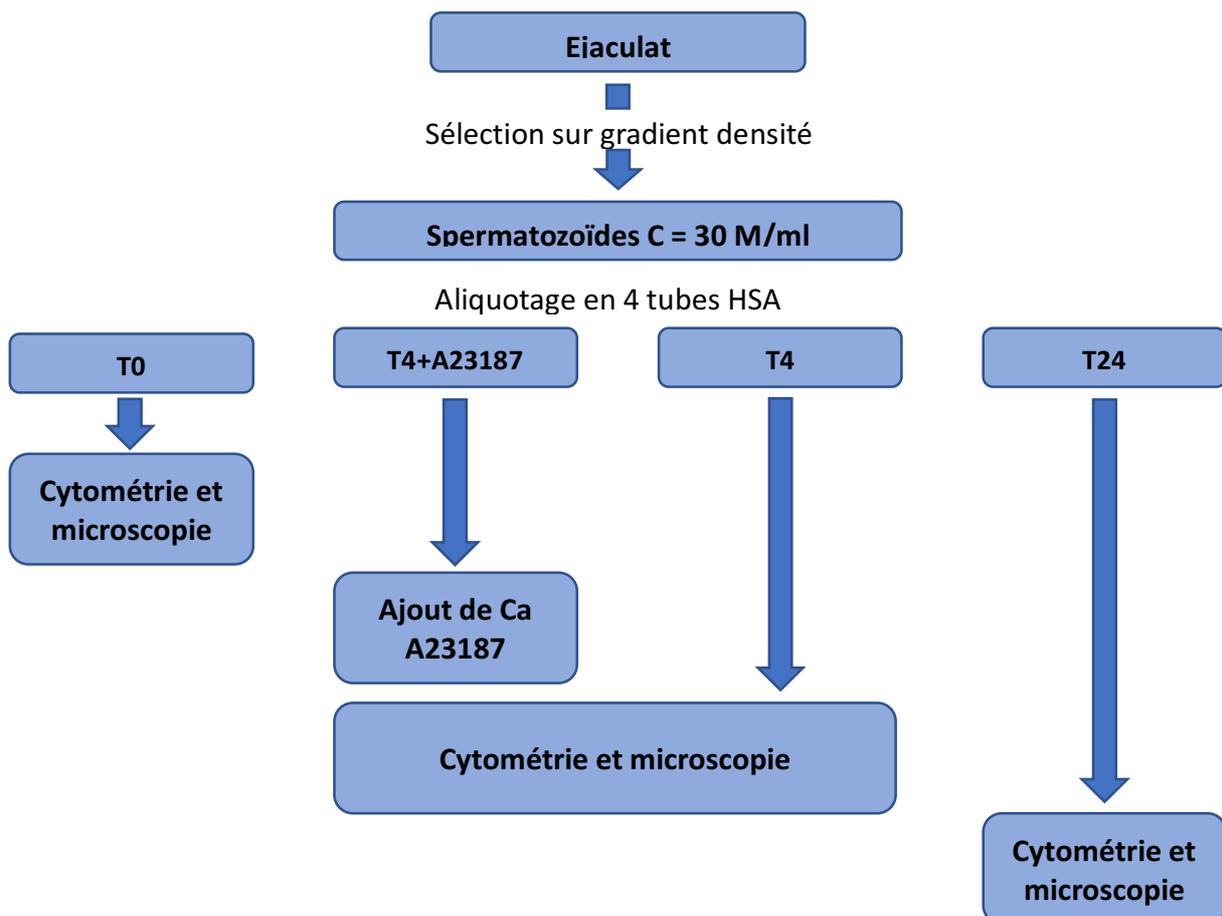


Figure 10 : Schéma descriptif du protocole.

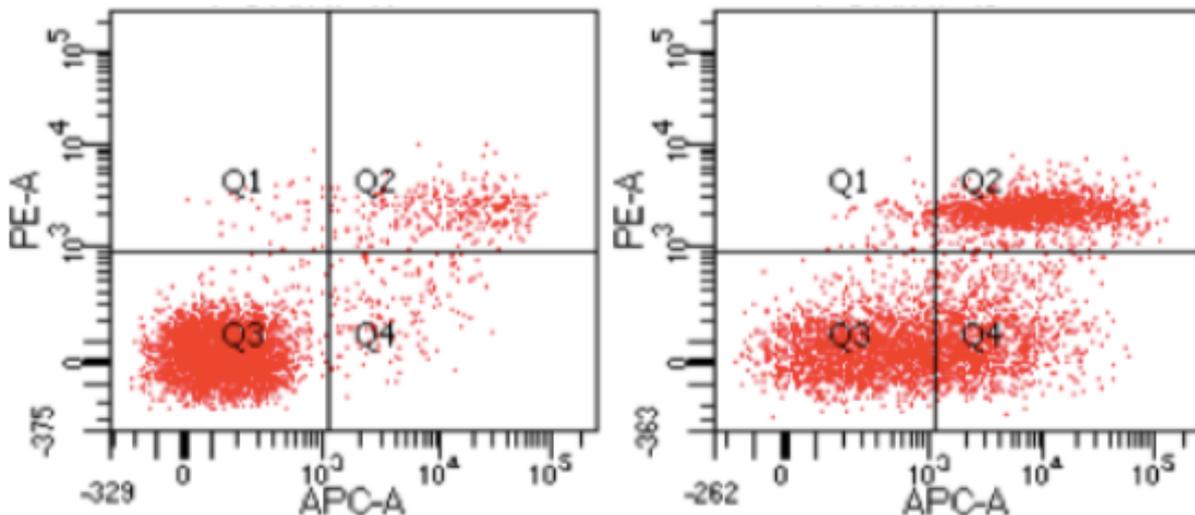
### **2.1.13 Analyse statistique**

Les valeurs sont présentées sous la forme moyenne +/- SEM. Les échantillons sont comparés par Test de Student pour échantillons appariés et sont considérés statistiquement différent si  $p < 0,05$ . Un test ANOVA a été réalisé pour tester une différence entre les différents temps d'incubation. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au programme <https://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/>.

## 2.2 Résultats

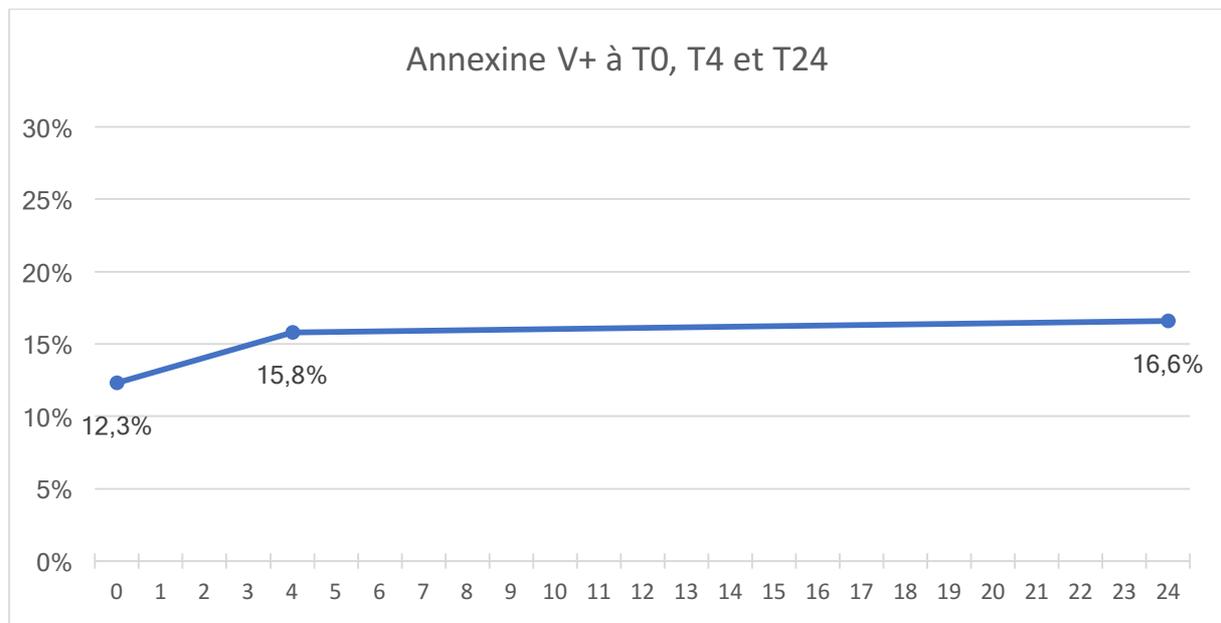
### 2.2.1 Externalisation de la phosphatidylsérine

L'externalisation de la PS a été mise en évidence grâce à l'annexine V. La figure 11 montre le marquage annexine V-APC/ PI-PE. On peut y distinguer 3 populations : dans les 2 quadrants supérieurs les spermatozoïdes nécrotiques PI+, dans le quadrant inférieur gauche les spermatozoïdes vivants annexine V- et dans le quadrant inférieur droit les spermatozoïdes vivants annexine V+.



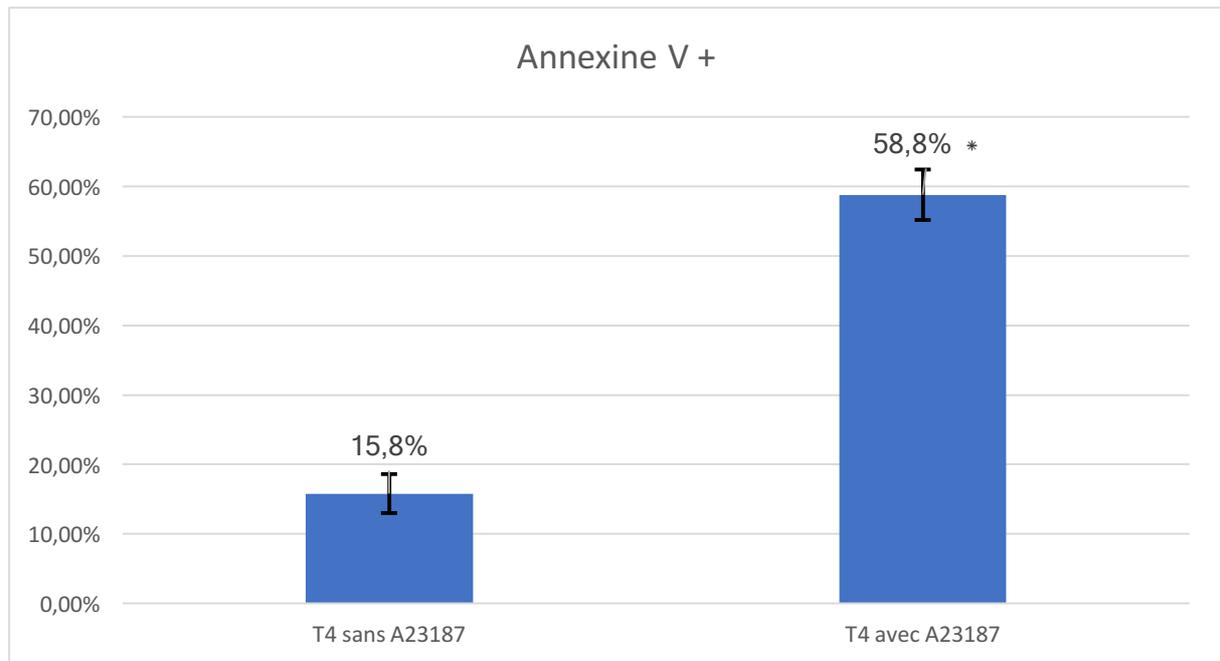
**Figure 11** : Analyse cytométrique de l'exposition de la phosphatidylsérine (PS) et de la nécrose (iodure de propidium (PI)). Cytogrammes typiques du marquage par annexine V-APC/ PI-PE après 4h d'incubation dans le milieu Global + HSA avec calcium ionophore A23187 (cytogramme de droite) et sans (cytogramme de gauche). Les spermatozoïdes nécrotiques sont PI+ (Q1 et Q2) ; les spermatozoïdes vivants sans exposition de la PS sont annexine V-APC-/PI- (Q3) ; et les spermatozoïdes vivants avec une exposition de la PS sont annexine V-APC+/PI- (Q4).

Il n'a pas été retrouvé de différence significative dans l'exposition de la PS entre les temps T0 et T4 ( $p = 0,09$ ), les moyennes étant respectivement de  $12,3 \pm 1,4\%$  et  $15,8 \pm 2,8$ . En revanche, une différence était mise en évidence entre T0 et T24 (T0 :  $12,3 \pm 1,4\%$  et T24 :  $16,6 \pm 1,7\%$ ,  $p < 0,05$ ) (Figure 12).



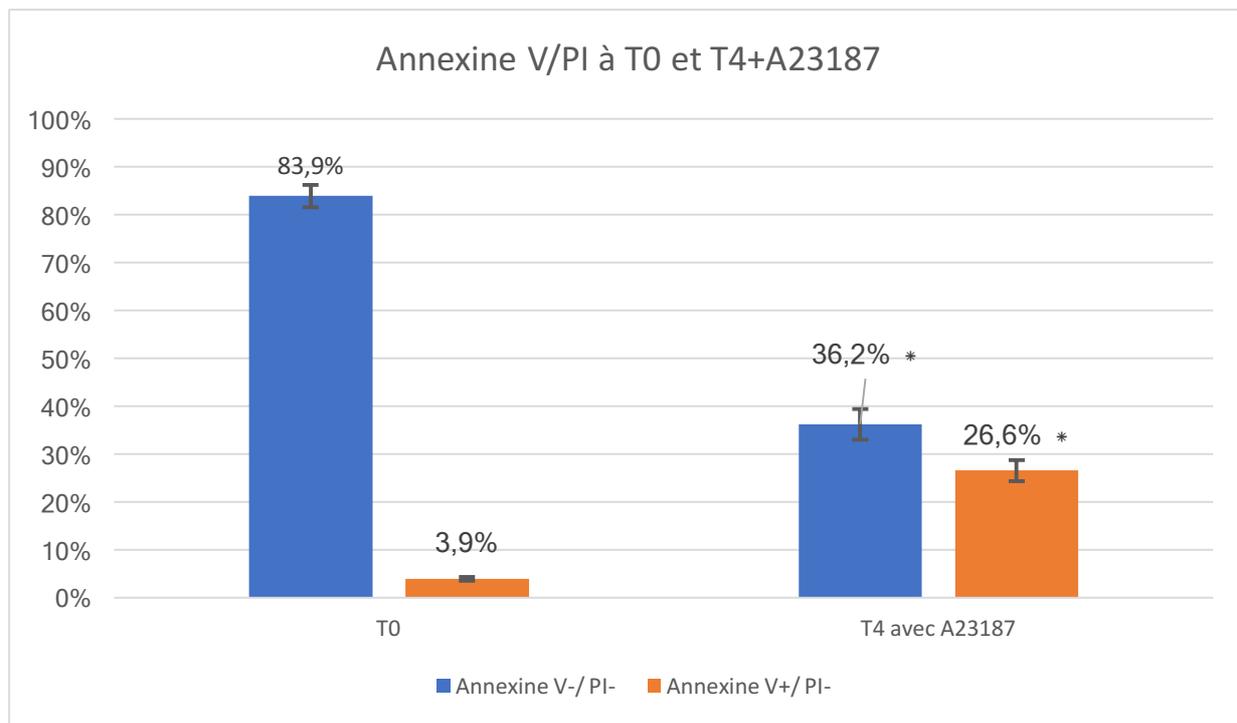
**Figure 12 :** Analyse des spermatozoïdes marqués par annexine V-APC après incubation dans le milieu Global + HSA. Pourcentage de spermatozoïdes annexine V+ en ordonnée et temps d'incubation en heure en abscisse.

En présence de calcium ionophore A23187, on retrouve une différence significative d'exposition de la PS ( $p < 0,001$ ) à 4h par rapport au même prélèvement sans addition de calcium ionophore A23187. On retrouve une augmentation à  $15,8 \pm 2,8\%$  sans calcium ionophore A23187 alors qu'on obtient  $58,8 \pm 3,6\%$  à 4h en présence de calcium ionophore A23187 (Figure 13).



**Figure 13 :** Analyse des spermatozoïdes marqués par annexine V-APC après 4h d'incubation dans le milieu Global + HSA avec et sans A23187. Pourcentage de spermatozoïdes annexine V+ en ordonnée.

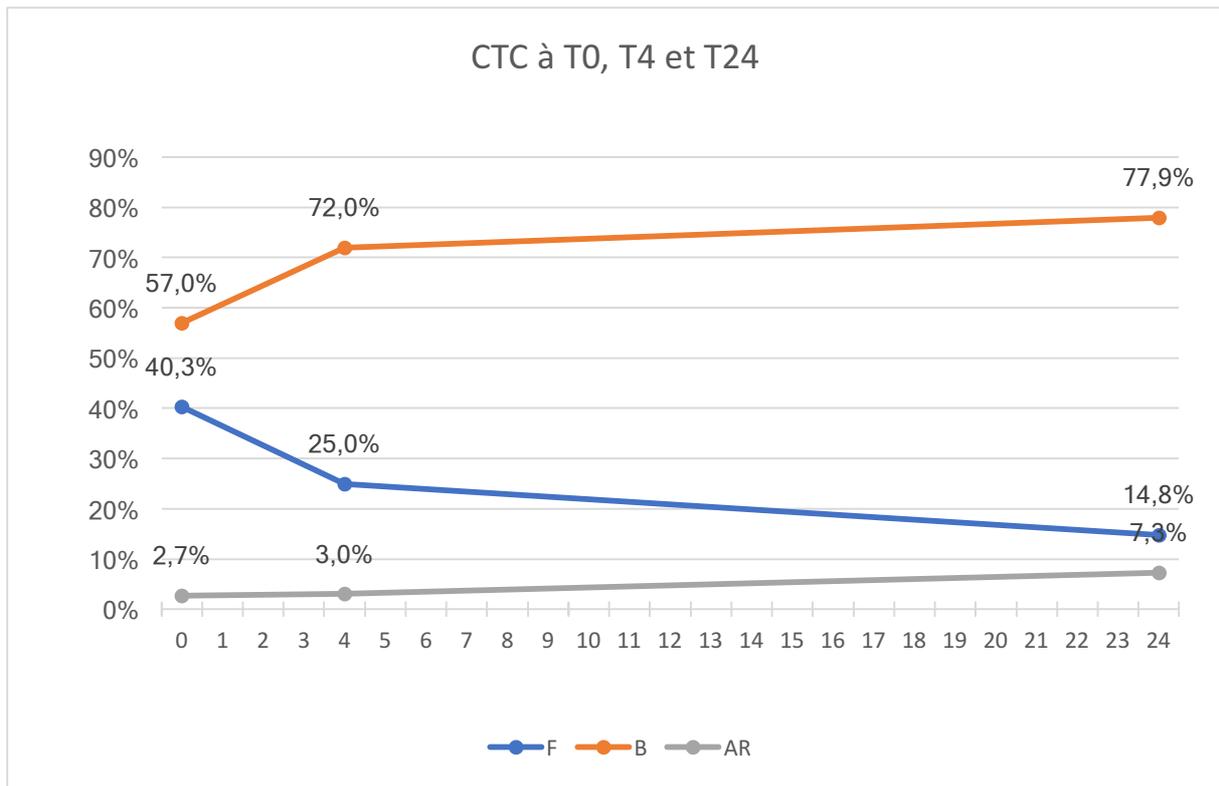
Entre T0 et T4 avec calcium ionophore A23187, les spermatozoïdes annexine V+/PI- ont augmenté d'un ratio  $\approx 5$  alors que les spermatozoïdes morts d'un ratio  $\approx 3$ . Avec l'adjonction de calcium ionophore A23187, les spermatozoïdes annexine V+/PI- augmentent en parallèle de la diminution des spermatozoïdes annexine V-/PI-, passant de 83,9 +/- 2,3% à 36,2 +/- 3,4% (Figure 14).



**Figure 14** : Analyse des spermatozoïdes marqués par annexine V-APC/PI-PE après incubation dans le milieu Global + HSA à T0 et T4 avec ajout A23187. Pourcentage de spermatozoïdes annexine V-/PI- et annexine V+/PI- en ordonnée.

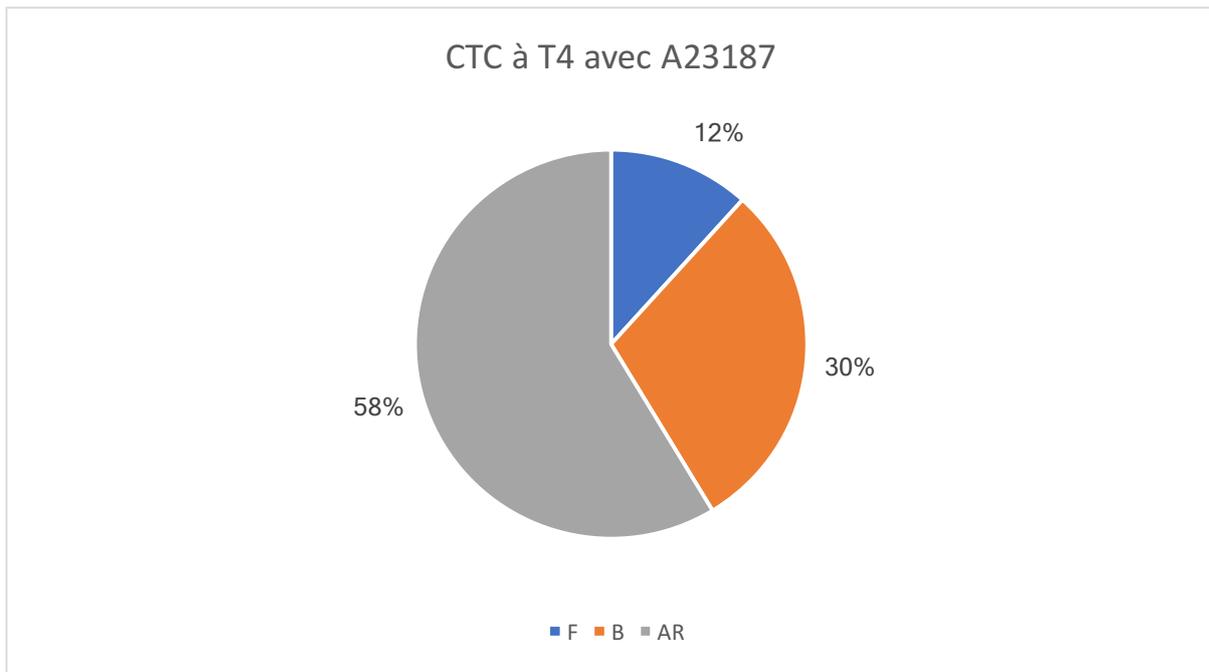
## 2.2.2 Capacitation et réaction acrosomique

La fluorescence de la CTC a permis de classer les spermatozoïdes selon trois catégories. A T0 déjà 57+/- 1,6% des spermatozoïdes étaient capités et quelques rares (2,7+/- 0,7%) acrosomes réagis. A chaque temps (T0, T4, T24), les formes F intactes diminuent (respectivement à 40,3 +/- 1,8%, 25 +/-1,3% et 14,8 +/-0,8%) au profit des formes B capitées (respectivement à 57+/- 1,6%, 72 +/-1,2% et 77,9 +/- 0,7%) de manière significative ( $p < 0,01$ ). Les formes AR augmentent aussi de manière significative ( $p < 0,01$ ) entre T0 2,7+/- 0,7% et T24 7,3 +/-0,7% (Figure 15). Ces résultats suggèrent une capacitation au cours du temps et dans une moindre mesure une réaction acrosomique.

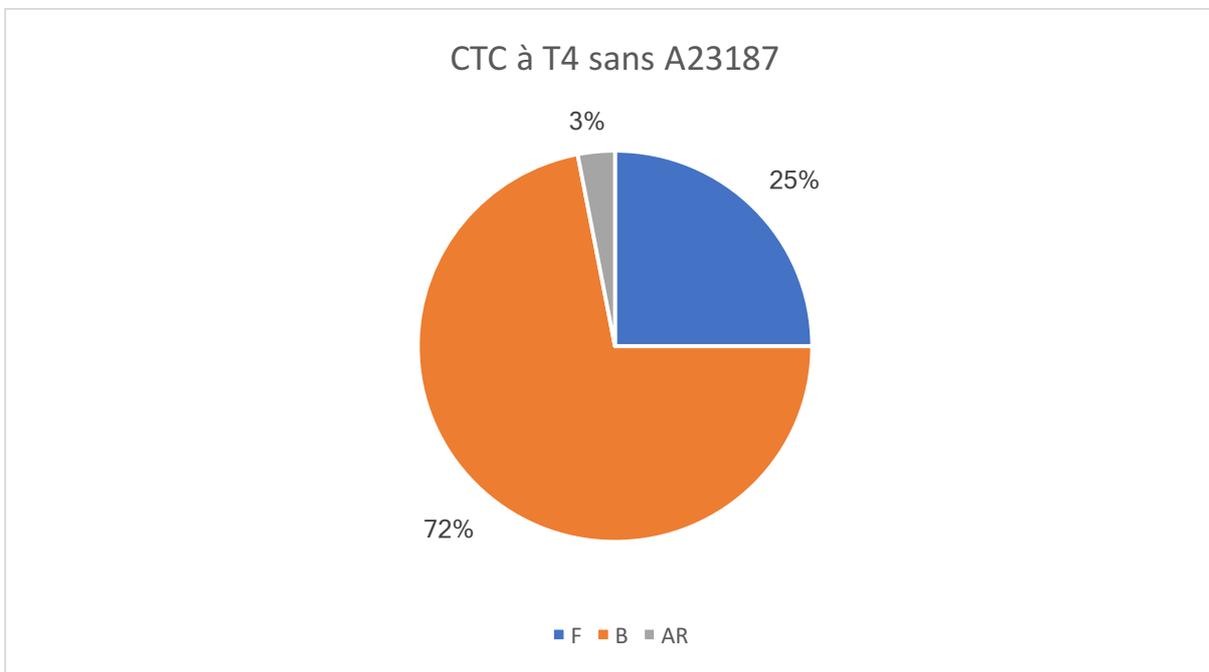


**Figure 15 :** Analyse de la fluorescence des spermatozoïdes par la chlortetracycline (CTC) après incubation dans le milieu Global + HSA. Pourcentage des formes F (intacts), B (capacités) et AR (acrosomes réagis) en ordonnée et temps d'incubation en heure en abscisse.

La présence de calcium ionophore A23187 augmente le nombre de forme AR, les faisant passer de 2,7 $\pm$  0,7% à 58,7  $\pm$  2,5% entre T0 et T4 + calcium ionophore A23187 ( $p < 0,01$ ). Cette augmentation se faisant en parallèle d'une diminution des formes F et B ( $p < 0,01$ ). Comme attendu, ces différences se retrouvent en comparant T4 avec et sans calcium ionophore A23187 ( $p < 0,01$ ) (Figure 16 et 17).

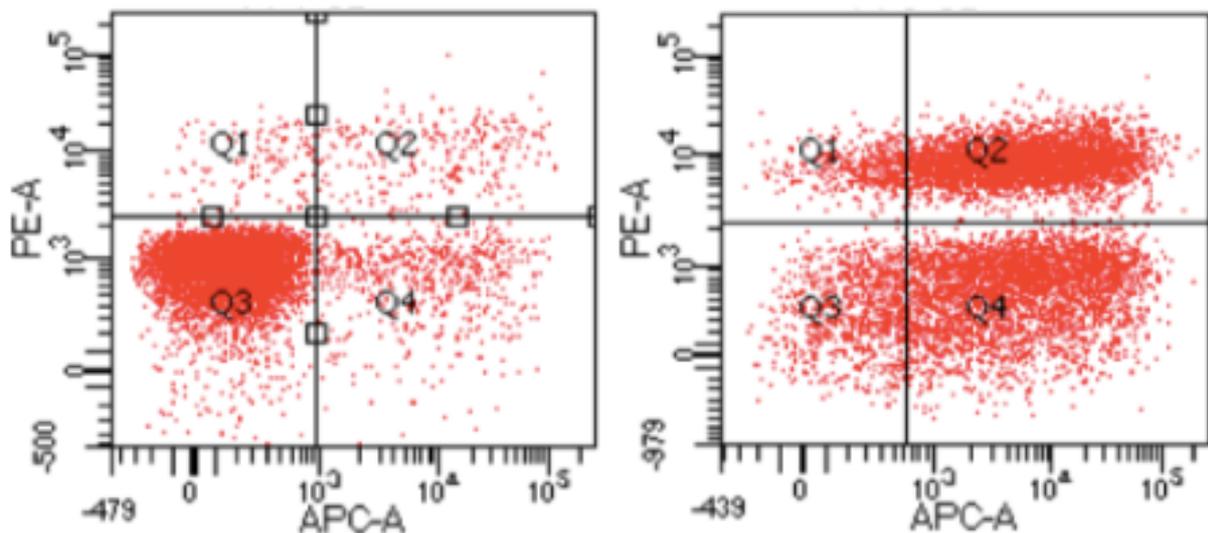


**Figure 16 :** Analyse de la fluorescence des spermatozoïdes par la chlortetracycline (CTC) après 4h d'incubation dans le milieu Global + HSA avec ajout de A23187. Pourcentage des formes F (intacts), B (capacités) et AR (acrosomes réagis).



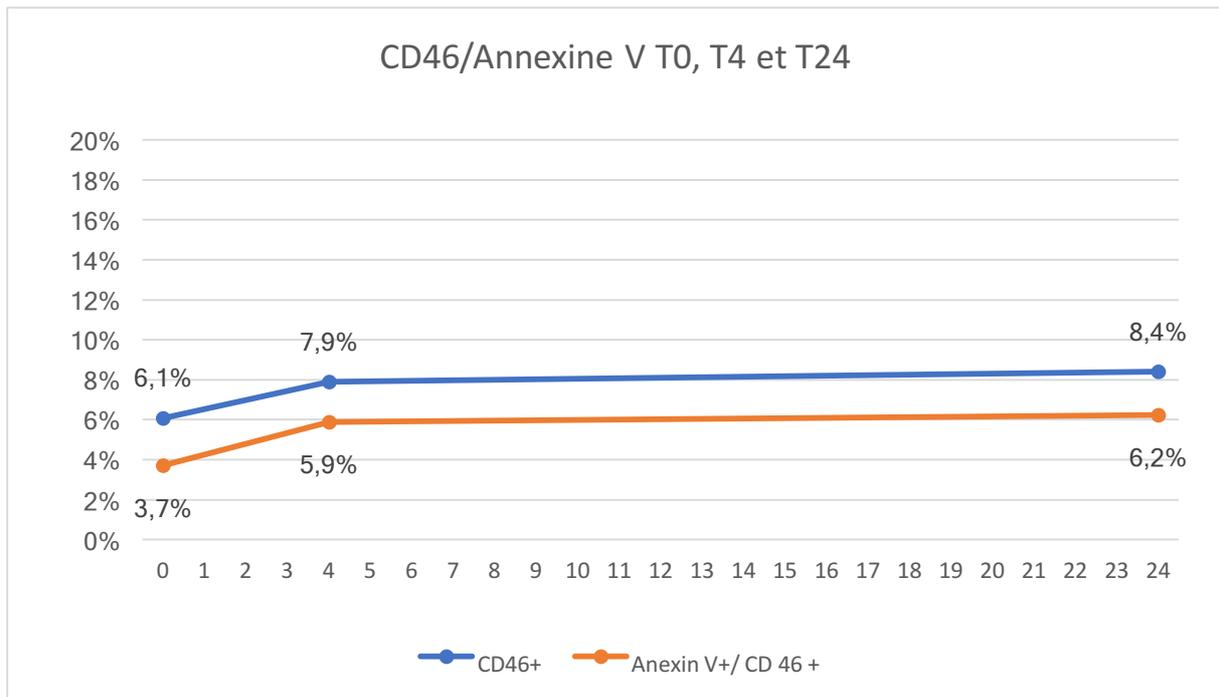
**Figure 17 :** Analyse de la fluorescence des spermatozoïdes par la chlortetracycline (CTC) après 4h d'incubation dans le milieu Global + HSA sans ajout de A23187. Pourcentage des formes F (intacts), B (capacités) et AR (acrosomes réagis).

La figure 18 montre le marquage annexine V-APC/ CD46-PE. On peut y distinguer 4 populations : dans le quadrant supérieur droit les spermatozoïdes acrosome réagi exposant la PS, dans le quadrant supérieur gauche les spermatozoïdes acrosomes réagi n'exposant pas la PS, dans le quadrant inférieur gauche les spermatozoïdes n'exposant pas la PS et non acrosome réagi et enfin dans le quadrant inférieur droit les spermatozoïdes exposant la PS acrosome non réagi.



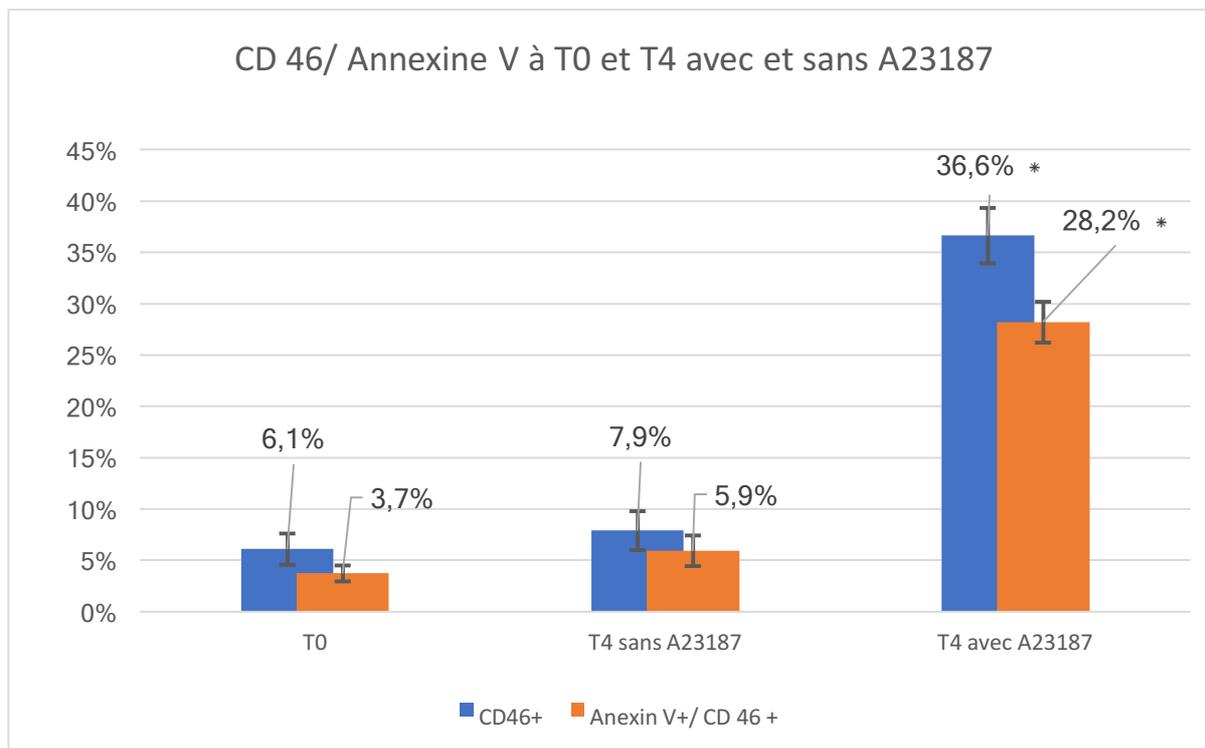
**Figure 18** : Analyse cytométrique de l'exposition de la phosphatidylsérine (PS) et de la réaction acrosomique (CD46). Cytogrammes typiques du marquage par annexine V-APC/ CD46-PE après 4h d'incubation dans le milieu Global + HSA avec calcium ionophore A23187 (cytogramme de droite) et sans (cytogramme de gauche). Les spermatozoïdes acrosomes réagis sont CD46-PE+ (Q1 et Q2) ; les spermatozoïdes avec une exposition de la PS sont annexine V-APC+ (Q2 et Q4).

Une différence dans le marquage au CD46 au cours du temps a été mise en évidence entre T0 et T24 (T0 : 6,1 +/-1,5% et T24 : 8,4 +/- 1,2%,  $p < 0,05$ ) (Figure 19).



**Figure 19 :** Analyse des spermatozoïdes marqués par CD46-PE et annexine V-APC/CD6-PE après incubation dans le milieu Global + HSA. Pourcentage de spermatozoïdes CD46+ et annexine V+/CD46+ en ordonnée et temps d'incubation en heure en abscisse.

L'incubation en présence de calcium ionophore A23187 induit une augmentation significative des spermatozoïdes acrosome réagit, passant de 6,1 +/- 1,5% à T0 à 36,6 +/- 2,7% à T4 + calcium ionophore A23187 ( $p < 0,01$ ). Cette différence n'étant pas retrouvée entre T0 et T4 sans calcium ionophore A23187 (6,1 +/- 1,5% à T0 et 7,9 +/- 1,9%,  $p=0,18$ ) (Figure 20).



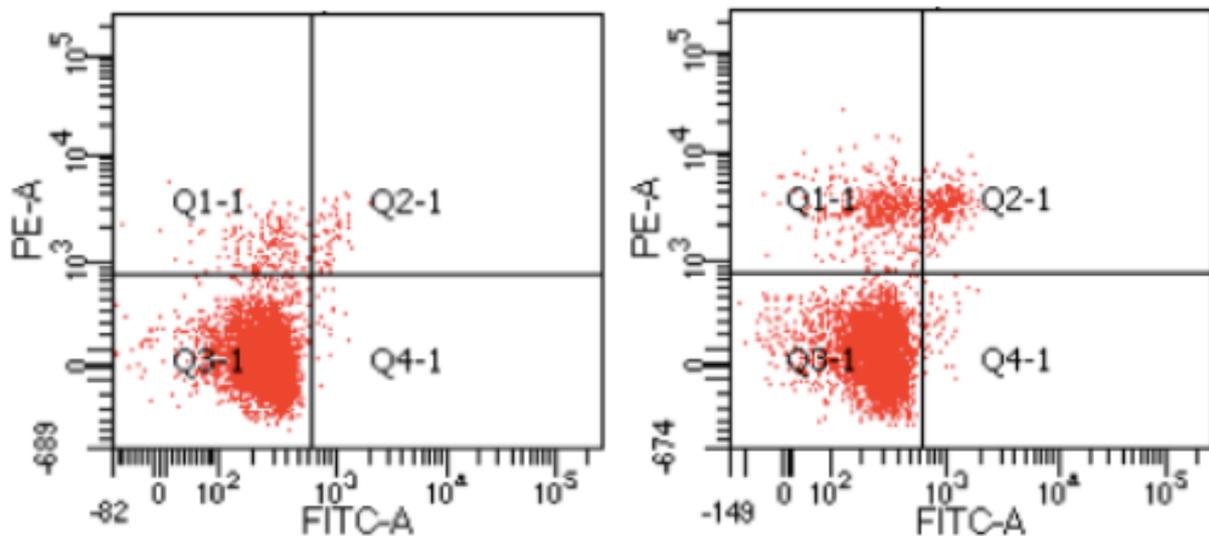
**Figure 20 :** Analyse des spermatozoïdes marqués par CD46-PE et CD46-PE/annexine V-APC après incubation dans le milieu Global + HSA à T0 et T4 avec ou sans ajout de A23187. Pourcentage de spermatozoïdes CD46+ et annexine V+/CD46+ en ordonnée.

La majorité des spermatozoïdes CD46+ sont annexine V+. Mais en présence de calcium ionophore, les spermatozoïdes annexine V+ ne sont pas tous CD46+ avec à la fois des spermatozoïdes annexine V+/CD46- et annexine V+/CD46+.

### 2.2.3 Marqueurs d'apoptose/nécrose

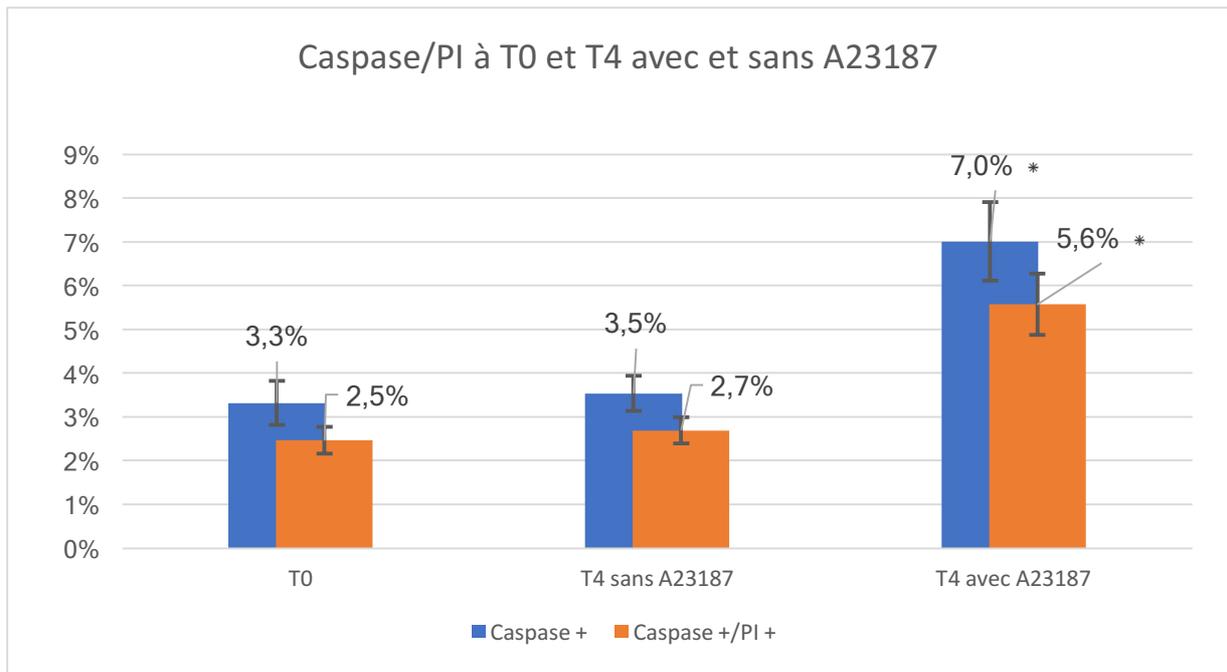
La figure 21 montre le marquage Caspase 3-FITC/ PI-PE. On peut y distinguer 4 populations : dans le quadrant supérieur droit les spermatozoïdes nécrotiques caspase +, dans le quadrant supérieur gauche les spermatozoïdes nécrotiques caspases-, dans le quadrant inférieur gauche les spermatozoïdes caspase - et non

nécrotiques et enfin dans le quadrant inférieur droit les spermatozoïdes caspase + non nécrotiques.



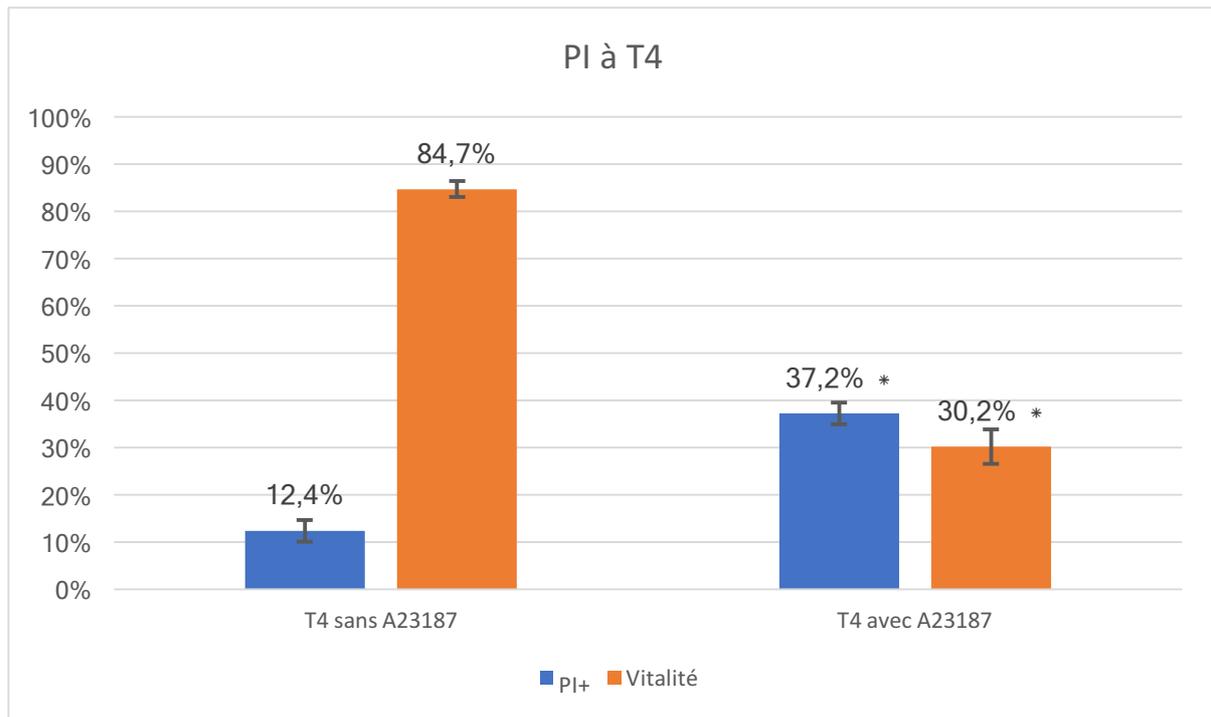
**Figure 21** : Analyse cytométrique de l'activation des caspase 3 et de la nécrose (iodure de propidium (PI)). Cytoigrammes typiques du marquage par Caspase 3-FITC/ PI-PE à 4h avec calcium ionophore A23187 (cytoigramme de droite) et sans (cytoigramme de gauche). Les spermatozoïdes nécrotiques sont PI-PE+ (Q1-1 et Q2-1) ; les spermatozoïdes vivants sans activation de la caspase 3 sont FITC-DEVD-FMK-/PI-PE- (Q3-1) ; et les spermatozoïdes apoptotiques sont FITC-DEVD-FMK+/PI-PE- (Q4-1).

La plupart des spermatozoïdes caspase + sont PI+. La population caspase + à T0 était de 3,3 +/-0,5% et n'a pas montré de variation significative à T4 sans calcium ionophore A23187 et T24. En revanche, le calcium ionophore A23187 engendrait une augmentation de la population caspases + de manière significative (de 3,3 +/-0,5% à 7 +/-0,9%,  $p < 0,01$ ), avec une augmentation profitant majoritairement à la population caspase+/PI+, la population nécrotique (Figure 22).



**Figure 22 :** Analyse des spermatozoïdes marqués par caspase 3 FITC-DEVD-FMK et caspase 3 FITC-DEVD-FMK / PI-PE après incubation dans le milieu Global + HSA à T0 et 4 avec ou sans ajout de A23187. Pourcentage de spermatozoïdes caspase+ et caspase+/PI+ en ordonnée.

Ces résultats sont en accord avec une augmentation significative de la population PI+ en présence de calcium ionophore A23187 par rapport à des spermatozoïdes non exposés à T4 (respectivement à 37,2 +/-2,3% et 12,4 +/-2,4%,  $p < 0,01$ ) et une diminution de la vitalité évaluée par le test à l'éosine (respectivement à 30,2 +/-3,7% et 84,7 +/-1,7%,  $p < 0,01$ ) (Figure 23).



**Figure 23 :** Analyse des spermatozoïdes marqués par PI-PE et du test à l'éosine après 4h d'incubation dans le milieu Global + HSA avec et sans A23187. Pourcentage de spermatozoïdes PI+ et de la vitalité en ordonnée.

## 2.3 Discussion

Pour que le spermatozoïde puisse féconder l'ovocyte, il faut qu'il soit vivant et capable de réaliser sa RA. Ces fonctions sont sous la dépendance de la capacité du spermatozoïde à modifier sa structure membranaire et à contrôler son intégrité. La translocation de la PS depuis le feuillet interne vers le feuillet externe est une de ces modifications. Cette translocation peut être observée et étudiée grâce au marquage par l'annexine V. La signification de l'exposition de la PS est un sujet débattu (Barroso *et al.*, 2000; Oosterhuis *et al.*, 2000; Ricci *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2002; Weng *et al.*, 2002; Paasch *et al.*, 2003; Lachaud *et al.*, 2004).

En l'absence de calcium ionophore A23187, le maximum de capacitation des spermatozoïdes était quasiment atteint en 4 heures. Cette observation explique la proposition de rinçage précoce des ovocytes en FIV classique (Gianaroli *et al.*, 1996; Kattera and Chen, 2003). Ce rinçage permettrait, en maintenant les taux de fécondation en FIV classique, de ne pas prolonger le contact des ovocytes avec des radicaux libres et de diminuer le risque de polyspermie. En l'absence de calcium ionophore A23187, il est aussi observé une augmentation de l'exposition de la PS et des formes AR au marquage par la CTC. Ces résultats peuvent aller avec des mécanismes de RA *in vitro* spontanée sans contact avec la zone pellucide (Esteves *et al.*, 1998). Il a été montré chez la souris qu'un nombre significatif de spermatozoïdes qui atteignaient l'isthme supérieur avaient effectués leur RA et que seulement 5% des spermatozoïdes arrivant au niveau de l'ampoule tubaire étaient acrosome intact (La Spina *et al.*, 2016).

En présence de calcium ionophore A23187, on observe une augmentation des formes AR (acrosome réagi) au marquage à la CTC. Cela confirme que le calcium ionophore A23187 induit bien la RA (Tao *et al.*, 1993; Jaiswal *et al.*, 1999). Une augmentation du marquage par l'annexine en présence de calcium ionophore A23187 a aussi été retrouvée dans notre étude et est en accord avec les données de la littérature (Martin, 2005). Il y a donc un lien entre RA et exposition de la PS, les deux étant induit par la présence de calcium ionophore A23187. On observe aussi

une augmentation à fois de la population annexine V+/CD46+ et de la population annexine V+/CD46-, montrant ainsi que l'exposition de la PS n'est pas exclusive à la RA. Il a été montré que sous conditions de capacitation les spermatozoïdes exposant la PS sont acrosome intact (de Vries *et al.*, 2003). Il y aurait donc une séquence capacitation – expositions PS – RA sachant que ces 2 mécanismes sont fortement intriqués.

Nous avons aussi observé une augmentation des caspases +/PI- en présence de calcium ionophore A23187 mais aussi une augmentation des annexine V+/PI- dans une proportion plus importante. Il y a donc des spermatozoïdes vivants exposant la PS, cette exposition ne pouvant être rapportée à un mécanisme d'apoptose.

Comme cela a précédemment été décrit, nous retrouvons également une augmentation de la mortalité en présence de calcium ionophore A23187 (Martin, 2005). En effet, en présence de calcium ionophore A23187, les spermatozoïdes annexine V- / PI- diminuaient en faveur à la fois des spermatozoïdes annexine V+ / PI- et des spermatozoïdes annexine V+ / PI+. On a aussi retrouvé dans une moindre mesure une augmentation de la mortalité à 24h sans calcium ionophore A23187.

On observe que l'évaluation par l'éosine est toujours plus importante que celle par le PI. Ceci peut être expliqué par le fait que le PI nécessite une lésion de la membrane nucléaire en plus de la membrane plasmique, alors que l'éosine ne nécessite qu'une lésion de la membrane plasmique. Le marquage CD46/IP n'était pas possible car ces deux marquages avaient des longueurs d'ondes équivalentes. On ne pouvait donc pas connaître le statut acrosome réagit ou non des spermatozoïdes morts. On pourrait supposer qu'une fois la RA réalisée, en l'absence de fécondation d'un ovocyte, le spermatozoïde entre en mort cellulaire. Ce qui donne une séquence plus complète comme capacitation – expositions PS – RA – mort cellulaire en l'absence de fécondation d'un ovocyte.

La mort cellulaire du spermatozoïde mature ne serait donc que la conséquence de l'absence de fécondation après la RA et pas un mécanisme spontané indépendant.

Ce mécanisme de mort cellulaire semble être majoritairement une nécrose. L'augmentation des caspases+/PI-, classiquement rapporté à une apoptose, laisse à penser qu'il pourrait y avoir un mécanisme minoritaire d'apoptose concomitant au sein de la population de spermatozoïdes.

Chez les mammifères, l'apoptose a été observée au niveau testiculaire (Hikim *et al.*, 1998; Lue *et al.*, 1999). Certains marqueurs d'apoptose ont été objectivés chez le spermatozoïde mature (Barroso *et al.*, 2000; Muratori *et al.*, 2000; Oosterhuis *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2002). Il pourrait s'agir de cellules immatures ayant échappé au processus apoptotique au cours de la spermatogénèse, processus engagé avant l'éjaculation (Lachaud *et al.*, 2004). Oosterhuis *et al.*, 2000, retrouvait 20 +/- 10% de spermatozoïdes annexine V+/ PI- et 20 +/- 15% de spermatozoïdes avec une fragmentation de l'ADN. Shen *et al.*, 2002, retrouvait dans le même ordre de grandeur, 24,7% de spermatozoïdes annexine V+/ PI- et 15% de spermatozoïdes avec une fragmentation de l'ADN. Chez Muratori *et al.*, 2000, la positivité à la technique TUNEL n'était que partiellement corrélée aux modifications ultrastructurales typiques de l'apoptose des cellules germinales. La présence de ces marqueurs a donc besoin d'être clarifiée, pour pouvoir statuer sur leur implication dans un processus apoptotique ou nécrotique. Allant dans le sens d'un processus nécrotique, la place de la caspase 3 dans les mécanismes de mort cellulaire peut différer en fonction de la lignée cellulaire. Il a été montré que les neurones du *subiculum* (région hippocampique) et du gyrus denté ne partageaient pas le même mécanisme de mort cellulaire en cas d'épilepsie. Avec une activation des caspases 3 dans les deux lignées, l'une donnait une morphologie nécrotique alors que l'autre une morphologie apoptotique (Lopez-Meraz *et al.*, 2010). Une étude sur un rôle possible de la caspase 3 dans le mécanisme de nécrose chez le spermatozoïde pourrait permettre d'apporter des informations majeures sur ce mécanisme de mort cellulaire.

La technique MACS se base sur l'hypothèse que le tri par l'annexine V permet de séparer les spermatozoïdes apoptotiques (annexine V+) des spermatozoïdes vivants (annexine V-). Cette hypothèse reste controversée puisque, comme nous l'avons vu précédemment, l'existence des phénomènes apoptotiques chez le spermatozoïde humain mature est débattu (Oehninger *et al.*, 2003; Lachaud *et al.*,

2004; Mahfouz *et al.*, 2010). L'utilisation du MACS a montré une diminution des marqueurs d'apoptose et de la fragmentation de l'ADN (Grunewald *et al.*, 2001; Paasch *et al.*, 2005; Said *et al.*, 2008). Dans notre étude, il a été montré que la RA s'accompagne d'une augmentation de l'annexine V et que probablement en absence de fécondation d'une nécrose. Il pourrait aussi s'agir de spermatozoïdes ayant réalisé leur RA ou ayant engagé un processus nécrotique. La diminution des marqueurs dit d'apoptose après le tri par MACS serait donc expliquée par la sélection de spermatozoïdes acrosome réagi qui se seraient engagés dans un processus nécrotique. De plus, l'étude de la fragmentation de l'ADN par TUNEL ne permet de différencier la nécrose de l'apoptose. En effet la technique TUNEL ne peut faire la différence entre une fragmentation régulière liée à l'apoptose et une fragmentation non régulière liée à la nécrose (Grasl-Kraupp *et al.*, 1995).

Il a aussi été décrit une meilleure capacité de fécondation des spermatozoïdes triés par MACS en présence d'ovocytes de hamster mais avec une décondensation de la chromatine équivalente après ICSI (Said *et al.*, 2006). Ceci est en accord avec nos résultats, les spermatozoïdes triés par MACS étant déjà acrosome réagi, ils ne pouvaient féconder l'ovocyte mais pouvaient décondenser leur chromatine en cas d'ICSI.

Au final, d'autres temps d'incubation et l'utilisation du caractère réversible de la capacitation, en décapacitant les spermatozoïdes par ajout de plasma séminal ou de cholestérol par exemple, pourraient être intéressants pour apporter plus de précision sur la séquence : Capacitation - externalisation de la PS - Réaction acrosomique – Nécrose en l'absence de fécondation.

Un des axes de recherche futur, sur la PS, pourrait venir de sa localisation se modifiant en fonction du caractère capacité/acrosome réagi du spermatozoïde (Kotwicka *et al.*, 2011). La modification de sa localisation laisse à penser que la PS joue un rôle spécifique dans cette séquence. En effet, après avoir traversé la zone pellucide le spermatozoïde peut fusionner avec l'ovocyte. Pour se faire, l'ovocyte et le spermatozoïde doivent entrer en contact au niveau du segment équatorial (Yanagimachi and Noda, 1970; Bedford *et al.*, 1979), précisément là où le calcium ionophore A23187 induit l'exposition de la PS. Une des hypothèses serait que

l'externalisation de la PS aurait une implication dans l'interaction spermatozoïde-ovocyte. Ainsi la recherche d'un récepteur spécifique à la PS sur l'ovocyte, tel que Class B Scavenger Receptor type 1 (SRFB1) impliqué dans l'interaction cellules de Sertoli/cellules germinales en apoptose (Kawasaki *et al.*, 2002) ou le Phosphatidylserine Receptor (PSR) impliqué dans l'interaction PS/phagocyte (Moreira and Barcinski, 2004), pourrait être un axe de recherche prometteur.

Une autre hypothèse serait l'implication de la PS dans l'interaction avec l'épithélium tubaire. La présence d'annexine V ayant déjà été retrouvée dans l'épithélium tubaire bovin (Ignatz *et al.*, 2007), on peut supposer un rôle dans le réservoir spermatique. On peut aussi supposer que la PS joue un rôle dans le blocage des spermatozoïdes acrosome réagi prématurément, ces spermatozoïdes ne pouvant alors plus féconder naturellement un ovocyte.

## 2.4 Conclusion

En l'absence de calcium ionophore A23187, certains spermatozoïdes humains exposent spontanément la PS. Cette exposition pourrait être relié à des spermatozoïdes ayant échappés aux mécanismes d'apoptose durant la spermatogénèse et/ou des spermatozoïdes spontanément acrosome réagi.

La présence de calcium ionophore A23187 induit une augmentation significative des spermatozoïdes vivants exposant la PS. Cette augmentation se fait aussi bien acrosome réagi que non réagi. Le calcium ionophore A23187 induit aussi un mécanisme de nécrose. On peut ainsi supposer une schématisation de l'externalisation de la PS dans une séquence :

Capacitation - externalisation de la PS - Réaction acrosomique – Nécrose en l'absence de fécondation.

L'externalisation de la PS ne serait donc pas liée à un mécanisme d'apoptose chez le spermatozoïde humain mature.

D'autres études avec différents temps d'incubation et en décapacitant les spermatozoïdes sont maintenant nécessaires pour apporter des précisions sur cette séquence et pour déterminer le rôle potentiel de la PS dans l'interaction spermatozoïde / ovocyte.

# Bibliographie

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996;**87**:171.

Anifandis G, Messini C, Dafopoulos K, Sotiriou S, Messinis I. Molecular and cellular mechanisms of sperm-oocyte interactions opinions relative to in vitro fertilization (IVF). *Int J Mol Sci* 2014;**15**:12972–12997.

Annexine V de BioLegend: détection de l'apoptose Available from: [https://www.ozyme.fr/produits/annexine-v-detection-apoptose.asp#/.](https://www.ozyme.fr/produits/annexine-v-detection-apoptose.asp#/)

Arden N, Betenbaugh MJ. Regulating apoptosis in mammalian cell cultures. *Cytotechnology* 2006;**50**:77–92.

Arnoult C, Escoffier J, Munch L, Pierre V, Hennebicq S, Lambeau G, Ray P. [Do phospholipases, key enzymes in sperm physiology, represent therapeutic challenges?]. *Med Sci MS* 2012;**28**:512–518.

Aydin H, Sultana A, Li S, Thavalingam A, Lee JE. Molecular architecture of the human sperm IZUMO1 and egg JUNO fertilization complex. *Nature* 2016;**534**:562–565.

Banerjee M, Chowdhury M. Induction of capacitation in human spermatozoa in vitro by an endometrial sialic acid-binding protein. *Hum Reprod Oxf Engl* 1995;**10**:3147–3153.

Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod Oxf Engl* 2000;**15**:1338–1344.

Bedford JM, Moore HD, Franklin LE. Significance of the equatorial segment of the acrosome of the spermatozoon in eutherian mammals. *Exp Cell Res* 1979;**119**:119–126.

Bicknell GR, Cohen GM. Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;**207**:40–47.

Blanco-Rodríguez J, Martínez-García C, Porras A. Correlation between DNA synthesis in the second, third and fourth generations of spermatogonia and the occurrence of apoptosis in both spermatogonia and spermatocytes. *Reprod Camb Engl* 2003;**126**:661–668.

Chen MS, Tung KS, Coonrod SA, Takahashi Y, Bigler D, Chang A, Yamashita Y, Kincade PW, Herr JC, White JM. Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1: implications for murine fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;**96**:11830–11835.

Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;**326**:1–16.

Cross NL. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod* 1998;**59**:7–11.

DasGupta S, Mills CL, Fraser LR. Ca(2+)-related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J Reprod Fertil* 1993;**99**:135–143.

De Jonge C. Biological basis for human capacitation-revisited. *Hum Reprod Update* 2017;**23**:289–299.

Delbes G, Herrero MB, Troeung E-T, Chan PTK. The use of complimentary assays to evaluate the enrichment of human sperm quality in asthenoteratozoospermic and teratozoospermic samples processed with Annexin-V magnetic activated cell sorting. *Andrology* 2013;**1**:698–706.

Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ, Agarwal A. Effect of in vitro incubation on spontaneous acrosome reaction in fresh and cryopreserved human spermatozoa. *Int J Fertil Womens Med* 1998;**43**:235–242.

Evans JP. Sperm-egg interaction. *Annu Rev Physiol* 2012;**74**:477–502.

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950* 1992;**148**:2207–2216.

Flesch FM, Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Biomembr* 2000;**1469**:197–235.

Florman HM. Sequential Focal and Global Elevations of Sperm Intracellular Ca<sup>2+</sup> Are Initiated by the Zona Pellucida during Acrosomal Exocytosis. *Dev Biol* 1994;**165**:152–164.

Florman HM, Corron ME, Kim TD, Babcock DF. Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Dev Biol* 1992;**152**:304–314.

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

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

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fiorentino A, Tosti E, Panzella S, Dale B. Reducing the time of sperm-oocyte interaction in human in-vitro fertilization improves the implantation rate. *Hum Reprod* 1996;**11**:166–171.

Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology Baltim Md* 1995;**21**:1465–1468.

Grunewald S, Paasch U, Glander HJ. Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell Tissue Bank* 2001;**2**:127–133.

Gupta SK. Role of zona pellucida glycoproteins during fertilization in humans. *J Reprod Immunol* 2015;**108**:90–97.

Harrison RAP, Gadella BM. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology* 2005;**63**:342–351.

Hikim AP, Wang C, Lue Y, Johnson L, Wang XH, Swerdloff RS. Spontaneous germ cell apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;**83**:152–156.

Ignotz GG, Cho MY, Suarez SS. Annexins are candidate oviductal receptors for bovine sperm surface proteins and thus may serve to hold bovine sperm in the oviductal reservoir. *Biol Reprod* 2007;**77**:906–913.

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

Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba SA, Chiba K, Hirohashi N. 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;**108**:4892–4896.

Jin S-K, Yang W-X. Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated? *Oncotarget* 2016;**8**:3600–3627.

Kattera S, Chen C. Short coincubation of gametes in in vitro fertilization improves implantation and pregnancy rates: a prospective, randomized, controlled study. *Fertil Steril* 2003;**80**:1017–1021.

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

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;**26**:239–257.

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

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

Kotwicka M, Jendraszak M, Warchoń JB. Plasma membrane translocation of phosphatidylserine in human spermatozoa. *Folia Histochem Cytobiol* 2002;**40**:111–112.

La Spina FA, Puga Molina LC, Romarowski A, Vitale AM, Falzone TL, Krapf D, Hirohashi N, Buffone MG. Mouse sperm begin to undergo acrosomal exocytosis in the upper isthmus of the oviduct. *Dev Biol* 2016;**411**:172–182.

Lachaud C, Tesarik J, Cañadas ML, Mendoza C. Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod Oxf Engl* 2004;**19**:607–610.

Lefebvre J, Fan J, Chevalier S, Sullivan R, Carmona E, Manjunath P. Genomic structure and tissue-specific expression of human and mouse genes encoding homologues of the major bovine seminal plasma proteins. *Mol Hum Reprod* 2007;**13**:45–53.

Leist M, Jäättelä M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;**2**:589–598.

Lopez-Meraz M-L, Niquet J, Wasterlain CG. Distinct caspase pathways mediate necrosis and apoptosis in subpopulations of hippocampal neurons after status epilepticus. *Epilepsia* 2010;**51 Suppl 3**:56–60.

Lue YH, Hikim AP, Swerdloff RS, Im P, Taing KS, Bui T, Leung A, Wang C. Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology* 1999;**140**:1709–1717.

Lukaszuk K, Wcislo M, Liss J, Stachowicz A, Jakiel G, Lukaszuk M, Pastuszek E, Woclawek-Potocka I, Galvao A, Bialobrzeska D. First Pregnancy, Somatic and Psychological Status of a 4-Year-Old Child Born following Annexin V TESA Sperm Separation. *AJP Rep* 2015;**5**:e105-108.

Mahfouz RZ, Plessis SS du, Aziz N, Sharma R, Sabanegh E, Agarwal A. Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. *Fertil Steril* 2010;**93**:814–821.

Martin G. Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction. *Hum Reprod* 2005;**20**:3459–3468.

Moreira MEC, Barcinski MA. Apoptotic cell and phagocyte interplay: recognition and consequences in different cell systems. *An Acad Bras Cienc* 2004;**76**:93–115.

Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, Gambera L, Baccetti B, Biagiotti R, Forti G, *et al.* Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl* 2000;**21**:903–912.

Muratori M, Porazzi I, Luconi M, Marchiani S, Forti G, Baldi E. AnnexinV binding and merocyanine staining fail to detect human sperm capacitation. *J Androl* 2004;**25**:797–810.

Nakanishi Y, Shiratsuchi A. Phagocytic removal of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells: mechanisms and consequences. *Biol Pharm Bull* 2004;**27**:13–16.

Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997;**22**:299–306.

- Noguchi S, Yonezawa N, Katsumata T, Hashizume K, Kuwayama M, Hamano S, Watanabe S, Nakano M. Characterization of the zona pellucida glycoproteins from bovine ovarian and fertilized eggs. *Biochim Biophys Acta* 1994;**1201**:7–14.
- Oehninger S, Morshedi M, Weng S-L, Taylor S, Duran H, Beebe S. Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2003;**7**:469–476.
- Oosterhuis GJ, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg E, Lambalk CB, Schoemaker J, Vermes I. Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertil Steril* 2000;**74**:245–250.
- Paasch U, Grunewald S, Fitzl G, Glander H-J. Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. *J Androl* 2003;**24**:246–252.
- Paasch U, Grunewald S, Wuendrich K, Jope T, Glander H-J. Immunomagnetic removal of cryo-damaged human spermatozoa. *Asian J Androl* 2005;**7**:61–69.
- Pop C, Salvesen GS. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem* 2009;**284**:21777–21781.
- Prakriya M, Lewis RS. Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev* 2015;**95**:1383–1436.
- Putney JW. Recent Breakthroughs in the Molecular Mechanism of Capacitative Calcium Entry (With Thoughts on How We Got Here). *Cell Calcium* 2007;**42**:103–110.
- Raynal P, Pollard HB. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1994;**1197**:63–93.
- Ricci G, Perticarari S, Fragonas E, Giolo E, Canova S, Pozzobon C, Guaschino S, Presani G. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Hum Reprod Oxf Engl* 2002;**17**:2665–2672.
- Said T, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Baumann T, Kriegel C, Li L, Glander H-J, Thomas AJ, Paasch U. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. *Biol Reprod* 2006;**74**:530–537.
- Said TM, Agarwal A, Zborowski M, Grunewald S, Glander H-J, Paasch U. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J Androl* 2008;**29**:134–142.
- Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 1997;**91**:443–446.
- Schweichel JU, Merker HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 1973;**7**:253–266.

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

Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995;**267**:1445–1449.

Tao J, Du J, Critser ES, Critser JK. Assessment of the acrosomal status and viability of human spermatozoa simultaneously using flow cytometry. *Hum Reprod Oxf Engl* 1993;**8**:1879–1885.

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

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

Van den Eijnde SM, Boshart L, Reutelingsperger CP, De Zeeuw CI, Vermeij-Keers C. Phosphatidylserine plasma membrane asymmetry in vivo: a pan-cellular phenomenon which alters during apoptosis. *Cell Death Differ* 1997;**4**:311–316.

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

Visconti PE, Kopf GS. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* 1998;**59**:1–6.

Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman AB. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol* 2002;**53**:133–150.

Vries KJ de, Wiedmer T, Sims PJ, Gadella BM. Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. *Biol Reprod* 2003;**68**:2122–2134.

Ward CR, Storey BT. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev Biol* 1984;**104**:287–296.

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

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

Yanagimachi R. Sperm-egg association in animals. *Curr Top Dev Biol* 1978;**12**:83–105.

Yanagimachi R, Noda YD. Physiological changes in the postnuclear cap region of mammalian spermatozoa: a necessary preliminary to the membrane fusion between sperm and egg cells. *J Ultrastruct Res* 1970;**31**:486–493.

Yang H, Li M, Ma S, Li C, Fan Y, Liu J, Chen Z. [Application of calcium ionophore A23187 in ICSI for globozoospermia: A report of 2 cases and review of the literature]. *Zhonghua Nan Ke Xue Natl J Androl* 2015;**21**:338–341.

Zhu G-Z, Miller BJ, Boucheix C, Rubinstein E, Liu CC, Hynes RO, Myles DG, Primakoff P. Residues SFQ (173-175) in the large extracellular loop of CD9 are required for gamete fusion. *Dev Camb Engl* 2002;**129**:1995–2002.

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

# Annexes

	Mob	Vita	Anein V+	Anein V+/P-	IP+	CD46+	Anein V+/CD46-	Anein V+/CD46+	Caspase+	Caspase+/P-	Caspase+/P+	CTCF	CTC8	CTCAR
P1	91	92	84	2,5	12,8	2,7	2,9	1,9	0,3	0,1	0,2	44	53	3
P2	95	99	3,6	0,8	4,9	1,5	3,4	1	3,1	0	3,1	37	61	2
P3	80	96	3,2	0,2	5,7	2,3	2,5	1,4	11,2	2,4	8,8	48	48	4
P4	79	92	8,4	3,8	5,6	2,7	5,9	1,8	2,2	1,2	1	37	59	4
P5	95	97	11,8	3,4	9,4	1,7	7,4	1,3	3,9	1,7	2,2	30	69	1
P6	77	77	26,3	6	38,7	26,4	9,7	15	7	2,6	4,4	26	61	13
P7	95	98	18,5	6,3	13,9	7,5	13	6,2	4,3	1,4	2,9	50	46	4
P8	100	100	7,5	1,9	7,2	2,7	4,9	2	3,1	0,3	2,8	55	43	2
P9	94	95	7,4	2,5	5,5	2,2	0	0,1	5,8	1,6	4,2	32	68	0
P10	100	100	5,7	2,4	3,9	1,6	4,2	1,1	3,5	1	2,5	43	57	0
P11	90	95	18,1	4,2	16,3	5	13,3	3,4	2	0,5	1,5	38	62	0
P12	85	87	4,5	2,3	2,3	1	3,7	0,7	0,9	0,3	0,6	46	53	1
P13	80	82	17,5	8,6	13,9	7,3	12,4	4	1,6	0,8	0,8	58	42	0
P14	90	93	12,7	3,7	11,6	4,7	6	3	3	0,4	2,6	46	53	1
P15	70	80	13,5	3,5	13,7	6,5	8,1	3,3	1,3	0,3	1	36	63	1
P16	85	90	14,6	4,7	11,6	5,9	9,6	4,4	3,5	0,6	2,9	41	58	1
P17	95	99	5,1	1,7	3,8	1,6	4,4	1,2	1,6	0,2	1,4	53	45	2
P18	85	91	13,8	4,2	12,7	7,6	8,7	5,2	3,8	0,9	2,9	33	63	4
P19	90	90	18,8	7,1	16,4	10,3	12,1	5,7	2,7	0,6	2,1	49	48	3
P20	80	86	4,5	2,2	3,1	1,5	4	0,9	1,5	0,5	1	28	68	4
P21	92	93	25,7	8,7	18,9	15,4	12,6	12,6	8,6	2	6,6	41	57	2
P22	58	58	35,7	2,7	62,3	37,2	16,7	17,9	4,5	0,1	4,4	25	59	16
P23	93	98	9,2	3,6	7,3	3,3	7,3	2	1	0,1	0,9	33	66	1
P24	96	97	9,2	3,1	8,6	4,4	4,6	2,5	0,7	0,2	0,5	31	67	2
P25	85	88	5,3	1,9	9,3	2,6	4,4	1,2	1,2	0,2	1	45	54	1
P26	92	95	12,1	6,6	10,1	2,5	13,5	1,8	3	1	2	29	69	2
P27	90	90	11,5	6,6	5,9	1,6	9,6	1,2	2,6	0,6	2	30	67	3
P28	96	97	14,4	5,5	10,6	3,8	11,2	2,9	5,3	1,9	3,4	59	40	1
P29	91	91	10,9	3,7	6,9	2,8	9,8	2,1	3	1,2	1,8	47	53	0
Moyenne	87,9	91,2	12,3	3,9	12,2	6,1	7,8	3,7	3,3	0,9	2,5	40,3	57,0	2,7
Ecartype	9,2	8,7	7,6	2,2	11,9	7,9	4,2	4,3	2,4	0,7	1,9	9,7	8,8	3,6
Médiane	90	93	12,1	3,7	10,1	3,8	8,7	2,5	3	0,6	2,1	41	58	1
SEM	1,7	1,6	1,4	0,4	2,2	1,5	0,8	0,8	0,5	0,1	0,3	1,8	1,6	0,7

**Annexe 1 :** Pourcentages de spermatozoïdes par marquage pour chaque patient à T0, avec moyenne, écart type, médiane et SEM.

	Mob	Vita	Anein V+	Anein V+/PI -	PI+	CD46+	Anein V+/CD46	Anein V-/CD46+	Caspase +	Caspase+PI -	Caspase+PI+	CTCF	CTC8	CTCAR
P1	10	13	47	13,1	47,6	61,7	5	29,3	12,8	1,6	11,2	11	17	7,2
P2	40	47	26,6	11	17,3	7,8	13,7	4	2,5	0,6	1,9	20	48	3,2
P3	15	15	36,3	11,3	31,8	54,7	6,1	24,1	5,2	1,5	3,7	34	21	4,5
P4	53	53	45,2	30,5	15,1	16,3	28,3	15,7	4	1,3	2,7	17	16	6,7
P5	62	66	54,4	22,9	33,1	41,1	30,7	34,4	4,7	0,6	4,1	5	23	7,2
P6	53	55	59,4	29,4	31,7	48,8	26,8	37,5	6,8	3,2	3,6	20	40	4,0
P7	44	45	69,1	25,8	45,9	44,3	28,2	34,4	7,8	1,5	6,3	13	32	5,5
P8	23	23	84,3	36,2	49,6	23,9	61,4	21,8	8	1	7	2	26	7,2
P9	29	33	67,2	37	32	62,3	23,3	48,7	2,5	0,6	1,9	5	28	6,7
P10	64	65	70,8	29,9	43,3	32,6	35,4	25,3	7,9	0,7	7,2	6	30	6,4
P11	23	26	14,2	2,2	33,8	17,3	47,9	14,8	2,3	0,4	1,9	9	39	5,2
P12	25	25	72	35,8	37,6	43,7	35,1	36,4	2,1	0,4	1,7	6	18	7,6
P13	9	12	75,4	44,1	36,3	29,8	48,1	23,3	3,1	0,4	2,7	6	42	5,2
P14	9	11	84,6	40,2	45,8	52,3	36,7	47,4	7,5	1	6,5	26	23	5,1
P15	18	22	68,8	30,8	41,8	31,3	42,2	26,2	8,9	1,2	7,7	24	37	3,9
P16	24	30	74,4	28,2	49,1	32,9	36,1	26,8	8	1,4	6,6	3	28	6,9
P17	55	67	38,4	22,6	17	25,1	21,2	19,3	2,7	0,5	2,2	10	21	6,9
P18	13	17	67,7	36,7	32,5	40,2	31,7	31	9,2	1,7	7,5	4	33	6,3
P19	58	68	52	23,2	32,9	27,6	23	18,5	2,7	0,7	2	10	17	7,3
P20	19	24	78,3	44	35,6	36,3	28,9	27,8	2,1	0,2	1,9	4	35	6,1
P21	14	21	67,3	28,2	41,7	36,1	33,7	31,8	7,1	1,2	5,9	4	33	6,3
P22	8	10	51,1	8	71,7	49,8	21	24,8	7,9	0,4	7,5	7	33	6,0
P23	15	18	64,6	22,2	45	50	21,8	37,8	6,2	0,3	5,9	5	33	6,2
P24	16	21	11,2	4,1	7,9	4,7	9	3,5	2,1	0,4	1,7	12	48	4,0
P25	28	28	63,4	29,1	36,8	40,6	25,8	36	19,2	4,7	14,5	22	54	2,4
P26	7	10	87,2	46,3	45,5	42,6	46,8	40,8	18,5	5	13,5	22	16	6,2
P27	38	41	57,7	27,6	40,8	33	27,5	29,2	5,6	0,9	4,7	7	17	7,6
P28	1	2	68,9	28	48,1	43,5	29,7	38,8	16,2	4,5	11,7	15	31	5,4
P29	8	8	47,9	21,7	32,1	32,3	19,6	28,8	9,7	3,9	5,8	10	21	6,9
Moyenne	26,9	30,2	58,8	26,6	37,2	36,6	29,1	28,2	7,0	1,4	5,6	11,7	29,7	58,7
Ecart type	18,9	19,9	19,6	11,7	12,6	14,3	12,8	10,8	4,7	1,4	3,6	8,2	10,5	13,7
Médiane	23	24	67,3	28,2	37,6	36,3	29,7	29,2	7,1	0,9	5,9	7	31	6,2
SEM	3,5	3,7	3,6	2,2	2,3	2,7	2,4	2,0	0,9	0,3	0,7	1,5	1,9	2,5

**Annexe 2 :** Pourcentages de spermatozoïdes par marquage pour chaque patient à T4 avec calcium ionophore A23187, avec moyenne, écart type, médiane et SEM.

	Mob	Vita	Anekin V+	Anekin V+/PI-	IP+	CD46+	Anekin V+/CD 46-	Anekin V+/CD 46+	Caspase +	Caspase +/PI-	Caspase +/PI+	CTCF	CTCB	CTCAR
P1	84	88	9,4	1,8	11,5	4,2	5	3,8	7,4	1,3	6,1	16	82	2
P2	82	83	8,7	3,2	5,9	2,2	4,7	1,9	1,6	0,7	0,9	33	65	2
P3	77	81	8,5	2,1	7,3	4,1	6,2	3,9	0,5	0,1	0,4	36	61	3
P4	64	79	5,9	2,8	5,3	1,9	4,5	1,2	2,3	0,6	1,7	18	80	2
P5	81	85	9,7	3,1	7,4	8	10	6,3	1,5	0,6	0,9	28	70	2
P6	66	66	29,7	19,9	10,7	20,8	17,1	14,2	3,5	1,1	2,4	22	69	9
P7	79	82	17,6	7,4	10,9	7,6	11,5	6,3	4,5	1,2	3,3	20	80	0
P8	97	97	7,4	3,2	4,6	2,6	5	1,9	3	0,6	2,4	20	77	3
P9	95	100	7,9	3,3	4,8	2,4	6,5	1,8	1,8	0,4	1,4	30	68	2
P10	98	100	10,3	6,9	3,6	1,8	5,9	1,3	7,1	2,6	4,5	33	65	2
P11	87	88	19,7	6,3	15	6,4	16,6	5	1,8	0,7	1,1	28	71	1
P12	93	93	4,9	2,9	2	0,9	3,4	0,7	1,6	0,5	1,1	35	65	0
P13	71	74	21,3	11,9	13,4	8,5	13,6	5,5	1,5	0,5	1	32	68	0
P14	90	90	11,9	2,9	10,5	5,6	6,8	3,9	6,1	0,7	5,4	20	79	1
P15	70	77	10,2	3,1	9,3	6	6,4	3,8	5,2	1	4,2	23	73	4
P16	81	84	15,1	5,6	10,5	5,8	7,8	4,6	8,1	1,7	6,4	14	82	4
P17	87	88	7,2	3,7	3,6	1,1	3,6	0,9	3	0,5	2,5	27	72	1
P18	84	91	17,9	7,4	11,9	9,1	11,2	6,9	5,7	1,3	4,4	18	80	2
P19	77	86	21,7	9,8	15,8	11,1	13,1	6,5	1,6	0,6	1	31	66	3
P20	80	83	6	3,4	3,1	2,4	4,1	1,1	0,8	0,3	0,5	20	78	2
P21	84	86	27,5	10,5	18,8	13,3	14,5	11,3	4,1	0,8	3,3	34	63	3
P22	56	61	77,6	36,6	42,4	43,5	40,3	38,4	3,3	0,6	2,7	12	76	12
P23	90	92	47,5	4	62,6	40,5	23	26,6	4,6	1,2	3,4	23	66	11
P24	94	97	12,1	3,6	10,5	6,8	6,6	5,1	1,1	0,2	0,9	25	71	4
P25	74	79	6,5	1,8	7,8	2,8	5,2	1,5	3,5	0,7	2,8	29	70	1
P26	82	85	7,8		22,6	2	6,3	1,5	7	1,2	5,8	20	77	3
P27	87	87	7,2	3,8	6	1,8	5,7	1,3	4,2	0,4	3,8	16	80	4
P28	68	77	13	4	13,2	3,5	10,1	2,6	3,7	1,5	2,2	36	62	2
P29	77	77	6,8	2,6	8,4	2,2	5,3	1,3	2,5	1,1	1,4	26	71	3
Moyenne	81,2	84,7	15,8	6,3	12,4	7,9	9,7	5,9	3,5	0,9	2,7	25,0	72,0	3,0
Ecartype	10,3	9,1	15,1	7,1	12,4	10,4	7,6	8,2	2,1	0,5	1,8	7,1	6,5	2,9
Médiane	82	86	11,9	3,9	10,5	5,8	6,8	3,9	3,5	0,7	2,5	25	71	2
SEM	1,9	1,7	2,8	1,3	2,3	1,9	1,4	1,5	0,4	0,1	0,3	1,3	1,2	0,5

**Annexe 3 :** Pourcentages de spermatozoïdes par marquage pour chaque patient à T4 sans calcium ionophore A23187, avec moyenne, écart type, médiane et SEM.

	Mob	Vita	Anekin V+	Anekin V+/PI-	IP+	CD46+	Anekin V+/CD 46-	Anekin V+/CD 46+	Caspase +	Caspase +/PI-	Caspase +/PI+	CTCF	CTC B	CTC AR
P1	79	81	10,8	2,6	12,5	3,7	6	2,9	4,6	2,2	2,4	18	73	9
P2	88	91	19,5	6,7	13,8	9,1	8,2	7,7	7	2,2	4,8	20	77	3
P3	57	76	30,5	10,4	26,3	7,6	22,7	4,3	10,7	1,5	9,2	15	75	10
P4	72	82	12,5	7,2	5,5	3,1	9,1	2,6	1,3	0,6	0,7	18	76	6
P5	72	72	11,8	3,3	8,7	2,7	5,9	2,1	5,6	0,5	5,1	16	77	7
P6	66	69	27,8	6,4	26,4	23	9,7	17	7,6	0,8	6,8	12	73	15
P7	75	77	10,5	3,2	7,8	9	9,5	7,3	1,9	0,3	1,6	15	83	2
P8	88	92	8,4	3,1	5,7	4,6	7,7	3,7	1,4	0,4	1	23	74	3
P9	95	98	7,5	3	4,8	2,5	4,7	2,1	1,1	0,6	0,5	17	72	11
P10	89	93	15,1	4,9	10,6	4,2	7,5	3,5	2,6	0,8	1,8	13	80	7
P11	87	87	18	4,3	15,8	6,7	14,6	4,8	1,6	0,2	1,4	15	81	4
P12	90	92	3,6	1,8	1,9	1,4	3,1	0,8	1,2	0,2	1	19	77	4
P13	70	71	29,5	13,5	22,7	15	17,4	9,1	1,4	0,1	1,3	22	72	6
P14	84	86	13,8	4	11,3	7,7	7,6	5,4	1,6	0,3	1,3	11	82	7
P15	71	72	12,8	3,9	10,2	5,3	6,2	4,1	1,5	0,4	1,1	13	82	5
P16	79	83	21,1	4,4	18,4	10,1	11,8	8,5	0,6	0,1	0,5	12	81	7
P17	86	86	6,2	3,5	2,8	1,7	3,3	1,5	1,3	0,2	1,1	14	80	6
P18	77	81	17,1	5,7	12,8	10,2	9	7,6	2,4	0,5	1,9	17	78	5
P19	61	67	22,8	9	18,5	13,1	13,4	7,3	1,5	0,3	1,2	11	79	10
P20	78	80	7,3	3,1	4,7	2,9	5	2	1	0,4	0,6	6	83	11
P21	83	83	24,2	4,2	23	13,9	10,7	11,7	5,4	0,2	5,2	16	75	9
P22	35	44	47,2	3,4	65,5	29,9	22,1	24,9	7,9	0,8	7,1	10	73	17
P23	74	74	14,2	6,3	8,8	3,9	9,6	3	2,1	0,5	1,6	14	77	9
P24	83	86	11,4	4,1	9,6	6,3	7,7	4,5	1,2	0,7	0,5	12	80	8
P25	66	67	13,3	4,3	12,7	12,7	5,8	7,8	4,3	1,4	2,9	19	75	6
P26	82	82	20,6	7,7	19,5	10	11	8	6,3	1	5,3	8	84	8
P27	76	80	12,5	3,8	11,2	5,3	9,3	4,2	4,6	0,7	3,9	10	80	10
P28	62	68	20,4	6,1	20,1	11,4	11,9	7,9	4,2	1,4	2,8	19	79	2
P29	59	71	10,4	2,7	12	6,6	4,7	4,6	2,9	0,9	2	13	82	5
Moyenne	75,3	79,0	16,6	5,1	14,6	8,4	9,5	6,2	3,3	0,7	2,6	14,8	77,9	7,3
Ecart type	12,7	10,9	9,1	2,6	11,9	6,4	4,9	5,0	2,6	0,6	2,3	4,1	3,6	3,5
Médiane	77	80	13,8	4,1	11,3	6,7	9	4,8	1,9	0,5	1,6	14	79	7
SEM	2,4	2,0	1,7	0,5	2,2	1,2	0,9	0,9	0,5	0,1	0,4	0,8	0,7	0,7

**Annexe 4 :** Pourcentages de spermatozoïdes par marquage pour chaque patient à T24 avec moyenne, écart type, médiane et SEM.

# Marquage du spermatozoïde humain par l'Annexine V, quelle signification ?

## INVESTIGATEUR COORDONNATEUR

Pr Clément JIMENEZ, PU-PH

Dr Lucie CHANSEL-DEBORDEAUX

Service de Biologie de la Reproduction-CECOS, Centre Aliénor d'Aquitaine-Hôpital Pellegrin  
Place Amélie Raba-Léon 33 000 Bordeaux

Tel : 05 56 79 56 81

E-mail : clement.jimenez@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 bilan de fertilité.

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

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

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

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

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

Oui

Non

Bordeaux le :

Signature précédée de la mention « lu et approuvé » :

**Annexe 5** : Consentement à la recherche.

## **Note d'information au patient**

**Titre de l'étude** : « Marquage du spermatozoïde humain par l'Annexine V, quelle signification ? »

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

Monsieur,

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

### ***Pourquoi cette étude ?***

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

Vos spermatozoïdes seront analysés le jour même du recueil. Tous les échantillons seront anonymisés par un code et ne seront en aucun cas utilisés en vue de fécondation.

### ***Que cela implique-t-il de participer à cette étude ?***

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

### ***Quels sont vos droits ?***

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

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

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

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

En vous remerciant de votre collaboration.

**Annexe 6** : Note d'information au patient.

## **Protocole de marquage des spermatozoïdes à l'annexine V**

### **Préparation :**

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

### **En parallèle préparer un tube témoin :**

- Prendre 600.000 spermatozoïdes (20µl), les ajouter au tube préparé Binding Buffer dilué, suivre la procédure du marquage sans ajouter d'annexine V

### **Marquage :**

- Prendre 600.000 spermatozoïdes (20µl)
- Les ajouter au tube préparé Binding Buffer dilué + Fluorochrome-conjugated Annexin V
- Laisser 20 min dans le noir à température ambiante
- Ajouter 500µl de Binding Buffer dilué
- Centrifuger 10min à 1500g
- Jeter le surnageant et garder le culot
- Ajouter 200µl de Binding Buffer dilué
- Transvaser dans un tube à fond rond pour le cytomètre
- Garder dans l'obscurité à température ambiante

### **Passer au cytomètre**

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

### **Repasser au cytomètre**

**Annexe 7 :** Protocole de marquage des spermatozoïdes à l'annexine V.

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

### **Préparation :**

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

### **Marquage :**

- Prendre 600.000 spermatozoïdes (20µl)
- Les ajouter au tube préparé Binding Buffer dilué + Fluorochrome-conjugated Annexin V + anti-CD46
- Laisser 20 min dans le noir à température ambiante
- Ajouter 500µl de Binding Buffer dilué
- Centrifuger 10min à 1500g
- Jeter le surnageant et garder le culot
- Ajouter 200µl de Binding Buffer dilué
- Transvaser dans un tube à fond rond pour le cytomètre
- Garder dans l'obscurité à température ambiante

### **Passer au cytomètre**

**Annexe 8 :** Protocole de double marquage des spermatozoïdes à l'annexine V et à l'anti-CD46.

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

### **Préparation :**

- Préparer un tube conique de 500µl de PBS + 1µl de FITC-DEVD-FMK

### **Marquage :**

- Prendre 600.000 spermatozoïdes (20µl)
- Les ajouter au tube de PBS + FITC-DEVD-FMK
- Laisser 20 min dans le noir à température ambiante
- Ajouter 2ml de PBS
- Centrifuger 10min à 1500g
- Jeter le surnageant et garder le culot
- Ajouter 2ml de PBS
- Centrifuger 10min à 1500g
- Jeter le surnageant et garder le culot
- Ajouter 300µl de PBS
- Transvaser dans un tube à fond rond pour le cytomètre
- Garder dans l'obscurité à température ambiante

### **Passer au cytomètre**

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

### **Repasser au cytomètre**

**Annexe 9 :** Protocole de marquage des spermatozoïdes à l'inhibiteur de caspase 3 activée.

## **Protocole de marquage des spermatozoïdes à la chlortetracycline**

### **Préparation :**

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

### **Marquage :**

- Prendre 600.000 spermatozoïdes (20µl)
- Les ajouter dans un tube contenant 50µl de solution de CTC préparée
- Homogénéiser
- Ajouter 4µl de PFA préparé
- Homogénéiser
- Sur une lame, déposer 10µl de la solution finale + 1 goutte de DABCO (0.22mol/l)
- Homogénéiser, déposer une lamelle, presser légèrement, lutter avec du vernis transparent
- Peut être lue dans les 4-5 jours

**Annexe 10 :** Protocole de marquage des spermatozoïdes à la chlortetracycline.

## SERMENT D'HIPPOCRATE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Résumé

**Titre : Marquage du spermatozoïde humain par l'Annexine V, quelle signification ?**

**Introduction** : La translocation de la phosphatidylsérine du feuillet membranaire interne vers le feuillet membranaire externe a lieu chez le spermatozoïde au cours de modifications de l'organisation des phospholipides membranaires. L'externalisation de la phosphatidylsérine est connue pour être un signe précoce d'apoptose. La phosphatidylsérine peut être mise en évidence grâce à l'annexine V.

**Matériel et méthodes** : Une analyse par cytométrie de flux du marquage par l'annexine V en parallèle du CD46, des caspases 3 activées et de l'iodure de propidium a été réalisée. Les éjaculats de 29 patients ont été analysés à différents temps d'incubation et avec ou sans calcium ionophore A23187.

**Résultats** : Nous avons mis en évidence une augmentation significative de l'externalisation de la phosphatidylsérine en présence de calcium ionophore A23187. Dans un même temps le marquage par caspase 3 augmentait mais dans une proportion moindre. On objectivait donc une augmentation du nombre de spermatozoïdes vivants exposant la phosphatidylsérine. Le calcium ionophore A23187 induisait aussi une augmentation des marqueurs de la réaction acrosomique (CD46, Chlortetracycline). **Conclusion** : Ces résultats suggèrent donc que l'externalisation de la phosphatidylsérine chez le spermatozoïde n'est pas à rapporter à un mécanisme d'apoptose mais plutôt à la séquence capacitation/réaction acrosomique.

**Mots clés** : Annexine V, phosphatidylsérine, apoptose, réaction acrosomique, spermatozoïdes humains

## Abstract

**Title: Human sperm labeling by Annexin V, what meaning?**

**Introduction**: Translocation of phosphatidylserine (PS) from the inner to the outer leaflet of the plasma membrane occurs in spermatozoa during changes in the organization of membrane phospholipids. Externalisation of phosphatidylserine is known to be one of the earliest signs of apoptosis and is evidenced by annexin V labeling. **Methods**: A flow cytometric analysis of the annexin V binding in parallel with CD46, caspase 3 and propidium iodide was performed. 29 sperm samples were analyzed at different incubation times and with or without A23187 ionophore calcium. **Results**: The results showed a significant increase in phosphatidylserine externalisation with calcium ionophore A23187, while at the same time caspase 3 increased to a lesser extent. The calcium ionophore A23187 led to a significant increase of the number of living spermatozoa exhibiting phosphatidylserine. At the same time, calcium ionophore A23187 induced an increase in the markers of the acrosomal reaction (CD46, chlortetracycline). **Conclusion**: These results suggest that the externalisation of phosphatidylserine in the spermatozoa is not related to an apoptosis mechanism but rather to the capacitation / acrosomic reaction sequence.

**Keywords**: Annexin V, phosphatidylserine, apoptosis, acrosomic reaction, human spermatozoa