



HAL
open science

Apoptose du spermatozoïde et fertilité masculine

Florence Brugnon

► **To cite this version:**

Florence Brugnon. Apoptose du spermatozoïde et fertilité masculine. Génétique. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2009. Français. NNT : 2009CLF1MM01 . tel-00726203

HAL Id: tel-00726203

<https://theses.hal.science/tel-00726203v1>

Submitted on 29 Aug 2012

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.

UNIVERSITE BLAISE PASCALE

UNIVERSITE D'Auvergne

Année 2009

*ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne pour l'obtention du grade de

Docteur d'Université

Spécialité : Biologie de la Reproduction

Soutenue le 23 janvier 2009

BRUGNON née BAUME Florence

**APOPTOSE DU SPERMATOZOIDE
ET FERTILITE MASCULINE**

Jury : Mme GRIZARD Geneviève
Mr JANNY Laurent
Mr LOBACCARO Jean-Marc
Mr MARCHETTI Philippe (rapporteur)
Mr POULY Jean-Luc
Mme VAN DER ELST Josiane (rapporteur)
Mr VAN STEIRTEGHEM André

**Laboratoire de Biologie de la Reproduction, EA975
Faculté de médecine-28, Place Henri Dunant, 63000 Clermont Ferrand**

A David, qui par tout l'amour qu'il me donne, m'a toujours soutenue et suivie dans mes insolites projets depuis dix ans déjà !

A Perrine, dont l'amour et la tendresse seront toujours une motivation inégalable pour donner chaque matin le meilleur de moi-même.

A mes parents, qui m'ont aidée et encouragée tout au long de mes études. Grâce à vous j'exerce aujourd'hui un métier passionnant.

A ma belle-mère, qui m'a accueillie si chaleureusement et dont le soutien est constant.

A Mme Chambaud Anne, ma troisième grand-mère, qui par les valeurs qu'elle m'a inculquées et tout l'amour qu'elle m'a apporté, m'a construit les piliers de ma personnalité. Ton départ me laisse un vide infini...

A toute ma famille qui m'a toujours soutenue.

A mes filleuls, Nicolas, Joseph et Clément, que je porte dans mon cœur à chaque instant.

A mes amis d'enfance, Annabelle, Stéphane, Laetitia, Benoît et Delphine dont l'amitié est restée infaillible depuis 23 ans malgré nos situations géographiques éloignées.

A William, Sarah, Isabelle, Vincent, nous avons passés ensemble à Reims les premiers et deuxièmes cycles des études de médecine. Ces six années sont d'une richesse fabuleuse. Le temps s'est écoulé, la distance s'est installée, mais l'amitié demeure indéfectible.

A madame le Dr Grizard Geneviève,

qui a dirigé cette étude.

Je vous remercie pour votre disponibilité et votre sens de l'analyse.

Les dix années passées à vos côtés m'ont permis d'acquérir la rigueur indispensable à tout travail de recherche.

Recevez ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A monsieur le Dr Janny Laurent,

qui m'a soutenue dès mes premiers pas de jeune médecin biologiste de la reproduction.

Que ce travail soit le reflet de la confiance que vous m'avez toujours témoignée.

A monsieur le Pr Lobaccaro Jean Marc,

qui a accepté d'être membre de ce jury.

J'ai apprécié votre sens aigu de la synthèse et votre rigueur scientifique.

Recevez ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A monsieur le Pr Marchetti Philippe,

qui a accepté de juger ce travail.

Votre avis spécialisé et vos conseils avisés m'ont aidée dans l'élaboration de mon projet.

Soyez assuré de ma profonde estime.

A monsieur le Pr Pouly Jean-Luc,

qui a accepté d'être membre de ce jury.

Je vous remercie de votre soutien indéfectible au développement de mes projets.

Je souhaite que notre collaboration se pérennise afin de promouvoir une biologie et médecine de la reproduction novatrice à Clermont Ferrand.

A madame le Pr Van Der Elst Josiane,

qui m'a fait l'honneur de juger ce travail.

Je vous adresse mes vifs remerciements pour l'enthousiasme et l'aide précieuse apportés à l'élaboration de ce projet.

A monsieur le Pr Van Steirteghem André,

qui a accepté de participer à ce jury.

Je vous remercie de m'avoir accueillie durant une année comme membre à part entière de votre laboratoire. Cette période m'a permis d'apprécier la qualité du travail de votre équipe mêlant à la fois rigueur professionnelle, interdisciplinarité et pratiques innovantes.

Recevez ici le témoignage de ma profonde gratitude.

Je tiens également à remercier particulièrement :

- **Monsieur le Pr Boucher Daniel**, pour avoir initié la direction de ce travail. Durant mon internat, il a été particulièrement agréable de me former à vos côtés. Votre habilité à diriger une équipe et votre expérience resteront pour moi un modèle.

- **Madame le Dr Verheyen Greta**, pour sa grande humanité et son soutien constant qu'elle m'a apporté dès le début de notre rencontre à Bruxelles. Recevez ma profonde gratitude et toute mon amitié.

- **Madame Artonne Christine** pour son aide technique si précieuse à la réalisation de ce travail. Les caspases n'ont désormais plus de secrets pour toi !, ou presque.....

- **Monsieur le Dr Ouchchane Lemlih**, pour m'avoir éclairée durant de longues heures dans les chemins obscurs du domaine des biostatistiques. Reçois toute mon amitié.

- **Monsieur le Dr Communal Yves, monsieur le Dr Chassagne Jacques et leur équipe technique**, pour leur accueil toujours si chaleureux et leurs conseils expérimentés en cytométrie en flux.

- **Madame le Dr Darcha Claude** pour m'avoir apporté son expérience dans l'analyse des anomalies ultrastructurales des spermatozoïdes. Recevez toute ma reconnaissance.

- **Madame le Dr Van Aasche Elvire** pour son accueil chaleureux et sa collaboration pour l'analyse de la ségrégation méiotique des prélèvements de Bruxelles.

- **Mr le Dr Pellestor Franck** d'avoir toujours été disponible et d'avoir participé à ce travail pour l'analyse de la ségrégation méiotique des prélèvements clermontois.

- **Mr le Pr Vago Philippe** pour sa collaboration à l'analyse de la ségrégation méiotique et pour m'avoir permis l'accès à la plate forme d'imagerie efficace et dynamique qu'il a su promouvoir à l'université de Clermont Ferrand.

- **Mme le Dr Pons Hanae**, qui m'a livré avec toute sa patience, sa rigueur et son savoir faire scientifique, les secrets de la technique *western blot*. Reçois ma profonde reconnaissance et toute mon amitié.

- **Mr le Dr Sion Benoit**, pour avoir toujours accepté spontanément de travailler à mes côtés dans les divers travaux scientifiques entrepris durant mon cursus. Vos connaissances et votre esprit analytique m'ont beaucoup apporté. Soyez assuré de ma reconnaissance.

- **Mr le Dr Micheau Olivier et Mr Jacquemin Guillaume de l'équipe INSERM U517** de Dijon pour avoir accepté spontanément de m'envoyer des extraits protéiques de cellules Hela induites en apoptose. Recevez mon profond respect et ma reconnaissance.

- **Mr le Dr Baron Silvère**, de l'équipe Génétique reproduction et Développement ; laboratoire oxystérol, LXR et tissu stéroïdogène, Clermont 2, pour avoir accepté de me

- **Mr le Dr Terriou Philippe**, pour m'avoir chaleureusement encouragée et fait partager son expérience et ses connaissances étendues en biologie de la reproduction. Reçois toute mon amitié.

- **Sophie Ferrandon et Jean-Pierre Charles**, pour leur amitié si chaleureuse et énergisante !

- **Mr le Dr Vrielynck Benoit** et toute son équipe soignante. Les trois années inoubliables de travail à vos côtés comme aide opératoire m'ont permis de faire mes premiers pas dans les soins médicaux et d'acquérir la rigueur nécessaire. Vous avez toujours été avec moi extrêmement bienveillant. Soyez assuré de ma gratitude et recevez la reconnaissance de votre brio opératoire.

- **Mon amie Aude Brunois**, qui a toujours su m'écouter et me supporter. Notre amitié reste immuable malgré les années qui passent et l'éloignement géographique.

- **La société Médicult**, et plus particulièrement Mr Denis Azra et Mme Nathalie Cotten pour le soutien financier qu'ils m'ont apporté qui a permis de mener à bien ce travail.

- **Le laboratoire pharmaceutique Merck Serono**, en particulier à madame Florence Schouler et Mr Cyrille Raffy, qui par leur sponsor, ont apporté une aide logistique précieuse pour le bon déroulement de ma soutenance de thèse.

donner des extraits protéiques de cellules LNCap induites en apoptose. Reçois toute mon amitié.

- **Madame Nouailles Claudine** pour sa disponibilité, son expérience et son aide technique qui m'ont accompagnée dans tous mes projets de recherche.

- **Monsieur Monnet Jean-Paul**, du laboratoire d'anatomie de la faculté de médecine de Clermont Ferrand, pour la réalisation de la planche anatomique illustrant mes propos.

- **L'équipe des biologistes du laboratoire de biologie de la reproduction de l'UZ Brussel : Drs Van de Velde Hilde, Van Landuyt Lisbet, van den Abbell Etienne, Staessen Katrien, et De Vos Annick** pour leur accueil chaleureux, leur patience à mon égard et la formation rigoureuse qu'ils m'ont donnée dans le domaine de la biologie de la reproduction. Recevez mes remerciements les plus chaleureux et ma plus grande reconnaissance.

- **L'équipe de gynécologie du centre de médecine de la reproduction, et en particulier Mr le Pr Devroey Paul, Pr Tournaye Herman, Drs Camus Michel et Vernaev Valérie** pour leurs compétences professionnelles qui s'enrichissent non seulement de leur expérience, mais aussi de leur nature chaleureuse et humaniste. Recevez tout mon respect.

- **Mme le Dr Stouffs Katrien**, pour m'avoir initiée, avec une grande disponibilité, à la technique TUNEL. Son esprit critique scientifique, sa rigueur et sa vivacité d'esprit ont été pour moi d'une grande richesse.

- **L'équipe paramédicale du centre de biologie et médecine de la reproduction de l'UZ Brussel qui m'ont si bien accueillie en particulier mes amis Ronny Janssens, Hubert Joris, Bart Desmet, Martin Staelens et Françoise Lebrun.** Nos soirées découvertes et week-ends de la culture flamande resteront à jamais gravés dans mes souvenirs....

- **L'équipe de biologie et médecine de la reproduction du CHU de Clermont Ferrand.** L'esprit familial que vous avez su préserver dans ces deux services, restés unis à travers les années, rend tellement agréable le fait de travailler à vos côtés. Merci à chacune d'entre vous de m'avoir toujours supportée (dans tous les sens du terme !....).

- **Mr le Dr Schubert Benoit, Mme le Dr Ouchchane-Roddier Helene et Mr le Dr Chassagne Laurent** auprès desquels je me suis formée en biologie de la reproduction au CHU de Clermont Ferrand. Recevez toute mon amitié.

- **Drs Peikrishvli Russedan et Bouraoui Zied** auprès desquels il est particulièrement agréable de travailler quotidiennement en équipe. Recevez toute mon amitié.

- **Sandra Sanfilippo**, qui sera la première étudiante en thèse que j'encadrerai pour une toute nouvelle aventure qu'est la cryoconservation du tissu ovarien.

Rêver un impossible rêve
Porter le chagrin des départs
Brûler d'une possible fièvre
Partir où personne ne part
Aimer, jusqu'à la déchirure
Aimer, même trop, même mal,
Tenter, sans force et sans armure,
D'atteindre l'inaccessible étoile,
Telle est ma quête,
Suivre l'étoile
Peu m'importent mes chances
Peu m'importe le temps
Ou ma désespérance
Et puis lutter toujours
Sans question ni repos
Se damner
Pour l'or d'un mot d'amour
Je ne sais si je serai ce héros
Mais mon cœur serait tranquille
Et les villes s'éclabousseraient de bleu
Parce qu'un malheureux
Brûle encore, bien qu'ayant tout brûlé
Brûle encore, même trop, même mal
Pour atteindre à s'en écarteler
Pour atteindre l'inaccessible étoile....

Jacque Brel, L'homme de la Mancha, 1968

Liste des publications incluses dans la thèse

- **Brugnon F**, Van Assche E, Verheyen G, Sion B, Boucher D, Pouly JL, Janny L, Devroey P, Liebaers I and Van Steirteghem A (2006) Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. Hum Reprod 21, 685-693.

- **Brugnon F**, Ouchchane L, Verheyen G, Communal Y, Van der Elst J, Tournaye H, Janny L and Grizard G (2007) Fluorescence microscopy and flow cytometry in measuring activated caspases in human spermatozoa. Int J Androl, 30, 1-9.

- **Brugnon F**, Janny L, Artonne C, Sion B, Pouly JL and Grizard G (2008) Activated caspases in thawed epididymal and testicular spermatozoa of patients with congenital bilateral absence of the vas deferens and intracytoplasmic sperm injection outcome. Fertil Steril, Epub ahead of print.

Liste des publications non incluses dans la thèse

Communications écrites

Revue internationale à comité de lecture

- **Brugnon F**, Bilan F, Heraud MC, Grizard G, Janny L, Creveaux I (2008) Outcome of ICSI for a couple in which the man is carrier of CFTR p.[R74W;V201M;D1270N] and p.P841R mutations and his spouse a heterozygous carrier of p.F508del mutation of CFTR gene. Fertil Steril, 90(5) :2004.e23-6.

Revue nationale à comité de lecture

- Vernaève V, **Brugnon F**, Tournaye H (2003) La prise en charge de l'azoospermie non-obstructive. Références en Gynecologie Obstetrique 10, 35-40.

- Vernaève V, **Brugnon F**, Tournaye H (2004) Inhibine B, facteur prédictif de la récupération de spermatozoïdes testiculaires? Gynecologie Obstetrique Fertilité 32, 767-770.

Communications orales

Congrès internationaux

- **Brugnon F**, Van Assche E, Verheyen G, Sion B, Boucher D, Pouly JL, Janny L, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A (2005) Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. Conjoint annual meeting of the American Society for Reproductive Medicine and the Canadian Fertility and Andrology Society (Montréal). Fertil Steril 84 (Sup1), O-148, S61.

- **Brugnon F**, Ouchchane L, Verheyen G, Van der Elst J, Janny L, Grizard G (2007) Reliability of flow cytometry and fluorescence microscopy in detecting activated caspases for apoptosis in human frozen-thawed spermatozoa. 63th annual meeting of American Society of Reproductive Medicine (Washington). Fertil Steril 88 (Sup 1), O-241, S90.

Congrès nationaux

- **Brugnon F**, Sion B, Janny L, Boucher D, Grizard G (2003) Intérêt de l'annexine V comme marqueur d'évaluation de la qualité des spermatozoïdes cryoconservés utilisés en AMP. XX^{ème} congrès de la Société d'Andrologie de Langue Française (Orléans).

- **Brugnon F**, Van Assche E, Sion B, Janny L, Aublet-Cuvellier B, Liebaers I, Van Steirteghem A, Boucher D (2004) Etude de deux marqueurs de l'apoptose et de la ségrégation méiotique sur des spermatozoïdes de patients porteurs d'une translocation chromosomique. XXI^{ème} Congrès de la Société d'Andrologie de Langue Française (Clermont Ferrand).

- **Brugnon F**, Ouchchane L, Verheyen G, Communal Y, Grizard G, Chassagne J, Van der Elst J, Tournaye H, Van Steirteghem A, Janny L (2006) Comparaison du niveau d'activation des caspases des spermatozoïdes humains testiculaires, epididymaires et éjaculés cryoconservés. Collège de biologie et médecine de la reproduction (Paris).

- **Brugnon F**, Janny L, Artonne C, Sion B, Pouly JL, Grizard G (2008) L'expression des caspases activées des spermatozoïdes épидидymaires et testiculaires décongelés de patients présentant une agénésie bilatérale des canaux déférents : une mesure intéressante pour comprendre les résultats d'ICSI ? 13^{es} journées de la Fédération Française d'Etude de la Reproduction (Paris), Deuxième prix des communications orales sélectionnées.

Communications affichées

Congrès internationaux

- **Brugnon F**, Ouchchane L, Janny L, Verheyen G, Communal Y, Chassagne J, Boucher D, Van der Elst J, Tournaye H, Van Steirteghem A, Grizard G (2006) Activated caspases in human epididymal and ejaculated spermatozoa. IVth international workshop on epididymis, satellite reunion of the IVth European Congress of Andrology (Chatel- Guyon).

Congrès nationaux

- **Brugnon F**, Creveaux I, Kitzi A, Herraud MC, Labbé A, Grizard G, Janny L (2005) Prise en charge en ICSI d'un couple dont l'homme est porteur d'une agénésie vésiculo-déférentielle associée aux mutations du gène CFTR [R74W ; D1270N] + [P841R] et dont la femme est hétérozygote pour la mutation F508Del. XXI^{ème} Congrès de la Société d'Andrologie de Langue Française (Marseille).

- **Brugnon F**, Ouchchane L, Grizard G, Verheyen G, Communal Y, Chassagne J, Van Steirteghem A, Tournaye H, Janny L (2006) Marquage des caspases actives par l'inhibiteur fluorescent FAM-VAD-FMK de spermatozoïdes testiculaires et épидидymaires humains. 11^{ème} journées de la Fédération Française d'Etude de la Reproduction (Paris).

Liste des abréviations utilisées

ABCD : Agénésie Bilatérale des Canaux Déférents
ADN : Acide Désoxyribonucléique
AIF : Apoptosis Inducing Factor
AMP : Assistance Médicale à la Procréation
AMPc : Adénosine Monophosphate Cyclique
Apaf-1: Apoptotic Protease Activating factor-1
ARNm: Acide Ribodésoxynucléique messenger
Bcl 2: B-cell lymphoma 2
BH: Bcl Homology
BIR: Baculovirus IAP repeat
CAD: Caspase Activated DNase
CARD : Caspase Recruitment Domain
CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
DAO : dérivés actifs de l'oxygène
DED : Death Effector Domain
DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DR : Death Receptor
DFF : DNA fragmentation factor
DFI : DNA Fragmentation Index
DIABLO: Direct Inhibitor of Apoptosis Linding protein with Low PI
DISC: Death Inducing Signaling Complex
DPI : Diagnostic PréImplantatoire
FADD : Fas Associated Death Domain
FISH : Fluorescence In Situ Hybridization
FIV : Fécondation In Vitro
FLICA: Fluorescent Inhibitor of Activated Caspases
FLIP : FLICE inhibitory protein
FSH: hormone folliculo-stimulante
hCG: gonadotrophine chorionique humaine
HK : Hexokinase
HSP : Heat Shock Protein
HtrA2 : High temperature requirement protein A2
IAP: Inhibitor of Apoptosis Proteins

IBM : IAP Binding Domain

ICAD : Inhibitor of Caspase Activated DNase

ICC: Intraclass Correlation Coefficient

ICE : Interleukine Converting Enzyme

ICSI : Intra Cytoplasmic Injection

IUI : Insémination Intra-Utérine

MESA : Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PARP : Poly-ADP Ribose Polymerase

PBS : Phosphate Buffered Saline

PS : Phosphatidylsérine

PTPC: Permeability Transition Pore Complex

RIP : Receptor Interacting Protein

SCF : Stem Cell Factor

SCSA : Sperm Chromatin Structure Assay

Smac: Second mitochondria-derived activator of caspase

SR-BI : class B Scavenger Receptor type I

TdT: Terminal deoxy-nucleotidyl Transferase

TESE: Testicular Sperm Extraction

TRADD: TNF Receptor Associated Death Domain

TRAF-2: Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 2

TRAIL : Tumour necrosis factor- α -Related Apoptosis-Inducing Ligand

TUNEL : Terminal Uridine Nick end-Labeling

SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>REVUE DE LA LITTERATURE</u>	3
1. <u>Anatomie de l'appareil génital masculin</u>	4
1.1 Les testicules	4
1.2 La jonction épидидymo-testiculaire	6
1.3 L'épididyme	7
1.4 Le canal déférent	8
1.5 Les vésicules séminales	9
1.6 La prostate	10
1.7 L'urètre	11
1.8 La verge et les corps érectiles	11
1.9 Un exemple de malformation du tractus génital masculin : l'agénésie bilatérale des canaux déférentes (ABCD)	12
2. <u>La spermatogenèse</u>	14
2.1 L'épithélium séminifère	14
2.2 Les différentes étapes de la spermatogenèse	15
2.2.1 La phase de multiplication	15
2.2.2 La phase de maturation nucléaire	16
2.2.2.1 Les spermatocytes primaires (ou spermatocytes I)	17
2.2.2.2 Les spermatocytes secondaires (ou spermatocytes II)	20
2.2.3 La phase de différenciation	21
2.3 La cinétique de la spermatogenèse	23
2.3.1 Le cycle spermatogénétique	23
2.3.2 Le cycle de l'épithélium séminal	23
2.4 Une anomalie de la spermatogenèse : les translocations chromosomiques	24
2.4.1 Définitions	24
2.4.2 Les translocations chromosomiques Robertsoniennes	25
2.4.3 Les translocations chromosomiques réciproques	26
2.4.4 L'infertilité des hommes porteurs d'une translocation chromosomique	27
3. <u>La maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme</u>	32
3.1 Modifications morphologiques	32
3.2 Modifications biochimiques	32
3.2.1 Fluidité de la membrane plasmique	32
3.2.2 Modifications des glycoconjugués	32
3.2.3 Modifications des protéines de la membrane plasmique	33
3.2.4 Modifications des protéines flagellaires et mitochondriales	35
3.3 Modifications fonctionnelles	35

4. <u>L'éjaculat</u>	36
5. <u>L'apoptose cellulaire : les voies de signalisation et de régulation</u>	37
5.1 De <i>Caenorhabditis elegans</i> aux mammifères	37
5.2 Apoptose et nécrose	38
5.3 Déroulement de l'apoptose	39
5.4 Les caspases	40
5.4.1 Structure et mécanismes d'activation des caspases	41
5.4.2 Régulation de l'activation des caspases	44
5.4.2.1 Régulation transcriptionnelle	44
5.4.2.2 Inhibiteurs exogènes	45
5.4.2.3 La famille des IAP (Inhibitor of Apoptosis Proteins)	45
5.4.2.4 Les Heat shock proteins	46
5.5 Les voies caspases dépendantes	46
5.5.1 La voie de signalisation extrinsèque	47
5.5.1.1 Structure et fonctions des récepteurs de mort cellulaire	47
5.5.1.2 Activation de l'apoptose par le récepteur Fas et TNF-R1	47
5.5.1.3 Activation de l'apoptose par le récepteur TRAIL/DR4 et TRAIL/DR5	49
5.5.2 La voie de signalisation intrinsèque	50
5.5.2.1 Les protéines de la famille Bcl-2	50
5.5.2.2 Perméabilisation de la membrane mitochondriale externe au cours de l'apoptose	52
5.5.2.3 Activation des caspases par l'apoptosome	53
5.5.2.4 Smac/DIABLO	54
5.6 Les voies caspase indépendantes	54
5.6.1 Apoptosis inducing factor	55
5.6.2 Endonucléase G	55
5.7 Conclusion	56
6. <u>Apoptose et cellules germinales masculines</u>	57
6.1 Apoptose et cellules germinales durant la spermatogenèse	57
6.1.1 Spermatogenèse et voie de signalisation extrinsèque de l'apoptose	57
6.1.2 Spermatogenèse et voie de signalisation intrinsèque de l'apoptose	57
6.1.3 Spermatogenèse et voies de signalisation caspases indépendantes	59
6.1.4 Elimination des cellules germinales apoptotiques	59
6.1.5 Infertilité et dysrégulations de l'apoptose testiculaire	59
6.1.5.1 Altération de la spermatogenèse et apoptose	60
6.1.5.2 Cryptorchidie et apoptose testiculaire	60
6.1.5.3 Chimiothérapie, radiothérapie et apoptose testiculaire	61
6.1.5.4 Exposition testiculaire à la chaleur et apoptose testiculaire	61
6.1.5.5 Dysrégulations endocrines et apoptose testiculaire	62
6.1.5.6 Vieillesse et apoptose testiculaire	63
6.1.5.7 Facteurs environnementaux et apoptose testiculaire	63

6.2 Apoptose et spermatozoïde humain	64
6.2.1 L'apoptose existe-t elle dans les spermatozoïdes ?	64
6.2.2 Apoptose et spermatozoïdes éjaculés	65
6.2.2.1 Altérations ultrastructurales	65
6.2.2.2 Altérations membranaires	65
6.2.2.3 Altérations mitochondriales	68
6.2.2.4 Altérations nucléaires	69
6.2.2.5 Caspases	70
6.2.2.6 Les voies caspases indépendantes	73
6.2.3 Apoptose et spermatozoïdes testiculaires ou épидидymaires	73
6.2.4 Induction de l'apoptose dans les spermatozoïdes	74
6.2.4.1 Cancers et traitements anti-cancéreux	74
6.2.4.2 Infections urogénitales	75
6.2.4.3 Varicocèle	75
6.2.4.4 Substances toxiques	76
6.2.4.5 Capacitation et réaction acrosomique	76
6.2.4.6 La congélation-décongélation	77
6.2.5 Apoptose du spermatozoïde et Assistance Médicale à la Procréation	78
6.2.5.1 Les marqueurs d'apoptose exprimés par le spermatozoïde humain peuvent ils être utiles au diagnostic d'infertilité masculine ?	79
6.2.5.2 Préparation du sperme en AMP et marqueurs d'apoptose	79
6.2.5.3 Pouvoir fécondant des spermatozoïdes et apoptose	80
6.2.5.4 Taux de grossesses et marqueurs d'apoptose du spermatozoïde	80
6.3 Conclusion	81

BUT DE L'ETUDE **82**

MATERIEL ET METHODES **84**

1. Les patients	85
2. Les prélèvements de spermatozoïdes	86
3. La congélation-décongélation des spermatozoïdes	87
4. Analyse des marqueurs d'apoptose	88
4.1 Les marqueurs biochimiques	88
4.1.1 L'expression des caspases activées	88
4.1.2 L'externalisation de la phosphatidylsérine	94
4.1.3 La fragmentation de l'ADN	95
4.2 Analyse ultrastructurale	97
5. Analyse de la ségrégation méiotique	99
6. Analyses statistiques	101

<u>RESULTATS</u>	103
Publication n°1	105
Publication n°2	108
Publication n°3	111
Publication n°4	113
<u>DISCUSSION</u>	123
1. Limites, adaptation et interprétation des techniques de mesure des marqueurs d'apoptose du spermatozoïde humain	124
1.1 Nécessité d'une étude multiparamétrique pour mesurer l'apoptose du spermatozoïde humain	125
1.2 Cryoconservation des spermatozoïdes et marqueurs d'apoptose	125
1.3 Les différents marqueurs d'apoptose mesurés	125
2. Signification des marqueurs d'apoptose du spermatozoïde humain	
3. Apports de la mesure des marqueurs d'apoptose du spermatozoïde en biologie de la reproduction	131
3.1 Amélioration de la compréhension de l'infertilité masculine	133
3.2 Amélioration de la compréhension des résultats obtenus en AMP	135
<u>CONCLUSION-PERSPECTIVES</u>	137
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	141
<u>ANNEXES</u>	169
<u>RESUME</u>	174
<u>ABSTRACT</u>	175

Introduction

L'apoptose est un processus de mort cellulaire complexe dont les voies de signalisation et de régulation ont été décrites de façon exhaustive dans les cellules somatiques (Cohen, 1997). Des modifications ultrastructurales et une expression des marqueurs typiques d'apoptose ont été décrits dans les spermatozoïdes éjaculés humains (Baccetti *et al.*, 1996 ; Paasch *et al.*, 2003 ; Marchetti *et al.*, 2005b). Même si l'apoptose des cellules germinales est nécessaire pour la mise en place et le maintien d'une spermatogenèse normale dans les testicules, l'existence de l'apoptose, qui est une mort cellulaire « active » dans les spermatozoïdes reste controversée (Oehninger *et al.*, 2003 ; Lachaud *et al.*, 2004). En effet, les spermatozoïdes sont des cellules hautement différenciées qui présentent peu d'activité transcriptionnelle. Néanmoins de nombreux travaux ont montré une proportion plus importante de spermatozoïdes exprimant des marqueurs d'apoptose dans les éjaculats de patients infertiles, comparé aux hommes fertiles (Martin *et al.*, 2003 ; Weng *et al.*, 2002 ; Taylor *et al.*, 2004 ; Said *et al.*, 2004). Cela traduirait soit une apoptose testiculaire initiée et avortée (Sakkas *et al.*, 1999), soit une apoptose initiée et/ou poursuivie dans le tractus génital masculin (Grunewald *et al.*, 2005). Les travaux rapportés chez l'homme sur des spermatozoïdes éjaculés ne permettent pas clairement de répondre à ces hypothèses.

Une mesure de l'apoptose sur des spermatozoïdes prélevés à différents niveaux du tractus génital pourrait aider à mieux comprendre le déroulement du processus apoptotique du spermatozoïde depuis sa formation jusqu'à l'éjaculation. Pour ce travail, l'utilisation de prélèvements provenant de patients dont l'infertilité est clairement établie, pourrait apporter des informations sur la physiopathologie de leur infertilité et sur la qualité fonctionnelle de leurs spermatozoïdes.

Revue de la littérature

1. Anatomie de l'appareil génital masculin

L'appareil génital masculin est constitué de différentes structures et organes qui permettent la production, le transport, la maturation, le stockage et l'expulsion des gamètes mâles : les spermatozoïdes.

L'appareil génital masculin comprend (Figure 1):

- Les deux testicules qui ont une fonction exocrine (production et émission des spermatozoïdes) et endocrine (synthèse d'androgènes).

- Le tractus génital constitué par les voies spermatiques intra-testiculaires (tubes droits et rete testis) et extra-testiculaires : système de canaux pairs (canaux ou cônes efférents, épидидyme, canal déférent et canal éjaculateur) assurant le transport des spermatozoïdes.

- Les glandes annexes : les vésicules séminales, l'épididyme, la prostate, et les glandes de Cowper dont la fonction principale est de sécréter le liquide séminal constituant le sperme avec les spermatozoïdes.

- Le tractus uro-génital constitué par l'urètre (prostatique, périnéal et pénien) qui s'ouvre à l'extérieur par le méat urinaire (méat urétral). Ce dernier assure l'évacuation des urines lors de la miction et celle du sperme lors de l'éjaculation.

Nous décrirons l'anatomie des principaux éléments constituant l'appareil génital masculin en respectant le trajet des spermatozoïdes depuis leur production jusqu'à leur émission (pour revue : Mauvais Jarvis, 1984 ; Dadoune, 2006).

1.1 Les testicules

Le testicule est un organe pair (droit et gauche) localisé dans le scrotum, hors de la cavité abdominale. Chaque testicule correspond à une masse ovoïde dont les dimensions sont d'environ 5cm de long, 3cm de large et 2,5 cm d'épaisseur. Leur volume est de 16 ml. Le bord postéro-supérieur de chacun des testicules est coiffé sur toute sa longueur par l'épididyme. Le pôle inférieur est fixé à la paroi du scrotum par le *gubernaculum testis*.

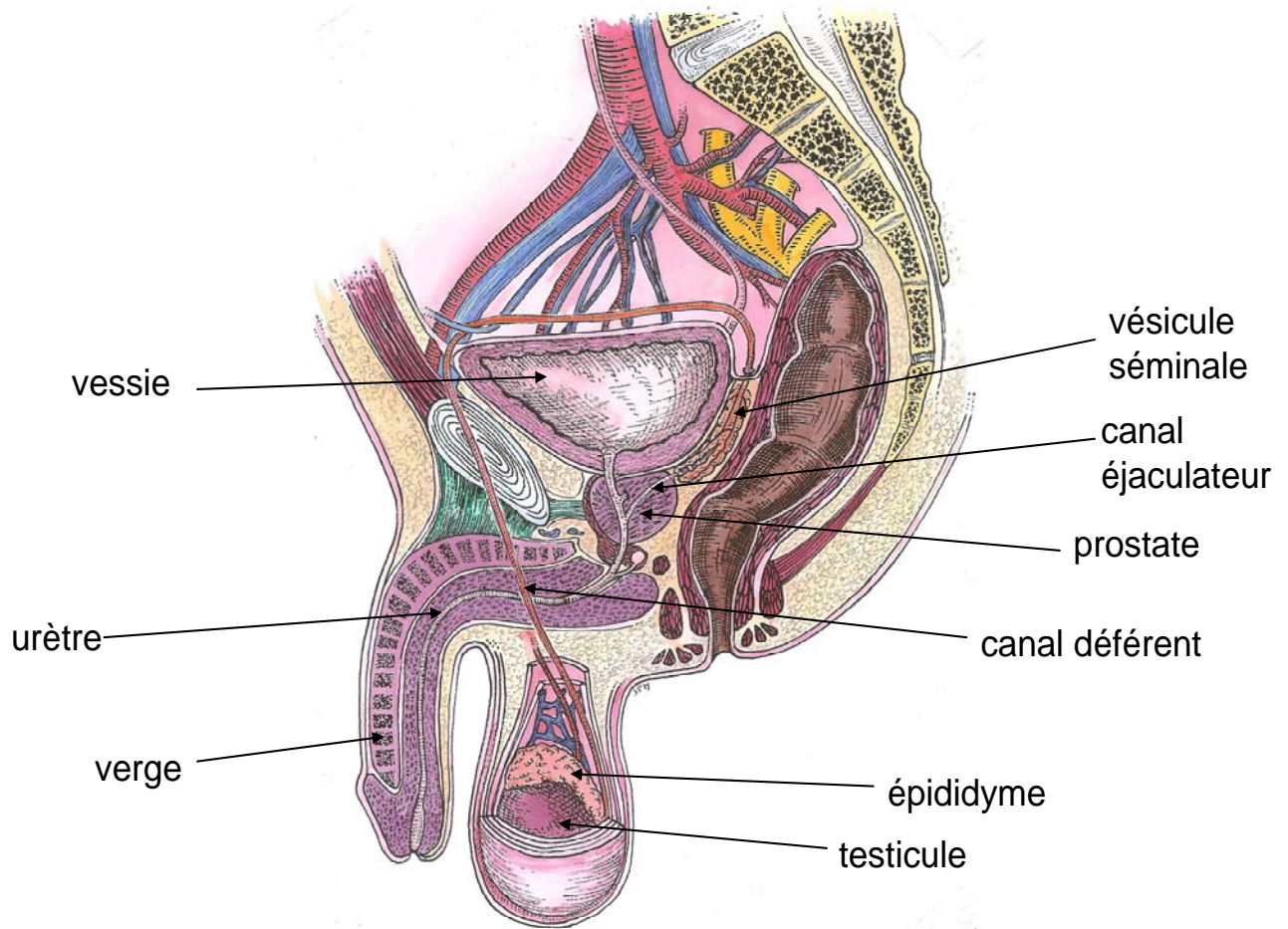


Figure 1

Coupe sagittale de l'appareil génital masculin

Chaque testicule est revêtu d'une capsule fibreuse, l'albuginée, tapissée à l'extérieur par la tunique vaginale, feuillet viscéral du diverticule péritonéal et, à l'intérieur, par la tunique vasculaire riche en vaisseaux sanguins. L'albuginée est constituée de faisceaux de fibres de collagène et de cellules musculaires lisses. L'albuginée se contracte spontanément et rythmiquement, contribuant à propulser les spermatozoïdes et le liquide testiculaire hors du testicule. Au bord supérieur du testicule, l'albuginée s'épaissit et s'enfonce en profondeur pour constituer le *corps de Highmore*, perforé par les vaisseaux et les canaux qui constituent le *rete testis*. Entre l'albuginée et le *corps de Highmore* sont tendues des cloisons ou *septa* qui délimitent environ 300 lobules testiculaires, chacun contenant 1 à 4 tubes séminifères.

Les tubes séminifères ont une longueur de 30 cm à 1m, un diamètre de 150 à 300µm et une structure pelotonnée. Les cellules germinales aux différents stades de leur division et les cellules de Sertoli forment l'épithélium des tubes séminifères qui constitue le lieu exclusif de la spermatogenèse. Les tubes séminifères convergent vers le *corps de Highmore* où ils s'abouchent dans le *rete testis* par des segments rectilignes, les tubes droits. Chaque tube séminifère est limité par une paroi propre : la gaine péritybulaire. Cette paroi est formée de de l'intérieur vers l'extérieur par la membrane basale, une ou plusieurs assises de cellules semblables à des cellules musculaires lisses, les cellules péritybulaires et une couche de fibrilles de collagène en contact avec la paroi des capillaires sanguins et des vaisseaux lymphatiques. Les cellules péritybulaires, riches en filaments d'actine et de myosine sont contractiles. Les contractions qui résultent d'un contrôle endocrine et paracrine de ces cellules jouent un rôle essentiel dans l'évacuation des spermatozoïdes des tubes séminifères.

L'espace compris entre les tubes séminifères, appelé tissu interstitiel, est occupé par du tissu conjonctif lâche, riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques et en nerfs, au sein duquel sont répartis des petits amas de cellules de Leydig (Figure 2) qui ont pour principale fonction de synthétiser et sécréter des androgènes, principalement de la testostérone.

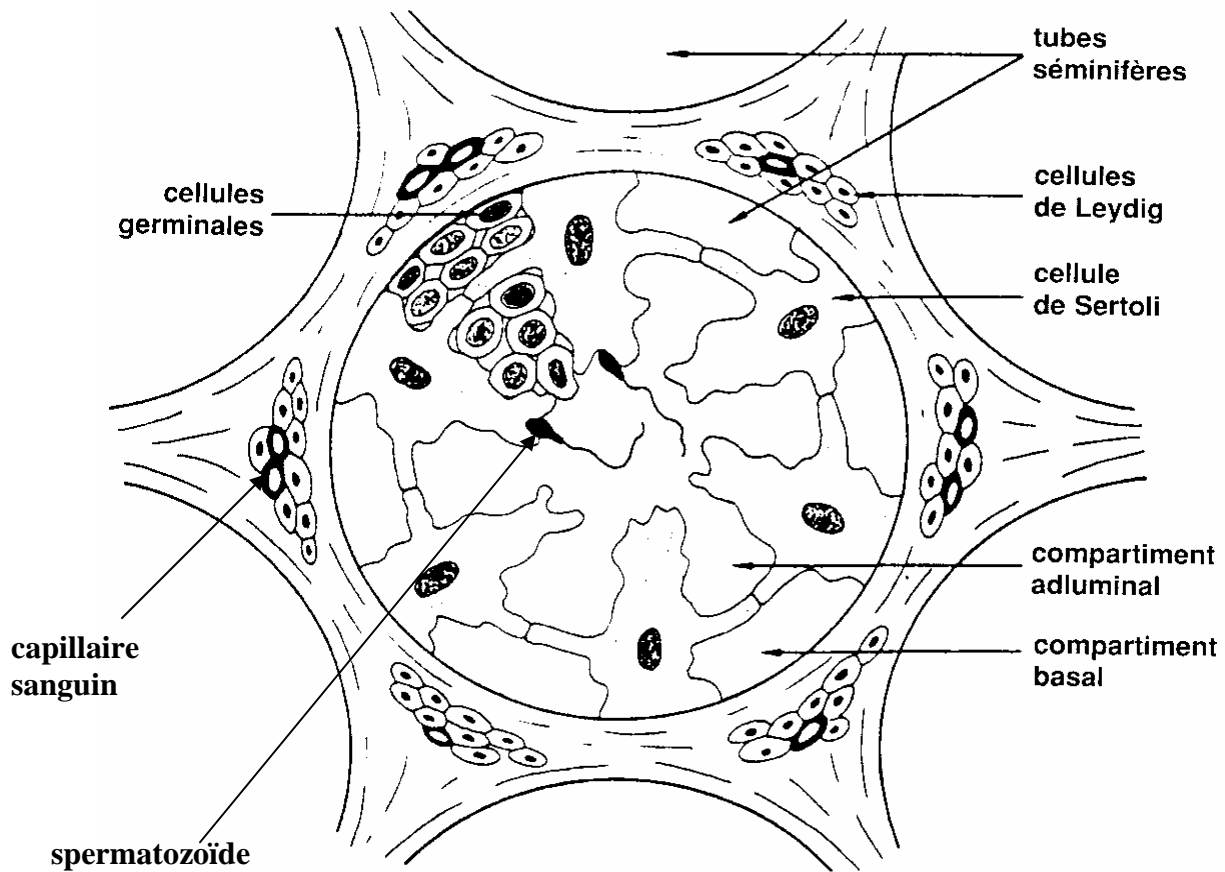


Figure 2

Le lobule testiculaire

(selon Humeau et Arnal, reproduction et développement, Sauramps Medical)

Les testicules sont suspendus dans le scrotum à l'extrémité du cordon spermatique qui contient l'artère spermatique, les veines testiculaires et épididymaires et le canal déférent vascularisé par l'artère et des veines déférentielles. Au niveau de chaque testicule, l'artère spermatique se divise en deux artères testiculaires. Celles-ci donnent naissance à des branches terminales qui parcourent l'albuginée et les cloisons inter-lobulaires. Les veines testiculaires et épididymaires se regroupent au pôle dorsal du testicule pour former le *plexus pampiniforme* étroitement appliqué sur l'artère spermatique. Les vaisseaux lymphatiques suivent le trajet des vaisseaux sanguins. L'innervation du testicule dépend de deux plexus nerveux : le plexus spermatique (innervation parasympathique) et le plexus déférentiel (innervation sympathique).

Le liquide contenu dans les tubes séminifères (liquide tubulaire) assure le transport des spermatozoïdes expulsés dans la lumière en fin de spermatogenèse.

La jonction épididymo-testiculaire

Entre le testicule et l'épididyme, les spermatozoïdes empruntent des structures canalaire : le *rete testis* et les canaux efférents.

Le *rete testis* est constitué de 3 parties distinctes au sein du *corps de Highmore* : une portion septale dans laquelle débouchent les tubes droits, une portion médiastinale, enveloppée dans l'albuginée, recevant les spermatozoïdes provenant de la portion septale et une portion extra-testiculaire.

Les canaux efférents communiquent avec la portion extratesticulaire du *rete testis*. Ils sont en nombre variable (généralement une douzaine). Après un segment testiculaire rectiligne, ils deviennent pelotonnés et se disposent en une masse conique à sommet testiculaire et base épididymaire donnant l'aspect de cône efférent. Le segment épididymaire est court. Les canaux efférents se jettent successivement en « dents de peigne » dans le canal épididymaire.

L'épididyme

L'épididyme est un organe pair allongé, aplati d'avant en arrière, situé sur le bord supérieur du testicule dont il épouse la convexité. L'épididyme est recouvert par la tunique vaginale excepté au niveau de sa partie distale. Il mesure 5 cm de longueur et 1,5 cm de largeur. Le canal épидидymaire mesure 5 à 6 mètres de longueur et a une structure pelotonnée. L'épididyme comprend 3 parties : la tête, le corps et la queue. La tête de l'épididyme est arrondie, lobulée et repose sur le pôle antérosupérieur du testicule où elle est amarrée par une albuginée commune. Le corps est allongé et séparé du testicule par un repli de la vaginale. La queue de l'épididyme et l'anse épидидymodéférentielle constituent une zone de transition entre l'épididyme et le canal déférent.

Les branches artérielles épидидymaires (antérieures et postérieures) issues de l'artère spermatique permettent la vascularisation de la partie proximale de l'épididyme. La partie distale de l'épididyme est vascularisée par l'artère déférentielle. Les deux systèmes artériels sont anastomosés. Les artères se disposent à la périphérie de l'épididyme au sein du tissu conjonctif. De ces artères superficielles se détachent des artérioles qui pénètrent perpendiculairement l'épididyme. Ces artères sont spiralées et se terminent dans le lit capillaire pérítubulaire. Les différentes parties de l'épididyme présentent des différences dans la densité et la distribution du lot capillaire. Contrairement au *rete testis* qui est pauvrement vascularisé, la vascularisation de la tête et de la queue de l'épididyme est dense. Les veines ont la même disposition que les artères dont elles suivent le trajet. Les lymphatiques de l'épididyme se drainent vers les ganglions lombaires, les ganglions iliaques externes et hypogastriques. Il existe de nombreuses connexions lymphatiques entre les voies drainant la lymphe du testicule vers l'épididyme.

L'innervation de l'épididyme provient du plexus interspermatocodéférentiel à la face interne de l'épididyme, qui est le résultat de l'anastomose du plexus déférentiel avec le plexus spermatique.

Le canal déférent

Le canal déférent est un organe pair constitué d'un tube cylindrique qui présente une augmentation de diamètre dans sa terminaison pour former l'ampoule déférentielle. Sa longueur moyenne est de 40 cm, son diamètre est de 2 mm sauf au niveau de l'ampoule où il atteint 5 à 6 mm.

Le canal déférent fait suite au canal épiddymaire par une portion juxta-épiddymo-testiculaire et se porte en haut et en avant sur la face interne du testicule. Avec la queue de l'épididyme, il forme l'anse épiddymodéférentielle. La seconde portion du canal déférent est une portion funiculaire verticale à la face interne du corps de l'épididyme. Rectiligne et vertical, il monte avec les autres éléments du cordon spermatique. Dans le cordon, le canal déférent gagne l'orifice inguinal externe puis chemine dans le canal inguinal. A l'orifice profond du canal inguinal, les éléments du cordon se séparent et le canal déférent se porte en dehors et en arrière pour rejoindre le pelvis. Dans sa portion pelvienne, le canal déférent parcourt la face latérale de la vessie en cheminant sous le péritoine. Il passe à la face postérieure de la vessie après avoir croisé la face antérieure de l'uretère terminal puis s'élargit pour former l'ampoule déférentielle. L'ampoule déférentielle est contenue dans un dédoublement de l'aponévrose de Denonvilliers où elle est en rapport étroit avec la vésicule séminale en dehors.

La paroi du canal déférent comprend une muqueuse, une musculature formée de fibres lisses encastrées et une adventice contenant vaisseaux et nerfs. Sa lumière est de 0,8 mm de diamètre.

Le canal déférent est vascularisé par l'artère déférentielle, branche de l'artère vésiculo-déférentielle, elle-même branche de l'artère hypogastrique. L'artère accompagne le déférent, intimement liée à lui jusqu'à la queue de l'épididyme où elle s'anastomose à l'artère épидидymaire, participant au réseau anastomotique artériel de la queue de l'épididyme.

Les veines déférentielles se jettent dans les veines du cordon et dans le plexus vésico-prostatique au niveau de la portion terminale du déférent.

Le drainage lymphatique du déférent est bipolaire avec des collecteurs lymphatiques qui se jettent à une extrémité dans les ganglions iliaques externes et à l'autre dans les ganglions hypogastriques.

L'innervation du canal déférent, issue du plexus hypogastrique est assurée par des filets nerveux qui suivent son trajet et vont s'anastomoser avec le plexus nerveux spermatique pour former le plexus interspermatocodéférentiel.

1.5 Les vésicules séminales

Les vésicules séminales sont des organes glandulaires pairs qui secrètent 40 à 60% du liquide séminal, constituant le sperme. Elles sont de surface bosselée, et en dérivation sur la voie séminale principale au niveau de la terminaison du canal déférent. Chaque vésicule séminale a une forme piriforme et aplatie d'avant en arrière. Oblique en haut, en dehors et en arrière, la vésicule séminale est longue de 5 cm et large de 1,5 cm au niveau du fond. Les deux vésicules séminales sont placées symétriquement en dessous et en arrière de la vessie, en avant du rectum, au dessus de la prostate et au dessous du cul de sac de Douglas. Au bord interne de la vésicule séminale vient se terminer le canal déférent, sinueux et dilaté formant l'ampoule déférentielle. Le col de la vésicule séminale, après avoir rejoint l'ampoule déférentielle se prolonge par le **canal éjaculateur** qui pénètre dans la glande prostatique. Les vésicules séminales et les ampoules déférentielles situées dans un dédoublement de

l'aponévrose de Denonvilliers sont entourées d'une véritable loge fibromusculaire, amarrée à la loge prostatique au niveau de la base de la prostate.

La vascularisation artérielle de la vésicule séminale dépend de l'artère vésiculo-déférentielle, branche de l'artère hypogastrique. Le flux veineux rejoint le plexus veineux prostatico-vésical. L'innervation des vésicules séminales dépend du plexus hypogastrique. Une branche nerveuse s'en détache pour suivre le trajet déférentiel et innerver l'épididyme. La contraction de la vésicule séminale, motrice de l'émission du sperme avant l'éjaculation, dépend de l'innervation assurée par le système sympathique.

1.6 La prostate

La prostate est un organe musculo-glandulaire unique et médian situé dans le petit bassin au dessous de la vessie et en avant du rectum. Elle est constituée de deux glandes : une glande caudale dans laquelle l'élément glandulaire prédomine sur l'élément musculaire et une glande crâniale où l'élément musculaire prédomine sur le glandulaire. Aplatie d'avant en arrière, elle a un grand axe oblique en bas et en avant. Ses dimensions moyennes chez l'adulte sont de 3 cm de haut, 3 cm de large et 2 cm d'avant en arrière. Sa face postérieure, convexe en arrière présente un sillon médian vertical. Sa base présente une dépression dans laquelle confluent les vésicules séminales et ampoules déférentielles. Le long de son grand axe, elle est traversée par l'urètre prostatique dont elle constitue la paroi.

La branche prostatique de l'artère vésico-prostatique se divise en un rameau intracapsulaire à trajet horizontal et descendant et un rameau intra-glandulaire. Les veines prostatiques se jettent dans le plexus latéro-prostatique, où aboutissent les veines de l'urètre et le plexus de Santorini avant de rejoindre la veine iliaque interne.

L'innervation sympathique est assurée par 4 à 5 filets nerveux issus du ganglion hypogastrique qui constituent sur les faces latérales de la prostate le plexus prostatique. L'innervation para-sympathique est issue des nerfs viscéraux du plexus sacré (S3 et S4).

1.7 L'urètre

L'urètre s'étend du col de la vessie au méat urétral (méat urinaire). C'est un conduit musculo-membraneux de 16 cm de longueur environ chez l'homme. On distingue **l'urètre postérieur et l'urètre antérieur**.

L'urètre postérieur comprend l'urètre prostatique et l'urètre membraneux. L'urètre prostatique correspond à la portion initiale de l'urètre entre le col vésical et l'urètre membraneux. Il traverse la prostate dont la structure musculo-glandulaire constitue les parois. Dans sa partie moyenne, au niveau de sa face postérieure, l'urètre prostatique présente une saillie verticale : le *veru montanum*. C'est à ce niveau que les deux canaux éjaculateurs débouchent latéralement. L'urètre membraneux désigne la partie urétrale qui traverse le plancher pelvien. Il est situé entre la terminaison de l'urètre prostatique et le début de l'urètre spongieux ou pénien. Deux glandes bulbo-urétrales, ou glandes de Cowper s'ouvrent par un canal dans l'urètre membraneux. Leurs sécrétions sont impliquées dans la lubrification des voies génitales basses et dans la formation du liquide séminal.

L'urètre antérieur (urètre pénien, urètre spongieux) est englobé dans une formation érectile : les corps spongieux et constitue la partie terminale de l'urètre masculin.

1.8 La verge et les corps érectiles

La verge (ou pénis) est formée essentiellement de l'urètre pénien constituant l'axe central des corps érectiles (corps caverneux et corps spongieux) qui lui donnent la rigidité lors de l'érection. L'extrémité de la verge est représentée par le gland. La vascularisation des organes érectiles est assurée par l'artère honteuse interne qui naît du tronc postérieur de l'artère hypogastrique. Le drainage veineux est réalisé par un système de dérivation extra-caverneux superficiel et intra-caverneux.

1.9 Un exemple de malformation du tractus génital masculin :

l'agénésie bilatérale des canaux déférents (ABCD)

Les canaux de Wolff se différencient en canaux déférents, épididyme et vésicules séminales lors de l'embryogenèse à partir de la septième semaine de développement. L'absence de dérivés des canaux de Wolff, ou agénésie, peut correspondre à une anomalie de développement isolée ou peut être associée à une malformation embryologique de l'organogenèse de l'arbre urinaire supérieur avec des anomalies bilatérales.

Il a été décrit des agénésies vésiculo-déférentielles qui présentent une agénésie rénale unilatérale associée. Ce type d'anomalie serait associé à des facteurs polygéniques et multifactorielles (Schellen and Van Straaten, 1980 ; Budde *et al.*, 1984 ; Czeizel, 1985).

L'existence d'une azoospermie obstructive à la fois chez les patients présentant une mucoviscidose et les patients porteurs d'une agénésie bilatérale des canaux déférents (ABCD) a conduit Holsclaw *et al.*, 1971, à suggérer que l'ABCD pourrait correspondre à une forme mineure ou incomplète de mucoviscidose, qui est une maladie multisystémique transmise de façon autosomique récessive.

Le clonage du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) et la réalisation de nombreuses études sur des patients porteurs de cette anomalie génitale (Bienvenu *et al.*, 1993 ; Mercier *et al.*, 1995 ; Le Lannou *et al.*, 1995) ont permis de confirmer cette hypothèse (Dumur *et al.*, 1990). Pour certains auteurs, il serait préférable d'utiliser le terme « atrésie » au terme « agénésie » dans le cas d'une absence bilatérale des canaux déférents associée à l'existence de mutation(s) du gène CFTR. En effet, l'examen de fœtus de 12 et 18 semaines de gestation porteurs de deux mutations sévères du gène CFTR montre la présence de canaux déférents normaux non obstructifs ou sténosés. De même, la proportion élevée de garçons prépubères porteurs de mutations du gène CFTR avec une absence d'anomalie des canaux déférents plaide pour un mécanisme d'atrésie secondaire à la composition des sécrétions aboutissant à une obstruction progressive. En effet, il semblerait

que l'organogenèse des canaux déférents ne soit pas modifié chez ces patients, mais que des anomalies de sécrétions, secondaires à l'altération de fonction du canal chlore, seraient à l'origine d'une obstruction des canaux déférents puis de leur atrésie (Gaillard *et al.*, 1997)

Plus de 1300 mutations du gène CFTR de ce gène localisé sur le bras long du chromosome 7 ont été décrites. Une ou plusieurs mutation(s) du gène CFTR est (sont) retrouvée(s) chez 70% des hommes présentant une ABCD. En fonction de leur retentissement sur la fonctionnalité de la protéine CFTR qui constitue un canal chlore, les mutations sont classées en type sévère et mineur. La fréquence d'hétérozygotie dans la population générale est élevée puisqu'elle est de 1/20. La mutation sévère $\Delta F508$ est la mutation la plus fréquemment retrouvée (Mercier *et al.*, 1995).

L'existence d'une ABCD peut être secondaire à la présence d'une forme composite hétérozygote d'une mutation sévère et d'une mutation mineure du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane) ou d'une forme homozygote de deux mutations mineures, ou de l'association d'un variant 5T de l'intron 8 sur un allèle du gène CFTR avec une mutation du gène CFTR sur l'autre allèle qui est la forme la plus fréquemment retrouvée (Claustres, 2005 ; Brugnon *et al.*, 2008).

Le diagnostic d'ABCD est réalisé fréquemment chez les hommes infertiles présentant une azoospermie obstructive (Stuhrman and Dörk, 2000). Ces patients présentent une spermatogenèse active (Silber *et al.*, 1990) mais ne peuvent excréter les spermatozoïdes produits du fait de l'ABCD. Le développement de l'ICSI avec spermatozoïdes épидидymaires et/ou testiculaires prélevés chirurgicalement (Tournaye *et al.*, 1997 ; Palermo *et al.*, 1999) a permis à ces hommes de pallier à leur problème d'infertilité.

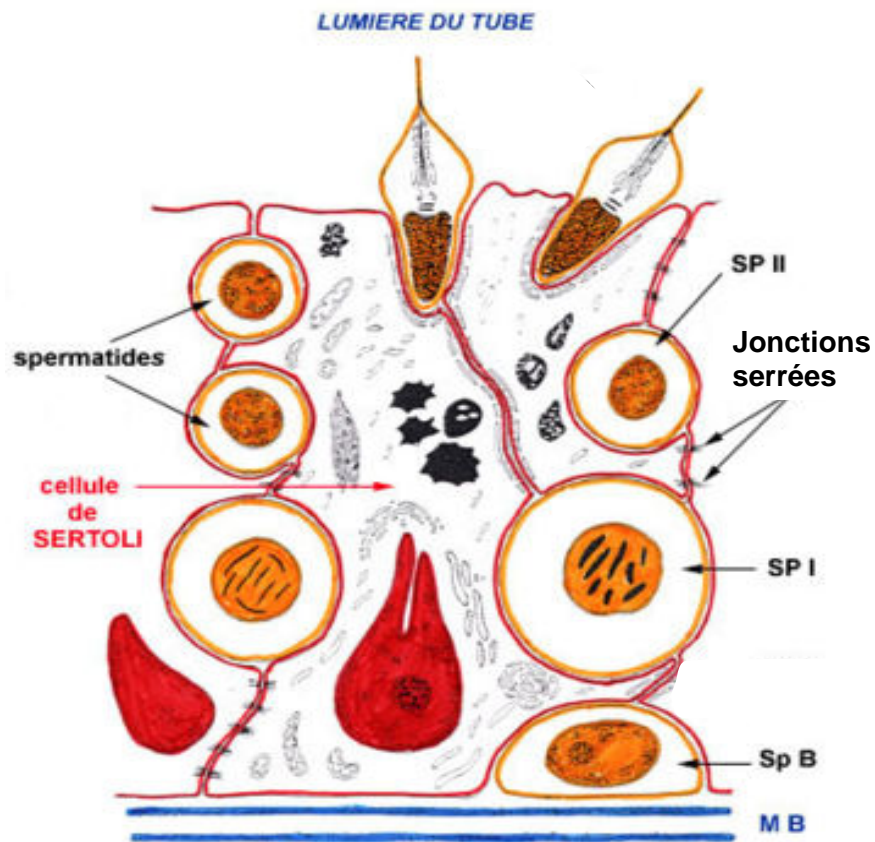


Figure 3

Coupe transversale de tube séminifère

(selon Humeau et Arnal, reproduction et développement, Sauramps Medical)

MB : membrane basale; SpB: spermatogonie B; SPI : spermatocyte I;
 SPII : spermatocyte II

2. La spermatogenèse

Nous décrivons les principales caractéristiques de la spermatogenèse en nous basant essentiellement sur les synthèses rapportées par Thibault et Levasseur, 2001; Karp, 2004 ; Humeau et Arnal, 2005 ; Dadoune, 2006.

La spermatogenèse est un processus physiologique mis en place lors de la puberté qui permet, chez l'homme, la production continue à partir de cellules souches de cellules germinales masculines hautement différenciées.

La spermatogenèse se déroule à l'intérieur des tubes séminifères en 3 phases : la multiplication, la maturation nucléaire et la différenciation.

2.1 L'épithélium séminifère

En coupe transversale (Figure 3), un tube séminifère apparaît constitué par :

- Une membrane conjonctive externe de 3 à 5 μm d'épaisseur, appelée membrane propre, contenant des cellules myoïdes contractiles et séparées de l'épithélium par une membrane basale.

- L'épithélium germinal dont l'épaisseur correspond aux $2/3$ du rayon du tube. Deux types de cellules y sont visibles : **les cellules de Sertoli et les cellules de la lignée germinales.**

→ **Les cellules de Sertoli** sont des cellules de forme pyramidale de grande taille occupant toute l'épaisseur de l'épithélium. Elles sont reliées entre elles par des jonctions serrées qui se trouvent aux extrémités de leurs prolongements latéraux. Par l'existence de ces jonctions serrées, deux compartiments distincts participent à la formation de la barrière hémato-testiculaire : un compartiment basal périphérique et un compartiment adluminal proche de la lumière du tube. Les différents éléments qui constituent cette barrière hémato-testiculaire sont : l'endothélium des capillaires sanguins, les cellules péri-tubulaires dont les espaces intercellulaires assurent la diffusion des molécules de taille réduite, la lame basale de la gaine péri-tubulaire, les

jonctions serrées inter-sertoliennes qui empêchent les substances en provenance des espaces interstitiels de pénétrer dans les espaces inter-cellulaires du compartiment adluminal des tubes séminifères. Cette barrière est perméable à l'eau, aux acides aminés, aux ions et aux sucres. Elle empêche le passage des grosses molécules hydrophiles comme les protéines. Par la mise en jeu d'un mécanisme de diffusion facilitée, elle permet la pénétration intra-tubulaire des stéroïdes. La barrière hémato-testiculaire joue donc deux rôles : elle contrôle le transit des composants du sang vers le compartiment adluminal et elle protège l'organisme des réactions immunitaires que pourraient induire les cellules germinales, porteuses d'antigènes spécifiques, si elles étaient au contact du milieu intérieur communiquant avec le compartiment basal.

Outre leur rôle dans la formation de la barrière hémato-testiculaire, les cellules de Sertoli ont d'autres fonctions : soutien des cellules germinales, sécrétions nécessaires au métabolisme des cellules germinales et phagocytose des résidus des cellules germinales en cours d'apoptose et des corps résiduels des spermatozoïdes en cours de différenciation.

→ **Les cellules de la lignée germinale** sont en relation avec les cellules de Sertoli par des jonctions de type communicantes. Disposées en assises plus ou moins régulières, elles représentent de la périphérie vers le centre du tube les stades successifs de la spermatogenèse : spermatogonies, spermatocytes primaires, spermatocytes secondaires, spermatides, spermatozoïdes.

2.2 Les différentes étapes de la spermatogenèse

2.2.1 La phase de multiplication

La phase de multiplication est initiée à partir des cellules souches: les spermatogonies Ad, puis elle est constituée d'une succession de mitoses, dont la dernière aboutit à la formation de cellules germinales appelées spermatocytes primaires.

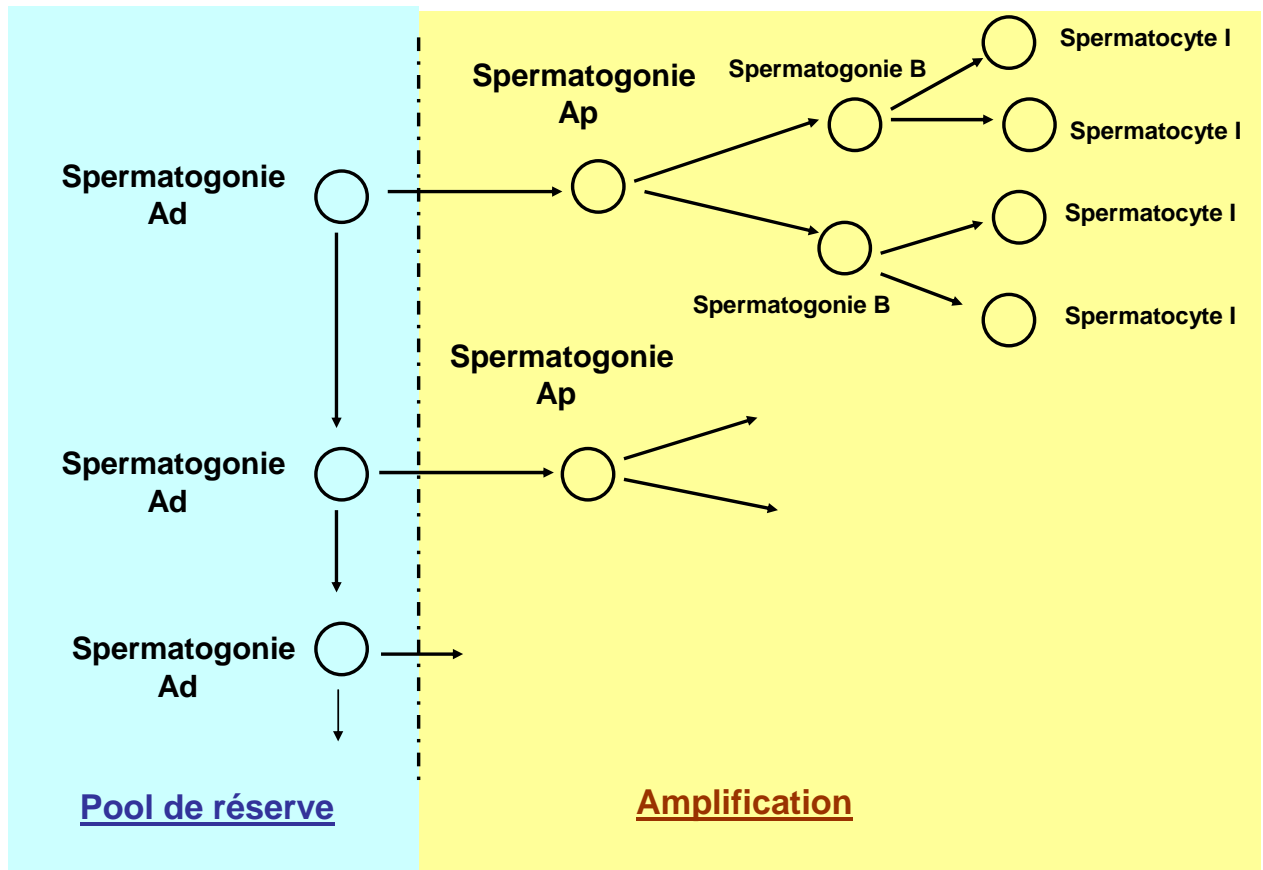


Figure 4

Schéma de la phase de multiplication des cellules germinales mâles

(selon Humeau et Arnal, reproduction et développement, Sauramps Medical)

Chez l'homme adulte, les spermatogonies sont disposées à la périphérie des tubes séminifères dans le compartiment basal entre les cellules de Sertoli (Figure 3). Les analyses histologiques ont permis de distinguer trois types de spermatogonies :

- les spermatogonies de *type Ad* (d=dark) qui possèdent un noyau arrondi avec une chromatine finement granuleuse, occupée par une vacuole centrale.
- les spermatogonies de *type Ap* (p=pâle) qui ont un noyau ovalaire, clair, avec une chromatine fine et dispersée, renfermant un ou plusieurs nucléoles.
- les spermatogonies de *type B* qui sont caractérisées par un noyau arrondi, foncé avec une chromatine en amas.

La succession des mitoses suivantes ont été décrites : une spermatogonie *Ad* se divise pour donner une autre spermatogonie *Ad* et une spermatogonie *Ap*; cette spermatogonie *Ap* se divise pour donner deux spermatogonies *B* ; chaque spermatogonie *B* apporte après division mitotique deux spermatocytes primaires diploïdes (Figure 4). Les spermatogonies sont connectées par des ponts intercellulaires qui les relient les unes aux autres, au sein d'un groupe homogène de cellules souches issues de la même génération. Ces ponts persistent entre les cellules filles tout au long de la spermatogenèse.

La production continue de spermatozoïdes nécessite à la fois la division des spermatogonies souches représentant les cellules souches de renouvellement et le maintien constant d'un pool de spermatogonies constituant les cellules souches de réserve. Le nombre de spermatogonies *Ad* est donc limité est constitue un pool de réserve permanent.

2.2.2 La phase de maturation nucléaire

La phase de maturation nucléaire correspond à la méiose et concerne les deux générations de spermatocytes : spermatocytes primaires (spermatocytes I) et spermatocytes secondaires (spermatocytes II).

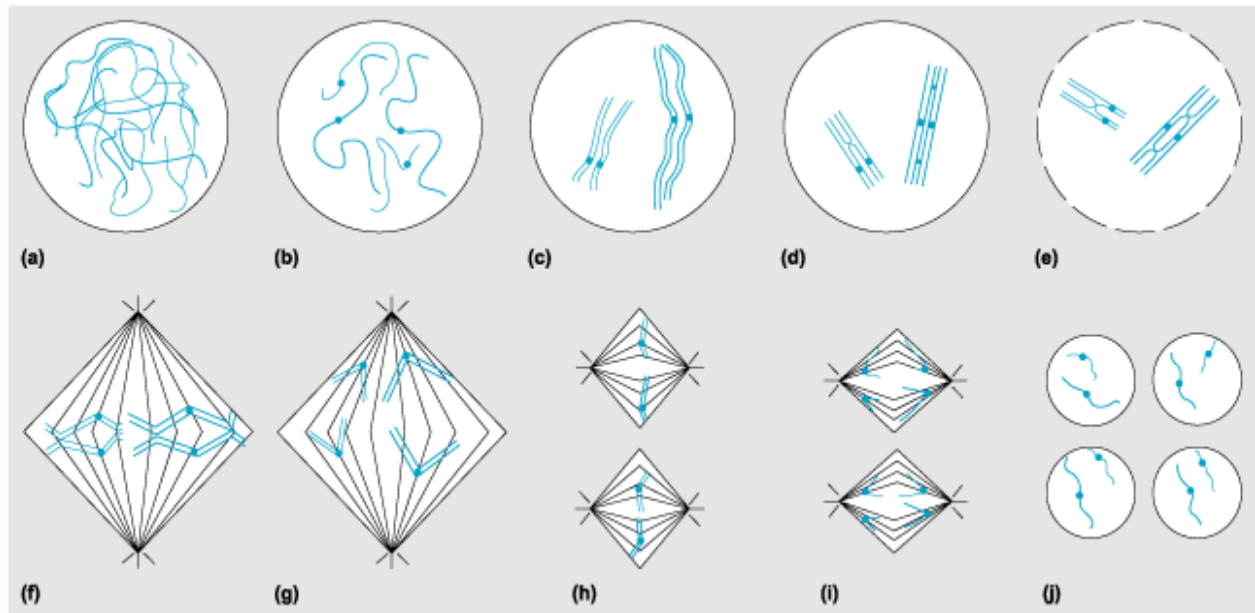


Figure 5

Les différentes étapes de la méiose gamétique masculine

(a) Interphase; (b) Leptotène; (c) Zygotène; (d) Pachytène; (e) Diplotène/ diacinèse;
 (f) Metaphase I; (g) Anaphase I (h) Metaphase II; (i) Anaphase II; (j) Telophase II

La méiose est une série de deux divisions successives (Figure 5) qui permet, en théorie, de donner naissance à quatre cellules haploïdes, appelées spermatides, à partir d'un spermatocyte I. La première division dite réductionnelle, conduit à la séparation des chromosomes paternels et maternels appariés et à la formation de spermatocytes II, première génération de cellules haploïdes. Chaque chromosome est alors formé de deux chromatides. La deuxième division dite équationnelle (méiose II), aboutit à la répartition de chacune des chromatides dans les deux cellules filles : les spermatides (deuxième génération de cellules haploïdes). La division cellulaire par méiose permet donc : (1) la réduction chromatique, qui correspond à la réduction du nombre de chromosomes (ou de la quantité d'ADN) permettant la formation de cellules filles haploïdes à partir de cellule mère diploïde ; (2) le brassage de l'information génétique ; (3) la transmission de l'information génétique d'une génération à la suivante.

2.2.2.1 Les spermatocytes primaires (ou spermatocytes I)

Issus de la division par mitose des spermatogonies B, les spermatocytes I se situent dans le compartiment basal du tube séminifère et restent en interphase pendant deux à quatre jours, au cours desquels leur taille s'accroît. A leur entrée en phase de méiose, les spermatocytes I se situent dans le compartiment adluminal du tube séminifère. La première division de méiose (méiose I) dite réductionnelle est précédée d'une phase de réplication (stade préléptotène) qui a pour effet de doubler la quantité d'ADN dans les spermatocytes I diploïdes et la réplication des filaments chromosomiques.

Au cours de la prophase qui dure 23 jours, le spermatocyte I passe par cinq stades successifs : **leptotène, zygotène, pachytène, diplotène, diacinèse.**

→ Stade léptotène

Dans le noyau apparaissent des chromosomes sous forme de filaments fins (au nombre de 2×23 chromosomes), semblables deux à deux, qui commencent à se condenser et s'apparier. Chaque chromosome est déjà dupliqué et les deux chromatides restent reliées par leur centromère. A la fin du stade leptotène, les télomères se placent à la face interne de l'enveloppe nucléaire d'un côté du noyau. On suppose que cette disposition des télomères favorise l'appariement des chromosomes homologues.

→ Stade zygotène

Le processus d'épaississement des chromosomes se poursuit et les paires de chromosomes s'apparient et constituent à ce stade des bivalents. L'appariement des chromosomes homologues, appelé *synapsis*, se constitue grâce à une structure protéique : le complexe synaptonémal. Ce dernier, visible en microscopie électronique, est constitué de trois bandes parallèles et de nombreuses fibres transversales reliant la bande centrale aux bandes latérales.

→ Stade pachytène

A ce stade, l'épaississement des chromosomes est tel qu'il devient possible de reconnaître et d'individualiser chaque bivalent d'après la disposition des chromomères et du centromère, qui deviennent visibles. Les chromosomes homologues restent étroitement unis par le complexe synaptonémal (Djelati *et al.*, 2005). L'appariement des chromosomes homologues est achevé. Les deux chromatides de chaque chromosome deviennent visibles et les bivalents sont désignés sous le terme de tétrades (4 chromatides).

Des nodules de recombinaison apparaissent au niveau des chromosomes appariés qui permettent un échange de segments chromosomiques entre chromatides de chromosomes

homologues d'origine paternelle et maternelle : ce sont les *crossing-over*. Ils permettent un échange réciproque d'allèles entre chromosomes homologues et participent ainsi à la diversité génétique. Une même chromatide recombinée peut porter alors des gènes d'origine paternelle et d'origine maternelle. Des anomalies d'échanges sont possibles à ce niveau entraînant dans l'une des chromatides une délétion et dans l'autre une duplication.

Le bivalent sexuel (chromosomes X et Y) se sépare des 22 bivalents autosomiques et se trouve inclus dans une masse dense : la vésicule sexuelle.

→ **Stade diplotène**

A ce stade, les chromatides homologues s'écartent l'une de l'autre en raison de la dissociation du complexe synaptonémal et l'appariement étroit entre les chromosomes homologues ne subsiste qu'en des points spécifiques ou chiasmas. Les chiasmas proviennent de la réunion de deux des quatre chromatides du bivalent (une chromatide de chaque chromosome homologue). Ils sont localisés sur les chromosomes où les *crossing-over* se sont produits auparavant. Le nombre de chiasmas varie pour un même bivalent d'une cellule méiotique à une autre. Le nombre moyen de chiasmas est plus élevé pour les chromosomes les plus longs. En l'absence de chiasma, les chromosomes du bivalent ont tendance à se séparer après la dissolution du complexe synaptonémal. Cette séparation prématurée des chromosomes homologues aboutit souvent à leur non disjonction et à la production de noyaux à nombre anormal de chromosomes, ou aneuploïdes.

→ **Stade diacinèse**

Ce stade marque la fin de la prophase de la première division méiotique. Il est caractérisé par une condensation maximale des chromosomes et la disparition de la membrane nucléaire et du nucléole. Les points d'entrelacement au niveau des chiasmas se sont progressivement déplacés vers les extrémités des chromosomes : c'est la terminalisation

des chiasmas. Le fuseau méiotique s'assemble et les tétrades se disposent de telle manière que les centromères des paires de chromosomes homologues soient symétriques de part et d'autre de la plaque métaphasique.

La prophase est suivie par les trois autres stades de division cellulaire : métaphase, anaphase et télophase.

Durant la métaphase I, les chromosomes bivalents se disposent sur les fibres du fuseau méiotique, constituant la plaque équatoriale située entre les deux centromères.

A l'anaphase I, chaque chromosome, constitué de deux chromatides sœurs migre vers les pôles du fuseau. Leur ségrégation au hasard dans les cellules filles est un facteur de brassage génétique

Durant la télophase I, les deux lots de chromosomes sont situés au niveau des pôles opposés du fuseau et sont entourés par une nouvelle membrane nucléaire. Cette individualisation nucléaire est suivie d'une cytodierèse incomplète avec réunion par un pont cytoplasmique des deux spermatocytes II produits.

Chacun des deux spermatocytes II résultant de cette division réductionnelle contient alors un lot haploïde de chromosomes remaniés (22+Y ou 22+X) avec deux chromatides et une quantité d'ADN réduite de moitié.

2.2.2.2 Les spermatocytes secondaires (spermatocytes II)

Les spermatocytes II ont une existence de brève durée. En effet, il est difficile d'observer des spermatocytes II sur les coupes histologiques de biopsies testiculaires. Cette deuxième division de méiose permet la formation de spermatides après division des spermatocytes II par une division assimilable à une division de mitose sans réplication de l'ADN préalable.

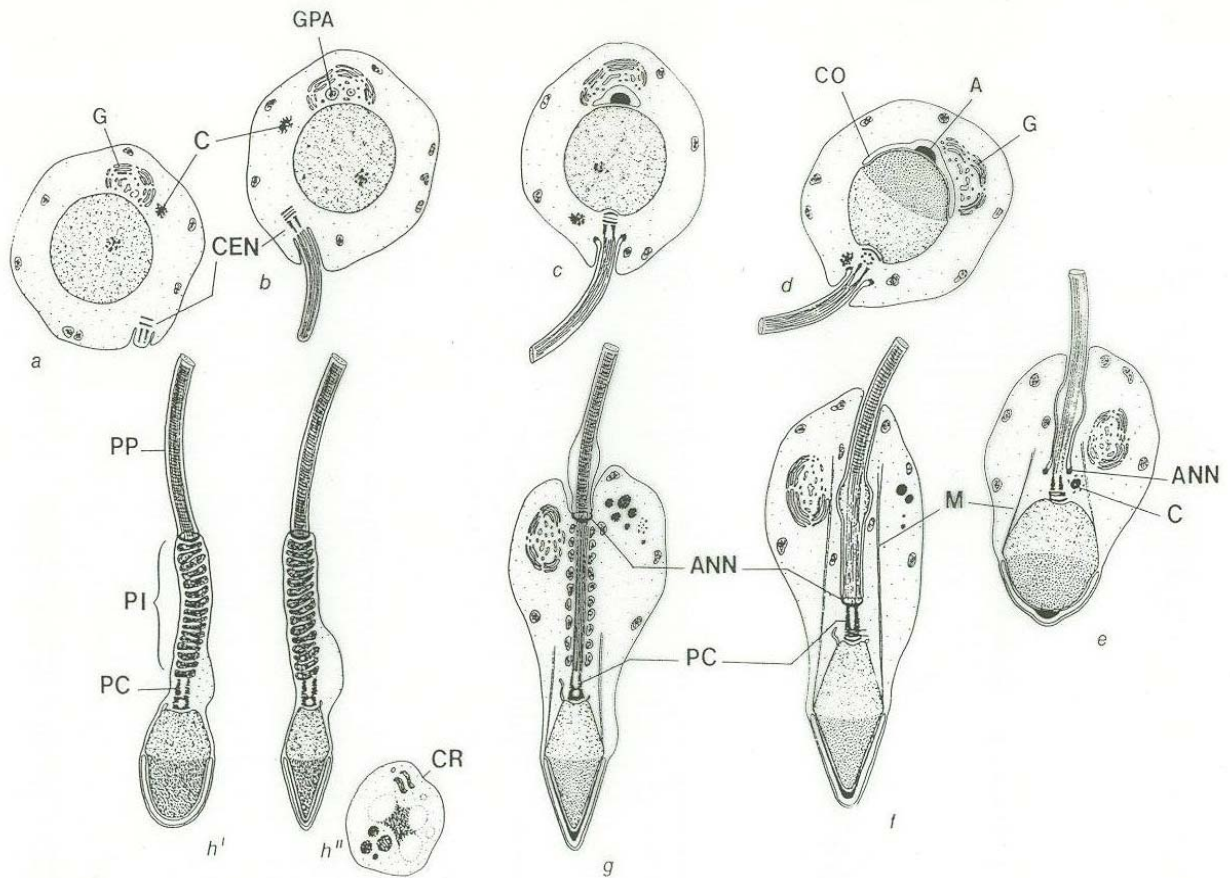


Figure 6

Principales modifications ultrastructurales lors de la spermiogenèse

(selon Mauvais-Jarvis, médecine de la reproduction masculine.
Editions Flammarion médecine/sciences)

G : appareil de Golgi ; C : corps chromatoides ; CEN : centrioles ;
GPA : granule postacrosomique ; CO : coiffe encéphalique ;
A : acrosome ; ANN : anneau ; PC : pièce connective ; PI : pièce intermédiaire ;
PP : pièce principale ; CR : corps résiduel.

Lors de la prophase II, les chromosomes constitués de deux chromatides se condensent et se dirigent vers la plaque métaphasique sur laquelle ils sont alignés en métaphase II. L'anaphase II débute par le clivage des liaisons entre chromatides sœurs permettant leur déplacement vers les pôles opposés des spermatocytes II. Enfin, la télophase II correspond à la dernière étape de la deuxième division de méiose durant laquelle une membrane nucléaire se constitue autour de chaque lot haploïde de chromosomes constituant le noyau haploïde des spermatides formées.

2.2.3 La phase de différenciation

Cette phase, appelée aussi spermiogenèse, ne comporte pas de division mais uniquement une différenciation des spermatides, aboutissant à la formation de spermatozoïdes.

Les spermatides sont situées dans le compartiment adluminal, enfoncées dans les dépressions des cellules de Sertoli auxquelles elles sont reliées par des jonctions spécialisées de type jonctions communicantes.

Les spermatides de petite taille et sphériques (8 à 10 μ m) subissent une série de transformations nucléaires, cytoplasmiques et membranaires qui sont le résultat de la traduction d'ARN synthétisés et stockés depuis le stade de spermatocyte primaire. La séquence des modifications morphologiques a été subdivisée en 8 stades successifs différents.

Les transformations de la spermatide qui se déroulent durant la spermiogenèse sont résumées dans la Figure 6 :

→ **La condensation du noyau** : la chromatine se condense progressivement pour donner un noyau compact, de forme allongée dans lequel persistent quelques lacunes claires. Lors de cette étape de compaction, les histones de type somatique présentes dans les stades précoces de la spermiogenèse sont remplacées par des nucléoprotéines plus basiques (protéines de transition TP1, TP2) qui sont elles mêmes déplacées par des nucléoprotéines

riches en arginine et cystéine (protamines P1, P2). L'interaction inter- et intra-protamines par la formation de ponts disulfures entre les résidus cystéine, est déterminante pour la condensation de la chromatine caractéristique du noyau du spermatozoïde mature. Les nucléoles disparaissent et les pores de l'enveloppe nucléaire se raréfient.

→ **La formation de l'acrosome :** l'appareil de Golgi fournit de nombreuses vésicules qui confluent en une vésicule unique de grande taille, l'acrosome. Des enzymes hydrolytiques (hyaluronidase, neuraminidase, phosphatase acide, proacrosine) nouvellement synthétisées vont se concentrer dans l'acrosome et parallèlement celui-ci s'aplatit pour recouvrir les deux tiers supérieurs du noyau. Cet équipement enzymatique sera indispensable à la progression du spermatozoïde à travers la zone pellucide de l'ovocyte lors de la fécondation.

→ **La formation du flagelle :** L'appareil centriolaire de la spermatide est profondément modifié. Le centriole proximal reste inchangé et vient se loger dans une légère dépression du noyau au pôle opposé à l'acrosome, donc au pôle postérieur. Le centriole distal disparaît après avoir produit les amorces des microtubules de l'axonème. Autour de cette zone apparaît une structure en forme d'entonnoir dont la base est orientée vers le noyau et dont la paroi est constituée par l'association de 9 colonnes d'aspect segmenté. Les microtubules de l'axonème s'allongent et repoussent la membrane plasmique en un doigt de gant.

→ **La formation du manchon mitochondrial :** dans le cytoplasme, les mitochondries d'abord dispersées se regroupent autour de la racine de l'axonème et s'alignent pour former une spirale, réalisant de la sorte un véritable manchon.

→ **L'élimination des restes cytoplasmiques :** la quasi-totalité du cytoplasme s'écoule sous forme de corps résiduels le long du flagelle et sera éliminée.

→ **Les modifications membranaires :** des protéines nécessaires à la fixation du spermatozoïde sur la zone pellucide entourant l'ovocyte vont s'intégrer dans la membrane

plasmique. Par exemple, la protéine hSMP-1 (human Sperm Membrane Protein), nécessaire dans le processus de reconnaissance à la zone pellucide de l'ovocyte lors de la fécondation, sera acquise lors de la spermiogenèse.

→ **La synthèse des protéines cytoplasmiques** : divers facteurs d'activation ovocytaire sont synthétisés, comme par exemple l'oscilline, qui est une protéine inductrice des oscillations calciques indispensables à l'activation de l'ovocyte lors de la fécondation.

Ces étapes se déroulent de façon concomitante et à leurs termes les spermatozoïdes sont libérés dans la lumière des tubes séminifères lors de l'étape de spermiation.

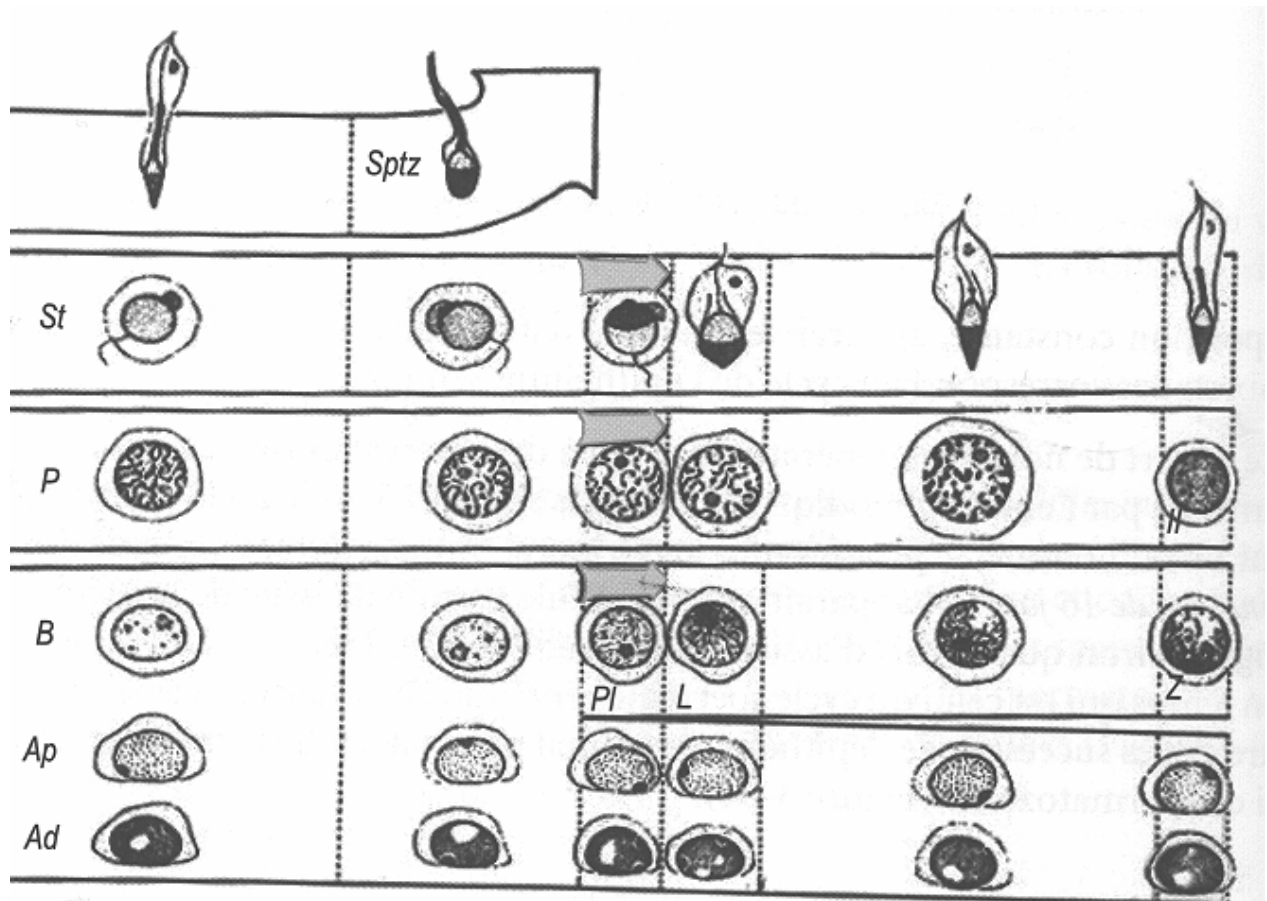
2.3 La cinétique de la spermatogenèse

2.3.1 Le cycle spermatogénétique

Le cycle spermatogénétique est défini comme la succession chronologique des différents stades de maturation d'une génération de cellules germinales, en un point fixe du tube séminifère. La durée de la spermatogenèse est constante pour une espèce donnée. Elle est de l'ordre de 74 jours chez l'homme. Chacune des étapes de la spermatogenèse a une durée fixe et constante. Ainsi, chez l'homme, la durée de vie moyenne des spermatogonies Ap est de 16 à 18 jours, de 7,5 à 9 jours pour les spermatogonies B, de 23 jours pour les spermatocytes I, de 1 jour pour les spermatocytes II et de 23 jours pour les spermatides.

2.3.2 Le cycle de l'épithélium séminal

Les cellules souches de renouvellement entrent en spermatogenèse périodiquement tous les 16 jours chez l'homme. Ces spermatogonies sont reliées par des ponts cytoplasmiques et entrent en spermatogenèse en groupes. Ces ponts persistent entre les spermatocytes de la même génération et leurs cellules filles jusqu'à la fin de la spermiogenèse. Ainsi, les groupes



Stade I II III IV V VI

Figure 7

Cycle de l'épithélium séminal chez l'homme

(classification de Clermont)

Les stades sont numérotés de I à VI, la longueur de la colonne est proportionnelle à la durée du stade.

Ad : spermatogonie de type Ad

Ap : spermatogonie de type Ap

B : spermatogonie de type B

PI, L, Z, P : spermatocytes I respectivement au stade
préleptotène, leptotène, zygotène, pachytène

II : spermatocyte II

St : spermatide

Sptz : spermatozoïde

isogéniques de cellules germinales qui appartiennent à la même génération effectuent leur spermatogenèse d'une manière synchrone.

Au sein de l'épithélium séminifère, quatre à cinq générations de différentes cellules germinales sont disposées en couches superposées. Cette stratification résulte d'une part de la durée fixe des différents stades de la spermatogenèse pour une génération donnée et d'autre part de l'entrée périodique des spermatogonies en spermatogenèse à un stade précis du cycle. Les différentes générations de cellules germinales forment ainsi des associations cellulaires de composition constante disposées dans les tubes séminifères selon des hélices concentriques. Chaque type d'association cellulaire permet de définir un stade dont la durée est constante mais variable d'un stade à un autre. Chez l'homme, 6 stades ont été décrits (classification de Clermont, Figure 7). Ainsi, en un point donné du tube séminifère, les stades apparaissent avec le temps et dans un ordre précis. La succession de tous ces stades correspond au cycle de l'épithélium séminal.

2.4 Une anomalie de la spermatogenèse : les translocations chromosomiques

2.4.1 Définitions

Une translocation chromosomique correspond à une anomalie de structure chromosomique qui se définit par un échange de matériel chromosomique entre deux chromosomes non homologues après cassures sur chacun des chromosomes impliqués. Si ce réarrangement est effectué sans être délétère sur le plan génique, alors la translocation est dite équilibrée. Si un déséquilibre quantitatif du matériel génétique est généré par l'existence d'une translocation chromosomique, la translocation est dite déséquilibrée. On distingue 2 types de translocation : les translocations Robertsoniennes et réciproques.

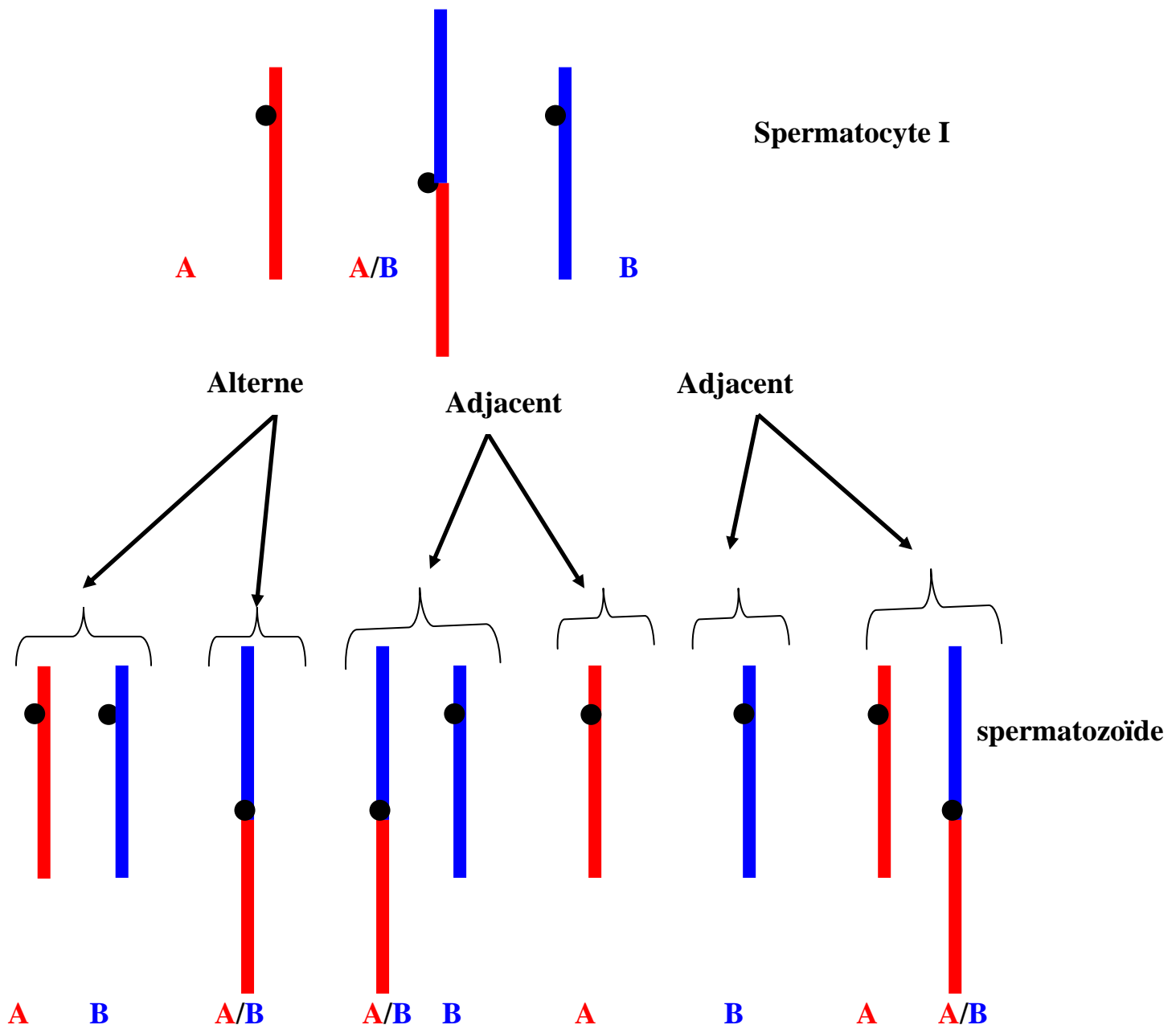


Figure 8

Ségrégation méiotique gamétique de patients porteurs d'une translocation Robertsonienne

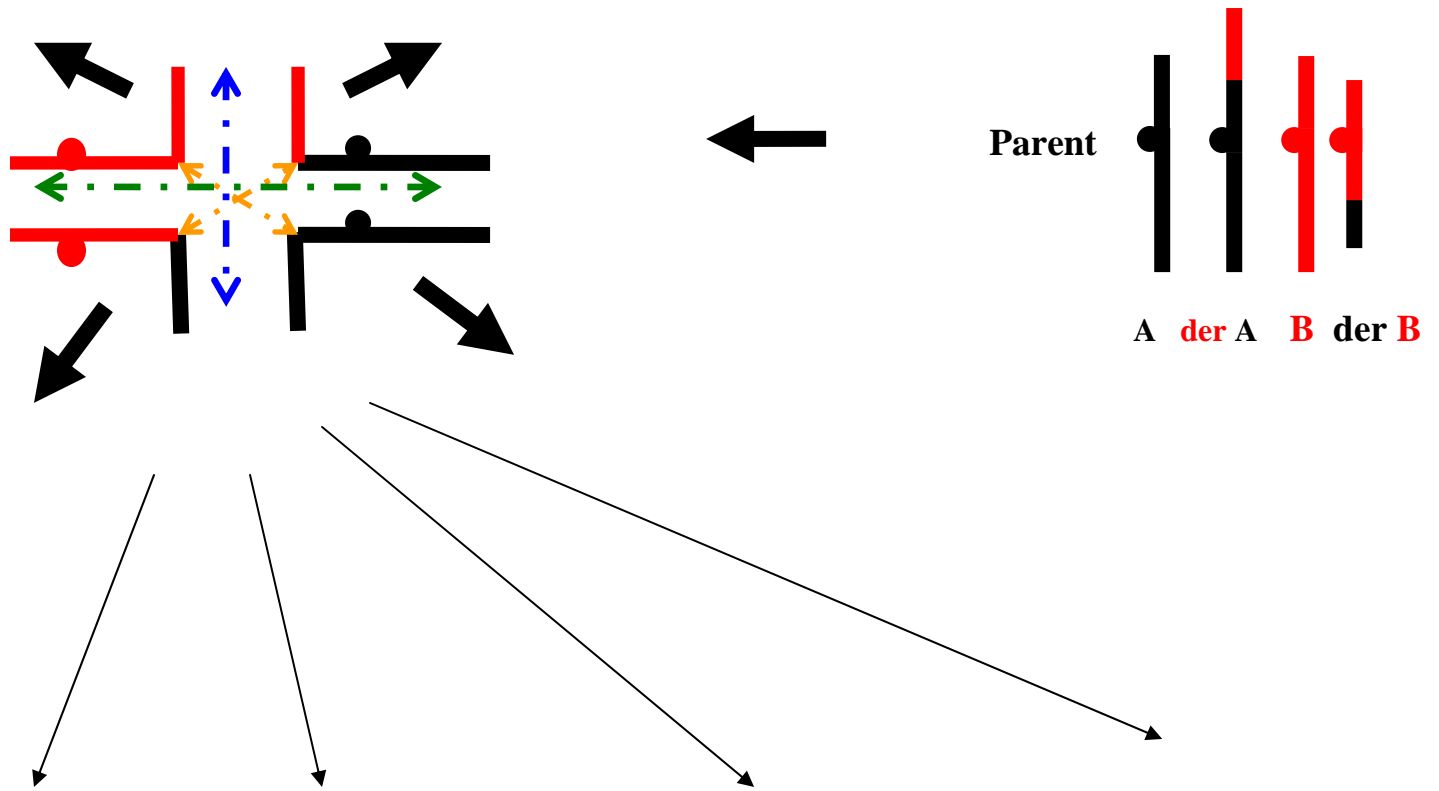
A et B sont deux chromosomes acrocentriques (chromosomes 13, 14, 15, 21, 22)

2.4.2 Les translocations chromosomiques Robertsoniennes

Les translocations chromosomiques Robertsoniennes se définissent par la fusion de deux chromosomes acrocentriques (chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22) au niveau de leur région centromérique avec une perte des bras courts. Ce type de translocation n'a pas de retentissement phénotypique (Egozcue *et al.*, 2000). Les translocations Robertsoniennes sont fréquemment associées à l'existence d'une oligozoospermie ou d'une azoospermie et concernent environ 1% des hommes infertiles (De Braeckelee and Dao, 1991 ; Van Assche *et al.*, 1996).

Chez les sujets porteurs d'une translocation Robertsonienne non homologue, le chromosome porteur de la translocation et les deux chromosomes homologues normaux appariés forment un trivalent au cours de la prophase de la première division méiotique. Deux formes de ségrégation 2:1 sont possibles, alterne ou adjacent (Figure 8), permettant théoriquement l'obtention de 6 gamètes différents. La ségrégation méiotique des translocations Robertsoniennes peut aboutir à une trisomie ou une monosomie complète. L'évaluation clinique des enfants nés d'hommes ou de femmes porteurs de ce type de translocation suggère que la ségrégation alterne (chromosomes normaux et équilibrés) est de loin la plus fréquente (Simpson and Bischoff, 2002). Il semble, en effet, que ce mode de ségrégation soit privilégié dans le sperme sans explication clairement définie.

Quand la translocation Robertsonienne implique deux chromosomes homologues, les gamètes seront soit disomiques ($n=24$), soit nullisomiques ($n=22$). Dans ce cas précis, aucun gamète équilibré sur le plan chromosomique n'est possible. Ainsi, en absence de perturbation chromosomique (absence de contribution chromosomique de la partenaire et de disomie uniparentale), tous les conceptus seront soit trisomiques, soit monosomiques.



ALTERNE
2 : 2 (2n=46)

ADJACENT 2
2 : 2 (2n=46)

ADJACENT 1
2 : 2 (2n=46)

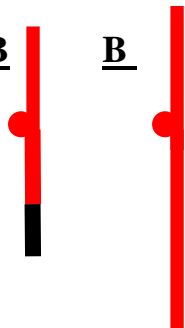
3 : 1
(2n=45 ou 47)

derB derA



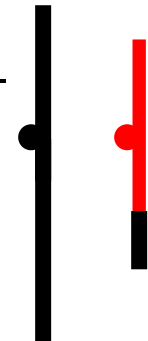
der B

B



A

der B



Trisomie

- A+B+derA ;
- A+B+derB ;
- A+derA+derB ;
- B+derA+derB

Monosomie :

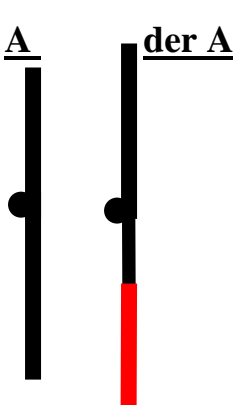
- der B ;
- der A ;
- A ;
- B

A B



A

der A



der A

B

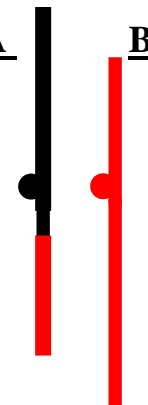


Figure 9

Ségréation méiotique gamétique de patients porteurs d'une translocation réciproque

2.4.3 Les translocations chromosomiques réciproques

Les translocations réciproques se définissent par un échange réciproque des segments terminaux de deux chromosomes. Ce type de translocation concerne 1/500 nouveaux-nés. Les translocations réciproques sont fréquemment diagnostiquées lors d'un bilan étiologique médical de fausses couches à répétition (9,2% des femmes présentant des fausses couches à répétition), d'infertilité (2 à 3% des hommes infertiles) ou d'une descendance présentant des anomalies phénotypiques en rapport avec la production de gamètes déséquilibrés (perte ou gain de matériel chromosomique) secondaire à la ségrégation méiotique. Le risque reproductif (fausses couches, malformations, infertilité) dépend des chromosomes impliqués et de la localisation des points de cassure (Van Assche *et al.*, 1996 ; Meschede *et al.*, 1998 ; Munné *et al.*, 2000)

Au cours de la prophase de la première division de méiose, les deux centromères homologues chromosomiques forment un quadrivalent avec appariement des segments homologues (Figure 9). Puis la ségrégation méiotique des chromosomes se déroule selon un mode alterne, adjacent 1, adjacent 2, 3 :1 ou 4 :0 selon les chromosomes et les points de cassure impliqués (Simpson and Bischoff, 2002).

→ **Alterne** : Les facteurs favorisant ce type de ségrégation sont l'implication de chromosomes de taille égale, de chromosomes métacentriques, ou des translocations impliquant un échange de segment de taille égale. Elle permet l'association de chromosomes normaux ou équilibrés.

→ **Adjacent 1** : Ce mode de ségrégation correspond à la ségrégation de centromères non homologues dans le même gamète, impliquant une monosomie pour un segment porteur de la translocation et une trisomie pour l'autre. Ceci est observé plus fréquemment lorsque le plus petit segment centromérique est aussi ou plus long que le plus grand segment porteur de la translocation. Les chromosomes acrocentriques et le chromosome 9 ne sont généralement pas impliqués dans ce mode de ségrégation.

→ **Adjacent 2** : les centromères homologues ségrégent ensemble et engendrent l'apparition d'une monosomie pour un segment centromérique et une trisomie pour l'autre. Ce type de ségrégation est habituellement observé dans les translocations avec des petits segments centromériques, impliquant donc souvent le chromosome 9 et les chromosomes acrocentriques.

→ **Ségrégation 3:1** : correspond à la ségrégation de trois chromosomes dans un gamète, tandis que l'autre n'en reçoit qu'un seul. Ce type de ségrégation est favorisé lorsque les segments centromériques et les segments porteurs de la translocation sont très différents en taille. Dans 90% des cas, on retrouve l'implication de chromosomes acrocentriques ou du chromosome 9, ou de points de cassure proches du centromère. Le chromosome surnuméraire est généralement le plus petit des chromosomes dérivés. 90% des enfants porteurs d'un déséquilibre chromosomique secondaire à ce type de ségrégation sont dans la descendance de mère porteuse d'une translocation Robertsonienne.

→ **Ségrégation 4:0** : se définit par la ségrégation des quatre chromosomes dans un spermatozoïde, tandis que l'autre n'en reçoit aucun. Ce type de ségrégation est rare.

2.4.4 L'infertilité des hommes porteurs d'une translocation chromosomique

Les études cytogénétiques effectuées chez les hommes consultant pour infertilité ont démontré que la prévalence des anomalies de structure chromosomique chez ces patients est supérieure à celle de la population générale (Van Assche *et al.*, 1996). Néanmoins d'importantes variations existent entre les études, rendant difficile l'établissement d'une valeur exacte de cette prévalence. Ces variations concernent à la fois le mode de recrutement des patients et les anomalies du caryotype prises en compte.

Le retentissement sur la spermatogenèse de l'existence d'une translocation chromosomique est très variable allant de l'atteinte sévère à la quasi normalité. Néanmoins,

ces hommes présentent très fréquemment une oligozoospermie ou une azoospermie (Egozcue *et al.*, 2000).

Différentes hypothèses ont été développées pour tenter d'expliquer la physiopathologie de l'infertilité des hommes présentant une translocation chromosomique :

- La mise en jeu de l'activation des voies d'apoptose.
- L'interaction des chromosomes présentant une translocation chromosomique avec la vésicule sexuelle lors de la méiose.
- Le retard ou l'absence d'appariement des chromosomes présentant une translocation chromosomique lors de la méiose.
- L'effet interchromosomique.

Nous développerons chacune de ces hypothèses :

→ **Apoptose et infertilité des hommes porteurs d'une translocation.**

Une analyse du tissu testiculaire de sanglier (Koykul *et al.*, 2000) porteur d'une translocation (X,14) a permis de démontrer l'existence de l'activation importante de l'apoptose (analysée par la fragmentation de l'ADN et la dégénérescence typique histologique générée par l'activation de l'apoptose) des spermatocytes I avec arrêt de la spermatogenèse à ce stade laissant présager une relation possible entre l'existence d'une translocation chromosomique et le retentissement sur la spermatogenèse.

Ceci a ensuite été confirmé par l'analyse du tissu testiculaire de souris porteuses d'une translocation Robertsonienne (Eaker *et al.*, 2001) qui a permis de mettre en évidence une importante expression de l'apoptose (fragmentation de l'ADN *in situ*) associée à une aneuploïdie et à des anomalies d'alignement des chromosomes au cours de l'étape de métaphase dans les spermatocytes I, comparé à une population contrôle de souris fertiles.

Chez l'homme, aucune étude d'expression de l'apoptose des cellules germinales de patients porteurs d'une translocation chromosomique n'a été réalisée. Seuls des travaux

rapportant l'analyse ultrastructurale par microscopie électronique à transmission de spermatozoïdes humains éjaculés de patients porteurs d'une translocation chromosomique réciproque (Baccetti *et al.*, 2003) ou Robertsonienne (Baccetti *et al.*, 2002a ; Baccetti *et al.*, 2005) ont permis de démontrer la prépondérance de spermatozoïdes présentant des anomalies caractéristiques d'apoptose et d'immaturation chez ces patients.

→ **Interaction des chromosomes porteurs d'une translocation avec la vésicule sexuelle.**

C'est au cours d'un travail tentant d'expliquer l'arrêt de la spermatogenèse chez des drosophiles mâles stériles, porteuses de translocation X-autosome, que Lifschytz et Lindsley (1972) ont postulé que l'inactivation du chromosome X représente un mécanisme indispensable au déroulement de la spermatogenèse, et que tout facteur intervenant dans cette étape essentielle de la prophase méiotique est susceptible de perturber le métabolisme de la cellule germinale en voie de différenciation et de provoquer l'arrêt de son développement. Cette hypothèse a été ensuite étendue par Forejt (1974, 1979) à la suite de travaux effectués chez la souris présentant des translocations réciproques ou Robertsoniennes. Chez l'homme, des analyses en microscopie électronique à transmission ont été réalisées sur des spermatocytes I provenant de patients porteurs d'une translocation Robertsonienne ou réciproque associée à une azoospermie ou oligozoospermie (Luciani and Guichaoua, 1990 ; Egozcue *et al.*, 2000). Ces études ont montré fréquemment un rapprochement des segments autosomiques non appariés des chromosomes porteurs de la translocation au niveau du chromosome X situé dans la vésicule sexuelle au stade pachytène de la première division de méiose (Luciani and Guichaoua, 1990 ; Guichaoua *et al.*, 1990). Ce phénomène est observé de façon plus fréquente si la translocation est de type Robertsonienne (Luciani *et al.*, 1984 ; Navarro *et al.*, 1991), ou réciproque avec implication d'un chromosome acrocentrique (Luciani *et al.*, 1987) ou d'un gonosome (Delobel *et al.*, 1998). Cette association du trivalent

ou quadrivalent chromosomique avec la vésicule sexuelle pourrait être responsable de la réactivation transcriptionnelle du chromosome X pendant le stade pachytène de la première division de méiose (Guichaoua *et al.*, 1993). A l'appui de cette hypothèse, l'étude de Homolka *et al.*, 2007, a démontré, sur le modèle souris, la mise en place d'une inactivation génique de la région chromosomique autosomique non appariée par un mécanisme épigénétique avec le recrutement de protéines spécifiques (ex : ATR, gamma H2AX). La chromatine autosomique ainsi modifiée serait ensuite attirée par un mécanisme non élucidé vers le bivalent sexuel. La chromatine autosomique dont l'expression génique est partiellement inhibée interférerait avec le processus de lyonisation et serait à l'origine d'une substitution incomplète des histones (De Rooj and De Boer, 2003) et empêcherait l'inactivation transcriptionnelle du chromosome X (Homolka *et al.*, 2007). Ces interférences avec le processus de lyonisation pourrait être un élément initiateur de l'activation de l'apoptose cellulaire et expliquer l'arrêt de la spermatogenèse observé par analyse histologique de coupes de tissus testiculaires chez ces patients (Homolka *et al.*, 2007).

→ **Retard ou absence d'appariement des chromosomes impliqués dans la translocation.**

Le retard (synapsis retardé) ou l'absence d'appariement (asynapsis) des chromosomes impliqués dans la translocation chromosomique perturberait le déroulement physiologique de la spermatogenèse. En effet, les zones chromosomiques pour lesquelles l'appariement homologue n'est pas réalisé complètement resteraient actives sur le plan génique et impliqueraient l'apparition de désordres métaboliques à l'origine d'une dégénérescence des spermatocytes et un arrêt de la spermatogenèse (Miklos, 1974 ; Gabriel Robez and Rumpler, 1994).

Ce processus pourrait expliquer l'altération de la spermatogenèse et il serait aussi impliqué dans le phénomène précédemment décrit concernant le rapprochement des segments

non appariés de ces chromosomes avec la vésicule sexuelle (Gabriel Robez and Rumpler, 1994 ; Homolka *et al.*, 2007).

→ **L'effet interchromosomique.**

L'effet interchromosomique se définit par une altération de la ségrégation méiotique des chromosomes non impliqués dans la translocation (Morel *et al.*, 2001 ; Machev *et al.*, 2005). Cet effet a été postulé initialement par Lejeune en 1963, par la mise en évidence d'une proportion importante d'enfants présentant une trisomie 21 nés de père porteurs d'une translocation Robertsonienne. Selon la nature et les points de cassure des chromosomes impliqués dans la translocation chromosomique, l'effet interchromosomique est à l'origine d'une proportion variable de spermatozoïdes présentant une aneuploïdie (disomie ou monosomie) des chromosomes non impliqués dans la translocation, mesurés par technique FISH sur spermatozoïdes éjaculés. Pour certaines translocations, le pourcentage d'aneuploïdie est inversement corrélé à la concentration de spermatozoïdes éjaculés, laissant supposer un retentissement sur la spermatogenèse (Rives *et al.*, 1999 ; Vegetti *et al.*, 2000).

Les chances d'achever une grossesse pour un couple dont l'homme est porteur d'une translocation chromosomique sont directement proportionnelles à la fréquence d'embryons équilibrés ou normaux sur le plan chromosomique, elle-même liée à la fréquence de gamètes équilibrés ou normaux. D'autres anomalies chromosomiques peuvent être rapportées sur les embryons de ces couples, mais elles sont généralement expliquées par l'étiologie ovocytaire avec une variabilité importante d'un couple à un autre, et augmentant avec l'âge (Escudero *et al.*, 2000). L'analyse de la ségrégation méiotique par technique FISH (Fluorescence In Situ Hybridation) sur des spermatozoïdes de patients porteurs d'une translocation chromosomique permet d'évaluer le risque génétique, le risque de fausses couches spontanées à répétition, et l'orientation par un conseil génétique spécifique et adapté de ces couples vers un diagnostic

préimplantatoire (DPI), ou l'utilisation de sperme de donneur (Escudero *et al.*, 2000 ; Munné *et al.*, 2000 ; Escudero *et al.*, 2003).

3. La maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme

A la sortie du testicule et dans la tête de l'épididyme, les spermatozoïdes sont immobiles. Ils acquièrent progressivement leur mobilité et pouvoir fécondant durant leur transit dans le corps et la queue de l'épididyme où ils sont soumis à d'importantes modifications morphologiques, métaboliques et biochimiques (pour revue Toshimori, 2003).

3.1 Modifications morphologiques

Le processus de différenciation des spermatozoïdes initié dans le testicule va s'achever dans l'épididyme. Les derniers restes cytoplasmiques sont évacués et libérés dans le liquide épididymaire. La compaction du noyau est renforcée par l'augmentation des ponts disulfures entre les protamines. Le manchon mitochondrial acquiert sa forme définitive.

3.2 Modifications biochimiques

3.2.1 Fluidité de la membrane plasmique

Des analyses par anisotropie de fluorescence ont montré une augmentation de la fluidité de la membrane des spermatozoïdes au cours de leur maturation épididymaire avec une diminution de la quantité de desmostérol et une augmentation du rapport cholestérol/phospholipides dans la membrane plasmique (Christova *et al.*, 2002).

3.2.2 Modification des glycoconjugués

L'utilisation de lectines pour caractériser les différents sucres présents à la surface des spermatozoïdes a permis de mettre en évidence d'importantes modifications de la teneur en glycanes des glycoprotéines et glycolipides au cours de la maturation ainsi qu'une

redistribution de ces composés dans la membrane. Ces modifications sont le résultat d'action d'enzymes présentes dans le fluide telles que les glycohydrolases et les glycosyltransférases (pour revue, Tulsiani, 2006).

3.2.3 Modifications des protéines de la membrane plasmique

De nombreuses modifications de protéines membranaires ont été mises en évidence lors du passage des spermatozoïdes dans l'épididyme (pour revue, Cooper, 1998 ; Dacheux *et al.*, 2003) avec : une adsorption ou l'intégration de protéines épидидymaires dans la membrane plasmique des spermatozoïdes ; la libération de protéines préexistantes par clivage protéolytique et/ou la relocalisation de protéines dans des domaines membranaires spécifiques. Ces modifications se déroulent de manière séquentielle dans les différentes zones de l'épididyme.

→ **Adsorption de composés d'origine épидидymaire** : certaines protéines d'origine épидидymaire ont été décrites comme adsorbées à la membrane plasmique des spermatozoïdes par des liaisons ioniques. Par exemple, chez le rat, CRISP-1 est synthétisée et sécrétée sous deux formes référencées comme les protéines D et E. Ces deux isoformes, sécrétées dans le fluide de la tête épидидymaire se fixent sur les spermatozoïdes (Kohane *et al.*, 1980) : l'isoforme D est localisée au niveau de la tête et l'isoforme E au niveau du flagelle (Roberts *et al.*, 2002). Tandis que la forme longue de la protéine D est présente de façon transitoire à la surface des spermatozoïdes, un clivage protéolytique est à l'origine d'une adhésion de forte affinité et durable des formes courtes des protéines D et E. Ces dernières joueraient un rôle important dans l'interaction gamétique lors de la fécondation alors que les formes longues inhiberaient les réactions de capacitation prématurée (pour revue Roberts *et al.*, 2006).

→ **Intégration de protéines à caractère hydrophobe** : bien que le mécanisme soit encore mal connu, certaines protéines à caractère hydrophobe sont décrites comme étant capables de s'intégrer dans les spermatozoïdes au cours de leur maturation épидидymaire.

Parmi ces protéines, CD52/HE5 apparaît dans la membrane des spermatozoïdes humains dans les derniers stades de leur maturation épидидymaire (Kirchoff and Hale, 1996).

→ **Clivage protéolytique et relocalisation** : les processus protéolytiques qui aboutissent à la redistribution, l'activation ou la disparition des protéines de la membrane plasmique sont essentiels pour la maturation des spermatozoïdes. Ces redistributions permettent de positionner les protéines dans leur zone d'activité ou d'augmenter leur densité dans un domaine précis. Par exemple, certaines protéines de la famille ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase protein), telles que les fertilines α et β ou la cyritestine sont retrouvées au niveau des spermatozoïdes de nombreuses espèces :

- La PH30, ou fertiline est une protéine composée d'une sous unité α (ADAM1, fertiline α , ou PH30 α) et d'une sous unité β (ADAM2, fertiline β , ou PH30 β). Ces deux sous-unités sont impliquées dans l'adhésion et la fusion à la membrane ovocytaire lors de la fécondation (pour revue Myles and Primakoff, 1997). Ces protéines d'origine testiculaire sont exprimées à la surface des gamètes immatures sous forme de précurseurs qui se clivent et se redistribuent à la surface de la membrane plasmique des spermatozoïdes durant leur transit épидидymaire (Nishimura *et al.*, 2001).

- La cyritestine (tMDC1 ou ADAM3), présente sur les spermatozoïdes testiculaires, subit un clivage protéolytique sans redistribution protéique lors du passage des spermatozoïdes dans la tête de l'épididyme. Chez les souris invalidées pour cette protéine, les spermatozoïdes présentent des défauts de liaison à la zone pellucide et à la membrane plasmique de l'ovocyte (Nishimura *et al.*, 2001).

Le développement des technologies d'analyse protéomique permettront dans l'avenir de mieux définir et caractériser les nombreuses protéines épидидymaires impliquées dans la maturation (Dacheux *et al.*, 2003)

3.2.4 Modifications des protéines flagellaires et mitochondriales

Chez la souris, il a été montré que les spermatozoïdes acquièrent au cours de leur transit épидидymaire des protéines tyrosine kinases fonctionnelles localisées dans le flagelle, dont l'activation sera nécessaire lors de la capacitation et de la fécondation. Les analyses protéomiques montrent que cette acquisition est associée à la phosphorylation de différentes protéines mitochondriales, l'apparition d'un potentiel membranaire mitochondrial et la production de DAO mitochondriaux (Aitken *et al.*, 2007). Ces données récentes laissent supposer un rôle important des mitochondries dans la maturation des spermatozoïdes épидидymaires.

3.3 Modifications fonctionnelles

Les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité sous l'influence du milieu épидидymaire qui se modifie de façon séquentielle et spécifique depuis la tête jusqu'à la queue de l'épидидyme pour apporter tous les substrats nécessaires à cette activation (Dacheux *et al.*, 2003 ; Aitken *et al.*, 2007). Au niveau du corps de l'épидидyme, l'activation de l'adénylate cyclase intracytoplasmique des spermatozoïdes par une pénétration de calcium et bicarbonate dans le compartiment intracellulaire permet l'augmentation de la concentration cytoplasmique en AMPc. Ce processus permet alors l'activation des protéines AMPc-dépendantes qui sont responsables de la phosphorylation des bras de dynéine de l'axonème à l'origine de l'acquisition de la mobilité des spermatozoïdes (pour revue, Dacheux and Paquignon, 1980).

Une fois leur transit épидидymaire achevé, les spermatozoïdes matures et mobiles ont donc subi des modifications protéiques importantes sous l'influence spécifique et séquentielle de l'environnement épидидymaire, qui leur ont permis d'acquérir les capacités de reconnaître et de se lier à la zone pellucide et de fusionner avec la membrane de l'ovocyte lors de la fécondation.

4. L'éjaculat

L'éjaculat a deux composantes principales : les spermatozoïdes et le liquide séminal.

Les spermatozoïdes sont transportés passivement par le liquide séminal dont la progression est régulée par les contractions du tractus génital. Ces contractions réflexes à point de départ pénien constituent l'essentiel du processus éjaculatoire. Elles sont par ailleurs associées à la fermeture du sphincter lisse de la prostate qui empêche le reflux vers la vessie.

Le volume de l'éjaculat est essentiellement fonction de la composante liquidienne du sperme, le liquide séminal, résultant des sécrétions des différentes glandes annexes du tractus génital masculin dans les proportions suivantes (en pourcentage du volume total) :

Glande de Cowper <2%

Epididyme : 5%

Prostate : 25-30%

Vésicules séminales : 63-70%

Selon les règles définies par l'OMS en 1999 (WHO, 1999), le volume d'un éjaculat normal est supérieur à 2 ml, sa concentration est supérieure à 20 millions de spermatozoïdes ml^{-1} (ou 40 millions de spermatozoïdes par éjaculat), la mobilité progressive totale (mobilité a+b) des spermatozoïdes est supérieure ou égale à 50% ou la mobilité progressive rapide (mobilité a) supérieure ou égale à 25%, et plus de 50% des spermatozoïdes sont vivants. L'utilisation d'un marquage peroxydase à la benzidine permet de différencier les leucocytes parmi les cellules rondes présentes dans le sperme. L'existence d'une leucocytospermie se définit par une concentration de leucocytes $\geq 1.10^6 \text{ ml}^{-1}$. Pour l'analyse de la morphologie des spermatozoïdes, aucune norme internationale n'est validée actuellement. En France, les critères de David (David *et al.*, 1975) sont classiquement appliqués pour cette évaluation. Selon ces critères, la tératozoospermie est définie si le sperme analysé contient moins de 25% de spermatozoïdes de morphologie normale.

5. L'apoptose cellulaire : les voies de signalisation et de régulation

5.1 De *Caenorhabditis elegans* aux mammifères

Le terme apoptose a été introduit par Kerr, Wyllie et Curie en 1972 (Kerr *et al.*, 1972). Par ce terme, signifiant en grec « la chute des feuilles », les auteurs ont voulu définir un type de mort cellulaire différente de la nécrose, seule mort cellulaire caractérisée jusqu'alors. En réalité, l'apoptose était déjà décrite par les anatomopathologistes sous les termes de nécrose acidophile ou corps de Councilman. Puis Wyllie *et al.*, 1980, ont démontré que l'altération de la chromatine observée au cours du processus apoptotique avait une traduction biochimique spécifique, caractérisée par une fragmentation régulière de l'ADN en oligonucléosomes répartis sur gel d'agarose en forme de barreaux d'échelle.

Les travaux d'Horvitz et de son équipe (Horvitz, 1999) ont montré par ailleurs que l'apoptose se définissait comme une mort cellulaire programmée génétiquement active. Ces travaux utilisaient comme modèle l'embryogenèse du nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) qui présente la particularité au cours de son développement de voir mourir par apoptose un nombre défini de certains types cellulaires. Ces travaux ont permis l'identification de gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose. Parmi ceux-ci *ced-3* et *ced-4* dont l'expression favorise le programme de mort cellulaire alors que *ced-9* l'inhibe.

Parallèlement à ces travaux, une autre équipe a individualisé à partir d'un point de cassure de la translocation (14 ;18) retrouvée dans certains lymphomes humains à cellules B, un gène appelé *bcl-2* (B-cell lymphoma), qui une fois transfecté dans des cellules hématopoïétiques, prolonge de façon significative leur survie en favorisant leur prolifération et en bloquant leur apoptose (Cory and Adams, 2002).

L'identification d'homologues fonctionnels de *ced-3*, *ced-4* et *ced-9* a contribué à la caractérisation du processus apoptotique des mammifères. Ainsi, une homologie importante a été mise en évidence : entre *ced-9* et *bcl-2* (Hengartner *et al.*, 1992) ; entre la protéine CED-3

	Apoptose	Nécrose
Caractéristiques morphologiques	<ul style="list-style-type: none"> -Diminution du volume cellulaire -Intégrité de la membrane plasmique longtemps préservée -Condensation et marginalisation de la chromatine - Corps apoptotiques (fragments de noyau et cytosol entourés de membrane plasmique) -Absence de réaction inflammatoire -Affecte une cellule unique -Organites intacts initialement puis gonflement des organites -Phagocytose par les cellules adjacentes 	<ul style="list-style-type: none"> -Gonflement puis lyse de la cellule -Rupture de la membrane plasmique - Faible compaction de la chromatine - Pas de corps apoptotiques, vacuolisation du cytoplasme - Réaction inflammatoire importante extracellulaire -Affecte des groupes de cellules voisines -Destruction des mitochondries et lysosomes
Caractéristiques biochimiques	<ul style="list-style-type: none"> -Processus régulé actif -Consommateur d'énergie -Fragmentation oligonucléosomique (180 à 200 paires de bases) 	<ul style="list-style-type: none"> -Processus non régulé, passif -Ne nécessite pas d'énergie -Fragmentation aléatoire de l'ADN

Tableau 1 : Comparaison des caractéristiques morphologiques et biochimiques des morts cellulaires par apoptose et nécrose.

et la protéase à cystéine ICE (IL1 β converting enzyme) et indirectement avec les protéines de la famille des caspases; et entre *ced-4* et *apaf-1* (Zou, 1997). L'homologie importante entre les gènes ou protéines de *C. elegans* et de mammifères impliqués dans l'apoptose montre que celle-ci représente un processus qui s'est maintenu au cours de l'évolution (Tewari *et al.*, 1995).

5.2 Apoptose et nécrose

L'apoptose est classiquement opposée à un autre type de mort cellulaire : la nécrose (Tableau 1). L'apoptose est une mort cellulaire physiologique permettant le maintien d'une homéostasie cellulaire. Au cours de son déroulement, les cellules mettent en place un mécanisme de suicide « ordonné » permettant l'élimination de cellules sans libération extracellulaire de produits activateurs de l'inflammation ou cytotoxiques, et, par conséquent, sans réponse inflammatoire amplifiée (Kerr *et al.*, 1972). Parmi les caractéristiques cellulaires de l'apoptose il est décrit une formation ultime de corps apoptotiques (structures cellulaires contenant des organites désorganisés de la cellule), un noyau avec une structure marginalisée et fragmentée et une membrane plasmique ne présentant pas d'altérations majeures de la perméabilité. Ces corps apoptotiques exposent sur le feuillet externe de leur membrane plasmique des résidus phosphatidylsérines, initialement situés sur le feuillet interne de la cellule vivante qui leur permettront d'être reconnus et ingérés par les cellules phagocytaires environnantes sans déclencher de réaction inflammatoire. A l'inverse, la nécrose survient lorsque un ensemble de cellules au sein d'un tissu est soumis à une agression suite à un phénomène infectieux, inflammatoire ou ischémique. Elle conduit à un gonflement de la cellule et de ses organites suivi de rupture de la membrane plasmique engendrant le déversement de diverses substances inflammatoires contenues dans le cytoplasme à l'origine d'une réaction inflammatoire intense et d'enzymes (type perforine). Ces enzymes vont alors altérer la membrane plasmique des cellules avoisinantes, engendrant leur lyse et la

propagation des lésions. La phase ultime de la nécrose se caractérise par une dégradation « aléatoire » de l'ADN nucléaire par des endonucléases activées notamment par des sérines protéases (Dong *et al.*, 1997). C'est pourquoi la mort cellulaire nécrotique est décrite comme mort bruyante par opposition à la mort apoptotique dite silencieuse (Marchetti, 2005a).

En dépit de ces différences fondamentales, des travaux récents remettent en cause la vision réductrice de la dichotomie entre apoptose et nécrose et révèlent que ces deux types de mort cellulaire pourraient partager des voies biochimiques communes (Hirsch *et al.*, 1997).

En effet, un stimulus pour un type cellulaire donné peut induire soit la nécrose à forte dose soit l'apoptose à faible dose (Marchetti *et al.*, 2005a). De plus, de nombreuses pathologies d'abord étiquetées d'origine nécrotique présentent en réalité à la fois des signes apoptotiques et nécrotiques. C'est le cas, par exemple, de l'infarctus du myocarde. Aussi, les altérations fonctionnelles mitochondriales sont rencontrées à la fois lors de l'apoptose et de la nécrose et la surexpression du produit du gène *bcl-2* peut inhiber aussi bien l'apoptose que la nécrose (Martinou *et al.*, 1994).

La progression vers l'un ou l'autre type de mort cellulaire dépend de facteurs environnementaux (intensité du stimulus initial de mort) et /ou cellulaires (quantité d'ATP, activation des caspases) (Leist *et al.*, 1997). Entre ces deux représentations opposées de mort cellulaire, il pourrait exister une multitude de types de mort, appelées nécrapoptose, paraptose, abortose, partageant à des degrés divers certaines caractéristiques apoptotiques et nécrotiques (Lemasters, 1999).

5.3 Déroulement de l'apoptose

Schématiquement, dans la cellule somatique, le déroulement de l'apoptose comporte successivement 3 phases fonctionnellement distinctes (Cohen, 1997; Strasser *et al.*, 2000) :

→ **La phase d'initiation** durant laquelle la cellule reçoit le stimulus d'apoptose. Il s'agit d'une étape réversible. La complexité de la phase d'induction est liée à la diversité des

signaux inducteurs spécifiques du type cellulaire et aux voies de signalisation qui lui sont associées. Les signaux inducteurs peuvent être physiologiques, pathologiques, intra ou extracellulaires. Il peut s'agir de l'action de certaines hormones, d'un stress chimique (radicaux libres, toxiques, hypoxie,...), d'un stress physique (radiations ionisantes, hyperthermie,...), ou de la stimulation des récepteurs de mort cellulaire (Steller, 1995 ; Levy and Seifer-Aknin, 2001). Les différents signaux sont intégrés par la cellule, qui, en fonction de son génotype et de son état physiologique, va orienter sa réponse soit vers la mort par apoptose, soit vers la survie. Cette intégration fait appel à des médiateurs intracellulaires anti et pro-apoptotiques.

En dépit de la diversité de ces multiples signaux inducteurs, toutes les cellules engagées dans un processus d'apoptose montrent des modifications biochimiques et morphologiques similaires, suggérant l'existence d'une phase effectrice commune (Thompson, 1995).

→ **La phase effectrice ou d'exécution.**

Elle correspond à une entrée dans une phase de non retour du processus de mort cellulaire. Cette étape est commune à toutes les voies de transduction du signal d'activation d'apoptose. Il s'agit d'une étape régulée correspondant à l'intégration des signaux de mise en jeu de l'apoptose cellulaire dont l'activité peut être modulée par des signaux inhibiteurs.

→ **La phase de dégradation** durant laquelle apparaissent les modifications morphologiques induites par l'apoptose cellulaire ; elle correspond à une phase irréversible du processus. L'ultime étape correspond à la dégradation des corps apoptotiques par les cellules avoisinantes ayant des fonctions de phagocytose.

5.4 Les caspases

Les caspases sont des enzymes qui ont un rôle important dans la transduction du signal cellulaire d'apoptose. La première caspase identifiée chez les mammifères a été ICE (codée par *ced-3* chez *c elegans*), nommée ensuite caspase-1. Les caspases correspondent à des enzymes qui possèdent une cystéine dans leur site actif et qui clivent spécifiquement leurs

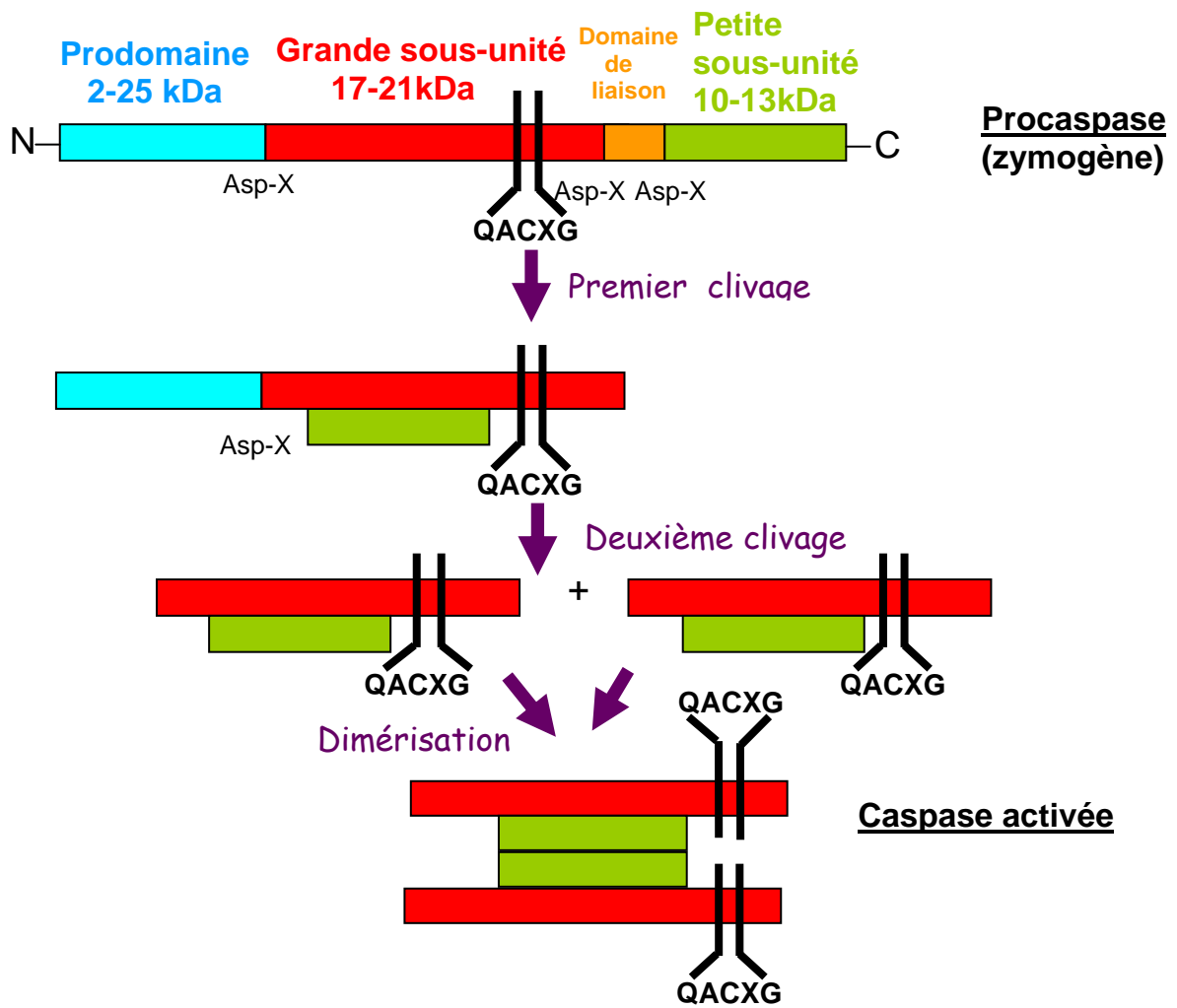


Figure 10

Structure et activation des caspases

substrats après une séquence térapeptidique qui se termine par un résidu aspartate (Thornberry and Lazebnik, 1998) ; Le « C » représente la cystéine du centre actif (QACXG) et « aspase » définit la spécificité stricte de clivage des substrats de cette famille de protéases après un acide aspartique. Aujourd'hui 14 caspases ont été identifiées, dont 12 dans l'espèce humaine (Tableau 2).

5.4.1 Structure et mécanismes d'activation des caspases

Les caspases ont une structure très conservée et sont toutes synthétisées sous la forme de précurseurs inactifs (ou zymogènes) encore appelés procaspases, comportant 4 domaines séparés par un résidu aspartate (Cohen, 1997). A l'extrémité N terminale, un prodomaine plus ou moins long (de 2 à 25kDa) qui contient différentes séquences impliquées dans les interactions avec les protéines à domaine effecteur de mort cellulaire. A l'extrémité C terminale, une petite sous unité de 10 kDa environ détermine la spécificité de substrat. Enfin, une grande sous-unité de 20kDa environ porte le site catalytique. Certains membres de la famille des caspases possèdent un domaine de liaison entre la grande et la petite sous-unité (Figure 10).

Le site actif des caspases comporte un site catalytique très conservé et un site de liaison au substrat. Le site catalytique consiste en un nombre restreint d'acides aminés incluant le résidu cystéine dans une séquence peptidique de type QACXG (X=N/Q). Les caspases clivent leurs substrats au niveau de la liaison peptidique en position C-terminale d'un résidu acide aspartique (Thornberry *et al.*, 1997). Ce résidu est situé en position P1 d'un motif térapeptidique P4-P1.

L'activation des procaspases consiste à la conversion de la forme zymogène en une enzyme active. Cette activation nécessite deux clivages successifs entre les différents domaines après les résidus aspartate : un entre les deux sous unités constitutives et un autre qui libère le prodomaine (Figure 10). Le fait que les caspases puissent être clivées après des

Enzyme	Localisation chromosomique	Possibilité auto-activation	Type prodomaine	Séquences d'acides aminés du site de clivage préférentiel
Caspases apoptotiques initiatrices				
Caspase 2	ND	oui	Long avec domaine CARD	DEHD-X
Caspase 8	2q33	oui	Long avec domaines DED	LETD-X
Caspase 9	1q34	oui	Long avec domaine CARD	LEHD-X
Caspase 10	2q33	oui	Long avec domaines DED	LEND-X
Caspases apoptotiques effectrices				
Caspase 3	4q34	oui	court	DEVD-X
Caspase 6	4q25	oui	court	VEHD-X
Caspase 7	10q25	oui	court	DEVD-X
Caspases impliquées dans la réaction inflammatoire				
Caspase 1	11q22	oui	Long avec domaine CARD	WEHD-X
Caspase 4	11q22	oui	Long avec domaine CARD	(WL)EHD-X
Caspase 5	11q22	ND	Long avec domaine CARD	(WL)EHD-X
Caspase 11	ND	ND	Long avec domaine CARD	WEHD-X
Caspase 12	ND	ND	Long	WEHD-X
Caspase 13	ND	ND	Long	WEHD-X
Caspase 14	ND	ND	Long	WEHD-X

Tableau 2 Caractéristiques structurales et fonctionnelles des membres de la famille des caspases (selon Strasser *et al.*, 2000)

ND : non déterminé ; CARD : Caspase Recruitment Domain ;
DED : Death Effector Domain

résidus aspartate constitue une donnée structurale importante, en faveur d'une capacité d'auto-catalyse ou d'activation mutuelle conduisant à une activation en cascade des caspases (Slee *et al.*, 1999 ; Adams and Cory, 2002). La grande et la petite sous-unité s'unissent alors, pour former un hétérodimère ; la cristallographie a permis de démontrer que la forme active des caspases correspond en fait à un hétérotétramère comportant deux grandes et deux petites sous unités, avec deux sites actifs (Nicholson, 1999).

Une fois activées, les caspases reconnaissent sur leur substrat cible un motif térapeptidique se terminant par le résidu aspartate définissant le site de clivage. Ceci est à la base d'une classification définissant 3 groupes de caspases :

→ **Les caspases du groupe I (caspase-1, -4 et -5)** clivent préférentiellement après le motif WEHD. Ces caspases sont particulièrement impliquées dans l'inflammation.

→ **Les caspases du groupe II (caspase-3 et -7)** clivent après le motif DEVD. Ce sont des caspases effectrices de l'apoptose, à l'origine de la dégradation des protéines intracellulaires. Elles possèdent généralement un prodomaine court.

→ **Les caspases du groupe III (caspase- 6, -8, -9 et -10)** clivent préférentiellement après le motif W(L/E)HD. Ces caspases activent généralement les caspases du groupe II au sein de la cascade protéolytique et sont qualifiées de caspases initiatrices. Elles possèdent, pour la majorité un long prodomaine avec un ou plusieurs motifs d'interactions protéines-protéines. Les domaines DED (Death Effector Domain) portés par les caspases 8 et 10 permettent le recrutement de protéines adaptatrices. Le domaine CARD (Caspase Recruitment Domain) permet l'interaction entre caspases et molécules modulant leur activité.

Le clivage coordonné et hiérarchique de plusieurs substrats des caspases induit la majorité des manifestations biochimiques et morphologiques caractérisant l'apoptose cellulaire. Une fois activées, les caspases vont inhiber des voies protectrices et activer parallèlement des voies de signalisation à l'origine de la destruction cellulaire. Le clivage d'une protéine cible par une caspase peut avoir deux conséquences : activer la protéine cible ou la dégrader. Compte tenu de l'hétérogénéité et du nombre important de substrats clivés par les caspases, nous avons choisi de ne présenter que les principales cibles cellulaires.

L'un des substrats principaux des caspases est la protéine ICAD/DFF45 (inhibitor of CAD/DNA fragmentation 45) qui inhibe la CAD/DFF40 (Caspase Activated DNase/DNA fragmentation 40) (Enari *et al.*, 1998 ; Liu *et al.*, 1998). CAD et ICAD correspondent à des protéines murines homologues aux protéines humaines DFF40 et DFF45. la protéine ICAD se comporte comme une protéine chaperone pour la protéine CAD. Lors de la synthèse de CAD, ICAD se fixe à la chaîne naissante, et lui permet d'acquérir une conformation active tout en la neutralisant. Une fois synthétisées, CAD et ICAD restent complexées dans le cytoplasme. Au cours de l'apoptose, le clivage d'ICAD par les caspases-3 et -7 génère son inactivation et la libération de CAD qui exerce alors dans le noyau sa fonction endonucléasique.

La protéine PARP (Poly-ADP Ribose Polymérase) est un substrat des caspases particulièrement important dans le maintien de l'intégrité cellulaire chez les mammifères (Tewari *et al.*, 1995) ; il s'agit d'une enzyme nucléaire de 116 kDa intervenant en particulier dans la réparation de l'ADN. Son clivage par la caspase-3 produit un fragment de 89 kDa et inactive sa fonction biochimique.

Les caspases dégradent également différentes protéines du cytosquelette impliquées dans l'organisation structurale de la cellule telles que les laminines A, B et C qui permettent l'attachement de la chromatine à l'enveloppe nucléaire (Rao *et al.*, 1996). Les caspases dégradent également d'autres types de filaments impliqués dans l'architecture cellulaire comme par exemple l'actine et la gelsoline (Zheng *et al.*, 1998). Les résidus

phosphatidylsérines seraient associés à des protéines du cytosquelette comme la fodrine, dont le clivage précoce durant l'apoptose pourrait les libérer et permettre leur externalisation (Fadok *et al.*, 1998).

Des protéines de voies de signalisation, comme les kinases de type MEKK1 peuvent être activées par les caspases. Leur protéolyse contribue ainsi à amplifier les signaux de mort cellulaire (Lee *et al.*, 1997).

Enfin, les caspases effectrices peuvent inactiver par clivage certaines protéines anti-apoptotiques (comme Bcl-2) contribuant ainsi à orienter de façon irréversible la cellule vers la mort cellulaire par apoptose.

5.4.2 Régulation de l'activation des caspases

Outre le fait que l'activation des caspases dépend de l'activité de synthèse de celles-ci dans chaque type cellulaire, elle est également modulée par de nombreux facteurs susceptibles de stimuler (facteurs pro-apoptotiques) ou d'inhiber (facteurs anti-apoptotiques) l'activation des caspases.

5.4.2.1 Régulation transcriptionnelle

De nombreux travaux ont démontré une régulation transcriptionnelle des procaspases qui varie selon le type cellulaire (Patel *et al.*, 1996 ; Henkart, 1996 ; Thornberry *et al.*, 1997). Ainsi, la caspase-3, par exemple, est fortement exprimée dans de nombreuses cellules lymphoïdes et myéloïdes matures alors qu'elle n'est que très faiblement présente dans l'épithélium mammaire et dans les neurones normaux (Krajewska *et al.*, 1997).

Néanmoins, cette régulation ne semble pas indispensable au déroulement de l'apoptose pour tous les types cellulaires car l'apoptose semble pouvoir se produire dans certains types cellulaires dans lesquels n'existent aucune synthèse d'ARNm (Weil *et al.*, 1996).

5.4.2.2 Inhibiteurs exogènes

Les virus ont développé diverses stratégies efficaces pour inhiber la mort cellulaire et la libération de cytokines pro-inflammatoires par les cellules infectées leur permettant d'achever leurs cycles de réplication et d'infecter d'autres cellules. A ce jour, de nombreuses molécules virales ayant une activité inhibitrice de l'apoptose (Thatte *et al.*, 2000) ont été décrites.

Par exemple CrmA (Cytokine response modifier A), protéine issue du gène du cowpox virus (virus de la vaccine), va se cliver et donner des résidus qui vont se fixer essentiellement aux caspases -1 et -8 et inhiber leur activation (Bump *et al.*, 1995).

FLIP (FLICE inhibitory protein) est une protéine initialement décrite chez le virus de l'herpès et le virus molluscipox (Bertin *et al.*, 1997 ; Thome *et al.*, 1997 ; Hu *et al.*, 1997). Elle contient deux domaines effecteurs de morts cellulaires (DED) qui vont lui permettre de se lier aux prodomaines des caspases 8 ou 10 et empêcher la liaison de celles-ci aux récepteurs de mort (notamment Fas et TNF) (Bump *et al.*, 1995). Donc dans ce cas, FLIP limite l'apoptose. Cependant, il existe une grande variété de transcrits de FLIP (Bump *et al.*, 1995). Le transcrit le plus long (FLIPL) possède, en plus des deux DED, l'équivalent d'un domaine de caspase inactif, qui serait impliqué dans l'activation de l'apoptose. Finalement FLIP pourrait empêcher l'apoptose (Rasper *et al.*, 1998) ou au contraire l'induire (Inohara *et al.*, 1997; Shu *et al.*, 1997) selon la nature du transcrit et le type cellulaire considéré.

5.4.2.3 La famille des IAP (Inhibitor of Apoptosis Proteins)

Les IAP (Inhibitor of Apoptosis Proteins) ont été initialement décrites chez les baculovirus. Ces protéines ont un effet inhibiteur des caspases effectrices. Huit ont été décrites chez les mammifères. Les protéines appartenant à cette famille contiennent un à trois domaines BIR (Baculovirus IAP Repeat). L'interaction entre le domaine BIR des IAP et le site catalytique des caspases est à l'origine d'une inhibition de l'activité des caspases effectrices. Chez l'homme, XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis), cIAP-1, cIAP-2 et

survivin sont capables de se lier aux caspases effectrices-3 et -7 activées, inhibant leur activité protéolytique (Hengartner, 2000). Les IAP peuvent également être à l'origine d'une fonction anti-apoptotique en stimulant les voies de survie, notamment en activant le facteur de transcription NF- κ B par des mécanismes non élucidés (Deveraux and Reed, 1999).

Toutefois, l'action anti-apoptotique des IAP peut être inhibée par différents facteurs pro-apoptotiques présents dans la mitochondrie comme Smac/DIABLO (Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct inhibitor of apoptosis binding protein with low pI) et HtrA2 (High temperature requirement protein A2) ou dans le cytosol comme XAF-1 (XIAP associated factor 1) (Salvesen and Duckett, 2002).

5.4.2.4 Les Heat shock proteins

Les Hsp (Heat Shock Proteins, Hsp) permettent la régulation de l'activation de l'apoptose par le contrôle de l'activation des caspases (Creagh *et al.*, 2000). La famille Hsp est constituée de protéines pro- et anti-apoptotiques.

Hsp-70 et -90 préviennent l'activation des caspases (Garrido *et al.*, 1997) en interagissant avec Apaf-1 afin d'empêcher la formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase-9 (Beere *et al.*, 2000). Hsp-27 inhibe la formation de l'apoptosome en s'associant au cytochrome c libéré par la mitochondrie.

Hsp-10 et -60, quant à elles, s'associent à la procaspase-3 et favorisent son activation (Bruey *et al.*, 2000).

5.5 Les voies caspases dépendantes

Schématiquement, l'activation de l'apoptose cellulaire peut être mise en jeu par des voies de signalisation caspases dépendantes (la voie de signalisation extrinsèque et la voie de signalisation intrinsèque) ou par des voies caspases indépendantes.

VOIE EXTRINSEQUE

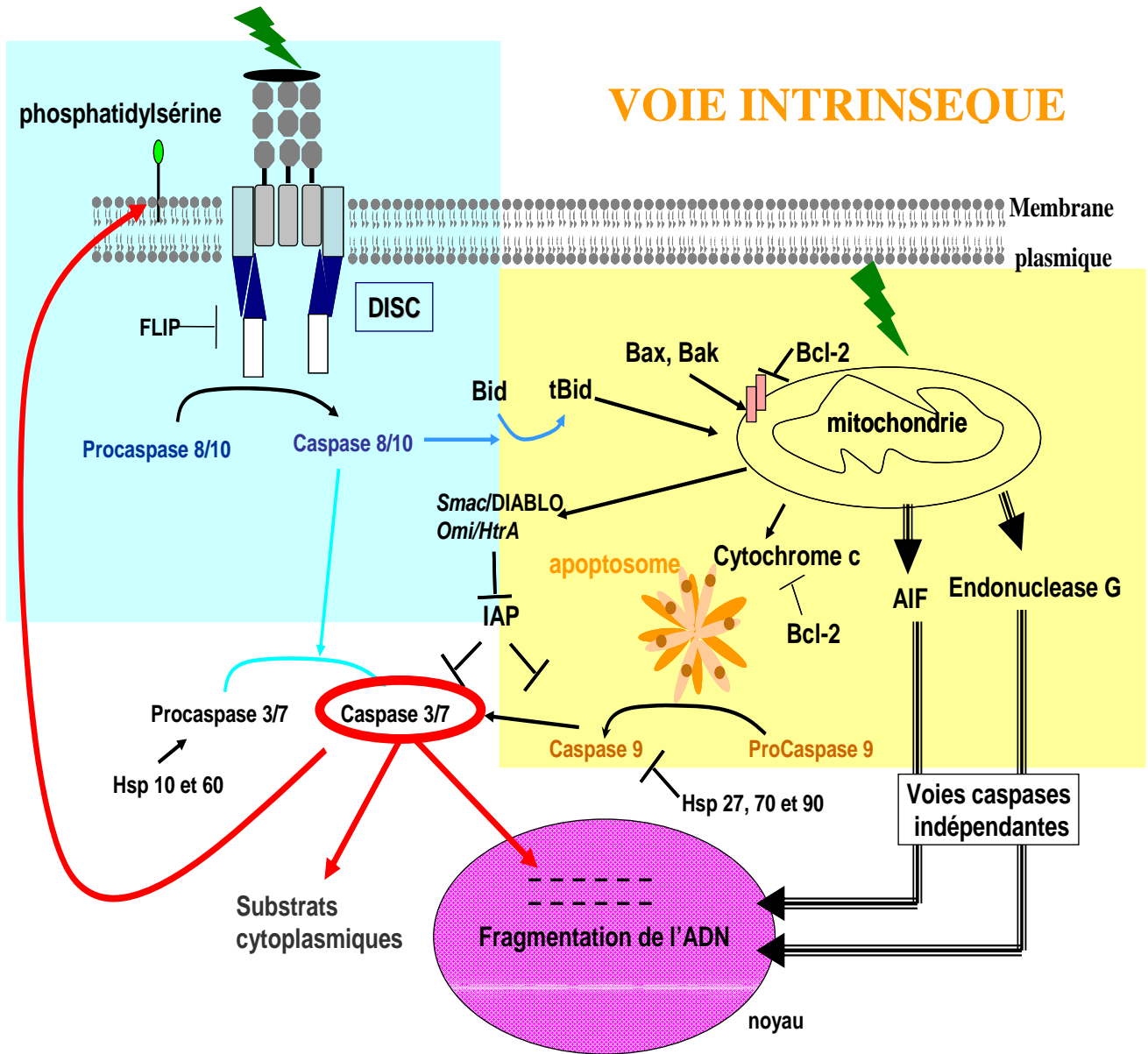


Figure 11

Principales voies de signalisation et de régulation de l'apoptose cellulaire

5.5.1 La voie de signalisation extrinsèque (ou voie des récepteurs de mort cellulaire)

L'interaction d'un signal pro-apoptotique extracellulaire avec un récepteur de mort (DR, death receptor) cellulaire membranaire permet l'induction (Ashkenazi and Dixit, 1998) de la voie extrinsèque de signalisation de l'apoptose (Figure 11).

5.5.1.1 Structure et fonctions des récepteurs de mort cellulaire

Les récepteurs de mort cellulaire appartiennent à une famille de protéines transmembranaires de la superfamille du TNF (Tumor Necrosis Factor) (Nagata, 1997). Chez les mammifères, les récepteurs de mort incluent Fas/APO1/CD95, TNF-R1 et -R2, DR3/APO3/WSL-1/TRAMP et les récepteurs TRAIL avec DR4/TRAIL-R1 et DR5/TRAIL-R2/TRICK2/KILLER. Les récepteurs de mort ont des séquences homologues intracytoplasmiques, impliquées dans la signalisation de l'apoptose. La partie N terminale de ces récepteurs riche en cystéine correspond à leur domaine extracellulaire.

Les ligands de ces récepteurs appartiennent aussi à la superfamille du TNF : Fas-L (Fas ligand) se lie à Fas, TNF- α et la lymphotoxine α au TNF-R1, Apo3L à DR3 et Apo2L aux récepteurs TRAIL (Schmitz *et al.*, 2000).

5.5.1.2 Activation de l'apoptose par le récepteur Fas et TNF-R1

Les récepteurs Fas et TNF-R1 possèdent un domaine cytoplasmique nommé Death Domain (DD) d'environ 80 acides aminés permettant le recrutement des protéines cytoplasmiques de signalisation ou protéines adaptatrices (Itoh and Nagata 1993 ; Nagata and Golstein, 1995).

L'interaction ligand-récepteur extracellulaire induit une trimérisation de ces récepteurs transmembranaires entraînant une modification de conformation du domaine de mort DD contenu dans la région cytoplasmique, permettant ensuite le recrutement d'une ou plusieurs

protéines adaptatrices cytoplasmiques (FADD, Fas associated death domain) pour Fas et TRADD (TNF Receptor Associated Death Domain) pour TNF-R1. Les protéines adaptatrices vont alors recruter et s'associer par leur domaine effecteur de mort cellulaire (DED : Death Effector Domain) aux procaspases initiatrices 8 et 10. Ce complexe protéique constitué par le ligand, les récepteurs, les protéines adaptatrices et les procaspases initiatrices constitue le DISC (Death Inducing Signaling Complex). La mise en place du DISC induit l'activation auto-catalytique des caspases initiatrices qui conduit la cellule vers la mort cellulaire de façon irréversible par l'activation des caspases effectrices (Ashkenazi and Dixit 1998 ; Schmitz *et al.*, 2000).

Le niveau de caspase-8 active générée par le DISC constitue un élément essentiel dans l'orientation ultérieure vers la voie de signalisation mitochondriale ou non. En effet, la transduction du signal d'activation de l'apoptose dans la cellule après recrutement des récepteurs de mort cellulaire peut être réalisée dans la cellule par une voie mitochondriale indépendante (type I) ou dépendante (type II) (Scaffidi *et al.*, 1998). Dans les cellules de type I, le recrutement du récepteur Fas entraîne une activation importante de la caspase-8, qui active directement la caspase-3 effectrice en aval de la cascade sans passer par une voie de signalisation mitochondriale.

Dans les cellules de type II, le recrutement du récepteur Fas n'est à l'origine que d'une faible quantité de formation du DISC et de caspase-8 active. L'exécution de l'apoptose nécessite alors l'intervention de la voie mitochondriale. Dans ces cellules, la caspase-8 active par protéolyse la protéine pro-apoptotique Bid du groupe « BH3 only », générant une forme tronquée appelée tBid qui va permettre une liaison entre la voie de signalisation membranaire et mitochondriale. La protéine tBID, en s'insérant dans la membrane mitochondriale externe et en activant Bax va ainsi provoquer la libération de cytochrome c (Nagata, 1999) et activer la voie de signalisation intrinsèque (Scorrano *et al.*, 2002).

Des mécanismes de régulation ont été décrits sur cette voie de signalisation extrinsèque en amont de l'activation des caspases effectrices au niveau du recrutement des protéines adaptatrices. Celles-ci permettent à la fois le recrutement de protéines pro- ou anti-apoptotique. Ainsi, TRADD permet le recrutement des protéines RIP (Receptor Interacting Protein) qui est pro-apoptotique et TRAF-2 (Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 2) qui est anti-apoptotique en activant le facteur nucléaire de survie NF-KB (Hsu *et al.*, 1995 ; Sheikh and Yuang, 2003). Les molécules FLIP (FLICE-inhibitor proteins) ont aussi été décrites comme des protéines impliquées dans la régulation de cette voie de signalisation. Elles entrent en compétition avec les procaspases initiatrices 8 et 10 lors de leur recrutement par les protéines adaptatrices des récepteurs de mort et elles empêchent ainsi l'auto-activation des procaspases et inhibent la voie d'activation d'apoptose extrinsèque (Schmitz *et al.*, 2000).

5.5.1.3 Activation de l'apoptose par le récepteur TRAIL/DR4 et TRAIL/DR5

Quatre récepteurs pouvant lier TRAIL (Tumour Necrosis factor- α -Related Apoptosis-Inducing Ligand ou Apo2L) ont été décrits (Almasan and Ashkenazi, 2003). Deux de ces récepteurs, DR4 et DR5, possèdent des domaines de mort (DD) cytoplasmiques et sont impliqués dans l'apoptose. Les deux autres récepteurs de type TRAIL : DcR1/TRAIL R3 et DcR2/TRAIL-R4 ne sont pas capables d'induire l'apoptose. DcR1/TRAIL R3 correspond à une protéine liée par un groupement glycophyatidylinositol à la membrane plasmique et ne possède pas de domaine intracellulaire ; DcR2/TRAIL-R4 possède un DD non fonctionnel et se lierait donc à TRAIL sans entraîner d'activation de la machinerie de signalisation d'apoptose ; il semblerait même exercer un effet inhibiteur de l'activation de TRAIL sur DR4 et DR5 (Almasan and Ashkenazi, 2003 ; Grataroli *et al.*, 2004).

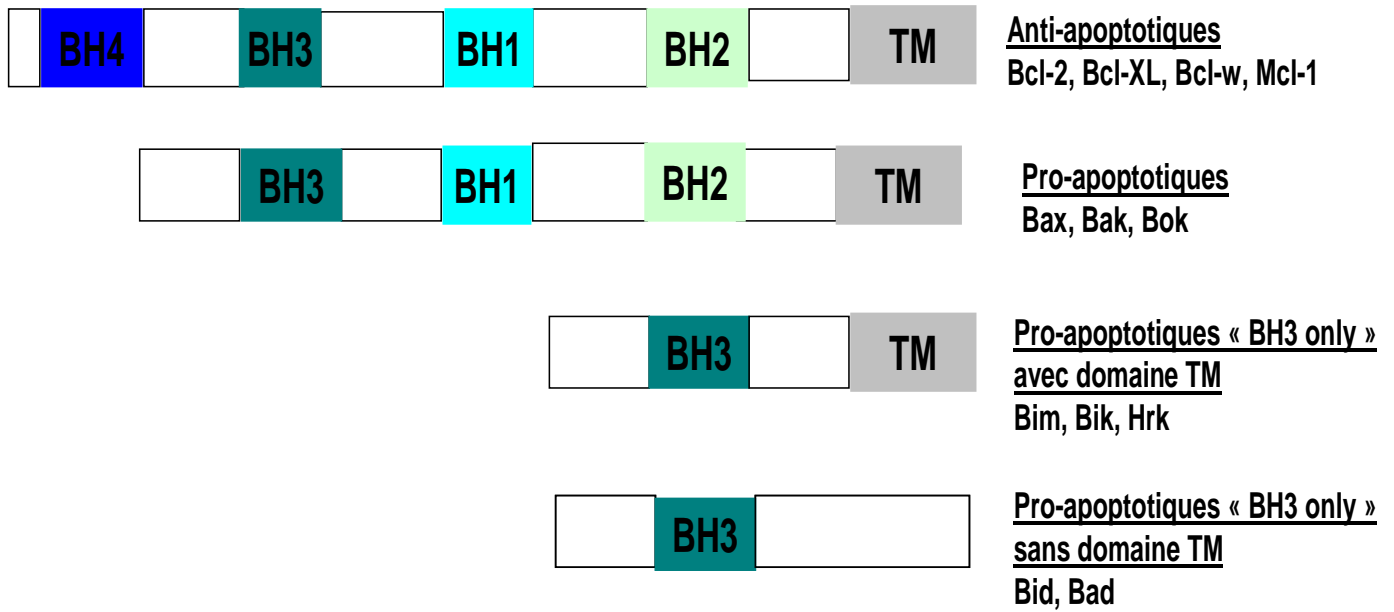


Figure 12

Classification des protéines de la famille Bcl-2.

Les domaines BH1, BH2 et BH3 permettent l'interaction entre les différents membres de la famille.

Le domaine BH4 possède une fonction anti-apoptotique.

Le domaine transmembranaire (TM) n'est pas décrit dans tous les membres de la famille

De façon similaire à FasL, TRAIL initie l'apoptose par sa liaison au récepteur et le recrutement de molécules cytoplasmiques permettant la formation du DISC, puis de l'activation de la caspase-8 par protéolyse. TRAIL peut donc induire l'apoptose via DR4 et DR5. Dans les cellules exprimant à la fois DR4 et DR5, ces récepteurs peuvent former des hétérocomplexes.

L'engagement de la voie extrinsèque par TRAIL est suffisant dans certains types cellulaires pour activer l'apoptose tandis que d'autres systèmes d'amplification par la voie intrinsèque (tBid) peuvent être nécessaires pour d'autres types cellulaires (Almasan and Ashkenazi, 2003).

5.5.2 La voie de signalisation intrinsèque (ou mitochondriale)

La deuxième voie d'activation de l'apoptose correspond à la voie intrinsèque (ou mitochondriale), mise en jeu par des stimuli intrinsèques, c'est-à-dire présents à l'intérieur de la cellule, par opposition à la voie extrinsèque (Figure 11).

La mitochondrie est un élément central dans l'activation et la régulation de l'apoptose cellulaire. La perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, sous la dépendance de membres de la famille Bcl-2, est à l'origine d'une libération de protéines apoptogènes (Brenner and Kroemer, 2000).

5.5.2.1 Les protéines de la famille Bcl-2

La famille Bcl-2 regroupe des protéines contenant au moins un des quatre domaines d'homologie de Bcl-2 (Bcl-2 Homology domain) appelés BH1, BH2, BH3 et BH4 (Reed, 1997). La nature des domaines BH détermine la fonction pro- ou anti- apoptotique des protéines de la famille Bcl-2 (Figure 12). Le domaine BH4 a un effet anti-apoptotique. Les domaines BH1, 2 et 3 sont nécessaires à la dimérisation avec d'autres protéines de la famille de Bcl-2. A l'exception de Bad et Bid, tous les membres de la famille Bcl-2 possèdent un

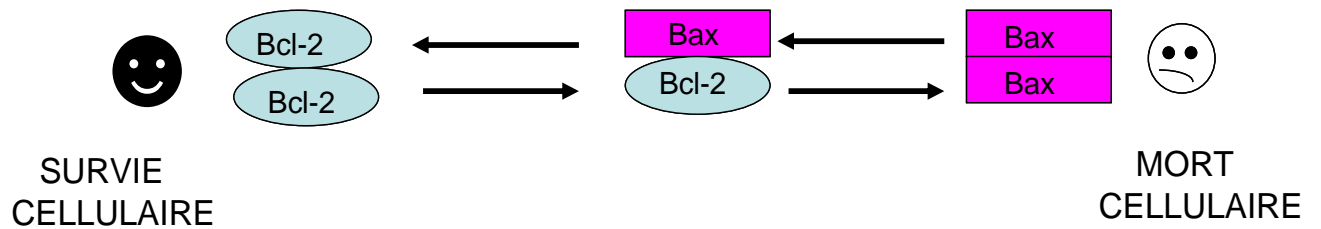


Figure 13

Dimérisation des protéines de la famille Bcl-2.

La présence d'un excès de Bcl-2 entraîne la formation d'homodimères Bcl-2 et la survie de la cellule tandis qu'un excès de Bax entraîne la formation d'homodimères Bax et la mort cellulaire.

domaine transmembranaire C-terminal indispensable à leur ancrage dans la membrane mitochondriale externe (N Guyen *et al.*, 1993 ; Adams and Cory, 1998).

On distingue 3 sous-groupes dans la famille des protéines Bcl-2. Le premier groupe contient : les protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W ou Mcl-1 qui possèdent les régions homologues BH1, BH2, BH3 et BH4 ; Le second groupe contient des protéines pro-apoptotiques comme Bax, Bak, ou Bok, caractérisées par la présence de plusieurs régions homologues BH1, BH2, BH3. Enfin, le troisième sous-groupe, qui est appelé le groupe des protéines « BH3-only » est composé d'un nombre important de protéines comme Bim, Bik, Bid, Bas,... qui sont constituées d'une unique région BH3 (Tsujiimoto and Shimizu, 2000). Ces protéines « BH3 only » ont pour particularité de provoquer une libération du cytochrome c mitochondrial sans chute du potentiel membranaire associée (Shimizu *et al.*, 1999). Ainsi, par exemple, tBid pourrait se lier à Bax via son domaine BH3 et favoriser l'oligomérisation de Bax permettant la formation d'un pore spécifique permettant la libération du cytochrome c (Ruffolo *et al.*, 2000).

La dimérisation des protéines pro- ou anti- apoptotique de la famille Bcl-2 permet d'engager la cellule vers la survie ou la mort cellulaire selon le ratio d'expression de ces formes (Figure13).

Ainsi, quand la protéine Bax est surexprimée, sa forme homodimère s'accumule et la sensibilité cellulaire envers les stimuli apoptotiques correspondants augmente. Au contraire, lorsque Bcl-2 et/ ou Bcl-x_L sont surexprimées, des homodimères Bcl-2, Bcl-x_L ou des hétérodimères Bcl-2/Bax ou Bcl-x_L/Bax s'accumulent et la mort cellulaire est réprimée (Reed, 1997 ; Reed, 1998).

5.5.2.2 Perméabilisation de la membrane mitochondriale externe au cours de l'apoptose

Deux mécanismes principaux de perméabilisation de la membrane mitochondriale externe ont été décrits lors de l'activation de l'apoptose. Ces deux mécanismes se différencient par l'association ou non de modifications de la membrane mitochondriale interne.

→ Perméabilisation de la membrane mitochondriale externe sans modification de la membrane mitochondriale interne :

Ce mécanisme implique la mise en jeu des protéines de la famille Bcl-2, et en particulier des protéines pro-apoptotiques Bax et/ou Bak qui changent de conformation et s'oligomérisent au niveau de la membrane mitochondriale externe lors de la mise en jeu d'un stimulus apoptotique de la voie intrinsèque (altérations nucléaires, sevrage en facteurs de croissance,...), permettant ainsi la formation d'un canal. Les molécules contenues dans l'espace inter-membranaire, dont le cytochrome c, peuvent alors être déversées par ce canal (Kuwana *et al.*, 2002) dans le cytoplasme. L'activation de Bax et/ou Bak peut être mise en jeu directement par la protéine Bid ou de façon indirecte par les autres protéines BH3-only, par une séquestration des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.

→ Perméabilisation de la membrane mitochondriale externe avec modification de la membrane mitochondriale interne :

Ce mécanisme met en jeu des canaux de large conductance dénommés PTPC (Permeability Transition pore Complex) situés aux points de contact entre les membranes mitochondriales externes et internes (Green and Kroemer, 2004). L'ouverture de ces canaux rend possible le passage d'ions et de molécules de faibles poids moléculaires de façon non spécifiques. Ces canaux ont des structures complexes constitués du facteur de translocation des nucléotides adényliques (ANT), de l'hexokinase II (HKII), d'une porine appelée

« voltage-dépendent anion channel » (VDAC), du récepteur périphériques des benzodiazépines (PBR), de la créatine kinase mitochondriale (mtCK), de la cyclophiline D (CyD) et de certains membres de la famille Bcl-2 comme Bax ou Bcl-2. VDAC, PBR, HKII se situent au niveau de la membrane mitochondriale externe, mtCK dans l'espace intremembranaire, l'ANT dans la membrane interne et la CyD dans la matrice.

L'ouverture de ce canal mitochondrial, appelée transition de perméabilité est à l'origine de modifications fonctionnelles et structurales de la mitochondrie générant une chute du potentiel mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) permettant la libération cytoplasmique des facteurs mitochondriaux apoptogènes. Ce $\Delta\Psi_m$ a pour origine un découplage de la chaîne respiratoire et de la production d'anions superoxydes, suivis d'une diminution de la production d'ATP (Marchetti *et al.*, 1996).

L'ouverture de ce pore est régulé par le voltage, le pH intra-matriciel, le stress oxydatif, la cyclophiline et les membres pro-apoptotiques (comme Bax) et anti-apoptotiques (comme Bcl-2 et Bcl-XL) de la famille Bcl-2 (Crompton, 2000). En effet, Bcl-2 et Bcl-XL bloquent l'ouverture du canal en fermant la porine VDAC alors que Bax induit son ouverture. Cette voie de signalisation a été plus particulièrement mise en évidence dans les cellules dont l'apoptose est induite par ischémie-repérfusion ou en réponse à un stress cellulaire mettant en jeu un second messager comme le calcium ou la production de dérivés actifs de l'oxygène (Tsujimoto and Shimizu, 2000).

5.5.2.3 Activation des caspases par l'apoptosome

Dans la mitochondrie des cellules non apoptotiques, le cytochrome c a une fonction de transporteur d'électrons dans le processus de phosphorylation oxydative (Waterhouse and Green, 1999). Une fois libéré dans le cytoplasme, le cytochrome c s'associe avec deux facteurs cytoplasmiques : Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) et la procaspase-9. Ce complexe trimoléculaire, dénommé apoptosome, est à l'origine de l'activation de la

caspase-9, puis de l'activation de la principale caspase effectrice : la caspase-3 (Zou *et al.* , 1999). L'activation de la caspase-3 par l'apoptosome se déroule en plusieurs étapes. Tout d'abord, Apaf-1 hydrolyse l'ATP en ADP, permettant l'exposition de domaines protéiques riche en séquences répétées d'Apaf-1 appelés WD40 sur lesquels le cytochrome c se fixe. Cette interaction modifie la conformation d'Apaf-1 qui s'oligomérisent en structure heptamérique ouverte. Sept dimères de procaspase-9 sont alors recrutés par l'intermédiaire des domaines CARD en position N terminale d'Apaf-1 et participent à la formation de l'apoptosome. Le regroupement des molécules de procaspase-9 induit leur activation par autoprotéolyse, puis les caspases-9 activées sont libérées du complexe, et vont activer par clivage les caspases effectrices.

5.5.2.4 Smac/DIABLO

Smac/DIABLO (Second mitochondria-derived activator of caspases/Direct IAP Binding protein with Low PI) et Omi/HtrA (high temperature requirement A) correspondent à des protéines mitochondriales de 23 et 37 kDa respectivement (Van Gurp *et al.*, 2003). Etant donné que la formation de l'apoptosome n'est pas toujours suffisante au déclenchement de l'activation des caspases, Smac/DIABLO et Omi/HtrA peuvent également favoriser l'activation des caspases par la neutralisation des IAP (Wu *et al.*, 2000).

5.6 Les voies d'activation caspases indépendantes

Deux voies caspases indépendantes mettant en jeu la libération de molécules, l'AIF (Apoptosis Inducing Factor) et l'endonucléase G contenues dans l'espace intermembranaire mitochondrial sont décrites. Sous l'effet de stimuli apoptotiques, ces protéines migrent jusque dans le noyau dans lequel elles sont à l'origine d'une altération de l'ADN. La cinétique de libération mitochondriale de ces facteurs n'est pas clairement définie (Otera *et al.*, 2005 ; Uren *et al.*, 2005).

5.6.1 Apoptosis inducing factor (AIF)

L'AIF est une flavoprotéine de 57kDa localisée dans l'espace intermembranaire mitochondrial qui présente des homologies avec les oxydoréductases à NADH bactériennes. En plus de son activité pro-apoptotique, l'AIF participe à la régulation de la chaîne respiratoire mitochondriale par son activité oxydo-réductase (Susin *et al.*, 1999).

L'effet pro-apoptotique de l'AIF est indépendant de l'activation des caspases. Selon le type cellulaire, l'AIF constituerait une voie mitochondriale parallèle à l'apoptosome ou agirait comme une molécule de signalisation en provoquant la libération du cytochrome c et l'activation de l'apoptosome (Susin *et al.*, 2000).

Lors de la mise en jeu du signal apoptotique, l'AIF est libéré par la mitochondrie vers le cytoplasme et transloqué dans le noyau où elle induit une condensation de la chromatine nucléaire et le clivage de l'ADN en grands fragments (environ 50 kb).

Cette fragmentation de grande taille de l'ADN induite par la mise en jeu de l'AIF pourrait correspondre à une étape initiale de préparation de la fragmentation internucléosomale induite par les caspases effectrices activées secondairement (Susin *et al.*, 2000).

5.6.2 Endonucléase G

L'endonucléase G est une nucléase de 30kDa localisée dans l'espace intermembranaire mitochondrial (Li *et al.*, 2001). Sous l'influence de stimuli apoptotiques, cette protéine est libérée dans le cytoplasme puis se localise dans le noyau où elle est à l'origine d'une fragmentation internucléosomale de l'ADN, indépendante des caspases.

5.7 Conclusion

La mise en jeu de l'apoptose est spécifique d'un stimulus et d'un type cellulaire donné. La phase effectrice de l'apoptose, induisant des altérations irréversibles de la cellule, est une étape fondamentale dans la voie de signalisation qui est régulée essentiellement par deux acteurs principaux : les caspases (elles mêmes régulées par les IAP) d'une part, et la mitochondrie (elle-même régulée par les protéines de la famille Bcl-2) d'autre part. Pour une meilleure compréhension des voies de signalisation de l'apoptose, il est habituel de décrire des voies hiérarchisées : voies caspases dépendantes (voies extrinsèque et intrinsèque) et les voies caspases indépendantes. Cependant les voies de signalisation de l'apoptose cellulaire seraient plus complexes avec l'implication d'interactions entre les voies extrinsèque et intrinsèque et une activation parallèle des voies caspases dépendantes et indépendantes. De plus, des boucles d'auto-amplifications impliquant un effet des caspases activées à un stade post-mitochondrial ont été décrites (Susin *et al.*, 1999). Ainsi, après la libération mitochondriale du cytochrome c, l'activation de la caspase-3 provoque en retour des dommages fonctionnels mitochondriaux par dégradation de la chaîne respiratoire (Ricci *et al.*, 2004).

L'asymétrie membranaire avec l'externalisation de la phosphatidylsérine (PS) induite sous l'activation des caspases permet la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques par les cellules phagocytaires par une interaction entre la PS et les récepteurs des phagocytes de type PSR (PS receptor) (Van Engeland *et al.*, 1998 ; Fadok *et al.*, 2000).

Une dysrégulation de ce processus complexe de signalisation cellulaire peut être à l'origine de diverses pathologies. Dans le chapitre suivant, nous étudierons plus particulièrement l'expression et la mise en jeu de l'apoptose au cours de la spermatogenèse, dans le spermatozoïde humain durant son transit dans le tractus génital mâle et les conséquences sur la fertilité masculine.

6. Apoptose et cellules germinales masculines

6.1 Apoptose et cellules germinales durant la spermatogenèse

L'apoptose semble nécessaire dans le testicule prépubère pour la mise en place et le développement fonctionnel de la spermatogenèse (Billig *et al.*, 1995 ; Rodriguez *et al.*, 1997 ; Kierszenbaum, 2001). Ainsi, chez la souris et le rat, une vague d'apoptose portant essentiellement sur les spermatogonies et les spermatocytes dès les premières semaines de vie (correspondant au stade prépubère) serait nécessaire à la formation de spermatozoïdes matures et fonctionnels (Jahnukainen *et al.*, 2004 ; Zheng *et al.*, 2006).

Un phénomène apoptotique est également observé durant la spermatogenèse normale dans les testicules adultes dont les fonctions seraient : (1) de contrôler l'expansion clonale excessive des cellules germinales (Johnson *et al.*, 1983) et d'assurer le maintien d'un ratio optimal entre le nombre de cellules germinales et le nombre de cellules de Sertoli afin de permettre une spermatogenèse efficace en touchant préférentiellement certains stades de l'épithélium séminifère (Orth *et al.*, 1988 ; Billig *et al.*, 1995 ; Print and Loveland, 2000) ; (2) de permettre la formation de la barrière hémato-testiculaire en éliminant les cellules germinales surnuméraires pour permettre la formation des jonctions serrées entre les cellules de Sertoli (Knudson *et al.*, 1995) ; (3) d'éliminer les cellules germinales présentant des anomalies de réarrangement durant la méiose, ou des cassures de leur ADN (Rodriguez *et al.*, 1997 ; Blanco-Rodriguez *et al.*, 2003) ; (4) d'éliminer les corps résiduels, correspondant à l'excès de cytoplasme émis lors de la spermiogenèse (Blanco-Rodriguez and Martinez-Garcia, 1999 ; Arama *et al.*, 2003 ; Tesarik *et al.*, 2002).

6.1.1 Spermatogenèse et voie de signalisation extrinsèque de l'apoptose

Chez le rat et l'homme, seul le récepteur membranaire Fas a été détecté dans les cellules germinales testiculaires (spermatogonies, spermatocytes et spermatides) tandis que dans les

cellules de Sertoli l'expression à la fois du récepteur Fas et de son ligand Fas L a été mise en évidence (Lee *et al.*, 1997 ; Pentikainen *et al.*, 1999). L'absence d'expression de Fas et Fas ligand dans le tissu testiculaire de fœtus de 20 à 22 semaines de grossesse et chez des patients présentant un hypogonadisme hypogonadotrope (Francavilla *et al.*, 2000) montre que la mise en place de ce système (Fas/FasL) est probablement sous le contrôle des gonadostimulines.

Le traitement de tissus testiculaires humains adultes en culture par un anticorps capable de se lier à Fas L et ainsi de bloquer son interaction avec Fas entraîne une inhibition de l'expression de l'apoptose des cellules germinales (Pentikainen *et al.*, 1999), suggérant le rôle de Fas-Fas L dans la régulation de la spermatogenèse.

Dans un testicule adulte, dans les conditions normales, les cellules de Sertoli expriment faiblement Fas L, qui en se fixant sur le récepteur Fas des cellules germinales permet l'induction de l'apoptose de celles-ci, mais dans une faible proportion (Sugihara *et al.*, 1997 ; D'Alesio *et al.*, 2001). Lors d'une diminution pathologique du nombre de cellules de Sertoli, celles-ci, au contraire, surexpriment Fas Ligand pour faciliter l'élimination des cellules germinales porteuses de Fas (Lee *et al.*, 1997), permettant ainsi d'atteindre un ratio optimal cellules de Sertoli-cellules germinales, essentiel au déroulement d'une spermatogenèse normale. Néanmoins, les souris mutantes *lpr* (déficientes pour Fas) (Adachi *et al.*, 1995) et *gld* (déficientes pour Fas L) (Richburg *et al.*, 2000) sont fertiles avec une spermatogenèse normale. Ces données suggèrent que le système Fas/Fas L n'est pas le seul élément impliqué dans l'induction de l'apoptose des cellules germinales.

Chez les patients présentant une altération de la spermatogenèse (arrêt complet de maturation après la première division méiotique ou hypospermatogenèse), une expression plus importante de Fas/FasL a été mise en évidence dans le tissu de ces patients (Francavilla *et al.*, 2002). Les mécanismes moléculaires de signalisation entre l'altération méiotique et l'expression accrue de l'apoptose via Fas/FasL ne sont pas connus à ce jour.

Il a aussi été montré que TRAIL et ses récepteurs (DR4, DR5, DcR1 et DcR2) sont exprimés dans le tissu testiculaire humain avec une colocalisation du ligand et de ses récepteurs dans les spermatocytes et spermatides (Spierings *et al.*, 2004 ; Grataroli *et al.*, 2004).

6.1.2 Spermatogenèse et voie de signalisation intrinsèque de l'apoptose

Chez la souris, la voie de signalisation intrinsèque mitochondriale régulée par les membres de la famille Bcl-2 est essentielle au déroulement de la spermatogenèse. En effet, l'inactivation génique de Bax (Knudson *et al.*, 1995) ou la surexpression de Bcl-2 ou Bcl-x1 (Furuchi *et al.*, 1996 ; Rodriguez *et al.*, 1997) sont à l'origine d'une accumulation de cellules germinales pré-méiotiques avec diminution des cellules apoptotiques sans spermatogenèse active. De même, lorsque le gène Apaf-1 est invalidé, seuls 5% des mutants survivent jusqu'à l'âge adulte. La seule anomalie observée chez les survivants est une infertilité des mâles avec une dégénérescence des cellules germinales et un phénotype similaire à celui observé lors d'une invalidation de Bax (Honarpour *et al.*, 2000).

6.1.3 Spermatogenèse et voies de signalisation caspases indépendantes

A notre connaissance, aucune étude ne rapporte la mesure ou l'expression de l'AIF ou de l'endonuclease G dans le tissu testiculaire animal ou humain.

6.1.4 Elimination des cellules germinales apoptotiques

Les cellules de Sertoli seraient responsables de l'élimination par phagocytose des cellules germinales apoptotiques.

Chez l'animal, des études ont permis de démontrer que la liaison de l'annexine V à la PS ou au SR-BI (class B scavenger receptor type I) *in vitro* est associée à une diminution de la phagocytose des cellules germinales apoptotiques (Shiratsuchi *et al.*, 1999 ; Maeda *et al.*,

2002). *In vivo*, l'injection d'annexine V ou d'anticorps anti-SR-BI (Nakanishi and Shiratsuchi 2004) s'accompagne d'une augmentation du nombre de cellules germinales apoptotiques.

Ainsi, le SR-BI, exprimé par les cellules de Sertoli serait le récepteur des PS externalisées par les cellules germinales en apoptose et permettrait leur phagocytose.

6.1.5 Infertilité et dysrégulations de l'apoptose testiculaire

6.1.5.1 Altérations de la spermatogenèse et apoptose

Une expression importante de l'apoptose a été mise en évidence par la mesure des marqueurs de l'apoptose (fragmentation de l'ADN, externalisation de la PS, expression de la caspase-3 activée et de Fas/FasL) dans les cellules germinales de prélèvements testiculaires de rat (Tres *et al.*, 2004) , de souris (Jurisicova *et al.*, 1999) ou de patients présentant à l'analyse histologique un arrêt de maturation de la spermatogenèse, une hypospermatogenèse (Kim *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2007a ; Bozec *et al.*, 2008) ou une altération de la spermiogenèse (Lin *et al.*, 1997 ; Tesarik *et al.*, 1998).

Une analyse sur des prélèvements testiculaires provenant de patients présentant un arrêt précoce ou tardif de maturation (arrêt pré- ou post-méiotique) ou une hypospermatogenèse montre sur le tissu dilacéré mécaniquement une expression à la fois des caspases et de la fragmentation de l'ADN dans les cellules germinales lorsque celles-ci sont accolées aux cellules de Sertoli, alors que lorsqu'elles sont séparées des cellules de Sertoli, elles présentent majoritairement une fragmentation de l'ADN sans expression des caspases activées associée. Ceci suggère le rôle actif des cellules de Sertoli dans l'induction de l'apoptose des cellules germinales chez ces patients (Tesarik *et al.*, 2004).

6.1.5.2 Cryptorchidie et apoptose testiculaire

Lors de cryptorchidie unilatérale expérimentale chez les rats prépubères (Dundar *et al.*, 2005) ou chez le macaque rhésus (Zhang *et al.*, 2003), une atrophie du testicule cryptorchide est observé avec dans les spermatogonies et dans les spermatocytes soit une surexpression de Bax chez le rat ou une redistribution de Bax chez le macaque.

Chez l'homme, une analyse récente de biopsies testiculaires d'enfants opérés d'une cryptorchidie a permis de montrer une expression importante de l'apoptose (fragmentation de l'ADN *in situ*) dans les cellules germinales (Ofoderme *et al.*, 2005).

6.1.5.3 Chimiothérapie, radiothérapie et apoptose testiculaire

La radiothérapie touchant l'aire pelvienne et la chimiothérapie en particulier avec des protocoles composés d'agents alkylants ou de dérivés du platine sont à l'origine d'une expression importante de l'apoptose des cellules germinales testiculaires engendrant une altération de la spermatogenèse (Kemp *et al.*, 2001 ; Kim *et al.*, 2002 ; Chater *et al.*, 2007). Récemment, une étude chez le rat a montré que dans le cas particulier du protocole BEP (Bléomycine, Etoposide, Cisplatine) utilisé fréquemment dans le traitement du cancer du testicule (cancer le plus fréquent de l'homme jeune), l'apoptose des cellules germinales induites par ce traitement est réversible, puisque 9 semaines après son arrêt, on observe une reprise de la spermatogenèse, une diminution de la proportion de cellules germinales exprimant une fragmentation de l'ADN (TUNEL *in situ*) et une amélioration de la fertilité (augmentation du nombre de portées) (Marcon *et al.*, 2008).

6.1.5.4 Exposition testiculaire à la chaleur et apoptose testiculaire

Chez le rat, lors d'une exposition prolongée des testicules à la chaleur, une expression de l'apoptose des cellules germinales est observée avec l'activation de la voie intrinsèque par

une redistribution de Bax suivi de la libération du cytochrome c vers le cytoplasme et de l'activation de la caspase-9, puis des caspases effectrices 3, 6 et 7, aboutissant au clivage de la PARP et à une fragmentation de l'ADN (Hikim *et al.*, 2003a et b) sans mise en évidence d'induction de la voie extrinsèque.

6.1.5.5 Dysrégulations endocrines et apoptose testiculaire

Chez le rat, l'hypophysectomie entraîne l'apparition d'une proportion importante de cellules germinales avec une fragmentation de l'ADN. Cet effet régresse après l'administration de FSH (hormone folliculo-stimulante), hCG (gonadotrophine chorionique humaine) et testostérone à ces animaux (Tapanainen *et al.*, 1993). De plus, chez le rat, après la pose d'implants de testostérone et d'estradiol permettant d'inhiber la sécrétion de LH et ainsi de supprimer la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig, une diminution du nombre de spermatozoïdes et spermatozoïdes et une augmentation de la proportion des cellules germinales exprimant la caspase-3 activée sont observées. De plus, l'immunomarquage de la caspase-3 activée dans les cellules germinales de ces animaux met en évidence un passage du cytoplasme vers le noyau de l'enzyme, suivi par le clivage de ses principaux substrats nucléaires : PARP et ICAD, puis d'une fragmentation de l'ADN des cellules germinales (Kim *et al.*, 2001 ; Kim *et al.*, 2007b). Une chute du taux de testostérone intratesticulaire entraînerait donc une altération de la spermatogenèse dû à l'activation de l'apoptose dans les cellules germinales par les voies caspases dépendantes.

Chez l'homme, seule une étude *in vitro* a été réalisée sur des tissus testiculaires dilacérés mécaniquement provenant d'hommes à spermatogenèse active (Tesarik *et al.*, 2002). Une déplétion des milieux de culture en FSH entraîne une augmentation de la proportion des cellules germinales présentant une fragmentation de l'ADN sans augmentation de l'expression des caspases activées et aucune variation de l'expression de ces

paramètres dans les cellules de Sertoli. Quant à la déplétion des milieux de culture en testostérone, elle induit au niveau des cellules de Sertoli une augmentation importante de la proportion des cellules exprimant une fragmentation de l'ADN et des caspases activées et au niveau des cellules germinales une faible augmentation de la proportion des cellules avec une fragmentation de l'ADN sans augmentation de l'expression des caspases activées. Ces données montreraient le rôle important et complémentaire de la FSH et de la testostérone dans la régulation de l'apoptose pour le maintien de la spermatogenèse.

6.1.5.6 Vieillessement et apoptose testiculaire

Chez l'homme au cours du vieillissement, il apparaît une diminution du nombre de cellules de Sertoli (Dakouane *et al.*, 2005) et du ratio spermatides/cellules de Sertoli associé à une augmentation de l'apoptose des spermatocytes primaires avec perte de l'équilibre prolifération-apoptose cellulaire nécessaire au bon déroulement de la spermatogenèse (Johnson, 1986 ; Kimura *et al.*, 2003).

6.1.5.7 Facteurs environnementaux et apoptose testiculaire

De nombreux facteurs environnementaux toxiques ont été décrits comme délétères sur les cellules germinales mâles. Par exemple l'acide méthoxyacétique utilisé dans les peintures industrielles induit une atrophie testiculaire accompagnée d'une fragmentation de l'ADN des cellules germinales chez le rat exposé avec une redistribution du cytochrome c vers le cytosol et un pic d'activation des caspases-3 et -9 (Rao and Shaha, 2002).

Un phénomène apoptotique impliquant préférentiellement la voie mitochondriale a été décrit dans les testicules de rats adultes exposés à la cocaïne avec la mise en évidence d'une libération du cytochrome c par les mitochondries et d'une activation des caspases-3 et -9 sans activation de la caspase-8 (Li *et al.*, 2003).

Enfin, l'alcoolisme chronique induit une infertilité associée à un hypogonadisme hypogonadotrope avec une expression augmentée de l'apoptose des cellules germinales testiculaires qui présentent une expression augmentée des caspases -3 et -9 (Eid *et al.*, 2002).

6.2 Apoptose et spermatozoïde humain

6.2.1 L'apoptose existe-t-elle dans les spermatozoïdes ?

L'existence de l'apoptose dans le spermatozoïde éjaculé reste aujourd'hui controversée (Sakkas *et al.*, 1999 ; Lachaud *et al.*, 2004).

Pour certains auteurs, les spermatozoïdes, cellules différenciées ne se multipliant pas par mitose ou méiose ne pourraient pas subir de processus apoptotique (Samali *et al.*, 1996). De plus, les spermatozoïdes matures présentent un noyau transcriptionnellement peu actif donc, à priori, peu capable de générer un processus de mort cellulaire active et programmée (Weil *et al.*, 1998 ; Galeraud-Denis *et al.*, 2007). Lachaud *et al.*, 2004, ont montré que les spermatozoïdes éjaculés mis en culture durant 24 heures meurent essentiellement par nécrose et non par apoptose (évaluée par l'externalisation de la phosphatidylsérine et la fragmentation de l'ADN). De plus, l'induction *in vitro* de l'apoptose des spermatozoïdes, par les molécules utilisées habituellement pour les cellules somatiques est difficile et incomplète (Weil *et al.*, 1998 ; Grunewald *et al.*, 2005 ; Mahfouz *et al.*, 2008).

Néanmoins, des études de microscopie électronique et des analyses biochimiques et fonctionnelles ont montré que les spermatozoïdes éjaculés présentent des altérations ultrastructurales nucléaires et cytoplasmiques et des signes d'apoptose identiques aux cellules somatiques (Baccetti *et al.*, 1996 ; Taylor *et al.*, 2004 ; Said *et al.*, 2004) que nous préciserons ultérieurement.

Actuellement, il n'est pas clairement défini si l'expression de cette apoptose dans les spermatozoïdes éjaculés est : (i) la conséquence d'une apoptose testiculaire initiée et avortée

(Sakkas *et al.*, 1999), (ii) induite ou poursuivie durant le transit des spermatozoïdes dans les voies génitales. A notre connaissance, aucune étude comparative de mesure de l'expression de l'apoptose des spermatozoïdes prélevés à différents niveaux du tractus génital mâle n'a été réalisée pour tenter de répondre à ces hypothèses.

6.2.2 Apoptose et spermatozoïdes éjaculés

6.2.2.1 Altérations ultrastructurales

Baccetti *et al.*, 1996, ont été les premiers auteurs à rapporter la présence de modifications ultrastructurales du spermatozoïde éjaculé mis en évidence par microscopie électronique similaires à celles observées sur les cellules somatiques en apoptose. Elles se caractérisent essentiellement par une marginalisation de la chromatine, des mitochondries gonflées et regroupées de façon anarchique dans la pièce intermédiaire et une membrane plasmique conservée. Ces altérations ultrastructurales sont plus fréquentes dans les prélèvements de patients infertiles, comparé aux hommes fertiles (Baccetti *et al.*, 1996 ; Baccetti *et al.*, 2002a ; Baccetti *et al.*, 2002b, Baccetti *et al.*, 2003).

6.2.2.2 Altérations membranaires

→ Fas/FasL

Chez l'homme, la présence de Fas a été rapportée à la surface des spermatozoïdes éjaculés (Sakkas *et al.*, 1999 ; Sakkas *et al.*, 2002 ; Mc Vicar *et al.*, 2004). Dans les éjaculats de patients infertiles, une proportion plus importante des spermatozoïdes expriment Fas comparés aux donneurs fertiles. Une analyse par immunodétection des spermatozoïdes éjaculés de patients infertiles a montré une association entre l'expression de Fas et de Bcl-x sur ces éjaculats qui contiennent une proportion importante de spermatozoïdes à ADN fragmenté. Ces résultats suggèrent, selon les auteurs, l'existence d'une apoptose testiculaire

avortée dont les stigmates s'exprimeraient dans les spermatozoïdes éjaculés (Sakkas *et al.*, 2002).

Par contre, des travaux récents (Castro *et al.*, 2004 ; Peticarrari *et al.*, 2008) n'ont pas retrouvé d'expression de Fas à la surface de spermatozoïdes de donneurs ou de patients infertiles. Ces données contradictoires peuvent s'expliquer par le fait que la méthodologie utilisée pour les cellules somatiques n'est pas adaptée aux spermatozoïdes (par exemple dans l'étude de Sakkas *et al.*, de 1999 et 2002 : Absence de témoin positif, immunodétection indirecte par un anticorps anti-Fas non spécifique, auto-fluorescence non évaluée, population leucocytaire non exclue dans les mesures) conduisant à la mesure de faux positifs (Marchetti *et al.*, 2005b).

Enfin, l'incubation de spermatozoïdes éjaculés de donneurs ou de patients infertiles avec FasL ne permet pas d'augmenter leur activité caspases (Taylor *et al.*, 2004 ; Grunewald *et al.*, 2005 ; Peticarrari *et al.*, 2008). Finalement, s'il existe, le récepteur Fas ne serait pas fonctionnel sur le spermatozoïde humain.

→ **TRAIL**

Seule une étude chez le rat et la souris rapporte la présence des récepteurs DR4 et DR5 sur des spermatozoïdes épидидymaires (Cisternas and Moreno, 2006). L'incubation de ces spermatozoïdes avec une dose importante du ligand TRAIL n'induit pas de diminution de la vitalité de ces spermatozoïdes, suggérant l'absence de fonctionnalité de ces récepteurs.

A notre connaissance, aucune étude n'a rapporté l'expression de TRAIL et de ses récepteurs sur les spermatozoïdes éjaculés humains.

→ Externalisation de la phosphatidylsérine

L'externalisation de la phosphatidylsérine sur le versant externe de la membrane plasmique correspond à un phénomène survenant de façon précoce dans les cellules somatiques en apoptose représentant un moyen de signalisation pour les cellules phagocytaires environnantes (Williamson and Schlegel, 2002). Cette altération membranaire peut être visualisée et mesurée par la liaison spécifique des résidus phosphatidylsérines (PS) avec l'annexine V (conjuguée à un marqueur fluorescent) (Zhang *et al.*, 1997 ; Grunewald *et al.*, 2008).

L'externalisation de la PS a été mise en évidence dans les spermatozoïdes éjaculés humains (Weng *et al.*, 2002 ; Paasch *et al.*, 2003 ; Muratori *et al.*, 2004), bovins (Anzar *et al.*, 2002 ; Kotwicka *et al.*, 2002 ; Martin *et al.*, 2004) et porcins (Pena *et al.*, 2005).

Chez l'homme, la proportion de spermatozoïdes éjaculés externalisant la PS est plus élevée chez les patients infertiles que chez les donneurs normospermiques (Oosterhuis *et al.*, 2000 ; Shen *et al.*, 2002). Dans un éjaculat, l'externalisation de la PS sur certains spermatozoïdes peut être utilisée pour sélectionner les spermatozoïdes en utilisant un système de microbilles magnétiques ou de tri cellulaire (Paasch *et al.*, 2003 ; Said *et al.*, 2006 ; Hoogendijk *et al.*, 2008). La comparaison des deux populations obtenues montre que les spermatozoïdes n'ayant pas externalisé la PS ont un meilleur pouvoir fécondant (Grunewald *et al.*, 2007) et une plus faible expression des autres marqueurs d'apoptose (caspases activées, variation du potentiel mitochondrial, fragmentation de l'ADN), comparé aux spermatozoïdes ayant externalisé la PS. La mesure de la proportion de spermatozoïdes ayant l'externalisé la PS sur des éjaculats pourrait représenter un moyen d'évaluation de la qualité du sperme frais (Weng *et al.*, 2002 ; Muratori *et al.*, 2004) ou cryoconservé (Sion *et al.*,

2004). Cette propriété pourrait d'ailleurs être utilisée pour sélectionner des populations de spermatozoïdes à pouvoir fécondant élevé (Grunewald *et al.*, 2007).

Cependant, l'externalisation de la PS en tant que marqueur d'apoptose reste controversée. Une hypothèse a été avancée quant à la signification de cette altération membranaire (Nolan and Hammstedt, 1997). Une augmentation de la proportion des spermatozoïdes ayant externalisé la PS est observée après induction de la capacitation et/ou de la réaction acrosomique du spermatozoïde humain (De Vries *et al.*, 2003 ; Martin *et al.*, 2005) ou animal (Gadella and Harrison, 2002 ; Kotwicka *et al.*, 2002). Elle correspondrait à un phénomène physiologique lié au remaniement membranaire qui accompagne la capacitation et pourrait être considéré comme un élément de reconnaissance par les cellules phagocytaires du tractus génital féminin des spermatozoïdes capités qui ont perdu leur activité fonctionnelle (Kurz *et al.*, 2005 ; Marti *et al.*, 2008).

6.2.2.3 Altérations mitochondriales et spermatozoïdes éjaculés

Différentes observations tendent à démontrer l'existence d'altérations mitochondriales associées à l'apoptose dans les spermatozoïdes éjaculés humains.

La production de dérivés actifs de l'oxygène (DAO) s'accompagne d'une réduction du $\Delta\Psi_m$ et contribue activement à la mort de la cellule. Celui-ci peut être facilement évalué dans les spermatozoïdes en utilisant des fluorochromes lipophiles cationiques (Troiano *et al.*, 1998 ; Donnelly *et al.*, 2000 ; Marchetti *et al.*, 2004b ; Wang *et al.*, 2003). Ils ont la particularité de s'incorporer dans la matrice mitochondriale de cellules vivantes en fonction de la différence de potentiel de membrane mitochondrial et l'intensité de fluorescence accumulée est proportionnelle au $\Delta\Psi_m$.

Le $\Delta\Psi_m$ des spermatozoïdes de patients infertiles est significativement plus faible que celui des donneurs (Wang *et al.*, 2003). De plus une réduction du $\Delta\Psi_m$ est corrélée

positivement à une faible concentration des spermatozoïdes avant et après migration de densité (Troiano *et al.*, 1998 ; Marchetti *et al.*, 2002 ; Marchetti *et al.*, 2004b).

Dans les prélèvements de sperme éjaculés de patients fertiles et infertiles, des corrélations positives entre la proportion de spermatozoïdes présentant une diminution du $\Delta\Psi_m$ et la proportion des spermatozoïdes présentant une externalisation de la PS (Barroso *et al.*, 2006) ou une fragmentation de l'ADN (Zhang *et al.*, 2008) ont été mises en évidence, suggérant l'intérêt du $\Delta\Psi_m$ pour évaluer les spermatozoïdes éjaculés. Une étude récente a par ailleurs démontré l'intérêt du $\Delta\Psi_m$ dans l'évaluation de la qualité fonctionnelle et fécondante des spermatozoïdes éjaculés (Gallon *et al.*, 2006).

Une expression importante du cytochrome c (Wang *et al.*, 2003) mesurée par *Western Blot* a été observée chez les patients infertiles.

Enfin, l'incubation de spermatozoïdes éjaculés de donneurs avec de l'acide bétulinique (molécule pro-apoptotique) agissant directement sur la mitochondrie en induisant une transition de perméabilité mitochondriale, génère une diminution significative du $\Delta\Psi_m$ et une augmentation des caspases -3 et -9 activées (Paasch *et al.*, 2004a), néanmoins avec un faible rendement d'activation.

6.2.2.4 Altérations nucléaires

Les mécanismes exacts par lesquels les dommages de l'ADN apparaissent dans les spermatozoïdes restent encore mal compris.

Outre une altération du processus de compaction de l'ADN ou un effet du stress oxydatif (Zalata *et al.*, 1995 ; Aitken *et al.*, 1998 ; Gandini *et al.*, 2000 ; Agarwal *et al.*, 2008), une activation des voies effectrices de l'apoptose pourrait expliquer ces altérations de l'ADN (Irvine *et al.*, 2000). L'induction d'un stress oxydatif lié notamment à une production de peroxyde d'hydrogène entraîne une augmentation des spermatozoïdes présentant des

stigmates (fragmentation de l'ADN, caspase-3 activée, clivage de la PARP) caractéristiques d'apoptose (Agarwal and Said, 2005 ; Mahfouz *et al.*, 2008)

Nous avons vu précédemment qu'il existe des relations entre les proportions des spermatozoïdes présentant une fragmentation de l'ADN et les proportions de spermatozoïdes présentant d'autres anomalies caractéristiques de l'apoptose (altération ultrastructurale, externalisation de la PS, activation des caspases, baisse du $\Delta\Psi_m$,...) chez des hommes fertiles et infertiles (Weng *et al.*, 2002 ; Marchetti *et al.*, 2004a ; Zhang *et al.*, 2008).

Différents tests sont utilisés pour mettre en évidence une altération de l'ADN dans les spermatozoïdes : électrophorèse en gel d'agarose, TUNEL (Terminal Uridine Nick end-Labeling), comet assay, SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay), SCD (Sperm Chromatin Dispersion) (Gorczyca *et al.*, 1993 ; Aravindan *et al.*, 1997 ; Evenson *et al.*, 1999 ; Donnelly *et al.*, 2000 ; Zini *et al.*, 2001). Cependant, aucun d'entre eux ne permet de préciser l'origine de cette altération.

6.2.2.5 Caspases

→ Caspases activées et spermatozoïdes éjaculés

La présence des caspases et leur rôle éventuel dans les spermatozoïdes humains éjaculés n'a été décrit que très récemment (pour revue : Said *et al.*, 2004). Les études portent essentiellement sur l'expression de la caspase-3.

Chez l'animal, actuellement, seules la présence des caspases -3 et -8 ont été mises en évidence par immunodétection et mesure de l'activité enzymatique dans les spermatozoïdes épидидymaires de rat, souris, hamster et éjaculés de bœuf (Cisternas and Moreno, 2006 ; Martin *et al.*, 2007). Chez la souris, bien que la présence de la caspase-3 ait été rapportée, son rôle n'est pas clairement défini dans les spermatozoïdes épидидymaires (Weil *et al.*, 1998 ; Cisternas and Moreno, 2006).

Chez l'homme, la présence de la caspase-3 activée a été analysée par des techniques d'immunodétection (*western blot*), de détection intracellulaire par l'utilisation d'un inhibiteur de la caspase-3 activée conjuguée à un fluorochrome, et par la mesure de son activité enzymatique (Paasch *et al.*, 2003 ; Marchetti *et al.*, 2004a ; Perticarari *et al.*, 2007). Plus récemment, l'utilisation de ces méthodes ont été appliquées pour mettre en évidence l'expression des caspases -1, -8 et -9 dans les spermatozoïdes humains éjaculés (Wundrich *et al.*, 2006 ; Martin *et al.*, 2007).

La présence de caspases activées dans les spermatozoïdes éjaculés d'hommes fertiles et infertiles est inversement corrélée à la concentration, la mobilité et le pourcentage de morphologie normale des spermatozoïdes chez des hommes fertiles et infertiles (Weng *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2003 ; Marchetti *et al.*, 2004a ; Almeida *et al.*, 2005).

De plus, après sélection sur gradient de densité, l'activité des caspase-3, 8, et -9 est plus élevée dans les spermatozoïdes de la fraction de basse densité comparée à la la fraction de haute densité qui contient les spermatozoïdes les plus matures et fonctionnels (Weng *et al.*, 2002 ; Paasch *et al.*, 2003).

L'existence de corrélations positives entre les proportions de spermatozoïdes exprimant des caspases activées et celles exprimant d'autres marqueurs d'apoptose comme la fragmentation de l'ADN, la présence du cytochrome c (Wang *et al.*, 2003 ; Paasch *et al.*, 2003), l'externalisation de la PS (Kotwicka *et al.*, 2008), ou de la diminution du potentiel mitochondrial (Marchetti *et al.*, 2004b) est en faveur de l'expression d'une apoptose dans les spermatozoïdes éjaculés.

Néanmoins, la régulation de l'activation des caspases dans les spermatozoïdes montre des différences avec celle observée pour les cellules somatiques. Les traitements par des inducteurs de l'apoptose utilisés classiquement sur les cellules somatiques tels que le la staurosporine n'entraîne qu'une faible activation des caspases dans les spermatozoïdes

humains (Taylor *et al.*, 2004 ; Mahfouz *et al.*, 2008). Dans les spermatozoïdes épидидymaires de souris l'effet inhibiteur du peptide z-VAD-fmk n'est pas retrouvé (Weil *et al.*, 1998).

Enfin, bien que l'activation des caspases soit caractéristique de l'apoptose, elle peut être aussi impliquée dans d'autres processus, en particulier dans la maturation (Arama *et al.*, 2003) et la différenciation des spermatozoïdes (Cayli *et al.*, 2004 ; Almeida *et al.*, 2005 ; Aziz *et al.*, 2007). Une étude sur le modèle drosophile a montré que l'inhibition de l'activation des caspases et l'invalidation du gène de synthèse du cytochrome c entraînent des anomalies de différenciation des spermatides en spermatozoïdes (Arama *et al.*, 2003 ; Huh *et al.*, 2004). Chez l'homme, une étude a montré sur des spermatozoïdes éjaculés, incubés dans des conditions capacitantes, la présence de la caspase-3 activée et de Bcl-xl par immunodétection de façon plus fréquente dans les spermatozoïdes éjaculés présentant des signes d'immaturité caractérisés par un reste cytoplasmique important, la présence de la créatine kinase et l'absence de capacité de liaison à l'acide hyaluronique dans des conditions capacitantes (Cayli *et al.*, 2004). Finalement, comme il a été montré dans les cellules somatiques (Carlile *et al.*, 2004), dans le spermatozoïde humain, les caspases seraient des témoins du processus d'apoptose mais aussi de maturation et/ou de différenciation cellulaire.

→ **Inhibiteurs des caspases activées et spermatozoïdes éjaculés**

La protéine Hsp70 a été mise en évidence par *western blot* dans les spermatozoïdes éjaculés (Blanc-Layrac *et al.*, 2000) et une corrélation inverse entre le niveau d'expression d'Hsp70 et la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat (Erata *et al.*, 2008). De plus, l'expression de la protéine Hsp70 est corrélée positivement, dans les spermatozoïdes éjaculés de patients infertiles, aux taux de fragmentation de l'ADN mesuré par la technique TUNEL (Erata *et al.*, 2008). Un mécanisme de protection contre une activation de l'apoptose pourrait donc être mis en jeu dans les spermatozoïdes éjaculés de ces patients.

A notre connaissance, il n'existe aucune étude rapportant la recherche et/ou la mise en évidence des IAP dans les spermatozoïdes d'origine humaine ou animal.

6.2.2.6 Les voies caspases indépendantes

La présence de l'AIF dans les spermatozoïdes bovins (Martin *et al.*, 2007) et humains de patients fertiles et infertiles (Taylor *et al.*, 2004) a été mise en évidence par *western blot*. L'existence d'une voie caspase indépendante dans les spermatozoïdes humains pourrait expliquer l'apoptose observée dans les spermatides et spermatozoïdes testiculaires chez lesquels aucune expression des caspases activées n'a été retrouvée, mais qui sont riches en mitochondries, organites dans lesquels est produit l'AIF (Tesarik *et al.*, 2002 ; Taylor *et al.*, 2004).

Dans le spermatozoïde, à notre connaissance, une recherche et/ou une mise en évidence de l'endonucléase G n'a jamais été rapportée.

6.2.3 Apoptose et spermatozoïdes testiculaires ou épидидymaires

Actuellement, l'apoptose des spermatozoïdes d'origine testiculaires et épидидymaires humains n'a pas fait l'objet d'études spécifiques. Une étude sur des prélèvements des spermatozoïdes testiculaires et épидидymaires de patients présentant une azoospermie obstructive ou une anéjaculation (Ramos *et al.*, 2002) a montré que la proportion de spermatozoïdes présentant une fragmentation de l'ADN est plus élevée dans les prélèvements épидидymaires comparé aux prélèvements testiculaires. Néanmoins, lorsque seuls les spermatozoïdes mobiles de morphologie normale de ces prélèvements sont analysés par technique TUNEL, il n'apparaît pas de différence significative des taux de fragmentation de l'ADN quelque soit l'origine des spermatozoïdes (éjaculés, épидидymaires ou testiculaires).

Cependant dans ce travail, aucun autre marqueur d'apoptose n'a été mesuré. Il est donc difficile de faire un parallèle entre le niveau de fragmentation de l'ADN et le processus apoptotique.

6.2.4 Induction de l'apoptose dans les spermatozoïdes éjaculés

L'apoptose des spermatozoïdes éjaculés peut être induite : *in vivo* (1) par des traitements thérapeutiques, (2) au décours de différentes situations physiologiques ou pathologiques, (3) par des substances toxiques exogènes susceptibles de s'accumuler dans l'organisme, (4) *in vitro* par certaines manipulations, comme par exemple la congélation-décongélation.

6.2.4.1 Cancers et traitements anticancéreux

Les patients atteints d'un cancer du testicule (Kobayashi *et al.*, 2001) ou d'un cancer de la vessie (Hughes *et al.*, 1996 ; Mc Kelvey *et al.*, 1997) présentent une proportion de spermatozoïdes à ADN fragmenté plus importante que les populations contrôles.

Les traitements par chimiothérapie utilisant la fludarabine (Chatterjee *et al.*, 2000 ; Morris, 2002a) ou la combinaison bléomycine etoposide et cisplatine (Stahl *et al.*, 2004) induisent une fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes éjaculés. De même, après un traitement par radiothérapie pelvienne, la proportion des spermatozoïdes éjaculés chez présentant une fragmentation de leur ADN augmente chez ces patients (Hughes *et al.*, 1996 ; Mc Kelvey *et al.*, 1997).

Ces études portent essentiellement sur la mesure de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes éjaculés et ne permettent donc pas de conclure quant à la présence d'un phénomène uniquement lié à l'activation de l'apoptose dans ces cas particuliers de cancers ou de traitements anticancéreux par chimiothérapie ou radiothérapie.

6.2.4.2 Infections urogénitales

Différentes infections bactériennes, mycologiques ou virales apparaissent comme associées à des critères caractéristiques d'un processus apoptotique dans les spermatozoïdes éjaculés. Une infection génitale par *candida albicans* est associée à une augmentation de la proportion de spermatozoïdes à ADN fragmenté et externalisant la PS (Burrello *et al.*, 2004). Les lipopolysaccharides extraits de *Salmonella enterica*, de *Pasteurella multocida* et de *Chlamydia trachomatis* pourraient aussi induire un processus apoptotique (expression de la caspase-3 activée, externalisation de la PS) et provoquer la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes (Gorga *et al.*, 2001 ; Eley *et al.*, 2005 ; Satta *et al.*, 2006). Les bactéries *E. faecalis*, *E. coli* et *S. aureus* induiraient l'apoptose des spermatozoïdes par leur sécrétion de toxines et par un contact direct bactérie-flagelle du spermatozoïde (Villegas *et al.*, 2005). Le virus *influenza* serait responsable d'une hyperthermie à l'origine d'une augmentation d'altération de l'ADN (Evenson *et al.*, 2000).

6.2.4.3 Varicocèle

L'existence d'un varicocèle est fréquemment associée au diagnostic d'infertilité masculine (Marmar, 2001). La physiopathologie du varicocèle est encore mal comprise aujourd'hui. Les études réalisées chez l'animal (Zheng *et al.*, 2008) et l'homme (Chen *et al.*, 2004 ; Baccetti *et al.*, 2006 ; Wu *et al.*, 2008) tendent à démontrer une augmentation de l'expression de l'apoptose (modifications ultrastructurales, externalisation de la PS, fragmentation de l'ADN, diminution du $\Delta\Psi_m$) dans les spermatozoïdes et une augmentation de la production de DAO dans les éjaculats des patients. Il existe aussi une altération de la quantité et/ou mobilité et/ou morphologie des spermatozoïdes (Marmar, 2001 ; Agarwal *et al.*, 2003) qui pourrait s'expliquer par une dysrégulation du processus d'apoptose testiculaire et/ou la mise en jeu d'un stress oxydant (Ku *et al.*, 2005).

6.2.4.4 Substances toxiques

De nombreux pesticides susceptibles de s'accumuler dans l'organisme pourraient être à l'origine d'une baisse de la fertilité masculine (Perrera *et al.*, 2002 ; Swan *et al.*, 2006). Les mécanismes impliqués dans ces altérations restent mal documentés. Un travail réalisé dans notre équipe a montré, *in vitro*, que l'incubation en présence d'alachlore (qui est un herbicide) de spermatozoïdes éjaculés provenant d'hommes fertiles entraîne une augmentation de la proportion des spermatozoïdes présentant une externalisation de la PS, un faible $\Delta\Psi_m$ et un accroissement de la fragmentation de l'ADN, associée à une baisse de la vitalité et de la mobilité. Une des hypothèses avancées pour expliquer ces résultats serait que l'alachlore favorise l'apoptose du spermatozoïde via une augmentation du stress oxydant (Grizard *et al.*, 2006).

6.2.4.5 Capacitation et réaction acrosomique

La relation entre le processus de capacitation et l'apoptose reste controversée (Grunewald *et al.*, 2006). Lorsque des spermatozoïdes de mammifères ou humains sont incubés *in vitro* dans des conditions induisant la capacitation, la proportion de spermatozoïdes externalisant leurs PS et marqués à l'annexine V est augmentée (Gadella and Harrison, 2002 ; De Vries *et al.*, 2003 ; Grunewald *et al.*, 2006 ; Marti *et al.*, 2008) et la localisation du marquage sur la membrane plasmique est modifiée, elle migre de la pièce intermédiaire vers l'acrosome (Kotwicka *et al.*, 2002). Ce phénomène pourrait s'expliquer par la modification de la fluidité membranaire induite lors de la capacitation (Gadella *et al.*, 2002 ; De Vries *et al.*, 2003 ; Martin *et al.*, 2005).

Au contraire, Muratori *et al.*, 2004, n'observent pas de marquage annexine V sur les spermatozoïdes mis en conditions capacitantes. Ces auteurs considèrent donc l'externalisation de

la PS plutôt comme un marqueur d'altération et de modification membranaire que de capacitation.

Des données récentes rapportent une diminution du $\Delta\Psi_m$, une augmentation de l'activité des caspases-3 et -9 et un accroissement de la proportion des spermatozoïdes externalisant leur PS et présentant une fragmentation de l'ADN dans des spermatozoïdes éjaculés dont la réaction acrosomique a été induite (Martin *et al.*, 2005 ; Bejarano *et al.*, 2008).

6.2.4.6 La congélation-décongélation

La congélation des spermatozoïdes est utilisée chez l'homme principalement dans le cadre de la préservation de la fertilité des patients devant subir un traitement potentiellement stérilisant (chimiothérapie, radiothérapie ou autres traitements pouvant altérer la spermatogenèse) ou dans le but de conserver des spermatozoïdes de donneurs fertiles qui seront ensuite utilisés en AMP pour des couples receveurs dont l'indication médicale aura été posée au préalable.

La congélation-décongélation des spermatozoïdes a des effets délétères ; elle induit une diminution de leur vitalité et de leur mobilité progressive. Ces altérations sont associées à une augmentation de l'externalisation de la PS (Glander and Schaller, 1999 ; Sion *et al.*, 2004 ; Paasch *et al.*, 2004b), une activation des caspases-1, -3, -8 et -9 (Paasch *et al.*, 2004c ; Grunewald *et al.*, 2005 ; Wundrich *et al.*, 2006) et une réduction du $\Delta\Psi_m$ (Paasch *et al.*, 2004b). Toutes ces modifications sont en faveur d'une induction de l'apoptose par la congélation-décongélation. L'expression de ce phénotype apoptotique (Said *et al.*, 2004 ; Wundrich *et al.*, 2006) est dépendant des paramètres spermiologiques initiaux et du protocole de congélation utilisé (vitesse de descente en température, nature du cryoprotecteur,...).

La diminution de la quantité de Hsp90 observée dans les spermatozoïdes congelés-décongelés pourrait activer les caspases (Cao *et al.*, 2003).

Si la congélation n'a pas d'effets délétères sur la fragmentation des spermatozoïdes des hommes fertiles (Duru *et al.*, 2001), elle peut toutefois induire une augmentation de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes des sujets infertiles (Serzedello de Paula *et al.*, 2006 ; Kalthur *et al.*, 2008).

La cryoconservation semble donc induire un effet « apoptosis like » sur les spermatozoïdes humains (Sion *et al.*, 2004 ; Paasch *et al.*, 2004b). Cet effet a également été décrit sur les spermatozoïdes de diverses espèces animales (Pena *et al.*, 2003 ; Martin *et al.*, 2004 ; Ortega-Ferrusola *et al.*, 2008).

6.2.5 Apoptose du spermatozoïde et Assistance Médicale à la Procréation

Nous décrirons la relation entre l'expression de ces différents marqueurs d'apoptose du spermatozoïde humain et la capacité fécondante, le développement embryonnaire et les taux d'obtention de grossesse.

6.2.5.1 Les marqueurs d'apoptose exprimés par le spermatozoïde humain peuvent ils être utiles au diagnostic d'infertilité masculine ?

Dans les laboratoires de biologie de la reproduction, l'analyse conventionnelle des spermatozoïdes est réalisée en microscopie optique selon les critères de mesures définis par l'OMS (WHO, 1999). Cette analyse comporte la détermination de la concentration, mobilité, vitalité et morphologie des spermatozoïdes. Ces paramètres qui permettent d'apprécier notamment la qualité de la spermatogenèse et l'intégrité des voies génitales sont un reflet très indirect de la qualité fonctionnelle des spermatozoïdes. Pour apprécier celle-ci, le développement de nouveaux marqueurs plus sensibles et spécifiques des spermatozoïdes apparaît donc nécessaire pour établir le diagnostic d'infertilité masculine.

Les résultats rapportés par la littérature tendent à démontrer que parmi les marqueurs d'apoptose exprimés par les spermatozoïdes humains, les mesures du $\Delta\Psi_m$ et de la proportion des spermatozoïdes exprimant des caspases activées et/ou une fragmentation de l'ADN (Oehninger *et al.*, 2003 ; Said *et al.*, 2004 ; Marchetti *et al.*, 2004a ; Taylor *et al.* 2004 ; Gallon *et al.*, 2006 ; Varum *et al.*, 2007) semblent présenter un intérêt dans le diagnostic de l'infertilité masculine. Toutefois, avant d'envisager l'application de ces mesures en « routine » dans les laboratoires de biologie de la reproduction clinique, il serait nécessaire de valider leur sensibilité par une étude prospective à grande échelle.

6.2.5.2 Préparation du sperme en AMP et marqueurs d'apoptose

Pour la réalisation d'une technique d'assistance médicale à la procréation (Insémination intra-utérine (IIU), Fécondation In Vitro (FIV) ou Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI)), il est nécessaire et indispensable de sélectionner les spermatozoïdes de façon à augmenter la proportion de spermatozoïdes mobiles et morphologiquement normaux. Pour cette sélection, les techniques les plus fréquemment utilisées dans les laboratoires de biologie de la reproduction sont aujourd'hui la technique de migration sur gradient de densité et la migration ascendante (ou *swim up*). Dans les populations de spermatozoïdes sélectionnés par l'une de ces deux techniques, la proportion de spermatozoïdes exprimant des marqueurs d'apoptose (externalisation de la PS, fragmentation de l'ADN, $\Delta\Psi_m$, caspases activées) est plus faible comparée aux valeurs initiales (Donnelly *et al.*, 2000 ; Marchetti *et al.*, 2002 ; Taylor *et al.*, 2004 ; Ricci *et al.*, 2008). De plus, comparé à la population de spermatozoïdes isolée par migration sur gradient de densité, la population de spermatozoïdes sélectionnée par *swim up* contient une plus faible quantité de spermatozoïdes exprimant des marqueurs d'apoptose (Muratori *et al.*, 2000 ; Ricci *et al.*, 2008). Cette différence pourrait s'expliquer

par le fait que la technique de *swim up* nécessite moins de centrifugations, qui peuvent être potentiellement délétères, que la technique de migration sur gradient de densité.

6.2.5.3 Pouvoir fécondant des spermatozoïdes et apoptose

Une corrélation négative entre le taux de fécondation obtenu en FIV et respectivement le pourcentage de spermatozoïdes présentant une fragmentation de l'ADN (Lopes *et al.*, 1998 ; Host *et al.*, 2000) et le pourcentage de spermatozoïdes présentant des caspases activées (Marchetti *et al.*, 2004a) a été mise en évidence.

Dans une étude récente, Grunewald *et al.*, 2007, ont montré en utilisant le test de fécondation d'ovocytes dépellucidés de hamster que les fractions de spermatozoïdes éjaculés sélectionnés par migration sur gradient de densité qui ont le pouvoir fécondant le plus faible sont celles qui contiennent une proportion importante de spermatozoïdes exprimant des marqueurs d'apoptose (externalisation de la PS, caspase-3 activée et faible $\Delta\Psi_m$).

6.2.5.4 Taux de grossesses et marqueurs d'apoptose du spermatozoïde

A notre connaissance, seule l'influence de l'altération de l'ADN sur le développement embryonnaire précoce et les taux de grossesse ont été étudiés. Le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes utilisés aussi bien en FIV qu'en ICSI est corrélé négativement avec la qualité embryonnaire (Sakkas *et al.*, 1998 ; Morris *et al.*, 2002b) et le taux d'obtention de blastocyste au cinquième jour du développement (Virant-Klun *et al.*, 2002 ; Nasr-Esfahonie *et al.*, 2005 ; Muriel *et al.*, 2006). Ces données confirment l'influence de l'effet paternel sur le développement embryonnaire pré-implantatoire (Janny and Menezo, 1994). De plus, de nombreuses études ont démontré une corrélation négative entre le pourcentage de spermatozoïdes présentant une altération de l'ADN et les taux de grossesse après IIU, FIV ou ICSI (Evenson *et al.*, 1999 ; Benchaib *et al.*, 2003 ; Borini *et al.*, 2006)

dans des populations sélectionnées de couples dont l'infertilité est idiopathique ou présentant des fausses couches à répétition. Néanmoins ces études restent controversées (pour revue, méta-analyse ASRM 2006)

6.3 Conclusion

L'apoptose est un processus nécessaire au déroulement d'une spermatogenèse normale. L'expression des marqueurs d'apoptose, bien décrits dans les cellules somatiques, a été mise en évidence dans les spermatozoïdes humains avec une prévalence plus importante chez les hommes infertiles. Cependant, les mécanismes d'activation et de signalisation dans les spermatozoïdes humains sont encore mal connus. De plus, compte tenu de la faible activité transcriptionnelle des spermatozoïdes, la théorie d'une initiation de l'apoptose reste controversée aujourd'hui. Néanmoins, différentes études ont rapporté une proportion importante de spermatozoïdes exprimant des marqueurs d'activation de l'apoptose dans différentes situations physiopathologiques suggérant son implication dans la fertilité masculine. Deux hypothèses principales ont été émises pour expliquer la présence de ces marqueurs : (i) l'apoptose serait initiée et « avortée » au niveau testiculaire ; (ii) l'apoptose serait initiée ou poursuivie durant le transit des spermatozoïdes dans les voies génitales lors de l'éjaculation. Etant donné la complexité des mécanismes mis en jeu, une étude multiparamétrique des marqueurs d'apoptose permettant l'analyse des différentes étapes de l'apoptose est nécessaire. Ce travail permettrait de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu et responsables de l'apoptose du spermatozoïde humain d'une part et d'analyser l'implication de l'apoptose dans la fertilité masculine d'autre part afin d'optimiser la prise en charge des patients infertiles en particulier en assistance médicale à la procréation.

But de l'étude

Des travaux récents montrent que la proportion de spermatozoïdes présentant des signes d'apoptose est plus élevée dans les éjaculats des patients infertiles que dans ceux des donneurs fertiles. Les spermatozoïdes humains étant des cellules hautement différenciées avec une faible activité transcriptionnelle, la signification de l'expression des marqueurs d'apoptose dans ces cellules n'est pas clairement définie aujourd'hui. De plus, les méthodes de mesure des marqueurs d'apoptose dans les cellules somatiques, en particulier des caspases activées, ont été transposées aux spermatozoïdes humains sans validation préalable. Or, pour les prélèvements spermatiques, la réalisation de ces mesures montre certaines difficultés liées notamment à la faible quantité de spermatozoïdes disponible, en particulier dans les cas d'oligozoospermie, et à l'hétérogénéité des populations cellulaires.

Les objectifs de mon travail ont donc été :

1/ de valider les techniques de mesure de l'expression des caspases activées sur différents prélèvements spermatiques humains (spermatozoïdes testiculaires, épидидymaires et éjaculés) ;

2/ d'étudier le statut apoptotique des spermatozoïdes prélevés à différents niveaux du tractus génital (testicule, épидидyme et éjaculat) dans différentes situations physiopathologiques (témoins fertiles, patients présentant une agénésie bilatérale des canaux déférents (ABCD), patients porteurs d'une translocation chromosomique autosomiques) pour essayer de mieux comprendre la signification et l'origine des signes caractéristiques d'apoptose dans les spermatozoïdes humains. Pour évaluer la qualité fonctionnelle de ces spermatozoïdes, des relations ont été recherchées entre l'expression de ces marqueurs et les résultats obtenus en assistance médicale à la procréation. Le processus et les stigmates d'apoptose ont été évalués sur les spermatozoïdes par la mesure de plusieurs marqueurs biochimiques d'apoptose (caspases activées, externalisation de la PS, fragmentation de l'ADN) et par une analyse ultrastructurale en microscopie électronique.

Matériel et Méthodes

1. Les patients

Les patients inclus dans notre étude sont des hommes infertiles et des donneurs de sperme suivis et pris en charge dans le laboratoire de biologie de la reproduction du centre hospitalier et universitaire de Clermont Ferrand, France, ou du centre hospitalier universitaire libre néerlandophone de Bruxelles (UZB, Universitair Ziekenhuis Brussel). Deux types de patients infertiles ont été pris en compte : les hommes présentant une azoospermie obstructive (prélèvements de spermatozoïdes testiculaires et épидидymaires) associée à une agénésie bilatérale des canaux déférents (ABCD) d'une part et les hommes infertiles porteurs d'une translocation chromosomique réciproque ou Robertsonienne autosomique.

Les spermés des patients présentant une ABCD se caractérisent par une hypospermie (volume <2ml) associée à un pH acide (pH <7,2) et une azoospermie qui a été confirmée par l'analyse de deux éjaculats à au moins 74 jours d'intervalle avec une analyse complète du culot de centrifugation selon les normes définies par l'OMS (WHO, 1999). D'autre part, l'analyse biochimique du liquide séminal de ces prélèvements a montré des quantités effondrées (inférieures aux limites de détection de l'essai) de fructose (marqueur de l'activité des vésicules séminales) et d' α -glucosidase (marqueur de l'activité de l'épididyme). La réalisation d'une échographie des voies uro-génitales a permis de confirmer l'ABCD chez ces patients.

Un examen clinique complet a été réalisé pour l'ensemble des patients infertiles avec une exploration paraclinique comprenant au moins le dosage sérique de FSH et testostérone. Tous les patients infertiles ont bénéficié d'un conseil génétique avec la réalisation d'un caryotype sanguin sur culture de lymphocytes sanguins, selon la méthode décrite par Rooney and Czepulowski, 1992, et pour les patients présentant une ABCD la recherche des mutations du gène CFTR par la technique OLA (Oligonucleotide Ligation Assay ; CF OLA kit v.2,

Abbott France). Elle permet de détecter 33 des mutations les plus fréquentes (soit 90% des mutations les plus fréquentes) dans la population caucasienne et l'analyse du variant 5T. Le fragment d'ADN, correspondant à la région d'intérêt est amplifié par PCR (Polymerase Chain Reaction). L'analyse permet de déterminer l'existence ou non de mutation en fonction de la longueur du fragment d'ADN amplifié, par hybridation avec des oligonucléotides spécifiques pour les séquences normales ou mutées.

Un consentement écrit a été obtenu pour tous les patients inclus dans cette étude. Lorsque ces hommes étaient inscrits en programme d'assistance médicale à la procréation (AMP), leur partenaire féminine ne présentait aucune pathologie intercurrente ou altération de leurs fonctions endocrines, et avaient un caryotype normal (46,XX).

2. Les prélèvements de spermatozoïdes

Les spermés éjaculés ont été recueillis par masturbation dans un récipient stérile en plastique. Après liquéfaction (30 min, 37°C), ces prélèvements ont été analysés selon les critères définis par l'OMS (WHO, 1999) permettant la détermination de la concentration, mobilité et morphologie (critères de David, David *et al.*, 1975) des spermatozoïdes. Pour des raisons pratiques, il a été nécessaire de cryoconserver certains éjaculats en vue de la réalisation ultérieure des mesures de fragmentation de l'ADN, d'expression des caspases activées et d'analyse ultrastructurale des spermatozoïdes par microscopie électronique.

Les prélèvements chirurgicaux des spermatozoïdes épидидymaires et/ou testiculaires ont été réalisés sous anesthésie générale. Après dissection chirurgicale de l'épididyme, les spermatozoïdes épидидymaires ont été aspirés à l'aide d'une aiguille de 25 gauge montée sur une seringue stérile contenant du milieu de Earle (Cryobiosystem, France) dans la partie proximale de la tête de l'épididyme (Tournaye *et al.*, 1997) par la technique MESA (MESA : Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration). La concentration et la mobilité des

spermatozoïdes épидидymaires prélevés ont été mesurées selon les recommandations de l'OMS (WHO, 1999) avant congélation. Quand la MESA ne permettait pas d'obtenir suffisamment de spermatozoïdes mobiles utilisables secondairement en ICSI ou quand l'abord chirurgical de l'épididyme était difficile, des spermatozoïdes testiculaires ont été extraits par technique TESE (TESE : TEsticular Sperm Extraction) après biopsie testiculaire chirurgicale. Le nombre important de spermatozoïdes épидидymaires et/ou testiculaires toujours obtenus traduit une spermatogenèse active chez ces patients. Une fraction du prélèvement testiculaire prélevé a été fixée pour analyse histologique. Sur l'autre fraction l'extraction des spermatozoïdes suivie de leur cryoconservation a été réalisée. Le tissu testiculaire prélevé a été dilacéré entre deux lames stériles microscopiques en verre dans une boîte de Pétri en verre contenant 2ml de milieu de Earle (Cryobiosystem, France) et la suspension cellulaire a été centrifugée à 750 g pendant 5 minutes. A partir du culot remis en suspension (dans 500µl de milieu de Earle), la concentration et la mobilité des spermatozoïdes ont été déterminées selon les critères de l'OMS (WHO, 1999).

Pour des raisons pratiques, tous les prélèvements de spermatozoïdes testiculaires et épидидymaires analysés dans notre étude ont été congelés/décongelés.

3. La congélation-décongélation des spermatozoïdes

Deux protocoles de congélation ont été utilisés :

→ Pour les patients pris en charge et suivis dans le centre de biologie et médecine de la reproduction du centre hospitalier néerlandophone universitaire libre de Bruxelles (UZB), Belgique, les éjaculats ont été initialement dilués dans un milieu cryoprotecteur (TYB, composition en annexe) selon les recommandations du fournisseur (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA). Après équilibration, les suspensions ont été conditionnées dans des paillettes (Cryobiosystem, France) qui ont été ensuite congelées en les disposant horizontalement au à

20 cm au dessus des vapeurs d'azote pendant 15 minutes, puis à 10cm au dessus des vapeurs d'azote pendant 15 minutes, et finalement ces paillettes ont été plongées dans de l'azote liquide à -196°C pour conservation. Pour la décongélation, les paillettes ont été disposées pendant 10 minutes à température ambiante puis leur contenu a été soumis à une centrifugation lavage (500g, 5min., température ambiante) dans du milieu de Earle pour enlever le milieu cryoprotecteur.

→ Pour les patients pris en charge et suivis dans le centre de biologie et médecine du centre hospitalier universitaire de Clermont Ferrand, France, les éjaculats, les suspensions de spermatozoïdes épидидymaires et/ou testiculaires ont été dilués et équilibrés avec le milieu cryoprotecteur (Cryosperm, composition en annexe II) selon les recommandations du fournisseur (Cryosperm, Biomedica, France) puis conditionnés en paillettes. Celles-ci ont été ensuite congelées selon un protocole standard de descente en température contrôlée (de 20°C à -4°C à une vitesse de $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$; de -4°C à -30°C à une vitesse de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ et de -30°C à -140°C à une vitesse de $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) dans un appareil Minicool LC40 (Air liquide santé, France) puis, finalement elles ont été déposées dans l'azote liquide pour être conservées. Pour la décongélation, les paillettes ont été placées à 37°C durant 3 minutes, puis le contenu a été dilué progressivement et de façon contrôlée dans du milieu de Earle. Enfin, le cryoprotecteur a été enlevé par lavage centrifugation (750g, 5min., température ambiante).

4. Analyse des marqueurs d'apoptose

Les marqueurs biochimiques

4.1.1 L'expression des caspases activées

Dans une population de spermatozoïdes, la mesure d'expression des caspases activées peut s'envisager essentiellement de deux façons : 1/ par une analyse cellulaire individuelle

de l'expression des caspases activées (détection *in cellulo*, microscopie à fluorescence ou cytométrie en flux), 2/ de façon globale par la détection immunologique des caspases activées sur les extraits protéiques obtenus à partir d'une certaine quantité de spermatozoïdes (*western blot*).

L'analyse *in cellulo* est une technique dont la sensibilité et la spécificité dépendent essentiellement des ligands utilisés pour révéler la caspase activée. Combinée à un marqueur de vitalité (Propidium Iodide, PI), cette technique permet dans une population de spermatozoïdes d'évaluer la proportion de spermatozoïdes exprimant des caspases activées et de différencier les spermatozoïdes vivants et morts

La technique *western Blot* permet, après immunodétection, de révéler l'expression des caspases activées dans un extrait obtenu à partir de prélèvements de sperme sans distinction possible des différentes populations cellulaires. Cette technique est peu sensible.

La spécificité de la technique utilisée dépend du degré de pureté de la population des spermatozoïdes, et notamment de la contamination éventuelle par des autres types cellulaires (cellules germinales immatures, polynucléaires,...) et de la qualité de l'anticorps « anti-caspase ». De celle-ci dépendra également la sensibilité de la méthode.

Certaines de ces techniques adaptées aux spermatozoïdes humains à partir d'études préalables effectuées sur les cellules somatiques ont fait l'objet d'une mise au point approfondie pour notre étude, compte-tenu des caractéristiques des populations de spermatozoïdes étudiées (spermatozoïdes éjaculés, épидидymaires et/ou testiculaires) et de la faible quantité de spermatozoïdes présents dans les prélèvements.

→ **Détection de l'expression des caspases activées *in cellulo***

La détection de la proportion de spermatozoïdes exprimant des caspases activées *in cellulo* a été réalisée par l'utilisation de différents inhibiteurs fluorescents (FAM,

carboxyfluoréscéine) des caspases activées (FLICA : Fluorescent Inhibitor of Activated Caspases). La structure de ces inhibiteurs permet leur entrée passive dans la cellule où ils se lient de façon covalente (fmk : fluorométhylkétone) aux caspases activées. Le substrat fluorogénique devient fluorescent en se liant au site actif de la caspase mesurée, exposé après clivage et activation (Vaux and Korsmeyer, 1999). Les FLICA utilisés dans notre travail sont :

- FAM-VAD-fmk : détection de la majorité des caspases activées (caspase-1, -3, -4, -5, -6, -7, -8 et -9).
- FAM-DEVD-fmk : détection de la caspase-3 activée.
- FAM-LETD-fmk : détection de la caspase-8 activée.
- FAM-LEHD-fmk : détection de la caspase-9 activée.

Pour ces mesures, une analyse combinée de la vitalité est réalisée par l'utilisation d'un marquage au Propidium Iodide (PI, Sigma, France).

Selon les recommandations du fournisseur (Apoptosis detection kit caspase assay, Serotec, France), des aliquotes stocks du FLICA (150×) ont été obtenues par une dilution dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) et conservées à -20°C. Ces solutions ont été ensuite diluées dans du PBS extemporanément pour obtenir une solution de travail (30×, 10µl).

3. 10⁵ spermatozoïdes ont été ensuite incubés (37°C, 5%CO₂) en présence de cette solution pendant une heure dans un volume final de 300µl de PBS. Après incubation avec le FLICA, la suspension cellulaire a été traitée par lavage centrifugation avec le tampon de lavage fourni dans le kit (700g, 5 min, température ambiante) et repris dans 300µl du milieu de lavage. Après addition du propidium iodide (PI, 10µg.ml⁻¹), la suspension cellulaire a été maintenue dans l'obscurité à température ambiante pendant 15 minutes avant l'analyse par microscopie à fluorescence et/ou par cytométrie en flux.

Pour valider la technique, des témoins ont été réalisés. Le témoin positif a été obtenu en utilisant des polynucléaires sanguins (5.10^6), isolés sur gradient de densité d'histopaque (Sigma, France, densité : 1,119 et 1,077), et dont l'apoptose a été induite (Parvathenani *et al.*, 1998 ; Weng *et al.*, 2002) en les incubant 6 heures à 37°C avec du cycloheximide (1mM, Sigma, France). Le contrôle négatif a été obtenu en remplaçant le FLICA par 10µl de PBS afin d'évaluer l'auto-fluorescence des spermatozoïdes. Ces témoins ont ensuite été traités dans les mêmes conditions que les échantillons de spermatozoïdes à analyser.

Pour la microscopie à fluorescence, l'analyse de l'échantillon a été réalisée par un microscope épifluorescent conventionnel (excitation 450-490nm ; émission : 525-617nm). Le fluorochrome carboxyfluorescéine (FAM) du FLICA donne une fluorescence verte et le PI une fluorescence rouge. Pour chaque patient, 400 spermatozoïdes au minimum, répartis sur au moins 5 champs microscopiques ont été analysés de façon randomisée par patient.

4 combinaisons de marquage ont été détectées :

- Aucun marquage du spermatozoïde, uniquement vu en microscopie optique en lumière visible (Casp-/PI-) : spermatozoïde vivant sans marquage de(s) caspase(s) activée(s).
- Marquage en rouge du spermatozoïde (Casp-/PI+) : spermatozoïde mort sans caspase(s) activée(s)
- Marquage en vert du spermatozoïde (Casp+/PI-) : spermatozoïde vivant avec marquage de(s) caspase(s) activée(s)
- Marquage en rouge et vert du spermatozoïde (Casp+/PI+) : spermatozoïde mort avec un marquage de(s) caspase(s) activée(s)

La concordance inter- et intra-observateur a été analysée par des mesures effectuées sur des spermatozoïdes testiculaires et épидидymaires congelés/décongelés.

L'analyse par cytométrie en flux a été réalisée en utilisant un cytomètre en flux Coulter Epics XL. Pour chaque mesure, un minimum de 2.10^4 spermatozoïdes ont été

Spécificité	Dénomination anticorps, type, fournisseur	Espèce	Dilution	Protéines reconnues selon le fournisseur	Contrôle positif
Caspase 3	Caspase-3 (H-277) :sc-7148, anticorps polyclonal, Santa Cruz	lapin	1/500	Précurseur : p32 Fragments : p21, p17, p11	Extrait protéique de cellules Jurkat traitées avec 4µM de camptothecine pendant 4 heures pour induire l'apoptose (BD Pharmingen)
Caspase 8	Anti-caspase-8, clone 1-1-37, anticorps monoclonal IgG, Chemicon International,	souris	1/500	Précurseur : p55 Fragments : p43 ;p10	Extrait protéique de cellules Jurkat traitées avec 4µM de camptothecine pendant 4 heures pour induire l'apoptose (BD Pharmingen)
Caspase 9	Anti-caspase-9, clone 96-2-22, anticorps monoclonal IgG, Chemicon International	souris	1/500	Précurseur : p46 Fragments : p37, p10	Extrait protéique de cellules HeLa traitées avec his-TRAIL (1µg/ml) pendant 5 heures (Dr O. Micheau, INSERM U866, Dijon, France)

Tableau 3 Anticorps primaires utilisés pour la détection des caspases -3, -8 et -9 activées

examinés La sélection de la fenêtre de détection correspondant aux spermatozoïdes a été déterminée par l'analyse préalable d'échantillons de spermatozoïdes avant et après sélection sur migration de gradient de densité (Puresperm 90% et 45%, Nidacon International). Les fluorochromes ont été excités à une longueur d'onde de 488nm par un laser argon. Les fluorescences verte (FLICA) et rouge (PI) ont été respectivement détectées en FL1 par un filtre de bande passante de 525nm et en FL3 par un filtre de bande passante de 620nm. Les signaux de fluorescence détectés par FL1 et FL3 ont été enregistrés après amplification logarithmique et le pourcentage de cellules marquées a été calculé par le logiciel du cytomètre en flux (Coulter, France). Avant l'analyse du double marquage, 3 types d'échantillons ont été mesurés successivement pour le réglage du cytomètre: spermatozoïdes non marqués (FLICA et PI remplacés par du PBS), permettant la détection de la fluorescence non spécifique ; spermatozoïdes incubés uniquement avec le FLICA et spermatozoïdes incubés uniquement avec le PI pour effectuer la compensation électronique.

La concordance inter-méthode (microscopie à fluorescence vs. cytométrie en flux) a été analysée à partir de mesures effectuées sur des spermatozoïdes éjaculés congelés-décongelés.

→ **Détection de l'expression des caspases activées par *western blot***

Après décongélation et lavage (14000g, 5min., température ambiante) de l'échantillon à analyser, pour extraire les protéines, les cellules ont été resuspendues dans un tampon de lyse RIPA (Radio Immuno Precipitation Assay buffer, composition en annexe III) supplémenté en inhibiteur de protéases (Complete Mini EDTA free, Roche, France) et inhibiteur de phosphatases (Phosphatases inhibitor cocktail 2, Sigma, France). Après deux heures d'incubation à 100°C et sous agitation, le lysat a été soumis à une sonication. Puis, après incubation sur glace de 30 minutes, homogénéisation et centrifugation (14 000g, 10 min., 10°C), l'extrait protéique a été soit aliquoté et conservé à -20°C, soit immédiatement

Spécificité	Fournisseur	Espèce	Dilution
Caspase 3	Jackson Immuno Research	lapin	1/10 000
Caspase 8	Chemicon International	souris	1/2000
Caspase 9	Chemicon International	Souris	1/2000

Tableau 4 Anticorps secondaires utilisés pour la détection des caspases -3, -8 et -9 activées

traité. Les protéines ont été précipitées par une solution d'acide trichloracétique 20% (30 min. à 4°C). Après centrifugation (14000g, 5 min., 10°C), les protéines ont été dénaturées par chauffage à 100°C pendant 5 minutes dans du tampon de Laemmli (composition en annexe III), puis ont été déposées et soumises à une migration dans un gel de concentration (SDS PAGE 3%, 15min, 80V) puis dans un gel de séparation (SDS PAGE 12%, 45min, 100V). Pour déterminer les poids moléculaires des protéines en fonction de leur migration, des protéines de poids moléculaires connus ont été utilisées (SDS-PAGE molecular weight standards broad range, Biorad) et traitées de la même façon que les extraits protéiques analysés. Après transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose (dont l'efficacité a été vérifiée par une coloration au Rouge Ponceau), celle-ci a été saturée une nuit à 4°C dans une solution de lait écrémé lyophilisé diluée (8%) dans du tampon Tris Buffer Saline contenant 0,1% de Tween 20 (TTBS, composition en annexe III). Les anticorps primaires, utilisés aux dilutions indiquées dans le Tableau 3, ont été mis en contact avec la membrane pendant 2 heures, à température ambiante et sous agitation constante. Après 3 lavages dans du TTBS, la membrane a été incubée pendant 2 heures à température ambiante avec l'anticorps secondaire approprié (Tableau 4) puis révélée par le kit ECL (Amersham, Bioscience, France) selon les recommandations du fournisseur (Amersham, Bioscience, France). Les bandes spécifiques protéiques ont été visualisées sur film photographique.

Pour chaque anticorps primaire, un contrôle positif a été réalisé sur un extrait protéique de cellules somatiques appropriées (Tableau 3). La spécificité de chaque anticorps secondaire a été testée en supprimant l'incubation préalable avec l'anticorps primaire. Toutes les membranes analysées ont été immunodétectées secondairement par l'utilisation d'un anticorps murin anti- α tubuline (Monoclonal anti- α tubuline, Sigma 1/50 000^e) afin de contrôler la quantité des dépôts protéiques.

4.1.2 L'externalisation de la phosphatidylserine

L'externalisation de la PS des spermatozoïdes a été détectée par sa liaison spécifique à l'annexine V. L'utilisation simultanée de l'annexine V (AN), couplée à un fluorochrome vert (FITC) et d'un colorant vital à fluorescence rouge (Propidium Iodide, PI) a permis de caractériser 4 types de spermatozoïdes :

- Aucun marquage du spermatozoïde, uniquement vu en microscopie optique en lumière visible (AN-/PI-) : spermatozoïde vivant et intact.
- Marquage en rouge du spermatozoïde (AN-/PI+) : spermatozoïde mort sans externalisation de la PS.
- Marquage en vert du spermatozoïde (AN+/PI-) : spermatozoïde vivant avec une externalisation de la PS.
- Marquage en rouge et vert du spermatozoïde (AN+/PI+) : spermatozoïde mort avec une externalisation de la PS.

Dans notre travail, cette technique a été appliquée uniquement à des prélèvements de spermés frais (publication n°3).

Pour cette mesure 1µl d'annexine V-FITC (Sigma, France) a été additionné à 0,5µl de PI dans un volume final de 100µl de solution tampon (10 mmol.l⁻¹ HEPES, 150mmol.l⁻¹ NaCl, 5mmol.l⁻¹ KCl, 1mmol.l⁻¹ MgCl₂, 1,8mmol.l⁻¹ CaCl₂) selon les recommandations du fournisseur (Sigma, France). Après dilution volume à volume du sperme avec cette préparation, la suspension cellulaire a été incubée dans le noir à température ambiante pendant 15 minutes. Puis, l'analyse a été réalisée à l'aide d'un microscope à épifluorescence (émission : 525-617nm). Pour chaque patient, un minimum de 200 spermatozoïdes ont été comptés sur au moins 5 champs différents. La variabilité intra- et inter-observateur de nos mesures était inférieure à 6%.

4.1.3 La fragmentation de l'ADN

La fragmentation de l'ADN simple et double brin a été analysée par la technique TUNEL (Terminal Uridine Nick end-Labeling) en utilisant la kit « in situ cell death detection kit » selon les recommandations du fournisseur (Roche, France). Cette technique TUNEL est basée sur l'incorporation au niveau des extrémités libres 3-hydroxyles des fragments d'ADN d'uridine marquée à la biotine ou par un fluorochrome (FITC : Fluorochrome isothiocyanate) à l'aide de l'enzyme Terminal Deoxynucleotidyltransferase (TdT). Pour permettre à la TdT de pénétrer dans les spermatozoïdes, une perméabilisation préalable à la réaction enzymatique doit être réalisée. Cette technique permet donc de mesurer tous les spermatozoïdes (vivants et morts) ayant un ADN fragmenté.

Pour chaque échantillon, des contrôles positif et négatif ont été réalisés. Pour le contrôle négatif, l'enzyme TdT a été omise. Le contrôle positif a été obtenu par l'incubation des spermatozoïdes avec 1 à 2 UI DNase I (Sigma, France) pendant 15 minutes à 37°C dans du tampon Tris-HCl avant la réaction de marquage.

Deux types de détection ont été appliqués selon le type de marquage : une détection colorimétrique par microscopie optique ; une détection en fluorescence par microscopie à épifluorescence.

→ Détection colorimétrique.

Après lavage centrifugation (500g, 5 min., température ambiante) dans du PBS, $1,5 \cdot 10^6$ spermatozoïdes éjaculés ont été fixés durant 48 heures minimum dans une solution acide acétique : méthanol (1:3) à -20°C. Puis, la suspension cellulaire a été étalée sur une lame recouverte de polylysine. Après perméabilisation dans du citrate de sodium (0,1M) pendant 30 minutes à 70°C, les spermatozoïdes ont été recouverts de la solution de marquage contenant l'enzyme (TdT) et le nucléotide (dUTP marqué à la streptavidine) fournis dans le kit et la coloration a été réalisée en utilisant une solution de phosphatase alcaline et NBT

BCIP (NitroBlue Tetrazolium-5-Bromo-4-Chloro-3-Idolyl Phosphate) (Roche, Belgique). Les lames ont été ensuite contrecolorées au vert de méthyl avant d'être observées en microscopie optique à l'objectif $\times 400$. Pour chaque échantillon, la lecture d'un minimum de 400 spermatozoïdes a été réalisée.

→ Détection par fluorescence

Après lavage centrifugation (500g, 5 min., température ambiante, PBS), $1,5 \cdot 10^6$ spermatozoïdes ont été fixés dans une solution de paraformaldéhyde 2% (Sigma, France) pendant 30 minutes à température ambiante. Après lavage dans du PBS, les spermatozoïdes ont été resuspendus dans une solution de perméabilisation contenant 0,1% de Triton-X dans 0,1% de sodium citrate durant 3 minutes dans de la glace. Après lavage (500g, 5 min, température ambiante), la réaction de marquage est réalisée par l'incubation d'une heure à 37°C des spermatozoïdes dans 100 μl d'une solution contenant 50 μl de la solution enzymatique (Tdt, Roche, France) et 50 μl de la solution de marquage (dUTP, Roche, France) fournies dans le kit. Puis, la suspension cellulaire est lavée dans du PBS et contremarquée par du Propidium Iodide (2mg.ml⁻¹) afin de contrôler l'efficacité de la perméabilisation. L'analyse par cytométrie en flux a été réalisée sur un minimum de $2 \cdot 10^4$ spermatozoïdes en utilisant un cytomètre en flux Coulter Epics XL. Les fluorochromes ont été excités à une longueur d'onde de 488nm par un laser argon. Les fluorescences verte (FITC) et rouge (PI) ont été respectivement détectées en FL1 par un filtre de bande passante de 525nm et en FL3 par un filtre de bande passante de 620nm. Les signaux de fluorescence détectés par FL1 et FL3 ont été enregistrés après amplification logarithmique et le pourcentage de cellules marquées a été calculé par le logiciel du cytomètre en flux (Coulter, France). Avant l'analyse des échantillons à analyser, 2 types d'échantillon ont été mesurés successivement pour le réglage du cytomètre: spermatozoïdes non marqués, permettant la détection de la

fluorescence non spécifique ; spermatozoïdes utilisés comme contrôle positifs pour effectuer la compensation électronique.

4.2 Analyse ultrastructurale

L'analyse ultrastructurale des spermatozoïdes a été réalisée par microscopie électronique à transmission. Pour cela, nous avons bénéficié de la plateforme du centre d'imagerie cellulaire santé de l'Institut Fédératif de la Recherche santé, Auvergne, Clermont Ferrand.

Après décongélation, les spermatozoïdes ont été fixés dans une solution de tampon cacodylate contenant du glutaraldéhyde (1,6%) et du rouge ruthénium (0,09%) à 4°C pendant 2 heures. Les spermatozoïdes ont ensuite été lavés dans du tampon cacodylate (0,2M; pH 7,4), post-fixés pendant 1 heure à 4°C dans du tampon osmium tetroxide, puis déshydratés et inclus en résine epon Araldite. Des coupes ultrafines ont été réalisées à l'aide d'un ultramicrotome (UC6, Leica, Allemagne), montées sur des grilles de cuivre et marquées avec de l'acétate d'uranyl et du citrate de plomb. Elles ont été observées avec un microscope électronique à transmission (Hitachi, Elexience, France) et photographiées avec une caméra numérique (Hamamatsu, 1024×1024 pixels). Pour chaque patient, un minimum de 200 spermatozoïdes a été analysé par deux observateurs différents (La variabilité inter- et intra-observateur est inférieure à 6%).

Les spermatozoïdes observés ont été classés selon des critères décrits par Baccetti *et al.*, (Baccetti *et al.*, 1996; Baccetti *et al.*, 2002b ; Baccetti *et al.*, 2005) portant sur l'évaluation des différents éléments constituant leur ultrastructure (noyau, membrane plasmique, cytoplasme, acrosome, axonème, mitochondries):

- Spermatozoïde intact.

L'analyse révèle que les différents éléments constituant l'ultrastructure du spermatozoïde sont normaux et intacts.

- Spermatozoïde immature.

Noyau: enveloppe irrégulière, peut être bi- ou multinucléé. Présence de résidu cytoplasmique important. Membrane plasmique intacte. Acrosome: absent ou anormalement court ou à contours irréguliers. Gaine mitochondriale désorganisée. Axonème désorganisé avec fréquemment une absence des tubules centraux et/ou avec des doublets de microtubules sans bras de dynéine ou avec des bras de dynéine incomplets.

- Spermatozoïde apoptotique.

Noyau avec enveloppe irrégulière et chromatine marginalisée. Possibilité de résidu cytoplasmique important. Membrane plasmique intacte. Acrosome déformé. Gaine mitochondriale désorganisée. Axonème désorganisé avec fréquemment une absence des tubules centraux et/ou avec des doublets de microtubules sans bras de dynéine ou avec des bras de dynéine incomplets.

- Spermatozoïde nécrotique.

Noyau: enveloppe irrégulière voire rompue, chromatine nécrotique. Absence de reste cytoplasmique. Membrane plasmique rompue. Acrosome absent ou déformé. Gaine mitochondriale désorganisée. Axonème désorganisé avec fréquemment une absence des tubules centraux et/ou avec des doublets de microtubules sans bras de dynéine ou avec des bras de dynéine incomplets.

5. Analyse de la ségrégation méiotique

Les spermatozoïdes éjaculés des patients porteurs d'une translocation chromosomique ont été analysés par la technique d'hybridation in situ par fluorescence (FISH) pour évaluer le pourcentage de spermatozoïdes issus de différents modes de ségrégation méiotique.

Nous n'avons pas directement participé à cette analyse qui a été réalisée d'une part par le laboratoire de cytogénétique du centre hospitalier universitaire libre néerlandophone de Bruxelles (Pr I. Lieabers, Dr E. Van Assche) et par le laboratoire de biologie de la reproduction du CHU de Montpellier (Dr F. Pellestor).

→ **La méthode utilisée pour l'étude des patients porteurs d'une translocation Robertsonienne ou réciproque et rapportée dans la publication n°3 dans la partie résultats** a été décrite par Van Aasche *et al.*, 1999. Les spermatozoïdes congelés/décongelés ont été initialement fixés dans une solution acide acétique : méthanol (1:3) à -20°C puis étalés sur lames microscopiques (Superfrost Plus, Kindler GmbH, Allemagne). Après 2 lavages dans une solution 2X de Sodium chloride/Sodium Citrate (SSC), la décondensation nucléaire des têtes spermatiques a été réalisée par incubation des lames durant 5 minutes dans du tampon Tris (1mol.l⁻¹, pH 9,5) contenant du dithiothreitol (25 mmol.l⁻¹). Les lames ont été ensuite lavées dans une solution SSC (2X) puis dans du tampon PBS avant d'être déshydratées dans une série de bain d'éthanol et laissées sécher à l'air libre.

Le choix des sondes utilisées pour l'hybridation a été déterminé au préalable selon le type de la translocation et la localisation des points de cassure chromosomiques. Les sondes ont été utilisées selon les recommandations du fournisseur (Vysis, Abbot, Belgique). Pour les translocations réciproques, 3 sondes différentes s'hybridant de part et d'autre des points de cassure ont été choisies pour détecter les différentes combinaisons possibles de ségrégation méiotique. Pour détecter une seule combinaison de spots spécifique de chaque mode de ségrégation chromosomique possible, les sondes utilisées correspondaient à une ou deux

sondes centromériques et une télomérique ou locus spécifique (Figure 1a, Brugnon *et al.*, 2006). Afin de visualiser les noyaux, une contre-coloration au 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) a été réalisée.

Pour les translocations Robertsoniennes, les sondes utilisées étaient télomériques ou régions spécifiques pour les chromosomes 13, 14, 21 et 22 (Figure 1b de la publication n°3). Pour le chromosome 15, une sonde centromérique a été utilisée si aucun polymorphisme n'était présent. Si un polymorphisme existait, une sonde locus spécifique ou subtélomérique a été utilisée. Afin de visualiser les noyaux, une contre-coloration au DAPI a été réalisée.

→ **Pour l'étude des spermatozoïdes de patients porteurs d'une translocation Robertsonienne rapportée dans la publication n°4**, la méthode utilisée a été décrite au préalable par Moradkhani *et al.*, 2006. Après fixation dans une solution acide acétique : méthanol (1:3) à -20°C pendant une heure, les prélèvements de spermatozoïdes éjaculés ont été déposés sur lame microscopique et laissés sécher à l'air libre au moins pendant 2 jours. Avant la procédure d'hybridation, les lames ont été immergées pendant 10 minutes dans une solution de pepsine (50 ng.ml⁻¹) diluée de l'acide chlorhydrique (0,01 M) à 37°C puis lavées dans du PBS (2 minutes, température ambiante), déshydratées dans une série de bains d'éthanol (70, 90 et 100%) puis laissées séchées à l'air. La décondensation des noyaux spermatiques et la dénaturation de l'ADN ont ensuite été réalisées par une incubation de 8 minutes dans une solution de soude (0,5 M) à température ambiante des lames de spermatozoïdes fixés, suivi d'un lavage dans du SCC (2X). Les lames ont ensuite été déshydratées dans une série de bains d'éthanol (70, 90 et 100%) et incubées dans une solution de formamide (70%)/SCC 2 X durant 3 minutes à 73°C, puis lavées dans du SCC (2 X) et déshydratées dans une série de bain d'alcool.

Le marquage fluorescent *in situ* a été réalisé selon les recommandations du fournisseur (Vysis, Abbott, France) par l'utilisation de combinaison de sondes commerciales. Ce sont des

sondes de peinture chromosomique (WCP : Whole Chromosome Painting probe) spécifiques des chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22 marquées avec du Spectrum orange ou vert. Après dénaturation à 75°C pendant 5 minutes, les solutions contenant les combinaisons de deux sondes ont été déposées sur les lames de spermatozoïdes dénaturés au préalable. Après hybridation (une nuit, 37°C, chambre humide, à l'obscurité), les lames ont été lavées dans une solution (pH :7) de SSC (0,4 X)/NP40 (0,3%) pendant 2 minutes à 72°C puis dans du SSC (2 X)/NP40 (0,1%) pendant une minute à température ambiante. Afin de visualiser les noyaux, une contre-coloration au DAPI a été réalisée.

Pour les deux études (publications n^{os} 3 et 4), la lecture des lames a été réalisée par deux observateurs indépendants. Seuls les noyaux individualisés et bien délimités, ne présentant pas de chevauchement ont été comptés. Le nombre compté était dépendant de la concentration initiale de spermatozoïdes. La spécificité des sondes a été testée au préalable par une hybridation avec des cellules lymphocytaires sanguines d'hommes sains présentant un caryotype normal (46,XY).

6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel StatView, SAS Institute, Cary, NC, 1998.

Les résultats sont présentés sous forme de médiane ou de pourcentage.

Les comparaisons entre deux groupes de valeurs ont été menées en appliquant des tests de rang non paramétriques compte-tenu du faible effectif de patients (test de Wilcoxon ou test de Mann-Whitney). Les comparaisons de pourcentages observés (publication n^o2) ont été réalisées par un test χ^2 avec correction de Yates et test exact de Fisher.

Les corrélations ont été analysées par le test non paramétrique de Spearman.

Pour tous les calculs et les corrélations, deux groupes de valeurs ont été considérés comme significativement différents si $p < 0,05$.

Pour apprécier l'efficacité de deux méthodes de détection de l'expression des caspases activées et de la vitalité des spermatozoïdes (microscopie à fluorescence et cytométrie en flux), nous avons évalué la concordance intra- et inter-observateur et la concordance inter-méthode (publication n°1) selon la méthode de Bland and Altman, 1986, et avons calculé pour chaque analyse le coefficient de corrélation intra-classe (Coefficient Correlation intra-Class : ICC)

La concordance était considérée comme faible si $ICC < 0,04$; bonne si $0,4 \leq ICC < 0,75$; excellente si $ICC \geq 0,75$.

Résultats

Les résultats sont présentés sous forme de publications.

Publication n°1

Brugnon F, Ouchchane L, Verheyen G, Communal Y, Van der Elst J, Tournaye H, Janny L and Grizard G (2007) Fluorescence microscopy and flow cytometry in measuring activated caspases in human spermatozoa. Int J Androl, 30, 1-9.

Publication n° 2

Brugnon F, Janny L, Artonne C, Sion B, Pouly JL and Grizard G (2008) Activated caspases in thawed epididymal and testicular spermatozoa of patients with congenital bilateral absence of the vas deferens and intracytoplasmic sperm injection outcome. Fertil Steril, Epub ahead of print.

Publication n° 3

Brugnon F, Van Assche E, Verheyen G, Sion B, Boucher D, Pouly JL, Janny L, Devroey P, Liebaers I and Van Steirteghem A (2006) Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. Hum Reprod 21, 685-693.

Publication n° 4

Brugnon F, Janny L, Communal Y, Darcha C, Szcapaniak C, Pellestor F, Vago P, Pons-Rejraji H, Artonne C and Grizard G. (2008) Apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of Robertsonian translocation carrier patients. Manuscrit en préparation.

Publication n°1

Fluorescence microscopy and flow cytometry in measuring activated caspases in human spermatozoa.

Brugnon F, Ouchchane L, Verheyen G, Communal Y,

Van der Elst J, Tournaye H, Janny L and Grizard G (2007)

Int J Androl, 30, 1-9.

Présentation de la publication n°1

Chez l'homme, les difficultés pour réaliser la mesure des marqueurs d'apoptose, notamment l'expression des caspases activées, sont liées à la faible quantité de spermatozoïdes disponible, en particulier dans les cas d'oligozoospermie, et à l'hétérogénéité des populations cellulaires. Une validation des techniques utilisées sur différents types de prélèvements spermatiques (testicule, épididyme et éjaculat) s'est donc avérée nécessaire.

L'utilisation combinée d'un inhibiteur spécifique des caspases activées (Casp), couplé à un fluorochrome vert (FAM-VAD-fmK : inhibiteur fluorescent de la majorité des caspases activées) et d'un colorant vital émettant une fluorescence rouge (Propidium Iodide, PI) permet de détecter *in cellulo* l'expression des caspases activées dans les spermatozoïdes en différenciant les spermatozoïdes vivants et morts.

La détection des cellules marquées peut se faire par cytométrie en flux ou par microscopie à fluorescence et nécessite peu de spermatozoïdes (au minimum 600 000 spermatozoïdes). La cytométrie en flux est une technique automatisée et rapide permettant l'analyse de plusieurs milliers de cellules. A l'opposé, la microscopie à fluorescence est une technique observateur dépendante, longue, permettant l'analyse au mieux de quelques centaines de cellules. Néanmoins, avec cette méthode, le type cellulaire marqué peut être facilement caractérisé et de ce fait, la microscopie à fluorescence peut s'appliquer aux prélèvements de spermatozoïdes testiculaires, épидидymaires ou éjaculés. Elle est, en particulier, performante pour les prélèvements testiculaires où la cytométrie en flux ne permet pas une distinction entre les spermatozoïdes et les cellules (germinales et/ou somatiques).

La validité de ces techniques a été vérifiée par une analyse de concordance. Les coefficients de corrélation intra-classe montrent une bonne reproductibilité des mesures en microscopie à fluorescence et une bonne concordance des deux techniques. Toutefois, il existe une différence significative des quantités de spermatozoïdes marqués par le FAM-

VAD-fmk entre les deux modes de détection. Les valeurs mesurées en microscopie à fluorescence sont plus faibles que celles mesurées en cytométrie en flux. Ces données impliquent que seuls des résultats obtenus par la même technique de détection (cytométrie en flux ou microscopie à fluorescence) peuvent être comparés.

ORIGINAL ARTICLE

Fluorescence microscopy and flow cytometry in measuring activated caspases in human spermatozoa

F. Brugnon,^{*†} L. Ouchchane,^{‡§} G. Verheyen,[¶] Y. Communal,^{**} J. Van der Elst,[¶] H. Tournaye,[¶] L. Janny[†] and G. Grizard^{*†}

^{*}Université Clermont 1, UFR Médecine, EA 975, Laboratoire de Biologie de la Reproduction, France, [†]CHU Clermont-Ferrand, Biologie du Développement et de la Reproduction, CECOS, Hôtel Dieu, France, [‡]Université Clermont 1, UFR Médecine, Laboratoire de Biostatistiques, Télématique et Traitement d'Image, France, [§]CHU Clermont-Ferrand, Département de Santé Publique, Unité de Biostatistiques, Télématique et Traitement d'Image, France, [¶]Centre for Reproductive Medicine, UZ Brussel, Belgium, and ^{**}Centre Jean Perrin, laboratoire d'immunologie, Clermont Ferrand, France

Summary

Staining of spermatozoa with the fluorescein-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone has already been performed on ejaculated sperm samples, using fluorescence microscopy (FM) or flow cytometry (FCM) in order to score activated caspases. This assay may help in assessing apoptosis and its role in male fertility. The present study compares the above two techniques in order to adopt the most accurate method for detection in human frozen-thawed testicular, epididymal and ejaculated spermatozoa. The analyses were carried out on frozen/thawed testicular ($n = 14$), epididymal ($n = 8$) and ejaculated ($n = 10$) sperm samples. Activated caspases were detected in living spermatozoa using fluorescein-labelled inhibitors of poly-caspases (FLICA). For the measurements by FM, the same-observer and different-observer reliability were assessed in testicular and epididymal sperm samples. The inter-method (FM and FCM) reliability was assessed both in epididymal and ejaculated sperm samples. The reliability was evaluated by intraclass correlation coefficient (ICC) and the differences between paired measurements from the same sample were tested by Wilcoxon test for matched pairs. For the same-observer and the different-observer data, the ICC were 0.980 and 0.986. In testicular suspensions, the presence of different types of germinal and somatic cells hampers the differentiation of stained spermatozoa by FCM. For the inter-method reliability, the ICC was 0.903. A lower proportion of the viable spermatozoa stained with FLICA was observed by using FM (-6.60 ± 7.38 %, mean \pm SD; $p = 0.003$) compared with FCM. To measure the proportion of spermatozoa with activated caspases by this test, FM is a highly accurate and reliable method whatever the sperm origin (ejaculate, epididymis, and testis). FCM cannot be used for testicular samples but seems to be more appropriate for analysis of epididymal and ejaculated sperm samples. The systematic lower proportion by FM in measuring the proportion of stained viable spermatozoa with FLICA involves that only the data measured by the same method (FM or FCM) may be compared.

Keywords:

apoptosis, caspase, flow cytometry, fluorescence microscopy, reliability, spermatozoa

Correspondence:

Florence Brugnon, Université Clermont 1, UFR Médecine, EA 975, Laboratoire de Biologie de la Reproduction, F-63001 Clermont Ferrand Cedex 1, France. E-mail: fbrugnon@chu-clermontferrand.fr

Received 20 August 2007; revised 29 October 2007; accepted 2 November 2007

doi:10.1111/j.1365-2605.2007.00847.x

Introduction

It has been hypothesized that an altered apoptotic process may be closely associated with male infertility. However,

it is unclear so far whether the process of apoptosis in spermatozoa and somatic cells occurs in a similar way and whether ejaculated spermatozoa undergo the abortive form of this process, which would be initiated in the

testis (Lin *et al.*, 1997; Sakkas *et al.*, 2002; Brugnon *et al.*, 2006). Further investigations are needed in order to evaluate the phenomenon of apoptosis in human spermatozoa at different levels of the genital tract.

A central component of the apoptotic machinery involves a family of aspartic acid-directed cysteine proteases called caspases (Cohen, 1997; Salvesen & Dixit, 1997). The process of the activation of caspases is considered to be the key event of apoptosis (Nicholson, 1999; Fischer *et al.*, 2003). The identification of the dynamic process of caspases' activation in spermatozoa during their transit in the male genital tract may lead to a better understanding of some aspects of male-factor fertility. Therefore, it is interesting to measure the proportion of spermatozoa with activated caspases not only in the ejaculated but also in the testicular, and the epididymal samples from men with active and impaired spermatogenesis.

Recently, measurements of activated caspases in living ejaculated spermatozoa were performed using a cell-permeable fluorescent derivative of the inhibitor peptide VAD-fmk by detection with fluorescence microscopy (FM) (Weng *et al.*, 2002; Marchetti *et al.*, 2004) or flow cytometry (FCM) (Paasch *et al.*, 2004; Grunewald *et al.*, 2005). This test would permit to evaluate sperm quality (Shen *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2004) and sperm fertilizing capacity (Marchetti *et al.*, 2004). To our knowledge, the measurement of activated caspases has never been applied in human epididymal and testicular spermatozoa. Moreover, the accuracy and the reliability of the measurement by these two detection methods have not yet been compared in spermatozoa.

It seems that readings of stained spermatozoa with fluorescein-labelled inhibitors of poly-caspases (FLICA) and vital staining by FM may be performed in all sperm samples whatever their origin (testicular, epididymal, and ejaculate). However, FM is a time-consuming technique, needs to be performed by an experienced and qualified observer, and involves time limits with a limited number of analysed cells. Assays based on FCM are particularly well adapted for clinical purposes because they provide a rapid and objective analysis of extensive numbers of spermatozoa in ejaculated sperm samples (Perticarari *et al.*, 2006). Nevertheless, FCM is available to analyse stained samples with cells differentiated by their size and content. Taking into account the diversity of somatic and germinal cells with similar size and content parameters in testicular tissue, the usefulness of FCM to assess the activated caspases in extracted testicular spermatozoa is questionable. Therefore, the objective of this study was to assess the accuracy and the reliability of FM and FCM methods in the detection of activated caspases by using specific fluorochrome-labelled inhibitor detecting of activated caspases in viable human ejaculated, epididymal and testicular spermatozoa.

Material and methods

Samples and patients

Testicular ($n = 14$) and epididymal ($n = 8$) sperm samples analysed in this study were derived from patients with obstructive azoospermia. Azoospermia was diagnosed in the ejaculate based on the criteria of the World Health Organization (WHO, 1999) and confirmed in a second ejaculate 3 months later. Testicular volume and serum hormone levels of follicle-stimulating hormone and testosterone were normal for all patients.

The men underwent testicular sperm extraction (TESE) by open testis biopsy retrieval [mean age 39.0 ± 3.2 years (mean \pm SD)] or microsurgical epididymal sperm aspiration (MESA) [mean age 38.0 ± 2.7 years (mean \pm SD)] before sperm freezing.

In addition, frozen/thawed ejaculated samples ($n = 10$) with normal semen parameters (WHO, 1999) of fertile donors (mean age 33.0 ± 3.2 years (mean \pm SD)) were analysed for this study.

The patients belonged to couples referred to the Centre for Reproductive Medicine of the University Hospital of Clermont Ferrand (France) or to the Centre for Reproductive Medicine of the Universitair Ziekenhuis Brussel (Belgium). Written consent was obtained from all the patients.

Surgical sperm retrieval

Testicular and epididymal sperm retrieval was performed under general anaesthesia. Epididymal spermatozoa were aspirated by MESA from the most proximal part of the caput of the epididymis (Tournaye *et al.*, 1997). When MESA did not provide sufficient motile spermatozoa for intra cytoplasmic sperm injection (ICSI), or when the status of the epididymis did not allow sperm collection, testicular spermatozoa were extracted (TESE) from an open biopsy (Vernaev *et al.*, 2006).

Large numbers of epididymal and testicular spermatozoa were collected, reflecting a presumably ongoing spermatogenesis.

Freezing and thawing technique

After dilution with cryoprotective medium containing glycerol as cryoprotectant, the sperm (testicular, epididymal or ejaculated) samples were loaded into straws and frozen according to standard protocols. Afterwards, they were plunged into liquid nitrogen.

The straws were thawed at 37°C for 3 min. After gentle addition of Earle's medium, the removal of cryoprotectant was carried out by a washing procedure (500 μl , 5 min, room temperature).

Detection of activated caspases in spermatozoa

FAM-VAD-fmk, a cell-permeant fluorochrome-derivate of caspase inhibitor Val-Ala-Asp-fluoromethylketone, was used to detect the proportion of spermatozoa with activated caspases in frozen/thawed sperm samples. This non-cytotoxic fluorescent caspase inhibitor (FLICA) binds covalently and irreversibly to many activated caspases (caspase 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, and 9) (Ekert *et al.*, 1999). Therefore, it can be used as a generic probe for the detection of most caspases. The fluorogenic substrate becomes fluorescent upon cleavage by the caspases (Vaux & Korsmeyer, 1999). The inhibitor was used with the appropriate controls according to the instruction manual of the manufacturer (Apoptosis detection kit caspase assay, Serotec, France). As the nuclear and plasma membranes of dead cells are also damaged, the assay combines the inhibitor staining with Propidium Iodide (PI; Sigma, L'isles d'Abeau Chenes, France) in order to assess viability.

A 150-fold stock solution of the inhibitor was prepared in dimethyl sulfoxide and stored at -20°C . It was further diluted in phosphate-buffered saline (PBS) to make a 30-fold working solution ($10\ \mu\text{L}$). Spermatozoa (3×10^5 spermatozoa) were exposed to $10\ \mu\text{L}$ of the working solution and the incubation was performed in $300\ \mu\text{L}$ of PBS at 37°C under $5\%\text{CO}_2$ for 1 h.

Human neutrophils (5×10^6 cells), whose apoptosis was induced after treatment with 1 mM cycloheximide for 6 h, were used as positive controls of the staining (Parvathenani *et al.*, 1998; Weng *et al.*, 2002). The negative controls were processed by replacing the FLICA with $10\ \mu\text{L}$ of PBS (Sigma) to assess the auto-fluorescence of

unstained spermatozoa. After incubation, the samples were washed with the rinse buffer (400 g, 5 min, room temperature) provided with the kit and the vital staining by PI ($10\ \mu\text{g mL}^{-1}$) was performed in the dark, at room temperature, for 15 min. After labelling, all samples were analysed by FM and/or FCM.

For FM, the analysis of the sample was performed by conventional epifluorescent microscopy (excitation: 450–490 nm; emission: 525–617 nm). Carboxyfluorescein (FAM-VAD-fmk) of the FLICA was observed as green-coloured and PI as red-coloured fluorescence. A minimum of four hundred spermatozoa was randomly assessed per slide in at least five fields.

Four patterns of fluorescence were measured (Fig. 1):

- (1) Viable spermatozoa without staining of activated poly-caspases: Casp $-$ /PI $-$ (only observed with bright-light microscopy).
- (2) Dead spermatozoa without staining of activated poly-caspases: Casp $-$ /PI $+$ (red).
- (3) Viable spermatozoa with staining of activated poly-caspases (early apoptotic spermatozoa): Casp $+$ /PI $-$ (green).
- (4) Dead spermatozoa with staining of activated poly-caspases (late apoptotic spermatozoa) Casp $+$ /PI $+$ (red and green).

Flow cytometry was performed using the flow cytometer Coulter Epics XL. A minimum of 20 000 spermatozoa was examined for each assay. The sperm population was gated using a 90-degree and forward-angle light scatter to exclude debris and aggregates. The selection of the area corresponding to spermatozoa was determined beforehand by the analysis of purified thawed spermatozoa recovered

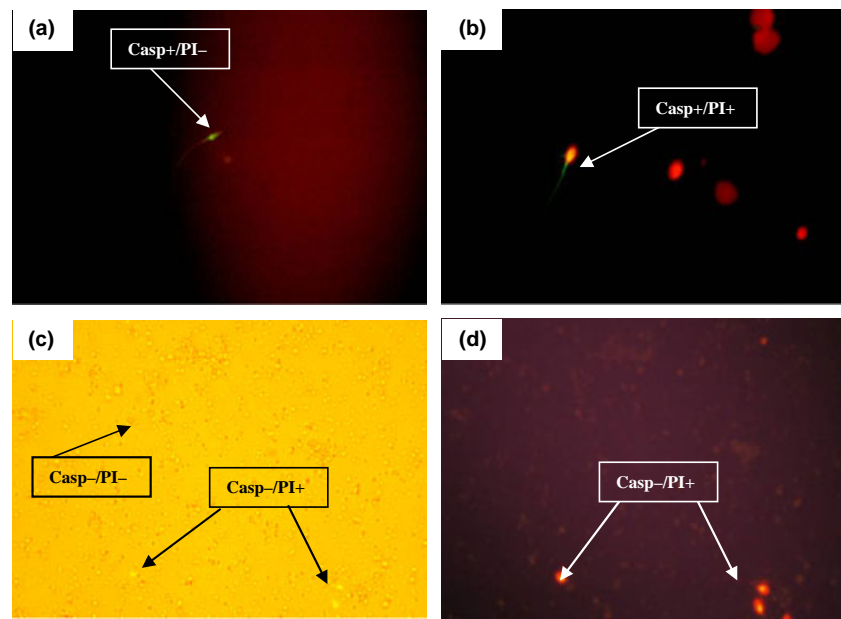


Figure 1 Staining patterns in human thawed epididymal (a) and testicular (b, c, d) sperm observed by fluorescence microscopy (FM) after combined staining by fluorescent inhibitor of activated caspases (FLICA, FAM-VAD-fmk, green) and Propidium iodide (PI, red). (a) Viable spermatozoa with staining of activated poly-caspases (early apoptotic spermatozoa, Casp $+$ /PI $-$). (b) Dead spermatozoa with staining of activated poly-caspases (late apoptotic spermatozoa, Casp $+$ /PI $+$). (c and d) The same field is seen under bright (c) and FM (d). Viable (Casp $-$ /PI $-$) and dead (Casp $-$ /PI $+$) spermatozoa without staining of activated poly-caspases.

after selection on a two-step gradient (Puresperm 90% and 45%, Nidacon International). The excitation wavelength was 488 nm supplied by an argon laser. Green (FLICA) derived fluorescence and red fluorescence (PI) were detected with FL1 (525 nm) and FL3 (620 nm) detections. FL1 and FL3 fluorescence signals were recorded after logarithmic amplification and the rates of stained cells were automatically computed by the flow cytometer (Coulter, Villepinte, France). For a bicolour analysis, four types of samples were measured to set up electronic compensation and quadrant statistics: unstained sperm (FLICA replaced by PBS); sperm stained with FLICA, sperm stained with PI, sperm stained with PI and FLICA (Figs 2a and b).

Experimental design

Same-observer and different-observer reliability were assessed on FM in testicular and epididymal sperm samples, while inter-method reliability was assessed between FM and FCM in epididymal and ejaculated sperm samples (Fig. 3).

Statistical analysis

The rate of each staining pattern was considered as a continuous measurement (mean \pm SD). Differences between paired measurements from the same sample were tested by the Wilcoxon test (Sheskin, 2000). These tests were performed between the two measurements from the first expert observer for FM (same-observer discordance test for testicular samples), between the two measurements from the two different experts for FM (different-observer reliability test for epididymal samples) and between the two measurements (FCM vs. first expert observer) for each technique (inter-method discordance test between FM and FCM for epididymal and ejaculated samples). A 0.05 type I error was used as significance level.

After each of the above-mentioned discordance test, intraclass correlation coefficients (ICC) were computed to assess the same-observer reproducibility, different-observer and inter-method reliability between measurements from the same sample based on usual values to characterize poor ($ICC < 0.4$), good ($0.4 \leq ICC < 0.75$) and excellent reliability ($0.75 \leq ICC < 1$) (Smith, 1956; Bartko, 1966; Shourki & Pause, 1999). Illustrative plots of the difference between the two measurements against their mean were also displayed (Bland & Altman, 1986).

Results

Same-observer reliability for FLICA/PI staining with FM

The two measurements with FM of the same experienced observer (first expert observer) were performed on

thawed testicular spermatozoa samples ($n = 14$). The differences between these two measurements were -1.93 ± 4.41 % (mean \pm SD) for Casp $-$ /PI $-$ ($p = 0.141$), -0.29 ± 2.49 % for Casp $-$ /PI $+$ ($p = 0.750$), 2.43 ± 6.61 % for Casp $+$ /PI $-$ ($p = 0.084$) and -0.21 ± 7.30 % for Casp $+$ /PI $+$ ($p = 0.903$). None of the differences was significant. The ICCs between the two measurements were 0.910 for Casp $-$ /PI $-$, 0.886 for Casp $-$ /PI $+$, 0.960 for Casp $+$ /PI $-$ and 0.949 for Casp $+$ /PI $+$. The Bland and Altman plot regarding same-observer reliability is presented in Fig. 4.

Different-observer reliability for FLICA/PI staining with FM

The two measurements with FM of the two different observers were performed on thawed epididymal sperm samples ($n = 8$). The differences between the two measurements were -1.00 ± 2.33 % for Casp $-$ /PI $-$ ($p = 0.500$), -1.63 ± 3.78 % for Casp $-$ /PI $+$ ($p = 0.344$), -1.63 ± 4.21 % for Casp $+$ /PI $-$ ($p = 0.500$) and 4.25 ± 5.95 % for Casp $+$ /PI $+$ ($p = 0.109$). None of the differences was significant. The ICCs between the two measurements from each expert were 0.971 for Casp $-$ /PI $-$, 0.975 for Casp $-$ /PI $+$, 0.919 for Casp $+$ /PI $-$ and 0.939 for Casp $+$ /PI $+$. The Bland and Altman plot regarding different-observer reliability is presented in Fig. 5.

Inter-method reliability for FLICA/PI staining between FM and FCM

As some germinal cells and somatic cells in testicular suspensions may show morphological similarity (size and/or content), they appeared confounded and no homogeneous fluorescence peak could be individualized by FCM, which may be misleading in detecting stained spermatozoa among all other cell types (Fig. 6). Therefore, only epididymal ($n = 8$) and ejaculated ($n = 10$) samples were used to assess inter-method reliability. In our study design, the first FM measurement from the first expert observer was compared with the FCM measurement (Fig. 7).

The difference between measurements from the two methods were 3.16 ± 10.11 % for Casp $-$ /PI $-$ ($p = 0.171$), 4.15 ± 10.99 % for Casp $-$ /PI $+$ ($p = 0.105$), -6.60 ± 7.38 % for Casp $+$ /PI $-$ ($p = 0.003$) and -0.71 ± 13.12 % for Casp $+$ /PI $+$ ($p = 0.663$). The significant discordance test for Casp $+$ /PI $-$ emphasized systematic difference of this particular pattern between FM and FCM with lower results by FM. The ICCs between measurements from the two methods were 0.574 for Casp $-$ /PI $-$, 0.586 for Casp $-$ /PI $+$, 0.841 for Casp $+$ /PI $-$

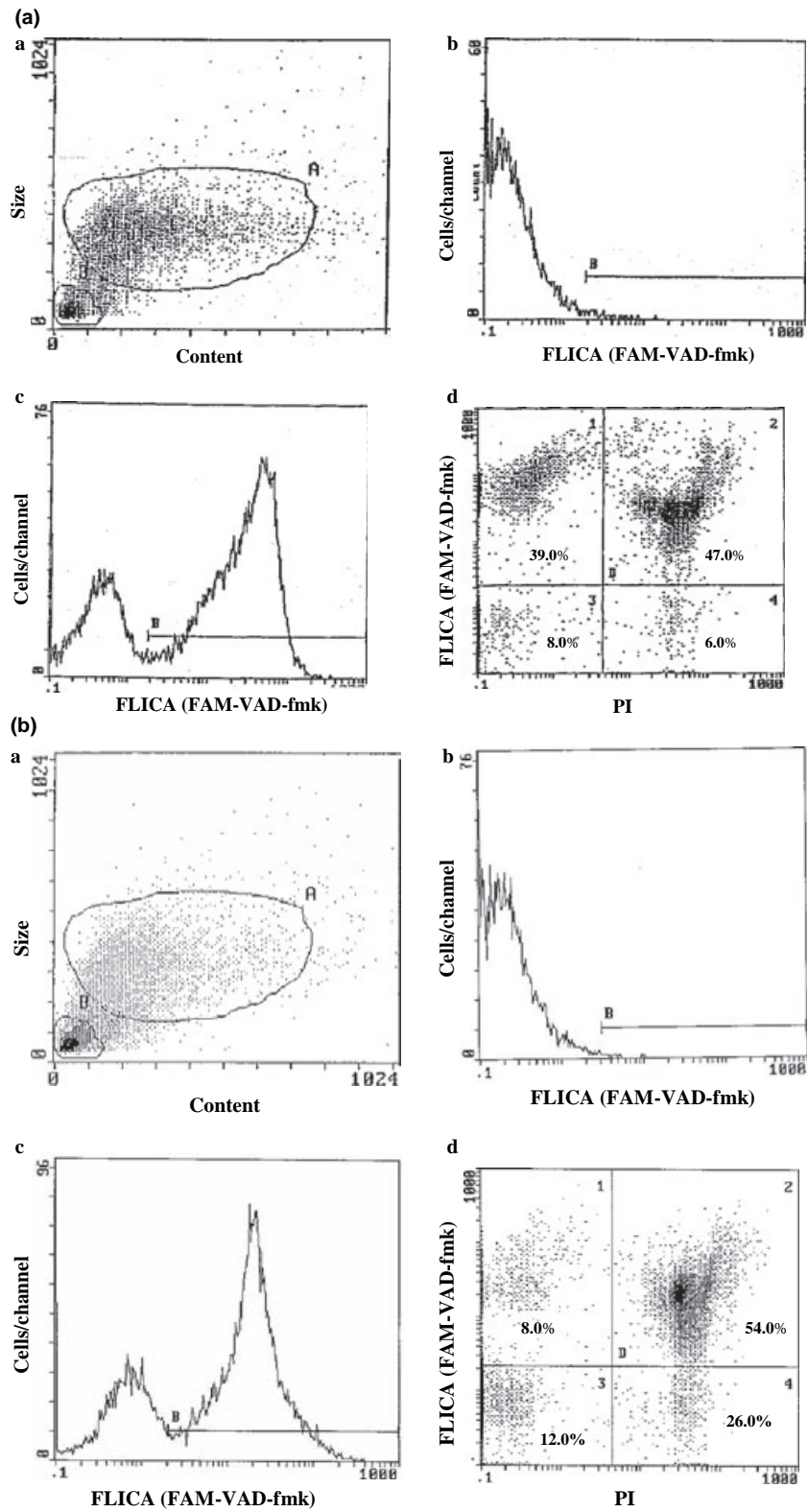


Figure 2 Detection of frozen/thawed ejaculated (a) and epididymal (b) viable spermatozoa with activated caspases by flow cytometry. (a) Detection of spermatozoa with activated caspases by flow cytometry in human frozen/thawed ejaculated sperm. (a) Size vs. content detection to select the region of spermatozoa and avoid measuring of debris. (b and c) Cytofluorometric analysis of the frequency histogram of ejaculated spermatozoa unlabelled (b) and labelled (c) by FLICA (fluorescent inhibitor of activated caspases, FAM-VAD-fmk). (d) Typical cytogram of combined staining by FAM-VAD-fmk and Propidium Iodide (PI, vital staining); the percentages of the different populations are indicated. (b) Detection of spermatozoa with activated caspases by flow cytometry in human frozen/thawed epididymal sperm. (a) Size vs. content detection to select the region of spermatozoa (a) and avoid measuring of debris (b). (b and c) Cytofluorometric analysis of the frequency histogram of epididymal spermatozoa unlabelled (b) and labelled (c) by FLICA (fluorescent inhibitor of activated caspases, FAM-VAD-fmk) (d) Typical cytogram of combined staining by FAM-VAD-fmk and propidium iodide (PI, vital staining); the percentages of the different population are indicated.

Origine of sperm samples	Fluorescence Microscopy	Fluorescence microscopy and flow cytometry
Testis	<u>Same-observer reliability</u> Two measurements from the same sample by the first expert observer	
Epididymis	<u>Different-observer reliability</u> Measurement from the same sample by the first and the second expert observer	<u>Inter-method reliability</u> Measurement by flow cytometry from the same sample read by the first expert observer with fluorescence microscopy
Ejaculate		

Figure 3 Experimental design to evaluate the same-observer and different-observer reliability with fluorescence microscopy and the inter-method reliability between fluorescence microscopy and flow cytometry for the measurement of activated caspases by a combined staining with a Fluorescent Labelled Inhibitor of Activated Caspases (FLICA; FAM-VAD-fmk) and Propidium Iodide (PI; vital staining) in human spermatozoa.

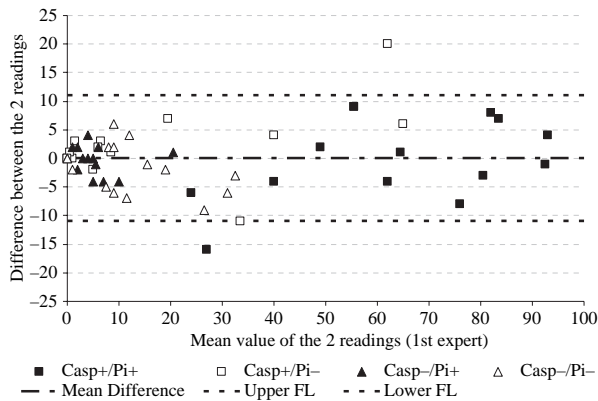


Figure 4 Same-observer reliability for FLICA/PI staining using detection with fluorescence microscopy: Bland and Altman plot of each pattern combining a staining by a Fluorescent Labelled Inhibitor of Activated Caspases (FLICA; FAM-VAD-fmk) and by Propidium Iodide (PI; vital staining) on extracted testicular spermatozoa samples ($n = 14$). Dashed lines locate the mean and the upper and lower limits of the 95 percent fluctuation interval of the difference between the two readings of the unique observer (first experienced observer).

and 0.622 for Casp+/PI+. The Bland and Altman plot regarding inter-method reliability is presented in Fig. 7.

Discussion

The current experiment was designed to assess the reliability and accuracy of FM and FCM methods to measure the proportion of viable spermatozoa with activated

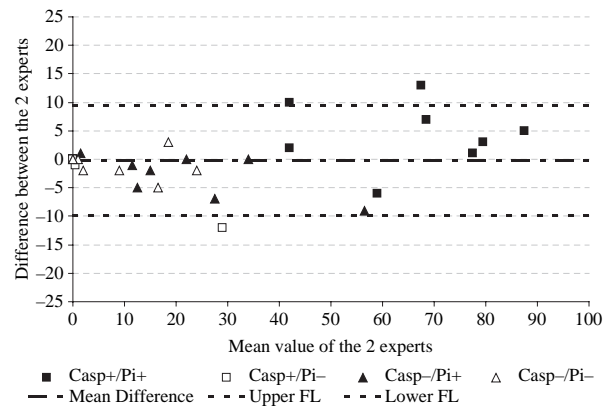


Figure 5 Different-observer reliability between the two experienced observers for FLICA/PI staining using detection with fluorescence microscopy: Bland and Altman plot of each pattern combining a staining by a Fluorescent Labelled Inhibitor of Activated Caspases (FLICA; FAM-VAD-fmk) and Propidium Iodide (PI; vital staining) on thawed epididymal sperm samples ($n = 8$). Dashed lines locate the mean and the upper and lower limits of the 95 percent fluctuation interval of the difference between the two observers.

caspases in human testicular, epididymal, and ejaculated frozen/thawed sperm samples. To our knowledge, it is the first study which analyses the reliability of these two analytical methods for a combined staining with FLICA and PI in spermatozoa. This work aimed to determine the most appropriate and reliable method for measuring apoptosis by activated caspases in human sperm, whatever the origin (testis, epididymis or ejaculate).

The detection of activated caspases in human spermatozoa was limited by the lack of positive controls for these cells. So, it is not completely sure whether all spermatozoa with activated caspases were visualized with the used method. An approved protocol to induce complete caspase activation in these cells is lacking as the molecular activation pathways in human spermatozoa are currently not clearly understood (Said *et al.*, 2004). It seems that caspase activation may be induced by specific agonists of apoptosis such as betulinic acid (Grunewald *et al.*, 2005; Perticarari *et al.*, 2006). This agonist, however, is not applicable for spermatozoa because it specifically induces only the mitochondrial apoptosis pathway in these cells. Nevertheless, the high induction of caspase activation in blood polynuclear neutrophils, already shown in previous studies (Parvathenani *et al.*, 1998; Weng *et al.*, 2002), confirms the accuracy of the staining and measures. The FLICA method is shown to be sensitive, reliable and easy to use in order to monitor the early cell apoptotic phases (Grabarek *et al.*, 2002; Vejux *et al.*, 2007). However, it has recently been demonstrated that FLICA covalently binds to a larger subunit of active caspases produced by proteolytic cleavage of the proenzyme, but the FLICA

Figure 6 Detection of activated caspases using flow cytometry and fluorescence microscopy of frozen/thawed testicular extracted sperm with the combined staining by FLICA (FAM-VAD-fmk) and propidium iodide (PI; vital staining). (a) Cytofluorometric analysis of the frequency histogram of heterogeneous labelled cells by FLICA (fluorescent inhibitor of activated caspases). (b and c) The same field is seen under bright (b) and fluorescence microscopy (c), demonstrating the heterogeneity of cells with some similarity in size and/or content in this sample.

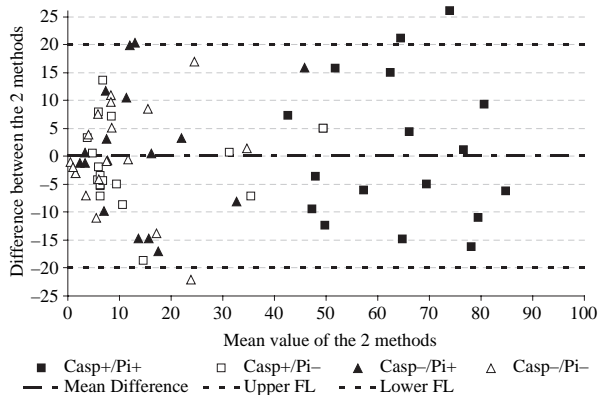
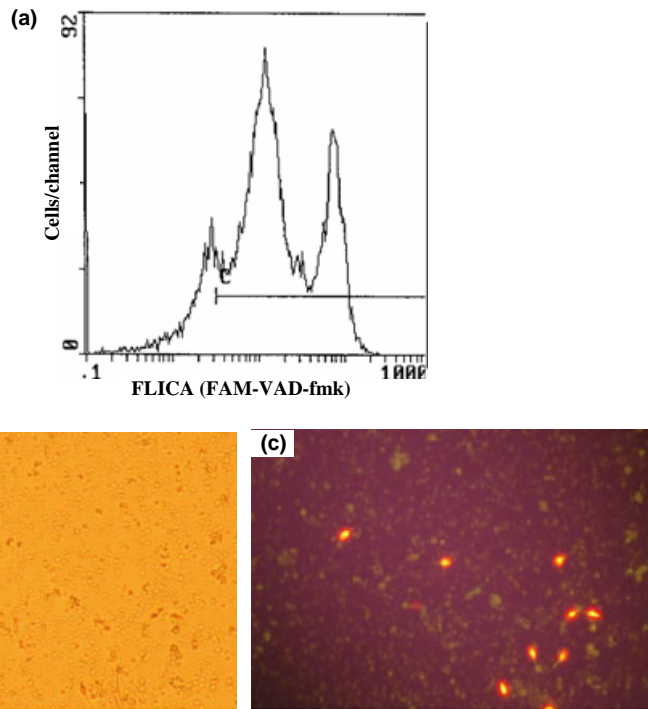


Figure 7 Inter-method reliability between the two detection methods (fluorescence microscopy and flow cytometry): Bland and Altman plot of each pattern combining FLICA (FAM-VAD-fmk) and propidium iodide (PI, vital staining) staining on thawed epididymal ($n = 8$) and ejaculated ($n = 10$) sperm samples. Dashed lines locate the mean and the upper and lower limits of the 95 percent fluctuation interval of the difference between the two methods.

signal detected with FM and/or FCM originates also from other sites (Pozarowski *et al.*, 2003; Kuzelova *et al.*, 2007). Therefore, the FLICA assay is fit for the poly-caspases analysis, but it would be prudent to support this test with other specific methods for the detection of activated caspases, such as western blot analysis and measurement of caspase activity. Moreover, to confirm that FLICA is a valuable staining for assessment of sperm apoptosis, the

combination with measurements for other markers of apoptosis may strengthen the analysis. Interestingly, previous reports (Weng *et al.*, 2002; Marchetti *et al.*, 2004) have demonstrated a positive correlation between DNA fragmentation rate and activated caspase 3 levels in human ejaculated spermatozoa.

Fluorescence microscopy being a non-automated and subjective method, it was important to assess its same-observer and different-observer reliability. As the decrease of fluorescence intensity of the fluorochromes is time-dependent and the reading by FM is time-consuming, the same-observer reliability was assessed only in testicular samples and the different-observer reliability only in epididymal samples. The excellent same-observer and different-observer reliabilities in order to detect the percentage of stained spermatozoa by FM confirm the accuracy of this method for all sperm samples irrespective of their origin. The readings, however, should be performed by experienced observers. Moreover, FM is a useful technique to distinguish stained spermatozoa from surrounding cells. It is interesting to underline that our measurements by FM are comparable to those reported by other authors (Blanco-Rodriguez & Martinez-Garcia, 1998; Weng *et al.*, 2002) and confirm that the in-situ staining by FLICA appears to be localized mainly in the cytoplasm of spermatozoa (Marchetti *et al.*, 2004).

For the purpose of assessing sperm with activated poly-caspases, FCM is a fast and automated method capable of analyzing thousands of spermatozoa, which minimizes

statistical error. These important characteristics encourage the use of this technique in sperm routine analysis. In testicular suspensions, however, the heterogeneity of cells does not allow precise measurements in spermatozoa by FCM. The absence of fluorescent markers specific for spermatozoa (Perticarari *et al.*, 2006) makes the detection of stained testicular spermatozoa for this caspase assay inaccurate. We have considered the combination with ploidy analysis for testicular samples, but this test must be performed on permeabilized cells and excludes vital staining by PI (Coskun *et al.*, 2002; Levek-Motola *et al.*, 2005). Moreover, ploidy analysis does not permit the differentiation of haploid spermatids from spermatozoa. For the above reasons, FM remains the most appropriate method in order to detect spermatozoa stained with FLICA and PI in testicular suspensions.

Despite the high reliability of both FM and FCM methods, a systematic lower proportion of the Casp+/PI- pattern by FM than FCM was observed. This possible bias may be explained by lower detection sensitivity (eye-dependent), fewer cells analysed and the duration for the reading causing fluorescence fading. This implies that only results measured either by FM or by FCM between themselves may be compared.

In conclusion, the present study defined the most appropriate method in detecting human spermatozoa with activated caspases according to their origin (testis, epididymis, and ejaculate). FM, used by an experienced observer, is a highly accurate and reliable method in detecting the proportion of live spermatozoa with activated caspases by combined staining with FLICA and PI irrespective of the sperm origin. FCM is a rapid and automated technique which seems more appropriate for routine analysis, but is only valid for epididymal and ejaculated sperm samples. However, only data measured by the same method (FCM or FM) can be compared because the absolute values may differ according to the detection technique.

The presence of activated caspases in human ejaculated spermatozoa has been demonstrated few years ago (Weng *et al.*, 2002; Marchetti *et al.*, 2004). However, the caspases' activation was never analysed so far in human epididymal and testicular spermatozoa. Further investigations of the proportion of spermatozoa with activated caspases by accurate and reliable methods in testicular, epididymis and ejaculated sperm samples from patients with normal and altered spermatogenesis would permit to understand better the physiological and pathological mechanisms involved in cascade apoptotic pathways related to male fertility.

Acknowledgement

We would like to thank Pr André Van Steirteghem and Dr Jacques Chassagne for their critical opinion about this

study, to Christine Artonne and Claudine Nouailles for their precious technical support.

References

- Bartko, J. J. (1966) The intraclass correlation coefficient as a measure of reliability. *Psychological Reports* 19, 3–11.
- Blanco-Rodriguez, J. & Martinez-Garcia, C. (1998) Apoptosis precedes detachment of germ cells from the seminiferous epithelium after hormone suppression by short term oestradiol treatment of rats. *International Journal of Andrology* 21, 109–115.
- Bland, M. J. & Altman, D. G. (1986) Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1, 307–310.
- Brugnon, F., Van Assche, E., Verheyen, G., Sion, B., Boucher, D., Pouly, J.L., Janny, L., Devroey, P., Liebaers, I. & Van Steirteghem, A. (2006) Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. *Human Reproduction* 21, 685–693.
- Cohen, G. M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal* 326, 1–16.
- Coskun, S., Tbakhi, A., Jaroudi, A., Uzumcu, M., Merdad, T. A. & Al-Hussein, K. A. (2002) Flow cytometry ploidy analysis of testicular biopsies from sperm-negative wet preparations. *Human Reproduction* 17, 977–983.
- Ekert, P. G., Silke, J. & Vaux, D. L. (1999) Caspase inhibitors. *Cell Death and Differentiation* 6, 1081–1086.
- Fischer, U., Janicke, R. U. & Schulze-Osthoff, K. (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differentiation* 10, 76–100.
- Grabarek, J., Amstad, P. & Darzynkiewicz, Z. (2002) Use of fluorescently labelled caspase inhibitors as affinity labels to detect activated caspases. *Human Cell* 15, 1–12.
- Grunewald, S., Paasch, U., Said, T., Sharma, R. K., Glander, H. J. & Agarwal, A. (2005) Caspase activation in human spermatozoa in response to physiological and pathological stimuli. *Fertility and Sterility* 83, 1106–1112.
- Kuzelova, K., Grebenova, D. & Hrkal, Z. (2007) Labeling of apoptotic JURL-MK1 cells by fluorescent caspase-3 inhibitor FAM-DEVD-fmk occurs mainly at site(s) different from caspase-3 active site. *Cytometry A* 71, 605–611.
- Levek-Motola, N., Soffer, Y., Shochat, L., Raziel, A., Lewin, L. M. & Golan, R. (2005) Flow cytometry of human semen: a preliminary study of a non-invasive method for the detection of spermatogenetic defects. *Human Reproduction* 20, 3469–3475.
- Lin, W. W., Lamb, D. J., Wheeler, T. M., Lipshultz, L. I. & Kim, E. D. (1997) In situ end-labelling of human testicular tissue demonstrates increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis. *Fertility and Sterility* 68, 1065–1069.
- Marchetti, C., Gallego, M. A., Defossez, A., Formstecher, P. & Marchetti, P. (2004) Staining of human sperm with

- fluorochromes-labeled inhibitor of caspases to detect activated caspases: correlation with apoptosis and sperm parameter. *Human Reproduction* 19, 1127–1134.
- Nicholson, D. W. (1999) Caspase structure, proteolytic substrates and function during apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation* 6, 1028–1042.
- Paasch, U., Grunewald, S., Agarwal, A. & Glander, H. J. (2004) Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertility and Sterility* 81, 802–809.
- Parvathani, L. K., Buescher, E. S., Chacon-Cruz, E. & Beebe, S. J. (1998) Type I cAMP-dependent kinase delays apoptosis in human neutrophils at a site upstream of caspase-3. *Journal of Biological Chemistry* 273, 6736–6743.
- Perticarari, S., Ricci, G., Granzotto, M., Boscolo, R., Pozzobon, C., Guarnieri, S., Sartore, A. & Presani, G. (2006) A new multiparameter flow cytometric method for human semen analysis. *Human Reproduction* 22, 485–494.
- Pozarowski, P., Huang, X., Halicka, D. H., Lee, B., Johnso, G. & Darzynkiewicz, Z. (2003) Interactions of fluorochrome-labeled inhibitors with apoptotic cells: a caution in data interpretation. *Cytometry* 55A, 50–60.
- Said, T. M., Paasch, U., Glander, H. J. & Agarwal, A. (2004) Role of caspases in male infertility. *Human Reproduction Update* 10, 39–51.
- Sakkas, D., Moffat, O., Manicardi, G. C., Mariethoz, E., Tarozzi, N. & Bizzaro, D. (2002) Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biology of Reproduction* 66, 1061–1067.
- Salvesen, G. S. & Dixit, V. M. (1997) Caspases: intracellular signalling by proteolysis. *Cell* 75, 1169–1178.
- Shen, H. M., Dai, J., Chia, S. E., Lim, A. & Ong, C. N. (2002) Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlation with sperm quality. *Human Reproduction* 17, 1266–1273.
- Sheskin, D. J. (2000) Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures. 2nd edn. Chapman & Hall/CRC.
- Shourki, M. M. & Pause, C. A. (1999) Statistical methods for health sciences. 2nd edn. CRC Press LLC.
- Smith, C. A. B. (1956) On the estimation of intraclass correlation. *Annals of Human Genetics* 21, 363–373.
- Taylor, S. L., Weng, S. L., Fox, P., Duran, E. H., Morshedi, M. S., Oehninger, S. & Beebe, S. J. (2004) Somatic cell apoptosis markers and pathways in ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality. *Molecular Human Reproduction* 10, 825–834.
- Tournaye, H., Camus, M., Vandervorst, M., Nagy, Z., Joris, H., Van Steirteghem, A. & Devroey, P. (1997) Surgical sperm retrieval for intracytoplasmic sperm injection. *International Journal of Andrology* 20, 69–73.
- Vaux, D. L. & Korsmeyer, S. J. (1999) Cell death in development. *Cell* 96, 245–254.
- Vejux, A., Lizard, G., Tourneur, Y., Riedinger, J.-M., Frouin, F. & Kahn, E. (2007) effects of caspase inhibitors (z-VAD-fmk, z-VDAD-fmk) on Nile red fluorescence pattern in 7-ketocholesterol-treated cells: investigation by flow cytometry and spectral imaging microscopy. *Cytometry A* 71, 550–562.
- Vernaeve, V., Verheyen, G., Goossens, A., Van Steirteghem, A., Devroey, P. & Tournaye, H. (2006) How successful is repeat testicular sperm extraction in patients with azoospermia? *Human Reproduction* 21, 1551–1554.
- Weng, S. L., Taylor, S. L., Morshedi, M., Schuffner, A., Duran, E. H., Beebe, S. & Oehninger, S. (2002) Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Molecular Human Reproduction* 8, 984–991.
- World Health Organization (1999) WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction, 4th edn. Cambridge University Press, Cambridge.

Publication n°2

Activated caspases in thawed epididymal and testicular spermatozoa of patients with congenital bilateral absence of the vas deferens and intracytoplasmic sperm injection outcome.

Brugnon F, Janny L, Artonne C, Sion B, Pouly JL and Grizard G
(2008) Fertil Steril, Epub ahead of print.

Présentation de la publication n°2

Le statut apoptotique des spermatozoïdes a été essentiellement étudié sur des spermatozoïdes éjaculés. Pour mieux comprendre à quel niveau est initié et/ou activée l'apoptose depuis leur formation (testicule) jusqu'à l'éjaculation, des mesures sur des spermatozoïdes prélevés à différents niveaux du tractus génital s'avéraient donc intéressantes. Notre étude a porté sur l'analyse de l'expression des caspases activées par des spermatozoïdes cryoconservés testiculaires et épидидymaires de patients présentant une agénésie bilatérale des canaux déférents (ABCD) avec spermatogenèse active et inscrits en programme d'ICSI. Les spermatozoïdes présentant des caspases activées ont été visualisés en les marquant avec un inhibiteur fluorescent vert (FAM-VAD-fmk) et en associant un colorant vital fluorescent rouge (Propidium Iodide, PI) pour différencier les spermatozoïdes vivants et morts. La détection des spermatozoïdes marqués a été réalisée en microscopie à fluorescence. Pour évaluer la qualité fonctionnelle de ces spermatozoïdes, nous avons comparé ces résultats à ceux obtenus après ICSI chez ces patients.

Nos résultats montrent que la proportion de spermatozoïdes vivants ou morts avec un marquage des caspases activées caractéristique d'une apoptose précoce ou tardive est significativement plus élevée dans les prélèvements testiculaires que pour les prélèvements épидидymaires. De plus, dans les prélèvements épидидymaires, aucun spermatozoïde vivant avec un marquage des caspases activées n'a été observé.

Bien que dans notre modèle (patients présentant une ABCD), il n'existe pas de transit des spermatozoïdes à travers la totalité de l'épididyme (ceux-ci pouvant rester plusieurs jours dans la portion épидидymaire restante), et que les spermatozoïdes analysés aient été cryoconservés, nos résultats suggèrent néanmoins une initiation du processus apoptotique dans les testicules et une incapacité des spermatozoïdes épидидymaires congelés-décongelés à initier l'apoptose.

Après ICSI, les taux de fécondation, d'embryons de bonne qualité morphologique au deuxième jour du développement (jour du transfert), d'implantation et de grossesse évolutive sont meilleurs avec des spermatozoïdes épидидymaires, comparé aux spermatozoïdes testiculaires.

Etant donné la proportion significativement plus faible de spermatozoïdes vivants avec des caspases activées dans les prélèvements épидидymaires que dans les prélèvements testiculaires, le risque d'injecter dans l'ovocyte un spermatozoïde en cours d'apoptose est plus faible et pourrait expliquer les résultats de meilleure qualité après ICSI avec les spermatozoïdes épидидymaires.

Activated caspases in thawed epididymal and testicular spermatozoa of patients with congenital bilateral absence of the vas deferens and intracytoplasmic sperm injection outcome

Florence Brugnon, M.D.,^{a,b} Laurent Janny, M.D.,^{a,b} Christine Artonne,^a Benoit Sion, Ph.D.,^b Jean Luc Pouly, M.D.,^{a,c} and Genevieve Grizard, Ph.D.^{a,b}

^a Université Clermont 1, EA975, UFR Médecine, F-63001 Clermont Ferrand Cedex 1, France; and ^b Biologie du Développement et de la Reproduction, CECOS, Hôtel Dieu, and ^c Département de gynécologie obstétrique et reproduction humaine, CHU Clermont-Ferrand, Clermont Ferrand, France

Objective: To analyze the expression of activated caspases and membrane permeability in thawed epididymal and testicular spermatozoa of patients with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD).

Design: Retrospective study.

Setting: Biology and medicine of reproduction in University hospital.

Patient(s): Eight CBAVD patients.

Intervention(s): Staining of activated caspases and viability (propidium iodide, PI); intracytoplasmic sperm injection (ICSI).

Main Outcome Measure(s): Proportion of viable (Casp-/PI-) or dead (Casp-/PI+) spermatozoa without activated caspases, viable (Casp+/PI-) or dead (Casp+/PI+) spermatozoa with activated caspases. ICSI results.

Result(s): Higher percentage of dead (Casp+/PI+; 84.0% vs. 57.5%) and viable (Casp+/PI-; 12.0% vs. 0) spermatozoa with activated caspases were observed in testicular than in epididymal samples. No significant difference was observed between the percentage of total testicular and epididymal spermatozoa permeant for PI. The outcome of ICSI fertilization (67.5% vs. 57.4%), good morphology embryo at day 2 (75.9% vs. 61.3%), clinical pregnancy (26.7% vs. 15.4%), and implantation (15.6% vs. 9.5%) rates were better when ICSI were performed with epididymal sperm samples.

Conclusion(s): These results support the hypothesis of an abortive apoptotic process and demonstrate that combined staining of the activated caspases and membrane permeability provide complementary measurements for the evaluation of viable and functional spermatozoa to better understand ICSI outcomes with epididymal and testicular spermatozoa. (Fertil Steril® 2008; ■: ■-■. ©2008 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Apoptosis, caspase, spermatozoa, ICSI, CBAVD, epididymis, testis

The development of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and surgical sperm retrieval has improved the infertility treatment of men with obstructive azoospermia and active spermatogenesis (1, 2). High fertilization and pregnancy rates have been reported (2, 3) after ICSI with sperm retrieved by microsurgical epididymal sperm aspiration (MESA) and/or testicular sperm extraction (TESE) for men with azoospermia associated with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD) and active spermatogenesis (4, 5). The cryopreservation of epididymal and/or testicular sperm before ICSI avoids the inconvenience of repeated sperm retrievals and unnecessary stimulation of ovulation for the female partner. Sperm cryopreservation, whether for epididymal (6, 7) or testicular spermatozoa (2, 5, 8), does not affect

fertilization, embryo cleavage, and pregnancy rates compared with fresh spermatozoa for these patients. A recent study (3) demonstrated that the fertilization, cleaved embryos, and delivery rates were significantly higher for epididymal spermatozoa compared with testicular spermatozoa when ICSI was performed for men with CBAVD. This may indicate that the quality of spermatozoa collected from the epididymis may differ from that collected from the testis, and suggests that the male gamete could affect developmental competence of the resulting embryos in vitro.

Sperm analysis, including the assessment of sperm viability, motility (9), and normal forms (10, 11), remain the standard procedures for evaluating the fertility potential of sperm samples before injection by ICSI. However, these criteria may be insufficient to understand the outcome of ICSI (9). Therefore, new biologic parameters are needed to better evaluate the functional quality of spermatozoa used in ICSI, particularly epididymal and testicular spermatozoa.

Measurement of activated caspases in viable ejaculated spermatozoa has been demonstrated to be a sensitive test to determine sperm quality (12–14) and sperm fertilizing

Received March 10, 2008; revised June 26, 2008; accepted July 9, 2008. F.B. has nothing to disclose. L.J. has nothing to disclose. C.A. has nothing to disclose. B.S. has nothing to disclose. J.L.P. has nothing to disclose. G.G. has nothing to disclose.

Reprint requests: Florence Brugnon, M.D., CHU Clermont-Ferrand, Biologie du Développement et de la Reproduction, CECOS, Hôtel Dieu, F-63058 Clermont Ferrand Cedex1, France (FAX: 33 4 73 750 219; E-mail: fbrugnon@chu-clermontferrand.fr).

capacity *in vitro* (13, 15). The caspases are enzymes that are found to be major transducers and effectors within the intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis, and mediate the major apoptotic changes resulting in cell disassembly and death (16, 17). Moreover, recent studies have demonstrated the involvement of caspases in sperm maturation (18). Therefore, the measurement in cells (19) of expression of activated caspases by a combined staining with a cell-permeable fluorescent inhibitor of activated caspases (FAM-VAD-fmk) and a permeant fluorescent vital dye (propidium iodide, PI) may provide a new assay to assess the quality of spermatozoa used in assisted reproductive technologies. To our knowledge, the comparison of the proportion of viable spermatozoa with activated caspases has never been investigated in human frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa of men with CBAVD, and may be an interesting tool to better understand the outcome of ICSI according to the origin of spermatozoa used for the injection of oocytes.

Therefore, the aim of this study was to analyze the expression of activated caspases and membrane permeability in frozen/thawed epididymal and testicular spermatozoa of ICSI patients with CBAVD [1] to compare the expression of activated caspases in the epididymal and testicular spermatozoa of these men with active spermatogenesis, and [2] to assess whether these markers may help to understand the outcome of ICSI of these patients.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Eight men with CBAVD belonging to couples who came to the center for reproductive medicine of the University Hospital, Clermont Ferrand, France, were included in this study. These men underwent surgical sperm recovery by MESA and/or by TESE before cryopreservation of the spermatozoa. Both MESA and TESE were performed in two patients, whereas only MESA was performed in three patients and only TESE in three other patients. Azoospermia was diagnosed in ejaculate on the criteria of the World Health Organization (WHO) (20) and confirmed by a second semen sample 3 months later. Biochemical analysis of the seminal plasma revealed considerably decreased concentrations (below the detection limit of the assay) of fructose and alpha glucosidase. Both the testicular volume and the serum hormone values of FSH and testosterone were normal for all patients. Ultrasound investigation confirmed obstructive azoospermia with bilateral congenital absence of vas deferens. All men were tested for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations and received genetic counseling. The karyotype was 46,XY for all male patients.

Both caspase assay and ICSI were performed for all patients with frozen-thawed epididymal and testicular sperm samples.

Written consent for the treatment was obtained from all patients.

Surgical Sperm Retrieval

The testicular and/or epididymal sperm retrievals were performed under general anesthesia. Epididymal spermatozoa were aspirated by MESA from the most proximal part of the caput of the epididymis (1) and spermatozoa were frozen after analysis of concentration and motility parameters (20). When MESA did not provide sufficient motile spermatozoa for ICSI, or when the status of the epididymis did not allow sperm collection, testicular spermatozoa were extracted (TESE) from an open biopsy (21). Large numbers of testicular spermatozoa were always collected, reflecting ongoing spermatogenesis. A small portion of the testicular biopsy was fixed for histopathologic examination to confirm that spermatogenesis was complete and active, and the remainder was sent to the laboratory for sperm processing. The wet preparation of testicular tissue was shredded roughly using two sterile microscope glass slides in a Petri dish containing 2.0 mL Earle's medium (Cryobiosystem, France). During this procedure, the seminiferous tubules were minced to facilitate the retrieval of spermatozoa. After 1 hour of incubation (37°C, 5% CO₂, 5% O₂), the remnant tissue was left in 200 µL Earle's medium and the cell suspension was centrifugated at 2,100 × *g* for 5 minutes. After removal of the supernatant, the pellet was resuspended in 500 µL Earle's medium. The quality of the cell suspension derived from the original biopsy was evaluated for sperm concentration and motility according to the criteria of the WHO (20). Sperm concentration was assessed in a Thoma chamber (depth: 0.1 mm; Dutscher, France). The concentration was expressed relative to the total number of spermatozoa present per milliliter suspension. Motility was assessed after pipetting 10 µL of the suspension onto a glass microscope slide covered by coverslip, and was scored as percentage type b + c + d (type a was not present) using a microscope with a 20× objective. A hundred spermatozoa were evaluated for motility.

Freezing and Thawing Technique

As previously described (22) the epididymal and/or testicular sperm samples were diluted (v/v) with the cryoprotective medium (Cryosperm, Biomédia, France) (glycerol 14%, sodium chloride 30 mmol/L; glycine 133 mmol/L; sodium citrate 40 mmol/L; glucose 69 mmol/L; antibiotics; pH = 7.4; osmolality = 430 mOsm). Samples were maintained for 15 minutes at room temperature for equilibration and sealed in straws. The straws were frozen following a standard freezing protocol (from 20°C to -4°C at a rate of 5°C/min, from -4°C to -30°C at 10°C/min and from -30°C to -140°C at 20°C/min) in a Minicool LC40 (Air Liquide Santé, France). The straws were then transferred to liquid nitrogen for storage.

The straws were thawed at 37°C for 3 minutes. After gentle addition of Earle's medium (Cryobiosystem, France), the cryoprotectant was removed by a washing procedure (750 × *g* for 5 minutes at room temperature) and sperm concentration and motility measurements were performed.

Detection and Evaluation of Activated Caspases in Spermatozoa (Caspase Assay)

Detection of the activated caspases was performed with FAM-VAD-fmk, a cell-permeant fluorochrome derivative of caspase inhibitor Val-Ala-Asp-fluoromethylketone, in frozen–thawed sperm samples according to a procedure published elsewhere (23). The caspase assay procedure was performed according to the manufacturer's instruction manual (Apoptosis Detection Kit Caspase Assay, Serotec, France).

Briefly, a 30-fold working solution was prepared by dilution of a 150-fold stock solution of the inhibitor stored in dimethyl sulfoxide at -20°C . Spermatozoa ($3 \cdot 10^5$ spermatozoa) were exposed to $10 \mu\text{L}$ of the working solution followed by incubation in $300 \mu\text{L}$ of phosphate buffered saline (PBS) at 37°C under $5\% \text{CO}_2$ for 1 hour. After incubation, the samples were washed with the rinse buffer ($400 \times g$ for 5 minutes at room temperature), provided with the kit, and vital staining by PI (Sigma, France; $10 \mu\text{g mL}^{-1}$) was performed in the dark, at room temperature, for 15 minutes.

Human neutrophils ($5 \cdot 10^6$ cells), whose apoptosis was induced after treatment with 1 mM cycloheximide for 6 hours, were used as positive controls of the staining (23). The negative controls were processed by replacing FAM-VAD-fmk with $10 \mu\text{L}$ of PBS (Sigma, France) to assess the possible autofluorescence of unstained spermatozoa.

The samples were read with conventional epifluorescent microscopy (excitation: 450–490 nm; emission: 525–617 nm). Carboxyfluorescein (FAM-VAD-fmk) was observed as green-colored and PI as red-colored fluorescence. A minimum of 400 spermatozoa was randomly assessed per slide in at least five fields by an observer whose reliability was assessed to be good before analysis (23).

Four different patterns of spermatozoa were detected:

1. Viable spermatozoa without staining of activated polycaspases: Casp–/PI– (only observed with bright microscopy).
2. Dead spermatozoa without staining of activated polycaspases: Casp–/PI+ (red).
3. Viable spermatozoa with staining of activated polycaspases: Casp+/PI– (green).
4. Dead spermatozoa with staining of activated polycaspases Casp+/PI+ (red and green).

Ovarian Stimulation and ICSI Procedure

All female partners underwent superovulation using a gonadotrophin-releasing hormone analogue suppression protocol and recombinant gonadotrophins (FSH per stimulated cycle varied between 1,800 and 3,500 IU depending on the individual response). As soon as at least three follicles of ≥ 18 mm were detected, ovulation was induced by 10,000 IU of human chorionic gonadotrophin (hCG). Oocyte–cumulus complexes were recovered 36 hours after administration of hCG. After cumulus cell removal by treatment with 25 IU of hyaluroni-

dase (SynVITRO Hyadase, Medicult, France), followed by pipetting to remove the innermost layer of cells; the oocytes were then rinsed three times in flushing medium (Flushing Medium, Medicult, France) and the morphology of the metaphase II oocytes was evaluated at the time of ICSI (from 2 to 4 hours after retrieval) under inverted microscope at $\times 400$ magnification. No giant oocyte was observed for these patients. Nuclear and cytoplasmic maturation were assessed. Only metaphase II oocytes with: normal and clear zona pellucida (24, 25), small size of perivitelline space (26), without vacuoles or cytoplasmic granularity and normal polar body (27, 28) were injected with motile spermatozoa into the ooplasm according to previously described procedures (29). For two patients for whom surgical epididymal and testicular sperm retrievals were both performed, frozen–thawed epididymal spermatozoa were used initially for ICSI attempts. When no pregnancy was achieved after ICSI with epididymal spermatozoa and when all epididymal straws had been used, ICSI subsequently took place using frozen–thawed testicular spermatozoa. The ovarian stimulation protocol was similar for the ICSI attempts with frozen–thawed testicular and epididymal sperm, and no apparent differences in oocyte quality or quantity was noted between them.

Assessment of Fertilization, Embryo Cleavage, and Establishment of Pregnancy

Further culture of injected oocytes was performed in 0.8 mL of culture medium (BM1, Ellios Biotek, France). Normal fertilization was confirmed with inverted microscopy readings after 16 to 18 hours, by the observation of two distinct pronuclei and a second polar body. Developing embryos were classified according to their morphologic appearance. Cleaving embryos with ≥ 4 equal size blastomeres and $< 50\%$ of their volume filled with anucleate fragments were considered eligible for transfer. Cleaving embryos were transferred into the uterine cavity 2 days after the ICSI procedure.

A rise in serum hCG on two consecutive occasions between 12 and 14 days after embryo transfer indicated pregnancy. Each pregnancy with at least one fetus with positive heartbeat, revealed by ultrasonography approximately 6 weeks after transfer, was considered as a clinical pregnancy.

Statistical Analysis

Analysis of the data was performed using the Stat View (SAS Institute, Cary, NC, 1998) program.

For each pattern, the proportions of spermatozoa expressed as median values and percentages of testicular and epididymal spermatozoa were compared by the Mann-Whitney test.

The differences between ICSI outcome with frozen–thawed epididymal and testicular sperm were assessed by χ^2 -test with Yates' correction and Fisher's exact test.

For all tests, values of $P < .05$ were considered statistically significant.

TABLE 1

Measurements of activated caspases (casp) by combined staining with a fluorescent inhibitor of activated caspases (FAM-VAD-fmk) and vital staining by propidium iodide (PI) in frozen/thawed epididymal and testicular spermatozoa of ICSI patients with CBAVD.

Origin of frozen-thawed sperm sample	Casp + /PI- Viable spermatozoa with activated caspases (%)	Casp + /PI + Dead spermatozoa with staining of activated caspases (%)	Casp-/PI- Viable spermatozoa (%)	Casp-/PI + Dead spermatozoa (%)	Total spermatozoa with activated caspases (%)	(Casp + /PI-) + (Casp + /PI+) Total spermatozoa (Casp-/PI+) Total dead spermatozoa (%)
Epididymis (n=5) Median (range)	0 ^a (0)	57.5 ^a (43-81)	20.0 ^a (8-23)	24.0 ^a (11-34)	56.0 ^a (43-81)	80.0 ^{NS} (77-92)
Testis (n=5) Median (range)	12.0 ^a (8-28)	84.0 ^a (60-92)	2.0 ^a (0-15)	2.0 ^a (0-3)	97.0 ^a (88-100)	86.0 ^{NS} (63-92)

^a The differences between data for the two sperm sources are significant ($p < 0.05$).

^{NS} The differences between data for the two sperm sources are not significant.

Brugnon. Caspases in sperm of CBAVD patients. *Fertil Steril* 2008.

RESULTS

Comparison of Proportion of Viable Spermatozoa with Activated Caspases between Frozen–Thawed Epididymal and Testicular Sperm Samples of Men with CBAVD

Measurements by caspase assay of frozen–thawed epididymal ($n = 5$) and testicular ($n = 5$) spermatozoa are summarized in Table 1. The pattern of dead spermatozoa with staining of activated caspases (Casp+/PI+) was predominant ($P < .05$) in all frozen–thawed epididymal and testicular sperm samples. Moreover, a higher percentage of dead (Casp+/PI+; 84.0% vs. 57.5%; $P = .01$), viable (Casp+/PI-; 12.0% vs. 0; $P = .01$), and total spermatozoa with activated caspases ([Casp+/PI-] + [Casp+/PI+]; 97.0% vs. 56.0%; $P = .02$) were observed in testicular than in epididymal sperm samples. No significant difference was observed between the percentage of total dead testicular and epididymal spermatozoa ([Casp+/PI+] + [Casp-/PI+]; 86.0% vs. 80.0%; $P = NS$).

The ICSI Outcome with Frozen–Thawed Epididymal and Testicular Spermatozoa of Patients with CBAVD

For the ICSI attempts with epididymal and testicular spermatozoa, the mean age of the men was respectively 36.1 ± 2.1 years and 33.2 ± 1.7 years (NS); for their female partner it was respectively 32.8 ± 2.5 years and 33.2 ± 1.7 years (NS) at the time of the first ICSI attempt. No difference (NS) appeared between the number of oocytes injected with epididymal (7.8 ± 2.7 oocytes) or testicular spermatozoa (8.3 ± 1.7 oocytes).

For the ICSI attempts performed with frozen–thawed spermatozoa of these CBAVD patients (Table 2), comparison of fertilization outcomes showed a higher fertilization rate (67.5% vs. 57.4%, $P = .02$) and a higher percentage of embryos with good morphologic appearance (75.9% vs. 61.3%; $P = .02$) when ICSI was performed with frozen–thawed epididymal spermatozoa, compared with testicular spermatozoa.

Comparison of implantation and pregnancy outcomes for these attempts (Table 3) showed higher pregnancy (26.7% vs. 15.4%, $P = .03$) and implantation rates (15.6% vs. 9.5%, $P = .01$) when ICSI was performed with frozen–thawed epididymal than with testicular spermatozoa. No miscarriage was reported during ICSI attempts with epididymal or testicular sperm samples.

DISCUSSION

This experiment was designed to compare, for the first time to our knowledge, the proportion of epididymal and testicular spermatozoa with activated caspases and/or permeant for the vital staining by PI in frozen–thawed sperm samples, and to assess whether this apoptotic marker may help to better understand ICSI outcome of CBAVD patients with active spermatogenesis. The caspases are considered to be the key mediators of apoptosis, initiating the irreversible steps of

TABLE 2

Fertilization and embryo development after ICSI with frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa of CBAVD patients.

Source of frozen-thawed spermatozoa	Number of attempts	Number of oocytes injected by ICSI per patient	Fertilization rate ^a	Number of cleaved embryos	Good-morphology embryo rate ^b
Epididymis	15	7.8 ± 2.7 ^{NS}	67.5% ^c (79/117)	79	75.9% ^c (60/79)
Testis	13	8.3 ± 1.7 ^{NS}	57.4% ^c (62/108)	62	61.3% ^c (38 /62)

^a Defined as the percentage of normal zygotes with two equal-sized pronuclei and two polar bodies/ number of injected oocytes.

^b Defined as the percentage of embryos with normal pronuclear morphology on day 1, ≥ 4 equal sized blastomeres on day 2 and <10% of the intrazonal space occupied by fragments. The percentages are calculated from the number of cleaved embryos (Number of embryos with good morphology / Number of cleaved embryos).

^c The differences between data for the two sperm sources are significant (p<0.05).

^{NS} The differences between data for the two sperm sources are not significant.

Brugnon. Caspases in sperm of CBAVD patients. Fertil Steril 2008.

cell demise and marking the “point of no return” along the apoptotic pathways (30) in somatic cells, but their role in human spermatozoa is not currently well understood (31). It has been hypothesized that a high level of activated caspases in ejaculated spermatozoa may be related to an abortive apoptosis initiated in testis (32) and could be a possible indicator of infertility (33, 34). Moreover, previous reports demonstrated that caspase assays performed in ejaculated spermatozoa with a cell-permeable fluorescent derivative of the inhibitor peptide VAD-fmk (13, 35) would provide the means for assessing sperm quality (14, 34) and fertilizing capacity in vitro (13, 15).

Caspase activation can be monitored by a variety of approaches (36). One of these relies on the detection of caspases and their cleavage products (14, 35), which can be identified in Western blots. However, this approach is limited to the measurement of caspase activation in cell extracts, so yields no information on individual cells or the heterogeneity of cell population. Similarly, the use of peptide substrates that generate colored or fluorescing products upon caspase-induced

cleavage has been tried mostly on cell extracts (37, 38). These methods are not appropriate for testicular suspensions because the spermatozoa extracts cannot be distinguished from other cells contained in these samples. So, to detect caspase activation on individual cells, the use of a fluorescent inhibitor of activated caspases (FAM-VAD-fmk) seems to be more appropriate to differentiate the population of stained spermatozoa from other surrounding cells (13, 39). FAM-VAD-fmk is a carboxyfluorescein (FAM)-labeled peptide (VAD) fluoromethylketone (fmk), which is probably the most generic of the fluorochrome caspase inhibitors that binds irreversibly to one to nine of the 14 known caspases with 1:1 stoichiometry to active centers of caspases (19). In testicular cell suspensions, the presence of different types of germinal and somatic cells hampers the distinction of stained spermatozoa by flow cytometry (40), and consequently, the measurements for comparisons in this study were all performed by fluorescence microscopy. However, it has recently been demonstrated that the signal detected with fluorescence microscopy after staining by a Fluorescent Inhibitor of Activated Caspases (FLICA) originates also

TABLE 3

Implantation and pregnancy after ICSI with frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa of CBAVD patients.

Source of frozen-thawed spermatozoa	Number of attempts	Number of embryos transferred	Pregnancy rate ^a	Implantation rate ^b
Epididymis	15	32	26.7% ^c (4/15)	15.6% ^c (5/32)
Testis	13	21	15.4% ^c (2/13)	9.5% ^c (2/21)

^a Defined as the percentage of clinical pregnancies with gestational sac with cardiac activity / number of attempts.

^b Defined as the percentage of gestational sacs /number of transferred embryos.

^c The differences between data for the two sperm sources are significant (p<0.05).

Brugnon. Caspases in sperm of CBAVD patients. Fertil Steril 2008.

from other sites than active centers of caspases (38, 41). Therefore, the caspase assay seems to be suitable for analysis of polycaspases, but it would be prudent to support this test with other specific methods (13). Moreover, to confirm that FLICA (FAM-VAD-fmk) is a valid method of staining for assessment of sperm apoptosis, combination with measurements of other apoptosis markers may strengthen the analysis (14, 42). Previous reports (13, 23) have demonstrated a positive correlation between DNA fragmentation rate and activated caspase 3 levels in human ejaculated spermatozoa. Unfortunately, the low number of available epididymal and testicular spermatozoa did not allow these measurements in our study.

Recently, it has been demonstrated that the caspases are enzymes that may serve other functions unrelated to apoptosis, particularly in sperm maturation and spermatogenesis (18, 43, 44). FLICA staining provides a convenient marker of *in situ* caspases activation (19) to assess sperm quality (45). In the present study, FLICA staining was combined with an analysis of a change in plasma membrane's ability to exclude the cationic fluorochrome PI. The loss of plasma membrane integrity that leads to its permeability to cationic dyes allows differentiation between dead and viable spermatozoa. The bivariate analysis of caspases activation versus uptake of PI made it possible to discern individual dead or viable spermatozoa with or without activated caspases. Therefore, this combined staining provides an easy to use complementary and sensitive assay to better evaluate viable and functional spermatozoa used in ICSI. Indeed, no difference was observed when the comparison of testicular and epididymal spermatozoa was only performed by PI measurements, but significant differences appeared between the different patterns where the combined staining was taken into consideration.

The higher proportion of testicular spermatozoa with activated caspases and the lack of viable epididymal spermatozoa with activated caspases in frozen-thawed sperm samples of CBAVD patients with active spermatogenesis (4) may be explained by an activation of the apoptosis process in testis during spermatogenesis and the inability of frozen-thawed epididymal spermatozoa to activate apoptosis. These results confirm previous reports that described the initiation of apoptosis in testis during normal spermatogenesis (46, 47), and support the hypothesis that spermatozoa with activated caspases detected in ejaculates (23, 48) might have escaped an initial apoptotic process during spermatogenesis. Indeed, apoptosis has been shown to be a regulatory process that controls physiologic spermatogenesis (49, 50). The efficient phagocytosis of apoptotic germ cells by Sertoli cells (43, 51) in human testis with active and normal spermatogenesis may explain the higher number of viable spermatozoa with staining of activated caspases (Casp+/PI-) in the testicular than in the epididymal sample because these testicular spermatozoa would be phagocytosed before reaching to the epididymis. This may also explain the lower viable percentage of spermatozoa without staining of activated caspases in testicular than in epididymal sperm samples because this intact population of

spermatozoa may leave the testis and pass through epididymis. Persistent activated caspases in epididymal spermatozoa are likely to have developed during spermatogenesis and may reflect an abortive apoptosis (32, 34). This argument is further supported by the evidence that spermatozoa that are healthy after ejaculation are incapable of becoming apoptotic spontaneously (48), and their demise occurs by necrosis rather than apoptosis (48). However, we cannot be sure that our data correspond to physiologic cell death activation pathways in male genital tract because cryopreservation induces an "apoptosis-like" phenomenon (37, 45), which may interfere with the measurements and explain the predominance of dead epididymal and testicular spermatozoa with staining of activated caspases (Casp+/PI+). Moreover, we may suppose that the longer storage of spermatozoa in the epididymis of CBAVD patients than in usual physiologic conditions could explain the high proportion of dead epididymal spermatozoa.

The ICSI results were in agreement with previously published studies (3, 52), and may suggest that the quality of sperm suspensions collected from testis containing a high proportion of spermatozoa with activated caspases could affect the developmental competences of resulting embryos *in vitro*. Although a previous analysis demonstrated that ICSI outcome is not affected by the origin of spermatozoa (testis or epididymis) in obstructive azoospermia (2), only one study of this meta-analysis differentiate clearly the ICSI outcome according to the cause of obstructive azoospermia (CBAVD) and the site of spermatozoa retrieval (53) by their data. This study demonstrated the pregnancy rate per transfer was essentially identical regardless of the origin of spermatozoa in these patients. However, the comparison of this study was mainly performed between fresh epididymal and testicular biopsies spermatozoa. Moreover these results were not confirmed by a recent study (2), which showed that fertilization, cleaved embryo, and delivery rates were significantly higher for epididymal than testicular spermatozoa by the analysis of a larger serie of thawed epididymal and testicular spermatozoa used for ICSI of CBAVD patients.

This may explain the lower rates of embryos with good morphology, and therefore, the lower number of transferred embryos for the testicular group. The ICSI data also may be influenced by various factors related to the female partner. However, there were no significant differences in maternal age and mean number of microinjected oocytes for ICSI with testicular and epididymal sperm for the attempts in this study. The clinical significance of our findings is emphasized by the known correlation of high levels of spermatozoa with staining of activated caspases and poor fertilization rates (13, 15). Given that the percentage of viable spermatozoa with activated caspases was higher in frozen-thawed testicular than in epididymal spermatozoa, there was an increased risk that an early apoptotic spermatozoa might ultimately fertilize an oocyte, which may explain the lower ICSI outcome with frozen-thawed testicular spermatozoa. This suggests that caspase assay could potentially be used as tool to better understand the ICSI outcome with frozen-thawed

epididymal and testicular spermatozoa in CBAVD patients. Moreover, it was demonstrated that cryopreservation of epididymal and testicular spermatozoa does not affect the ICSI outcome for men with obstructive azoospermia (2, 7). This may suggest that the consequences of cryopreservation may be similar for these spermatozoa. Nevertheless, further comparative studies in fresh samples are required to analyze whether the measurements of activated caspases is a marker of apoptosis or of some other form of sperm dysfunction in human frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa of CBAVD patients.

In conclusion, for the first time, the proportion of frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa with activated caspases has been compared in CBAVD patients. The higher proportion of spermatozoa with activated caspases in frozen-thawed testicular than in epididymal spermatozoa, and the absence of viable epididymal spermatozoa with activated caspases suggest that the apoptosis process may be initiated in testis during spermatogenesis, and that epididymal spermatozoa would be unable to initiate apoptosis. These results support the hypothesis of an abortive apoptotic process. Moreover, combined staining by FLICA and PI provide complementary measurements for the evaluation of viable and functional epididymal and testicular spermatozoa to better understand ICSI outcomes. Further comparative investigations with larger samples are required in fresh epididymal and testicular spermatozoa to better understand and define the significance of activated caspases in the spermatozoa of the CBAVD patients.

Acknowledgments: We thank Claudine Nouailles for her precious technical help for this study and Elisabeth Petit for revising the English of the manuscript.

REFERENCES

1. Tournaye H, Camus M, Vandervorst M, Nagy Z, Joris H, Van Steirteghem A, et al. Surgical sperm retrieval for intracytoplasmic sperm injection. *Int J Androl* 1997;20:69–73.
2. Nicopoulos JDM, Gilling-Smith C, Almeida PA, Norman-Taylor J, Grace I, Ramsay JWA. Use of surgical sperm retrieval in azoospermic men: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2004;82:691–701.
3. Buffat C, Patrat C, Merlet F, Guibert J, Epelboin S, Thiounn N, et al. ICSI outcomes in obstructive azoospermia: influence of the origin of surgically retrieved spermatozoa and the cause of obstruction. *Hum Reprod* 2006;21:1018–24.
4. Silber SJ, Patrizio P, Asch RH. Quantitative evaluation of spermatogenesis by testicular histology in men with congenital absence of the vas deferens undergoing epididymal sperm aspiration. *Hum Reprod* 1990;5:89–93.
5. Palermo GD, Schlegel P, Hariprasad JJ, Ergun B, Mielnik A, Zanninovic N, et al. Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men. *Hum Reprod* 1999;14:741–8.
6. Nagy Z, Liu J, Cecile J, Silber S, Devroey P, Van Steirteghem A. Using ejaculated, fresh, and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1995;63:808–15.
7. Tournaye H, Medad T, Silber J, Joris H, Verheyen G, Devroey P, et al. No differences in outcome after intracytoplasmic sperm injection with fresh or with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Hum Reprod* 1999;14:90–5.
8. Friedler S, Raziel A, Strassburger D, Schachter M, Soffer Y, Ron-El R. Factors influencing the outcome of ICSI with obstructive and non-obstructive azoospermia: a comparative study. *Hum Reprod* 2002;17:3114–21.
9. Moghadam K, Nett R, Robins JC, Thomas MA, Awadalla SG, Scheiber MD, et al. The motility of epididymal or testicular spermatozoa does not directly affect IVF/ICSI pregnancy outcomes. *J Androl* 2005;26:619–23.
10. De Vos A, Van De Velde H, Joris H, Verheyen G, Devroey, Van Steirteghem A. Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2003;79:42–8.
11. Wood S, Aziz N, Millar A, Schnauffer K, Meacock S, El Ghobashy A, et al. Morphological and morphometric attributes of epididymal and testicular spermatozoa following surgical sperm retrieval for obstructive or nonobstructive azoospermia. *Andrologia* 2003;35:358–67.
12. Shen HM, Dai J, Chia SE, Lim A, Ong CN. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlation with sperm quality. *Hum Reprod* 2002;17:1266–73.
13. Marchetti C, Gallego MA, Defossez A, Formstecher P, Marchetti P. Staining of human sperm with fluorochromes-labeled inhibitor of caspases to detect activated caspases: correlation with apoptosis and sperm parameter. *Hum Reprod* 2004;19:1127–34.
14. Taylor SL, Weng SL, Fox P, Duran EH, Morshedi MS, Oehninger S, et al. Somatic cell apoptosis markers and pathways in ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality. *Mol Hum Reprod* 2004;10:825–34.
15. Grunewald S, Said TM, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A. Relationship between sperm apoptosis signalling and oocyte penetration capacity. *Int J Androl* 2007; June 15 [Epub ahead of print].
16. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326:1–16.
17. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signalling by proteolysis. *Cell* 1997;75:1169–78.
18. Arama E, Agapite J, Steller H. Caspase activity and a specific cytochrome *c* are required for sperm differentiation in drosophila. *Dev Cell* 2003;4:687–97.
19. Smolewski P, Grabarek J, Halicka HD, Darzynkiewicz Z. Assay of caspase activation in situ combined with probing plasma membrane integrity to detect three distinct stages of apoptosis. *J Immunol Methods* 2002;265:111–21.
20. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen–cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.
21. Silber SJ, Nagy ZP, Liu J, Godoy H, Devroey P, Van Steirteghem A. Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Hum Reprod* 1994;9:1705–9.
22. Grizard G, Chevalier V, Griveau JF, Le Lannou D, Boucher D. Influence of seminal plasma on cryopreservation of human spermatozoa in a biological material-free medium: study of normal and low-quality semen. *Int J Androl* 1999;22:190–6.
23. Weng SL, Taylor SL, Morshedi M, Schuffner A, Duran EH, Beebe S, et al. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod* 2002;8:984–91.
24. Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;13:3431–3.
25. Rienzi L, Ubaldi FM, Iacobelli M, Minasi MG, Romano S, Ferreo S, et al. Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *Fertil Steril* 2008; Feb 4 [Epub ahead of print].
26. Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod* 1997;12:1750–5.
27. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Shebl O, Jesacher K, et al. Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development. *Fertil Steril* 2005;83:1635–40.

28. De Santis L, Cino I, Rabellotti E, Calzi F, Persico P, Borini A, et al. Polar body morphology and spindle imaging as predictors of oocyte quality. *Reprod Biomed Online* 2005;11:36–42.
29. Van Steirteghem A, Nagy P, Joris H, Janssenswillen C, Staessen C, Verheyen G, et al. Results of intracytoplasmic sperm injection with ejaculated, fresh and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 1998;13:134–42.
30. Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 2003;10:76–100.
31. Oehninger S. Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa. *RBM Online* 2003;7:469–76.
32. Sakkas D, Mariethoz E, St John JC. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* 1999;251:350–5.
33. Said TM, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A. Role of caspases in male infertility. *Hum Reprod Update* 2004;10:39–51.
34. Aziz N, Said T, Paasch U, Agarwal A. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Hum Reprod* 2007;22:1413–9.
35. Grunewald S, Paasch U, Said T, Sharma RK, Glander HJ, Agarwal A. Caspase activation in human spermatozoa in response to physiological and pathological stimuli. *Fertil Steril* 2005;83:1106–12.
36. Ekert PG, Silke J, Vaux DL. Caspase inhibitors. *Cell Death Differ* 1999;6:1081–6.
37. Martin G, Cagnon N, Sabido O, Sion B, Grizard G, Durand P, et al. Kinetics of occurrence of some features of apoptosis during the cryopreservation process of bovine spermatozoa. *Hum Reprod* 2007;22:380–8.
38. Kuzelova K, Grebenova D, Hrkal Z. Labeling of apoptotic JURL-MK1 cells by fluorescent caspase-3 inhibitor FAM-DEVD-fmk occurs mainly at site(s) different from caspase-3 active site. *Cytometry A* 2007;71:605–11.
39. Paasch U, Grunewald S, Fitzl G, Glander HJ. Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. *J Androl* 2003;24:246–52.
40. Brugnion F, Ouchchane L, Verheyen G, Communal Y, Van der Elst J, Tournaye H, et al. Fluorescence microscopy and flow cytometry in measuring activated caspases in human spermatozoa. *Int J Androl* 2007; Dec 7 [Epub ahead of print].
41. Pozarowski P, Huang X, Halicka DH, Lee B, Johnso G, Darzynkiewicz Z. Interactions of fluorochrome-labeled inhibitors with apoptotic cells: a caution in data interpretation. *Cytometry* 2003;55A:50–60.
42. Smolewski P, Bedner E, Du L, Hsieh TC, Wu J, Phelps DJ, et al. Detection of caspases activation by fluorochrome-labeled inhibitors: multiparameter analysis by laser scanning cytometry. *Cytometry* 2001;44:73–82.
43. Kim JM, Ghosh SR, Weil ACP, Zirkin BR. Caspase 3 and caspase-activated deoxyribonuclease are associated with testicular germ cell apoptosis resulting from reduced intratesticular testosterone. *Endocrinology* 2001;142:3809–16.
44. Cayli S, Sakkas D, Vigue L, Demir R, Huszar G. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl-xl levels in mature and diminished maturity sperm. *Mol Hum Reprod* 2004;5:365–72.
45. Paasch U, Grunewald S, Agarwal A, Glander HJ. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil Steril* 2004;81:802–9.
46. Pentikainen V, Erkkila K, Dunkel L. Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *Am J Physiol* 1999;276:E310–6.
47. Hikim AP, Lue Y, Diaz-Romero M, Yen PH, Wang C, Swerdloff RS. Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in testis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;85:175–82.
48. Lachaud C, Tesarik J, Canadas ML, Mendoza C. Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod* 2004;19:607–10.
49. Pentikainen V, Erkkila K, Suomalainen L, Ojala M, Pentikainen MO, Parvinen M, et al. TNF α down-regulates the Fas ligand and inhibits germ cell apoptosis in the human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4480–8.
50. Bozec A, Amara S, Guarmit B, Selva J, Albert M, Rollet J, et al. Status of the executioner step of apoptosis in human with normal spermatogenesis and azoospermia. *Fertil Steril* 2008; Jan 2 [Epub ahead of print].
51. Tesarik J, Ubaldi F, Rienzi L, Martinez F, Iacobelli M, Mendoza C, et al. Caspase-dependent and independent DNA fragmentation in Sertoli and germ cells from men with primary testicular failure: relationship with histological diagnosis. *Hum Reprod* 2004;19:254–61.
52. Pasqualotto FF, Rossi LM, Guilherme P, Ortiz V, Iaconelli A, Borges E. Etiology-specific outcomes of intracytoplasmic sperm injection in azoospermic patients. *Fertil Steril* 2005;83:606–11.
53. Silber SJ, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, Lissens W, Ferec C, et al. The use of epididymal and testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection: the genetic implications for male infertility. *Hum Reprod* 1995;10:2031–43.

Publication n°3

Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients.

Brugnon F, Van Assche E, Verheyen G, Sion B, Boucher D, Pouly JL, Janny L, Devroey P, Liebaers I and Van Steirteghem A (2006)
Hum Reprod 21, 685-693.

Présentation de la publication n°3

L'objectif de ce travail était d'essayer d'expliquer l'infertilité des patients porteurs d'une translocation chromosomique autosomique. Pour cela, une étude du processus apoptotique en relation avec la ségrégation méiotique a été réalisée sur les spermatozoïdes éjaculés de tels patients.

Les paramètres spermiologiques standards (concentration, mobilité progressive) sont systématiquement diminués chez les hommes porteurs d'une translocation Robertsonienne (n=6) et altérés à des degrés variables selon les chromosomes et les points de cassure dans le groupe des hommes porteurs d'une translocation autosomique réciproque (n=14).

L'expression de deux marqueurs d'apoptose (externalisation de la phosphatidylsérine et fragmentation de l'ADN) est significativement plus élevée sur les spermatozoïdes provenant d'éjaculats des patients porteurs d'une translocation chromosomique, comparés à ceux de donneurs sains (n=20). L'analyse de la ségrégation méiotique (technique FISH) démontre une prédominance de gamètes équilibrés dans l'éjaculat des patients porteurs d'une translocation chromosomique, contrairement à ce que le schéma de la méiose laissait prévoir.

Ces résultats suggèrent que chez les patients porteurs d'une translocation autosomique réciproque ou Robertsonienne, l'apoptose pourrait être impliquée dans l'infertilité. Elle pourrait être responsable de l'élimination des gamètes porteurs d'un déséquilibre chromosomique.

Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients

F.Brugnon^{1,4,5}, E.Van Assche³, G.Verheyen³, B.Sion^{1,4}, D.Boucher⁴, J.L.Pouly², L.Janny¹, P.Devroey³, I.Liebaers³ and A.Van Steirteghem³

¹Biologie de la Reproduction, CECOS, ²Département de gynécologie obstétrique et reproduction humaine and ³Research Centre Reproductive and Genetics, Vrije Universiteit Brussel, Laarbeeklaan 101, B-1090, Belgium and ⁴EA 975, Biologie de la Reproduction, Faculté de Médecine, BP 38, 63000 Clermont-Ferrand, France

⁵To whom correspondence should be addressed: fbrugnon@chu-clermontferrand.fr

BACKGROUND: To try to explain the infertility of chromosomal translocation carrier patients, we compared the expression of two markers of apoptosis in the sperm of patients and of fertile donors, and we studied the meiotic segregation in the ejaculated sperm of these translocation carriers. **METHODS:** Twenty semen samples of translocation carriers, [reciprocal ($n = 14$) and Robertsonian translocations ($n = 6$)], were compared with the semen samples of donors ($n = 20$). Different tests were applied: annexin V binding assay; terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling (TUNEL); and fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **RESULTS:** The annexin V binding assay in sperm of patients with chromosomal translocation ($n = 17$) showed a significantly increased proportion of sperm with externalized phosphatidylserine (PS) than in the control group ($n = 20$, $P \leq 0.05$). The rates of DNA fragmentation investigated by TUNEL reaction were higher in samples of translocation carriers ($n = 14$) than in donors ($n = 20$, $P < 0.0001$). The measures by FISH technique showed that the proportions of balanced or normal gametes were predominant in the reciprocal translocation group (alternate: $n = 7$; from 33.0 to 58.8%; adjacent I: $n = 7$; from 4.6 to 43.8%) and in the Robertsonian translocation group (normal: $n = 5$; from 76.0 to 88.5%). **CONCLUSIONS:** Our data show a predominant proportion of balanced gametes in sperm of chromosomal translocation carrier patients. Moreover, PS externalization and DNA fragmentation rates are significantly higher in ejaculated sperm of these patients than in donor sperm. These tests could be used to predict the outcome of ICSI for these patients.

Key words: apoptosis/chromosomal translocation/DNA fragmentation/meiotic segregation/phosphatidylserine externalization

Introduction

The treatment by assisted reproductive technology of men carrying chromosomal translocation changed after the introduction of ICSI (Palermo *et al.*, 1992; Van Steirteghem *et al.*, 1993) and preimplantation genetic diagnosis techniques (PGD) (Handyside *et al.*, 1989; Liebaers *et al.*, 1998). Reciprocal and Robertsonian translocations are frequent in infertile men (Van Assche *et al.*, 1996). Indeed, translocation carriers are found in 0.6% of infertile couples, and in 2–3.2% of males with severe infertility (Escudero *et al.*, 2003). Among different hypotheses to explain the infertility of these patients, the increased expression of apoptosis (Koykul *et al.*, 2000; Eaker *et al.*, 2001) and the role of the specific meiotic segregation of chromosomal translocations have been proposed (Van Assche *et al.*, 1999; Egozcue *et al.*, 2000).

It has been suggested that apoptosis is an important process involved in normal spermatogenesis (Rodriguez *et al.*, 1997) and disordered apoptosis was shown to be involved in

male infertility. In animals, the modification by knock-out of regulating genes of apoptosis involves male infertility (Knudson *et al.*, 1995). In human sperm cells, the overexpression of this physiological programmed cell death has been measured in germinal cells of ejaculates (Baccetti *et al.*, 1996; Muratori *et al.*, 2000; Oosterhuis *et al.*, 2000) and in testicular biopsies (Gorczyca *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1997; Hikim *et al.*, 1998) of patients with abnormal spermatogenesis.

An early event of apoptosis in somatic cells is the externalization of phosphatidylserine (PS). This phospholipid is located in the inner leaflet of the plasma membrane of intact cells. PS is a negatively charged phospholipid, which has a high affinity for annexin V. Externalization of PS enables a specific binding to this molecule, which can be detected by immunofluorescence (Annexin V binding assay) (Goossens *et al.*, 1995; Reutelingsperger and Van Heerde, 1997). Later, during apoptosis, double-stranded DNA fragmentation occurs, which can be measured by the terminal

deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labelling (TUNEL) reaction (Sgonc and Wick, 1994).

Aberration of not only the apoptosis phenomenon, but also of meiotic segregation in human sperm could explain the infertility of these men. Until now, this hypothesis was only studied in animals (Koykul *et al.*, 2000; Eaker *et al.*, 2001). The aim of this study was to measure both apoptotic markers (using Annexin V binding and TUNEL assays) and meiotic segregation [by fluorescence *in situ* hybridization (FISH)] in the ejaculated sperm cells of patients with chromosomal translocations and in the sperm of fertile donors (control population). The purpose was to analyse whether a dysfunction of physiological apoptosis and the specific meiotic segregation mode of chromosomal translocation could be associated with infertility and the alterations of sperm parameters in these patients.

Materials and methods

Patients

The men included in our study belonged to couples who visited the Centre for Reproductive Medicine of the university hospital, Brussels, Belgium, for infertility or for PGD. All couples received genetic counselling. In all couples, only the man was affected. The female partners did not have any intercurrent diseases or endocrine problem, and had a normal karyotype (46,XX). Chromosomal analysis for karyotype was performed on cultures of peripheral blood lymphocytes by the standard method (Rooney and Czepulowski, 1992).

Written consent for the treatment was obtained for all patients.

20 men were included in the study, divided into 14 carriers of a reciprocal translocation [11 fresh samples and 3 frozen samples (nos. I, II and III)] and 6 carriers of a Robertsonian translocation (6 fresh sperm). A control population consisted of 20 semen donors. All the control samples showed normal semen parameters according to the criteria of the World Health Organization (WHO, 1999).

Semen samples

Sperm samples were collected by masturbation into plastic jars, after 3–5 days of sexual abstinence. They were allowed to liquefy for 30 min at 37°C, and were then evaluated according to WHO (1999) criteria. The variables taken into consideration were sperm concentration and progressive motility (a + b).

Three semen samples were frozen (I, II and III) for practical reasons. These samples were diluted with an equal volume of cryoprotective medium (TYC; Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA). After equilibration, the solution was loaded in straws, which were frozen at 20 cm above the liquid nitrogen for 15 min, and then at 10 cm for 15 min. Afterwards, they were plunged into liquid nitrogen at –196°C. The specimens were thawed at room temperature for 10 min. The removal of cryoprotectant was carried out by a washing procedure (500 g, 5 min, room temperature).

Annexin V binding assay

Translocation of PS to the outer leaflet of the plasma membrane was detected by Annexin V–fluorescein isothiocyanate (FITC; Sigma, France). PS is normally found on the cytoplasmic face of the plasma membrane, and translocation to the extracellular leaflet involves a plasma membrane alteration. Since the nuclear and plasma membranes of dead cells are also damaged, the assay includes staining with the DNA stain propidium iodide (PI; Sigma) to assess viability. As cryopreservation is deleterious to the plasma membrane, this technique was only applied on fresh sperm. By fluorescence microscopy, AnnexinV–FITC was observed as green fluorescence and PI as red. For this assay,

1 µl AnnexinV–FITC (Sigma, France) was freshly mixed with 0.5 µl PI in 100 µl buffer solution (10 mmol/l HEPES, 150 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl, 1 mmol/l MgCl₂, 1.8 mmol/l CaCl₂) according to the instructions provided by the manufacturer (Sigma). An equal volume of this preparation was gently added to the sperm aliquot and the mixture was incubated in the dark, at room temperature, for 15 min. Analysis of the sample was performed by conventional epifluorescent microscopy (emission: 525–617nm). At least 200 spermatozoa were randomly assessed per slide in a minimum of five fields. As in the literature, the intra-observer and inter-observer variabilities were <6% for this technique (Barroso *et al.*, 2000; Duru *et al.*, 2001).

Four patterns of fluorescence were observed: (i) viable sperm with externalized PS (green) that stained only with annexin V–FITC (AN+PI–) = apoptosis-live; (ii) dead sperm without externalized PS (red) that stained only with PI (AN–PI+) = intact-dead; (iii) dead sperm with externalized PS (red and green) that stained both with annexin V–FITC and PI (AN+PI+) = apoptosis-dead; (iv) intact sperm without any staining (AN–PI–) = intact-live.

TUNEL reaction

DNA fragmentation in sperm was detected by the ‘in-situ cell death detection kit’ (Roche, Belgium) according to the instructions of the manufacturer, as described by Stouffs *et al.* (2004). Ejaculated sperm cells were washed twice in 5 ml phosphate-buffered saline (PBS) and once in 1 ml PBS followed by at least one night and a maximum of 48 h incubation at –20°C in acetic acid:methanol (1:3). The samples were spread on polylysine slides and the cells were permeabilized in 0.1 mol/l sodium citrate for 30 min at 70°C, incubated in the TUNEL reaction mixture for 1 h at 37°C after which the detection with converter-alkaline phosphatase and Nitroblue Tetrazolium–5-bromo-4-chloro-3-idolyl phosphate (NBT-BCIP) (Roche) was performed. Slides were counterstained by Methyl Green and analysed by light microscopy (data analysis performed on at least 400 Spermatozoa). For each test, positive (DNase: 2 UI/ml) and negative controls were included.

FISH

For each patient, all chromosomal translocations were initially defined by a lymphocyte karyotype.

Sperm from the male translocation carriers were analysed by FISH in order to collect data on the different modes of meiotic segregation. The method used has been described by Van Assche *et al.* (1999). Briefly, the semen sample was first washed in PBS and fixed in acetic acid:methanol (1:3). Sperm were then spread on Superfrost Plus glass slides (Kindler GmbH, Freiburg, Germany) and washed in 2×sodium chloride/sodium citrate (SSC). Decondensation of these sperm was performed by incubation for 5 min in 1 mol/l Tris buffer, pH 9.5, containing 25 mmol/l dithiothreitol. The slides were then washed in 2×SSC and 1×PBS, dehydrated through ethanol series and finally air-dried.

The probe mixture was prepared according to the type and localization of chromosomal translocation using manufacturer’s recommendations (Vysis Cytocell probes). To detect the different chromosomal combinations obtained after meiosis of reciprocal translocations, three different probes lying on both sides of the translocation breakpoints were chosen. These probes were a combination of one or two centromeric probes and one telomeric or locus-specific probe, permitting a unique signal specific to each segregation type (Figure 1a).

The probes used in the case of Robertsonian translocations were usually telomeric or region-specific probes for chromosomes 13, 14, 21 and 22 (Figure 1b). For chromosome 15, the centromeric probe was used if no polymorphism was present. In the case of polymorphism, a locus-specific or subtelomeric probe was preferred.

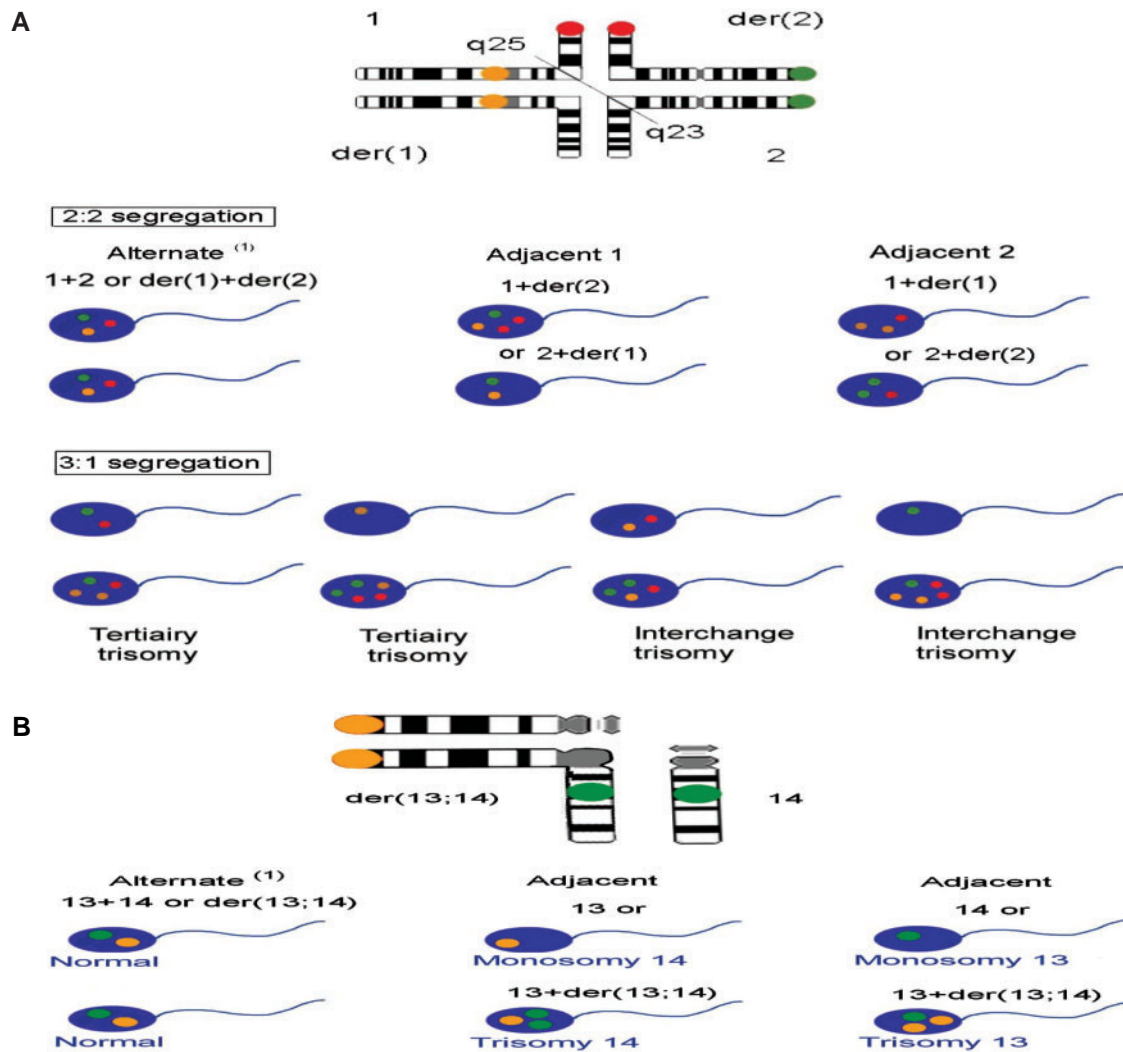


Figure 1. (A) Detection by FISH of different chromosomal combinations obtained after meiosis of reciprocal translocation [ex: 46,XY,t(1;2)(q25;q23)]. Quadrivalent shows chromosome pairing between chromosomes 1 and 2 during meiotic prophase. The large coloured circles indicate the location of the probes. Orange circle at the centromeric region of chromosome 1: orange-labelled probe specific for α -satellite1. Red circle at 1q telomeric region of chromosome 1: red-labelled probe specific for the subtelomeric region 1q. Green circle at 2p telomeric region of chromosome 2: green-labelled probe specific for the subtelomeric region 2p. Different modes of segregation are shown with three-colour FISH. (B) Detection by FISH of different chromosomal combinations obtained after meiosis of Robertsonian translocation [ex: 45,XY,der(13;14)]. Chromosome pairing between acrocentric chromosomes 13 and 14 during meiotic prophase. The large coloured circles indicate the location of the probes. Orange circle at the subtelomeric region of chromosome 14q. Green circle at q14.3 specific region of chromosome 13. Different modes of segregation are shown with two-colour FISH.

Two independent observers interpreted the signals obtained in sperm. The number of counted sperm depended on the initial sperm concentration.

Statistical analysis

Analysis of the data was carried out using the Stat View (SAS Institute, 1998) program. Values were compared by the Mann-Whitney test and correlations were studied by the Spearman test. For all tests, the $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Semen analysis

Based on the criteria of the WHO, the results of the semen analysis are summarized in Table I.

Significantly higher values of concentration and forward motility were found in the control population ($n = 20$) than in samples of reciprocal ($n = 20$, $P < 0.001$) and Robertsonian translocation carriers ($n = 6$, $P = 0.0003$ for concentration, and $P = 0.0042$ for forward motility). All samples of the Robertsonian group showed oligozoospermia, while the reciprocal translocation group varied from normozoospermia to oligozoospermia.

Results of Annexin V binding assay and TUNEL reaction

The low sperm number in samples of translocation carriers did not always allow for the different tests to be performed. Depending on the initial semen concentration, the different techniques were applied (Annexin V binding assay, TUNEL reaction, FISH). The list of assays applied to each sample and the type of translocation is presented in Table II.

Table I. Characteristics of the semen samples of reciprocal and Robertsonian translocation groups

Sample	Concentration ($\times 10^6$ /ml)	Motility a + b (%)
Reciprocal translocation		
1	0.10	0
2	67.00	40
3	42.70	45
4	6.20	8
5	2.40	6
6	8.20	55
7	24.50	48
8	1.20	38
9	64.00	53
10	22.60	45
11	131.00	38
I	11.40	23
II	3.20	39
III	40.00	30
Median	17.00	38
Robertsonian translocation		
12	0.01	0
13	4.70	24
14	3.50	10
15	5.80	14
16	1.40	18
17	2.60	52
Median	3.50	16.0

Annexin V binding assay

The results of this test are summarized in Tables IIIa (translocation patients) and IIIb (control samples). Translocation carriers showed a significantly higher proportion of sperm with externalized PS (AN+PI-, $P = 0.007$ for reciprocal translocation group, $P = 0.0006$ for Robertsonian group; AN+PI+, $P < 0.0001$ for reciprocal translocation group, $P = 0.0002$ for Robertsonian group), and a lower percentage of intact sperm (AN-PI-, $P =$

0.0002 for reciprocal translocation group, $P = 0.0004$ for Robertsonian group) than semen donors. No difference appeared between carriers of reciprocal and Robertsonian translocation.

TUNEL reaction

The results are summarized in Tables IIIa and IIIb. The rates of DNA fragmentation investigated by TUNEL reaction were higher in samples of translocation carriers ($n = 14$) than in samples of semen donors ($P < 0.0001$). There were no significant differences between fresh and cryopreserved samples and no differences between the two types of chromosomal translocation.

Correlation analysis between Annexin V and TUNEL measures

No correlation was found between rates of sperm with externalized PS (AN+PI-; AN+PI+; AN+PI- plus AN+PI+) and TUNEL reaction-positive sperm for fresh samples of the control population ($n = 20$), for the reciprocal translocation ($n = 7$) and for the Robertsonian translocation ($n = 4$) carrier populations.

Study of meiotic segregation by FISH

In translocation carriers

The results are summarized in Tables IV and V. For each patient included in the reciprocal translocation group ($n = 7$), the karyotype revealed different chromosomes and breakpoints. The measures by FISH showed that the proportion of gametes produced by alternate (from 33.0 to 58.8%) and adjacent I (from 4.6 to 43.8%) segregation were predominant in the sperm analysed in this group. In the case of sample 8, the FISH results were not included in the statistical analysis because of the low sperm number assessed ($n = 134$). Only in patient II was the rate of 3:1 segregation higher (51.8%) than in other samples (from 2.0 to 32.0%) (Table IV).

Table II. Assays applied on samples of translocation carriers

Sample	Karyotype	PS externalization analysis (Annexin V binding assay)	DNA fragmentation analysis (TUNEL reaction)	Chromosomal segregation (FISH)
Reciprocal translocation group				
1	46,XY,t(9;14)(q32;p11.2)	yes	no	no
2	46,XY,t(3;14)(q21;q32),ins(14;2)(q32;q33q37)	yes	yes	no
3	46,XY,t(1;2)(q25;q23)	yes	yes	yes
4	46,XY,t(2;22)(q33;p11)	yes	no	yes
5	46,XY,t(1;2)(q42;q21)	yes	yes	yes
6	46,XY,t(4;18)(q31.1;p11.2)	yes	yes	yes
7	46,XY,t(1;5)(p31.1;q33.3)	yes	yes	no
8	46,XY,t(12;16)(p11.2;p13.1)	yes	no	yes
9	46,XY,t(11;19)(p11.2;p13.1)	yes	yes	no
10	46,XY,t(2;13)(p16;q31)	yes	no	no
11	46,XY,t(9;17)(q22;p13)	yes	yes	no
I	46,XY,t(4;11)(q35;q13)	no	yes	yes
II	46,XY,t(7;15)(p15.3;q26)	no	yes	yes
III	46,XY,t(10;17)(q22.1;q21.3)	no	yes	yes
Robertsonian translocation group				
12	46,XY,t(14;15)(q32;q13)	yes	no	no
13	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	yes	yes	yes
14	45,XY,der(21;22)(q10;q10)	yes	no	yes
15	45,XY,der(13;15)(q10;q10)	yes	yes	yes
16	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	yes	yes	yes
17	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	yes	yes	yes

PS = phosphatidylserine; TUNEL = terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling; FISH = fluorescence *in situ* hybridization.

Table IIIa. Measures of phosphatidylserine (PS) externalization by Annexin V binding assay and DNA fragmentation by TUNEL reaction in sperm derived from patients with chromosomal translocation

Sample	Annexin V binding assay (PS externalization)				TUNEL
	AN+PI- Apoptosis-live (%)	AN+PI+ Apoptosis-dead (%)	AN-PI+ Intact-dead (%)	AN-PI- Intact-live (%)	DNA fragmentation (%)
Reciprocal translocation group					
1	14	48	5	33	NM
2	17	25	18	40	6
3	7	35	11	47	11
4	28	64	2	6	NM
5	10	64	22	4	22
6	2	43	10	45	16
7	7	8	3	82	22
8	15	36	12	37	NM
9	16	19	27	38	19
10	5	13	13	69	NM
11	3	34	13	50	25
I	NM	NM	NM	NM	13
II	NM	NM	NM	NM	12
III	NM	NM	NM	NM	5
Median	10	35	12	40	14.5
Robertsonian translocation group					
12	36	48	12	4	NM
13	18	40	11	31	18
14	12	42	36	10	NM
15	12	26	36	26	21
16	12	22	7	59	26
17	13	31	27	29	30
Median	12	35	19	27	23

All the samples were fresh except I, II and II were frozen.

AN+PI- = viable sperm with externalized PS, apoptosis-live; AN+PI+ = dead sperm with externalized PS, apoptosis-dead; AN-PI+ = dead sperm without externalized PS, intact-dead; AN-PI- = intact sperm, intact-live; NM = no measure.

Table IIIb. Measures of phosphatidylserine (PS) externalization by Annexin V binding assay and DNA fragmentation by TUNEL reaction in sperm derived from control group

Sample	Annexin V binding assay (PS externalization)				TUNEL
	AN+PI- Apoptosis-live (%)	AN+PI+ Apoptosis-dead (%)	AN-PI+ Intact-dead (%)	AN-PI- Intact-live (%)	DNA fragmentation (%)
A	2	4	2	92	2
B	4	4	5	87	4
C	1	0	16	83	2
D	0	0	5	95	3
E	1	1	23	75	4
F	2	4	15	79	1
G	2	2	14	82	2
H	10	6	24	60	4
I	6	6	23	65	2
J	11	10	18	61	1
K	5	21	14	60	1
L	4	16	24	56	5
M	4	5	25	66	2
N	5	8	15	73	4
O	7	3	13	77	1
P	6	0	2	92	8
Q	2	4	6	88	2
R	4	1	1	94	1
S	3	10	10	77	0
T	15	10	28	47	4
Median	4	4	14	77	2

AN+PI- = viable sperm with externalized PS, apoptosis-live; AN+PI+ = dead sperm with externalized PS, apoptosis-dead; AN-PI+ = dead sperm without externalized PS, intact-dead; AN-PI- = intact sperm, intact-live; PI = propidium iodide.

Table IV. Meiotic segregation analysis by FISH in sperm from patients with reciprocal translocation

Sample	Karyotype	n	Seg. 2:2			Seg. 3:1			Seg. 4:
			Alternate (%)	Adj. 1 (%)	Adj. 2 (%)	Tertiary Trisomy (%)	Interchange trisomy (%)	Monosomy (%)	(%)
3	46,XY,t(1;2)(q25;q23)	996	56.0	38.8	0.6	1.2	0.8	2.6	0
4	46,XY,t(2;22)(q33;p11)	1026	53.9	43.8	0.3	0.5	0.6	0.9	0
5	46,XY,t(1;2)(q42;q21)	1008	45.7	40.5	4.6	2.0	2.6	4.4	0.2
6	46,XY,t(4;18)(q31.1;p11.2)	1049	46.4	41.3	2.0	1.3	0.8	8.2	0
I	46,XY,t(4;11)(q35;q13)	1000	33.0	30.0	4.0	9.0	3.0	20.0	1.0
II	46,XY,t(7;15)(p15.3;q26)	500	37.6	4.6	5.8	2.4	2.8	46.6	0.2
III	46,XY,t(10;17)(q22.1;q21.3)	1002	58.8	30.2	0.8	2.4	1.3	6.5	0

n = count of sperm analysed by FISH technique; Seg. = segregation; Adj. = adjacent.

Table V. Meiotic segregation analysis with FISH technique in sperm from patients with Robertsonian translocation

Sample	Karyotype	n	Normal (%)	Nullisomy + disomy (%)		Diploidy (%)
				Chromosome A	Chromosome B	
13	45,XY,der(13;14)	1001	83.5	7.8	8.7	0
14	45,XY,der(21;22)	1016	85.7	6.9	6.7	0.7
15	45,XY,der(13;15)	1021	76.0	9.7	13.7	0.6
16	45,XY,der(13;14)	978	85.8	6.4	7.1	0.7
17	45,XY,der(13;14)	1003	88.5	4.3	3.6	3.6

A is the first chromosome described in the karyotype, and B the second; for example, 45,XY,der(13;14): chromosome 13 is A and chromosome 14 is B. n = count of sperm analysed by FISH technique.

In the Robertsonian translocation group (n = 5), samples 13, 16 and 17 had the same karyotype [45,XY,der(13;14)]. The measures by FISH revealed a majority of normal meiotic segregation form (Table V) (from 76.0 to 88.5%) in this group.

Correlation between balanced or normal sperm and concentration, forward motility parameters, annexin V and TUNEL measures

No significant correlation appeared between rates of balanced plus normal sperm on the one hand and concentration, forward motility, annexin V and TUNEL measures on the other. This correlation was absent for each reciprocal and Robertsonian group.

Discussion

The cellular homeostasis is regulated not only by the growth and differentiation of cells, but also by cell death through a process known as apoptosis. This programmed cell death is required for the development of functional spermatogenesis in the testis (Rodriguez *et al.*, 1997). Dysregulations of this biological process involve abnormalities in the production of male gametes, and male infertility (Hsueh *et al.*, 1996; Tesarik *et al.*, 1998; Fujisawa *et al.*, 1999). Apoptosis of sperm may originate both in

the testis and after the sperm have left the testis, since it can be induced in ejaculated sperm (Gorga *et al.*, 2001; Paasch *et al.*, 2004). The involvement of this mechanism of cell suicide in sterility was studied by Eaker *et al.* (2001) in male mice heterozygous for Robertsonian centric fusion chromosomal translocation. The authors suggested the presence of a checkpoint process, which identifies aberrant meiosis and allows for an increased apoptosis expression in spermatocyte I. Nevertheless, it seems that this programmed cell death is not completely efficient, as the authors describe the presence of a few unbalanced sperm in the mice. The involvement of apoptosis may explain the infertility of patients who carry chromosomal translocations.

Some authors have studied the ultrastructural morphology of the sperm of one patient with autosomal translocation (Baccetti *et al.*, 2003), but the markers of apoptosis in germinal cells of the men with chromosomal translocation have never been studied. The biochemical and cellular modifications induced by apoptosis are well known. Plasma membrane alteration with exposure of PS at the outer leaflet membrane is an early event in apoptosis (Vermes *et al.*, 1995; Van Engeland *et al.*, 1998). This process is clearly related to programmed cell death in somatic cells (Martin *et al.*, 1995; Vermes *et al.*, 1995; Narayan *et al.*, 2001); its significance and specificity in mature sperm has been discussed in recent research (Gadella and Harrison, 2002; Kotwicka *et al.*, 2002). Therefore, the results of the Annexin V binding assay are mainly an indicator of the quality of the plasma membrane. The results of the present study show that plasma membrane alterations are higher in patients with chromosomal translocations than in the control group. Our data confirm the literature data on live sperm with externalized PS (AN+PI-) in infertile men, but show higher rates of dead sperm with externalized PS (AN+PI+) (Oosterhuis *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2002). These membrane alterations could explain the low fertilization rates of these patients (data not shown).

The caspase enzyme family mediates apoptosis. One of these proteases, caspase 3, specifically induces internucleosomal DNA fragmentation in somatic cells (Enari *et al.*, 1998). This nuclear alteration can be detected by the TUNEL technique which uses terminal deoxynucleotidyl transferase and labelled dUTP to directly label the 3' ends of fragmented DNA. Enzymatic detection was preferred in our study, since it makes it possible to analyse more cells without time limitation, in contrast to the fluorescence method. As with somatic cells,

TUNEL reaction can be applied to germinal cells, but it is not certain whether it allows for the detection of only DNA fragmentation due to apoptotic process. Sakkas *et al.* (2002) showed that there were high rates of TUNEL positive and the expression of apoptosis markers such as Fas, p53 and Bcl-x in sperm samples with a low concentration and a low rate of normal morphology. However, in the study of Sakkas *et al.*, DNA fragmentation was not always concomitant with the expression of these apoptotic markers. The authors suggested that at least two different populations of sperm exist in the ejaculated sperm of these men: one population escaped programmed cell death initiated in the testis, and the second population underwent problems in nuclear remodelling of spermiogenesis during protamine deposition. Moreover, Weng *et al.* (2002) indicated that there were in the sperm of infertile men small germinal cell populations containing sperm with programmed cell death initiated through the action of caspases. However, the caspase 3 immunostaining rates are lower than PS externalization rates and TUNEL positive rates. Two hypotheses may explain this phenomenon. First, the time dissociation between caspase activation and cellular modification expression because of apoptosis; second, the existence of different activation processes that use different caspases or are caspase independent. So it seems that DNA fragmentation measured by TUNEL in sperm may not only be a marker of apoptosis, and that the activation of apoptosis in human sperm may follow different paths from those described in somatic cells.

Our TUNEL results confirm the data found by different authors in the sperm of infertile men (Oosterhuis *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2002). Fertilization rates (Host *et al.*, 2000; Marchetti *et al.*, 2002), embryo quality (Sakkas *et al.*, 1998), and pregnancy rates (Duran *et al.*, 1998) are negatively correlated to DNA fragmentation rates in sperm. Infertility of men with chromosomal translocations could therefore be partly explained by high DNA fragmentation in sperm. The lack of correlation between annexin V and TUNEL results may be an indication of the time dissociation in both apoptosis processes. As shown by Oosterhuis *et al.* (2000), this finding can be explained by the fact that expression of PS and presence of DNA strand breaks occur during different phases of the apoptotic process.

The sperm parameters of the patient and control groups showed significant differences. This suggests the involvement of selective processes excluding a proportion of germinal cells. Our data confirm oligozoospermia in most Robertsonian patient samples (Guichaoua *et al.*, 1990; De Braekeleer and Dao, 1991). However, since the chromosomes and breakpoints involved are different in the sperm of reciprocal carriers, the outcome in gene expression and spermatogenesis also vary individually. Increased knowledge of gene localizations will result in a better understanding of the different mechanisms involved.

Nowadays, the FISH technique is an efficient method; it is frequently applied, and allows for the analysis of meiotic segregation in the germinal cells of translocation carriers (Estop *et al.*, 1997; Van Assche *et al.*, 1999; Escudero *et al.*, 2000; Frydman *et al.*, 2001). By using subtelomeric and specific locus probes, all unbalanced chromosomal combinations (Van Assche *et al.*, 1999) can be detected. If one member of a couple is a reciprocal translocation carrier, meiotic segregation involves

a high risk of repeated miscarriages and a conceptus with chromosomal abnormalities (Stern *et al.*, 1999; Munné *et al.*, 2000). Depending on the chromosomes and breakpoints involved, the proportion of different types of meiotic segregation varies. Indeed, adjacent 1 segregation is frequently expected when the shortest centromeric segment is longer than the longest translocated segment; adjacent 2 segregation is usually observed in translocation with small centromeric segments; and 3:1 segregation is favoured when centromeric and translocated segments are unequal in size. In 90% of cases, chromosome 9, or acrocentric chromosomes, or breakpoints near the centromere are found (Simpson and Bischoff, 2002). Our data confirm these observations and in particular explain 3:1 segregation in the sperm of patient no. II [46,XY,t(7;15)(p15.3;q26)]. No publications describing the same reciprocal translocations are available, which excludes any comparison. The extent and diversity of this translocation type, however, explains the lack of data in the literature. For Robertsonian translocation carriers, our results are similar to those of other authors, demonstrating that most gametes are balanced (Scriven *et al.*, 2001; Simpson and Elias, 2003). It seems that alternate segregation occurs more frequently (Simpson and Bischoff, 2002) but the underlying mechanism is unclear. The probability of achieving a pregnancy in a couple when the man is a translocation carrier depends on the rates of balanced or normal embryos, which correlates with the rates of balanced or normal gametes (Escudero *et al.*, 2000; Munné *et al.*, 2000). Even if sperm are unbalanced, they keep their fertilizing ability. Moreover, translocation carriers show a high incidence of diploidy and chromosomal aneuploidies (Vegetti *et al.*, 2000). This suggests that these men, when they father a child, could transmit chromosomal abnormalities by meiotic segregation process, as well as by interchromosomal effect. In genetic counselling, the FISH technique on sperm can therefore be offered to these couples included in the assisted reproduction programme, and patients can be counselled for PGD, donor gametes or adoption, depending on the evaluated risk. The proportion of balanced gametes rates found in our study is high, suggesting selection pressure against a proportion of unbalanced sperm. No correlation was found between rates of balanced gametes and sperm concentration, forward motility, Annexin V and TUNEL measures. It would be interesting to confirm these data in a larger patient group, but the limits of this type of study are the numbers of sperm available for all these measures, and the availability of probes in FISH technique.

In conclusion, our data show a predominant population of balanced gametes in sperm of chromosomal translocation carrier patients. Moreover PS externalization and DNA fragmentation rates are significantly higher in ejaculated sperm of these patients than in donor sperm. Therefore, there is a higher chance that normal balanced sperm in the same sample will ultimately fertilize an oocyte. Annexin V binding assay and TUNEL reaction combined with FISH test could be used to predict the outcome of ICSI for these patients before the treatment. However, these tests cannot be applied during ICSI procedure, because they need high available sperm number and labelled sperm cannot be injected. To confirm and explain the involvement of apoptosis in sperm of chromosomal translocation carrier

patients, it would be interesting to study other apoptotic markers (Fas, caspases, mitochondrial membrane potential etc.) in the semen samples of a larger group of patients.

Acknowledgements

We would like to thank the clinical, paramedic and laboratory staff of the Centre for Reproductive Medicine, AZ-VUB Brussels, K.Stouffs for her help in measuring DNA fragmentation by TUNEL assay, and Dr P.Platteau for his contribution in counselling of patient translocation carriers and Dr B.Aublet Cubellier (Departement d'épidémiologie, CHU Clermont Ferrand), for his precious help for statistical analysis.

References

- Baccetti B, Collodel G and Piomboni P (1996) Apoptosis in human ejaculated sperm cells. *J Submicrosc Cytol Pathol* 28,587–596.
- Baccetti B, Bruni E, Collodel G, Gambera L, Moretti E, Marzella R and Piomboni P (2003) 10, 15 reciprocal translocation in an infertile man: ultrastructural and fluorescence in-situ hybridization sperm study: case report. *Hum Reprod* 18,2302–2308.
- Baroso G, Morshedi M and Oehninger S (2000) Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 15,1338–1344.
- De Braekeleer M and Dao TN (1991) Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 6,245–250.
- Duran EH, Gurgan T, Gunalp S, Enginsu ME, Yarali H and Ayhan A (1998) A logistic regression model including DNA status and morphology of spermatozoa for prediction of fertilization in vitro. *Hum Reprod* 13,1235–1239.
- Duru NK, Morshedi M, Schuffner A and Oehninger S (2001) Cryopreservation–thawing of fractionated human spermatozoa and plasma membrane translocation of phosphatidylserine. *Fertil Steril* 75,263–268.
- Eaker S, Pyle A, Cobb J and Hande MA (2001) Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. *J Cell Sci* 114,2953–2965.
- Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F and Egozcue J (2000) Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 6,93–105.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A and Nagata S (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391,43–50.
- Escudero T, Lee M, Carel D, Blanco J and Munné S (2000) Analysis of chromosome abnormalities in sperm and embryos from two 45,XY,t(13;14)(q10;q10). *Prenat Diagn* 20,599–602.
- Escudero T, Abdelhadi I, Sandalinas M and Munné S (2003) Predictive value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis for translocations. *Fertil Steril* 79,1528–1534.
- Estop AM, Ciepely KM and Aston C (1997) The meiotic segregation pattern of a reciprocal translocation t(10;12)(q26.1;p13.3) by fluorescence in situ hybridization sperm analysis. *Eur J Hum Genet* 5,78–82.
- Frydman N, Romana S, Le Lorc'h M, Vekemans M, Frydman R and Tachdjian G (2001) Assisting reproduction of infertile men carrying a Robertsonian translocation. *Hum Reprod* 16,2274–2277.
- Fujisawa M, Hiramane C, Tanaka H, Okada H, Arakawa S and Kamidono S (1999) Decrease in apoptosis of germ cells in the testes of infertile men with varicocele. *World J Urol* 17,296–300.
- Gadella BM and Harrison RA (2002) Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Reprod* 67,340–350.
- Goossens EL, Reutelingsperger CP, Jonqsm FH, Kraayenhof R and Herme WT (1995) Annexin V perturbs or stabilises phospholipid membranes in a calcium-dependent manner. *FEBS Lett* 359,155–158.
- Gorczyca W, Tuziak T, Kram A, Melamed MR and Darzynkiewicz Z (1994) Detection of apoptosis-associated DNA strand breaks in fine needle aspiration biopsies by in situ end labelling of fragmented DNA. *Cytometry* 15,169–175.
- Gorga F, Galdiero M, Buommino E and Galdiero E (2001) Porins and lipopolysaccharide induce apoptosis in human spermatozoa. *Clin Diagn Lab Immunol* 8,206–208.
- Guichaoua MR, Quack B, Speed RM, Noel B, Chandley AC and Luciani JM (1990) Infertility in human males with autosomal translocations: meiotic study of a 14;22 Robertsonian translocation. *Hum Genet* 86,162–166.
- Handyside AH, Pattinson JK, Penketh RJ, Delhanty JD, Winston RM and Tuddenham EG (1989) Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* 18,347–349.
- Hikim APS, Wang C, Lue Y, Johnson L, Wang XH and Swerdloff RS (1998) Spontaneous germ cell apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death. *J Clin Endocrinol* 83,152–156.
- Host E, Lindenberg S and Smidt-Jensen S (2000) The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand* 79,559–563.
- Hsueh AJW, Eisenhauer K, Chun SY, Hsu SY and Billig H (1996) Gonadal cell apoptosis. *Recent Prog Horm Res* 51,433–455.
- Knudson CM, Tung KS, Tourtellotte WG, Brown GA and Korsmeyer SJ (1995) Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 270,96–99.
- Kotwicka M, Jendraszak M and Warchol JB (2002) Plasma membrane translocation of phosphatidylserine in human spermatozoa. *Folia Histochem Cytobiol* 40,111–112.
- Koykul W, Baguma-Nibasheka M, King WA and Basrur PK (2000) Meiosis and apoptosis in germ cells of X-autosome translocation carrier boars. *Mol Reprod Dev* 56,448–457.
- Liebaers I, Sermon K, Staessen C, Joris H, Lissens W, Van Assche E, Nagy P, Bonduelle M, Vandervost M, Devroey P and Van Steirteghem A (1998) Clinical experience with preimplantation genetic diagnosis and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 13,186–195.
- Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM, Lipshultz LI and Kim ED (1997) In situ end-labelling of human testicular tissue demonstrates increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis. *Fertil Steril* 68,1065–1069.
- Marchetti C, Obert G, Deffosez A, Formstecher P and Marchetti P (2002) Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by cytometry in human sperm. *Hum Reprod* 17,1257–1265.
- Martin S, Reutelingsperger C and McGahon A (1995) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition of overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 182,1545–1556.
- Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Fung J, Gianaroli L and Cohen J (2000) Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Fertil Steril* 73,1209–1218.
- Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, Gambera E, Baccetti B, Biagiotti R, Forti G and Maggi M (2000) Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl* 21,903–912.
- Narayan P, Mentzer RM and Lasley RD (2001) Annexin V staining during reperfusion detects cardiomyocytes with unique properties. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281,1931–1937.
- Oosterhuis GJ, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg E, Lambalk C, Schoemaker J and Vermes I (2000) Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertil Steril* 74,245–250.
- Paasch U, Sharma RK, Gupta AK, Grunewald S, Mascha EJ, Thomas AJ, Glander HJ and Agarwal A (2004) Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biol Reprod* 71,1828–1837.
- Palermo G, Joris H, Devroey P and Van Steirteghem A (1992) Pregnancies after injection of a single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340,17–18.
- Reutelingsperger CP and Van Heerde WL (1997) Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalysed inflammation and coagulation during apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 53,527–532.
- Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I and Vassalli P (1997) An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J* 16,2262–2270.
- Rooney DE and Czepulowski BH (1992) (eds) *Human Cytogenetics. A Practical Approach*, Vol 1, Constitutional Analysis. IRL Press, Oxford.
- Sakkas D, Umer F, Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi PG, Shoukir Y and Campana A (1998) Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 13,11–19.
- Sakkas D, Moffat O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N and Bizzaro D (2002) Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 66,1061–1067.
- Scriven PN, Flinter FA, Braude PR and Ogilvie CM (2001) Robertsonian translocations—reproductive risks and indications for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* 16,2267–2273.
- Sgonc R and Wick G (1994) Methods for the detection of apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol* 105,327–332.

- Shen HM, Dai J, Chia SE, Lim A and Ong CN (2002) Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod* 17,1266–1273.
- Simpson JL and Bischoff F (2002) Genetic counseling in translocations. *Urol Clin North Am* 29,793–807.
- Simpson JL and Elias E (2003) *Genetics in obstetrics and gynecology*. 3rd edn, Saunders, Philadelphia, PA.
- Stern C, Pertile M, Norris H, Hale L and Baker HW (1999) Chromosome translocations in couples with in vitro fertilization implantation failure. *Hum Reprod* 14,2097–2101.
- Stouffs K, Lissens W, Verheyen G, Van Landuyt L, Goosens A, Tournaye H, Van Steirteghem A and Liebaers I (2004) Expression pattern of the Y-linked PRY gene suggests a function in apoptosis but not in spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* 10,15–21.
- Tesarik J, Greco E, Cohen-Bacrie P and Mendoza C (1998) Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Mol Hum Reprod* 4,757–762.
- Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A and Liebaers I (1996) Cytogenetics of infertile men. *Hum Reprod* 11,1–24.
- Van Assche E, Staessen C, Vegetti W, Bonduelle M, Vandervost M, Van Steirteghem A and Liebaers I (1999) Preimplantation genetic diagnosis and sperm analysis by fluorescence in-situ hybridization for the most common reciprocal translocation t(11;22). *Mol Hum Reprod* 5,682–690.
- Van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B and Reutelingsperger CP (1998) Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phospholipid exposure. *Cytometry* 31,1–9.
- Van Steirteghem A, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smitz J, Wisanto A and Devroey P (1993) High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 8,1061–1066.
- Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, Liebaers I and Van Steirteghem A (2000) Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod* 15,351–365.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H and Reutelingsperger C (1995) A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexinV. *J Immunol Methods* 184,39–51.
- Weng SL, Taylor S, Morshedi M, Schuffner A, Duran EH, Beebe S and Oehninger S (2002) Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod* 8,984–991.
- World Health Organization (1999) *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen–Cervical Mucus Interaction*. 4th edn, Cambridge University Press, Cambridge.

Submitted on September 5, 2005; resubmitted on October 31, 2005; accepted on October 31, 2005

Publication n°4

Study of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm
of Robertsonian translocation carrier patients.

Brugnon F, Janny L, Communal Y, Darcha C, Szcapaniak C,
Pellestor F, Vago P, Pons-Rejraji H, Artonne C and Grizard G (2008)

Manuscrit en préparation.

Présentation de la publication n°4

Pour vérifier l'hypothèse émise en conclusion de notre publication n°3, nous avons réalisé une seconde étude sur des spermatozoïdes éjaculés de patients infertiles porteurs d'une translocation Robertsonienne (n=7) et sur une population contrôle d'hommes fertiles (n=7).

Pour une meilleure évaluation du processus apoptotique, nous avons utilisé plusieurs marqueurs qui sont complémentaires, puisque certains sont impliqués dans les mécanismes d'activation de l'apoptose (mise en jeu des caspases activées) alors que d'autres sont des conséquences de celle-ci (altérations structurales et nucléaires). Pour les patients porteurs d'une translocation Robertsonienne, une étude complémentaire de la ségrégation méiotique par technique FISH a été réalisée sur les spermatozoïdes éjaculés.

L'expression de la majorité des caspases activées (mesurée par un inhibiteur polycaspases) et plus spécifiquement de la caspase-3, -8 ou -9 activée ont été mesurées par l'utilisation de la méthode préalablement validée (publication n°1) utilisant un marquage par un colorant vital (propidium iodide) fluorescent rouge et un inhibiteur fluorescent vert de la ou (les) caspase(s) activée(s) mesurée(s). La fragmentation de l'ADN a été évaluée par technique TUNEL. Pour ces deux analyses, nous avons utilisé la cytométrie en flux comme moyen de détection. L'analyse ultrastructurale des spermatozoïdes a été réalisée par microscopie électronique et selon des critères décrits dans la littérature pour différencier les spermatozoïdes intacts, immatures, apoptotiques et nécrotiques.

Nos résultats (1) confirment la prépondérance de gamètes équilibrés chez les patients porteurs d'une translocation Robertsonienne ; (2) montrent une proportion de spermatozoïdes présentant une expression de la majorité des caspases activées et plus spécifiquement de la caspase-3, -8 ou -9 activées et une fragmentation de l'ADN significativement plus importante dans les éjaculats de patients porteurs d'une translocation chromosomique Robertsonienne,

comparée aux donneurs fertiles ; (3) montrent une prépondérance de spermatozoïdes présentant des modifications ultrastructurales caractéristiques d’immaturité et/ou d’apoptose dans les spermies des patients infertiles ; (4) montrent une corrélation positive entre la proportion des spermatozoïdes exprimant le phénotype d’apoptose tardive (spermatozoïdes morts avec un marquage poly-caspases, caspase -3, 8 ou -9 activée) et le pourcentage de spermatozoïdes présentant une fragmentation de l’ADN pour l’ensemble des sujets pris en compte dans notre étude (patients infertiles porteurs d’une translocation Robertsonienne et hommes fertiles).

D’après nos données, chez les patients porteurs d’une translocation chromosomique Robertsonienne, deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l’oligozoospermie et l’élimination des gamètes porteurs d’un déséquilibre chromosomique : l’altération de la spermatogenèse se caractérisant par de nombreuses cellules immatures et/ou un processus apoptotique important mis en évidence sur les spermatozoïdes éjaculés.

Dans ce travail, il ne nous a pas été possible à partir des caspases mesurées de déterminer une voie prépondérante d’activation puisque les proportions des spermatozoïdes exprimant chaque caspase activée n’étaient pas significativement différentes. L’une des hypothèses retenue pour expliquer ces résultats était un manque de spécificité de la mesure de chaque caspases activée. Nous avons alors développé la technique *western blot*. La mise au point que nous décrivons en préambule de la publication n°4 a montré un manque de spécificité de certains anticorps commerciaux notamment pour la détection de la caspase-3 activée et une sensibilité insuffisante de cette méthode pour être appliquée aux échantillons des patients de notre étude, présentant une sévère oligozoospermie.

Anticorps : dénomination, type, fournisseur	Espèce	Dilutions testées	Protéines reconnues selon le fournisseur	Contrôle(s) positif(s)
Cleaved Caspase-3 (Asp175) Antibody, anticorps polyclonal, Cell signaling technology	lapin	1/1000, 1/500 et 1/200 ↓ <u>Contrôle positif</u> : détection p32, p19 et p17 <u>Extraits protéiques de sperme</u> : aucune bande protéique détectée	Précurseur : p32 Fragments : p19, p17	Extrait protéique de cellules LNCap incubées avec du T0901317 (10µmol/l) durant 72 heures à 37°C
Caspase-3/ CPP32 :HRPRO, clone19, IgG2a, Becton Dickinson Biosciences	souris	1/1000, 1/500 et 1/200 ↓ <u>Contrôle positif et extraits protéiques de sperme</u> : - détection de p32 - absence de détection de p21 et p17	Précurseur : p32 Fragments : p21	Extrait protéique de cellules LNCap incubées avec du T0901317 (10µmol/l) durant 72 heures à 37°C

Tableau 5 Anticorps primaires testés pour la mise au point de la détection de la caspase-3 activée sur des extraits protéiques de sperme congelés-décongelés de patients présentant une oligoasthénospermie.

MISE AU POINT ET ADAPTATION AU SPERMATOZOÏDE HUMAIN DE LA
TECHNIQUE D'IMMUNODETECTION DES CASPASES -3, -8 ET -9 ACTIVEES PAR
WESTERN BLOT

L'analyse *in cellulo* basée sur la reconnaissance et la liaison au site actif enzymatique des caspases par un inhibiteur fluorescent est une technique sensible qui permet l'évaluation de la proportion de spermatozoïdes exprimant les caspases activées. Cependant, sa spécificité est discutée. Pour compléter notre étude, nous avons donc développé une méthode plus globale et spécifique basée sur les propriétés antigéniques des caspases : la technique *western blot* pour l'immunodétection des caspases-3, -8 et -9 activées. Cette deuxième technique de mesure d'expression des caspases activées dans le spermatozoïde humain a fait l'objet d'une mise au point avec

- Réalisation de tests avec plusieurs anticorps commerciaux dirigés contre les différentes caspases activées.
- Détermination des conditions optimales (dilution de l'anticorps, blocage de la réaction antigène-anticorps, conditions d'immunodétection,...)
- Validation de témoins appropriés (contrôles positifs).

Nous développerons les principaux éléments de cette mise au point et les limites de cette technique *western blot* appliquée au spermatozoïde humain.

1. Validation des contrôles positifs et des anticorps primaires

1.1 Immunodétection de la caspase-3 activée

Nous avons testé deux anticorps dirigés (résumé Tableau 5) contre les formes clivées de la caspase-3 en utilisant comme contrôle positif des extraits protéiques de cellules humaines

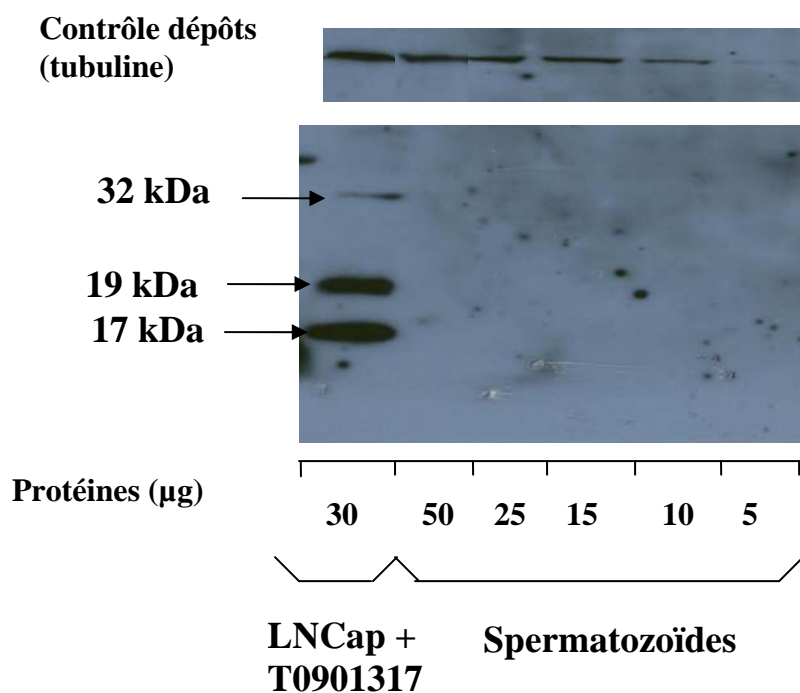


Figure 14

Immunodétection par *western blot* de l'expression de la caspase 3 activée

Un extrait protéique de cellules LNCap (30µg) dont l'activation de la caspase-3 a été induite par une incubation préalable avec un agoniste synthétique des LXR (T0901317) et des quantités croissantes d'extraits protéiques issus d'un pool de spermatozoïdes éjaculés congelés-décongelés provenant de patients présentant une oligoasthénozoospermie ont été analysées.

L'immunodétection a été réalisée par l'utilisation d'un anticorps primaire de lapin anti-caspase -3 (Cleaved Caspase-3 (Asp175) antibody, Cell Signaling technology ; 1/500) couplé à un anticorps secondaire adapté (Peroxidase conjugated affini pure anti-rabbit, Jackson Immunoresearch ; 1/5000).

Le contrôle des quantités protéiques déposées a été réalisé par une immunodétection anti- α tubuline.

LNCap (cellules tumorales humaines androgéno-dépendantes provenant d'adénocarcinome prostatique).

Le choix du premier anticorps testé était basé sur les résultats d'une étude préalable qui avait validé l'utilisation de cet anticorps primaire pour la détection des formes clivées de la caspase-3 sur des extraits protéiques de cellules LNCap (data soumis par l'équipe Génétique reproduction et Développement ; laboratoire oxystérol, LXR et tissu stéroïdogène, Clermont 2 ; Pr JM Lobaccaro et Dr S Baron) dont l'activation avait été induite par une incubation dans du T0901317 (10 μ mol/l, 72 heures, 37°C). La molécule T0901317 est un agoniste synthétique puissant (Repa *et al.*, 2000) des récepteurs nucléaires LXR (Liver X Receptor) dont l'effet inducteur de l'activation de la caspase-3 a été démontré au préalable sur un modèle de cellules pancréatiques en culture (Wente *et al.*, 2007). Cet anticorps primaire de lapin (Cleaved Caspase-3 (Asp175) antibody, Cell Signaling technology) est décrit selon le fournisseur comme étant dirigé contre la forme native (p32) et les formes clivées (p19 et p17) de la caspase-3 humaine. L'utilisation de cet anticorps primaire (dilution : 1/500) couplé à un anticorps secondaire adapté (Peroxidase conjugated affini pure anti-rabbit, Jackson Immunoresearch, 1/10000) a permis de révéler après différents temps d'exposition du film radiographique (1 minute à 3 heures) des bandes protéiques correspondantes à la caspase-3 native et clivée sur les extraits protéiques (30 μ g) de cellules LNCap pour lesquelles la caspase-3 a été activée.

Nous avons donc appliqué cette méthode à des quantités croissantes d'extraits protéiques (5, 10, 15, 25 et 50 μ g), provenant d'un pool de prélèvements de spermes éjaculés congelés-décongelés de patients présentant une oligoasthénotérazoospermie. Après exposition radiographique à des temps variables (1 minute à 3 heures), aucune bande n'a été détectée (Figure 14).

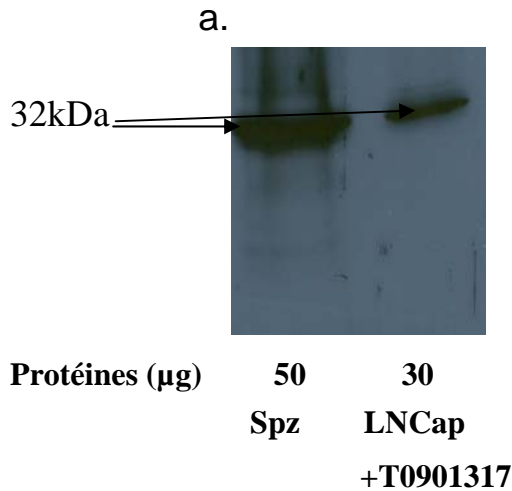


Figure 15

Immunodétection par *western blot* de l'expression de la caspase-3 activée par deux anticorps primaires différents

Un extrait protéique de cellules LNCap (30µg) dont l'activation de la caspase-3 a été induite par une incubation préalable avec un agoniste synthétique des LXR_s (T0901317) et un extrait protéique issu d'un pool de spermatozoïdes (spz) éjaculés congelés-décongelés (50µg) de patients présentant une oligoasthénozoospermie ont été analysés par *western blot*.

L'immunodétection a été réalisée par l'utilisation d'un anticorps primaire de souris anti-caspase 3 humaine (caspase 3/ CPP32, BD Biosciences, 1/500) couplé à un anticorps secondaire adapté (Goat Anti-Mouse IgG HRP, Millipore, 1/2000).

Nous avons alors utilisé un anticorps primaire, décrit auparavant (Marchetti *et al.*, 2004a) comme étant capable d'immunodétecter la caspase-3 activée dans le spermatozoïde humain. Cet anticorps de souris IgG2a anti-caspase-3 humaine (Caspase -3/ CPP32 : HRPO, clone 19, Becton Dickinson Biosciences) est présenté par le fournisseur pour reconnaître la forme native (p32) et une des formes clivées de la caspase-3 activée (p21). Cet anticorps primaire a été utilisé à des dilutions différentes (dilution 1/1000, 1/500 et 1/200) avec un anticorps secondaire adapté (Goat Anti-Mouse IgG HRP, Millipore, 1/2000) avec des temps d'exposition radiographiques variables (1 minute à 3 heures). Contrairement aux résultats rapportés par Marchetti *et al.*, 2004a, dans notre expérience, cet anticorps ne nous a pas permis d'immunodétecter les formes clivées de la caspase-3 aussi bien sur les extraits protéiques de cellules LNCap que sur les extraits protéiques des prélèvements de sperme (Figure 15).

Finalement, nous avons testé un troisième anticorps primaire anti-caspase-3 humaine d'un autre fournisseur et un témoin positif recommandé par ce fournisseur et selon les données de la littérature (Sanchez-Alcazar *et al.*, 2000). Avec cet anticorps primaire polyclonal de lapin (Caspase-3 (H-227) :SC-7148, Santa Cruz), la forme native (32kDa) et les formes clivée (p21, p17) de la caspase-3 (Figure 16) ont été immunodétectées sur des extraits protéiques de spermatozoïdes éjaculés congelés-décongelés présentant des paramètres spermiologiques altérés et sur des extraits protéiques (30µg) de cellules de Jurkat (Camptothecin treated Jurkat lysate, BD Biosciences) dont l'activation de la caspase-3 a été induite (J+) ou non (J-). Les cellules de Jurkat sont des cellules de lymphomes à lymphocyte T humain. Un traitement préalable à la camptothécine (4µM, 4 heures, 37°C) permet d'activer leur caspase -3.

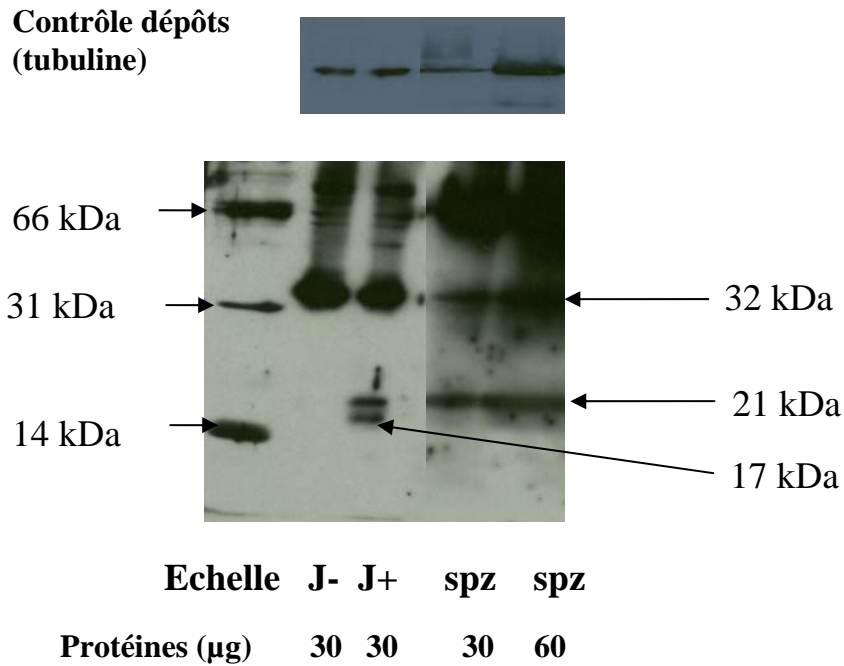


Figure 16

Immunodétection par *western blot* de l'expression de la caspase 3 activée

Des extraits protéiques ($30\mu\text{g}$) de cellules de Jurkat ayant été soumises (J+) ou non (J-) à une induction de l'activation de la caspase-3 (camptothecine, $4\mu\text{M}$, 4 heures, 37°C) et des extraits protéiques issus de spermatozoïdes (spz) éjaculés congelés-décongelés provenant de patients présentant une oligoasthénozoospermie ont été analysés.

L'immunodétection a été réalisée par l'utilisation d'un anticorps primaire de lapin polyclonal anti-caspase3 humaine (caspase-3 (H-277) :sc-7148, Santa Cruz ; 1/500), couplé à un anticorps secondaire adapté (Peroxidase conjugated affini pure anti-rabbit, Jackson Immunoresearch, 1/10000).

Le contrôle des quantités protéiques déposées a été réalisé par une immunodétection anti- α tubuline.

1.2 Immunodétection de la caspase -8 activée

Pour l'immunodétection de la forme zymogène (p55) et clivée (p43) de la caspase-8, le protocole expérimental et les caractéristiques de l'anticorps sont décrits dans le chapitre matériel et méthodes et dans le Tableau 3. Pour le contrôle positif, des extraits protéiques de cellules de Jurkat (Camptothecin treated Jurkat lysate, BD Biosciences) dont l'activation de la caspase-8 a été au préalable induite par un traitement à la camptothécine (4 μ M, 4 heures, 37°C) ont été utilisées (Figures 16, 17 et 18).

1.3 Immunodétection de la caspase -9 activée

Pour l'immunodétection de la forme zymogène (p46) et clivée (p37) de la caspase-9, le protocole expérimental et les caractéristiques de l'anticorps ont été décrits dans le chapitre matériel et méthodes et dans le tableau 3.

Pour le contrôle positif, des extraits protéiques (40 μ g) de cellules Hela (cellules du carcinome de col utérin humain), traitées par une forme recombinante de TRAIL contenant un tag histidine (his-TRAIL) à une concentration de 1 μ g/ml permettant d'activer la caspase-9 (Merino *et al.*, 2006) pendant 5 heures (extraits protéiques fournis par Drs Olivier Micheau et Guillaume Jacquemin, INSERM U866, Dijon, France) ont été utilisés (Figures 17 et 18).

2. Limites de la technique *western blot* pour la détection des caspases activées dans des échantillons de spermatozoïdes humains

2.1 Influence de la qualité de la suspension cellulaire

Les éjaculats contiennent des quantités plus ou moins importantes (Sigg and Hornstein, 1985) de cellules rondes (essentiellement des cellules germinales et/ou des leucocytes) qui peuvent interférer dans l'évaluation des caspases spermatiques. L'effet potentiel de la qualité de la suspension cellulaire sur l'immunodétection des caspases activées spermatiques a été

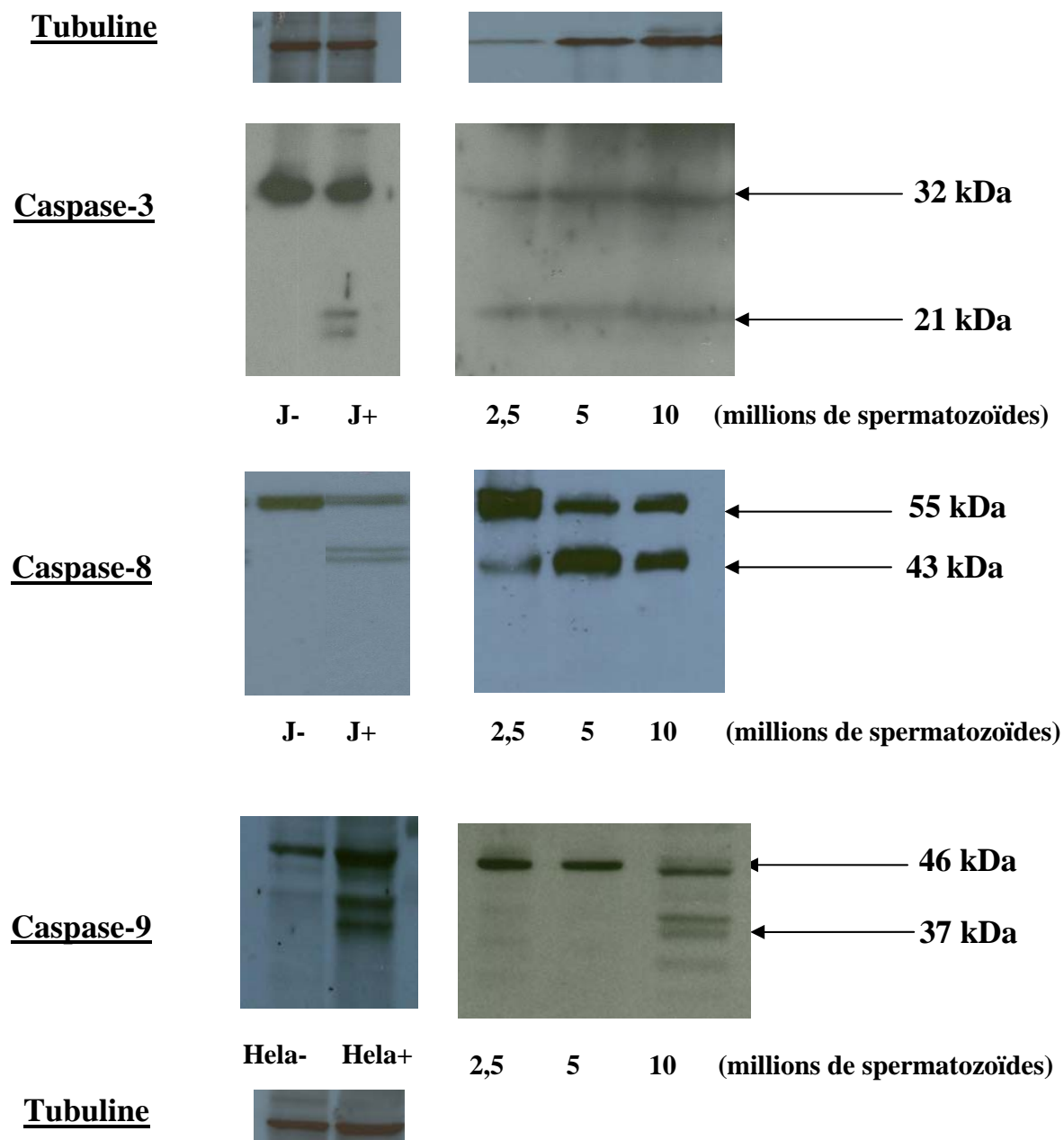


Figure 17

Immunodétection par *western blot* de la caspase-3, -8 et -9 activée sur des spermatozoïdes éjaculés de patients infertiles à spermogramme altéré (oligoasthénozoospermie)

Des extraits protéiques analysés proviennent :

- de cellules de Jurkat (30 μ g) ayant été soumises (J+) ou non (J-) à une induction de l'activation de la caspase-3 et -8 (camptothecine, 4 μ M, 4 heures, 37°C),
- de cellules HeLa (40 μ g) ayant été soumises (Hela+) ou non (Hela-) à une induction de l'activation de la caspase-9 par un traitement par une forme recombinante de TRAIL contenant un tag histidine (his-TRAIL, 1 μ g.ml⁻¹, 5 heures, 37°C),
- d'un pool de spermatozoïdes éjaculés congelés-décongelés et sélectionnés par gradient de densité (P90) provenant de patients infertiles présentant une oligoasthénozoospermie.

apprécié à partir des mesures réalisées sur deux populations de spermatozoïdes provenant du même éjaculat.

A partir d'un éjaculat, deux fractions cellulaires peuvent être sélectionnées par migration (500g, 20 minutes, 25°C) sur gradient de densité (90% et 45%) de Percoll (Sigma), dilué dans du milieu T6 (composition en annexe IV) : une suspension cellulaire de haute densité enrichie en spermatozoïdes matures et fonctionnels et pauvre en cellules rondes d'une part (fraction de haute densité : 90%, P90) et une suspension cellulaire de basse densité contenant une proportion importante de spermatozoïdes immatures et une concentration importante de cellules rondes (fraction de basse densité : 45%, P45) d'autre part.

L'immunodétection de la caspase-3 activée sur des extraits protéiques de suspensions cellulaires P90 et P45 d'un éjaculat provenant d'un patient présentant une oligoasthénotérazoospermie nous a permis de révéler une expression plus importante de la caspase-3 clivée sur la fraction P45 et l'existence de bandes protéiques surnuméraires de bas poids moléculaires, comparée à la P90 (Figure 19). Cette observation a été confirmée par la mesure de deux autres prélèvements de sperme de patients présentant une oligoasthénotérazoospermie.

Les éjaculats contiennent des populations cellulaires hétérogènes et l'expression de la caspase-3 activée varie en fonction de la population cellulaire analysée. Elle est plus faible dans la fraction de haute densité, enrichie en spermatozoïdes matures et fonctionnels (P90).

2.2 Nombre minimum de spermatozoïdes nécessaire pour l'immunodétection

Etant donné la faible quantité de spermatozoïdes dans les éjaculats des patients infertiles présentant des altérations des paramètres spermiologiques et du faible rendement de la migration sur gradient de densité, nous avons été contraints pour déterminer les seuils d'immunodétection de chaque caspase activée (caspase-3, -8 et -9) d'analyser un pool de

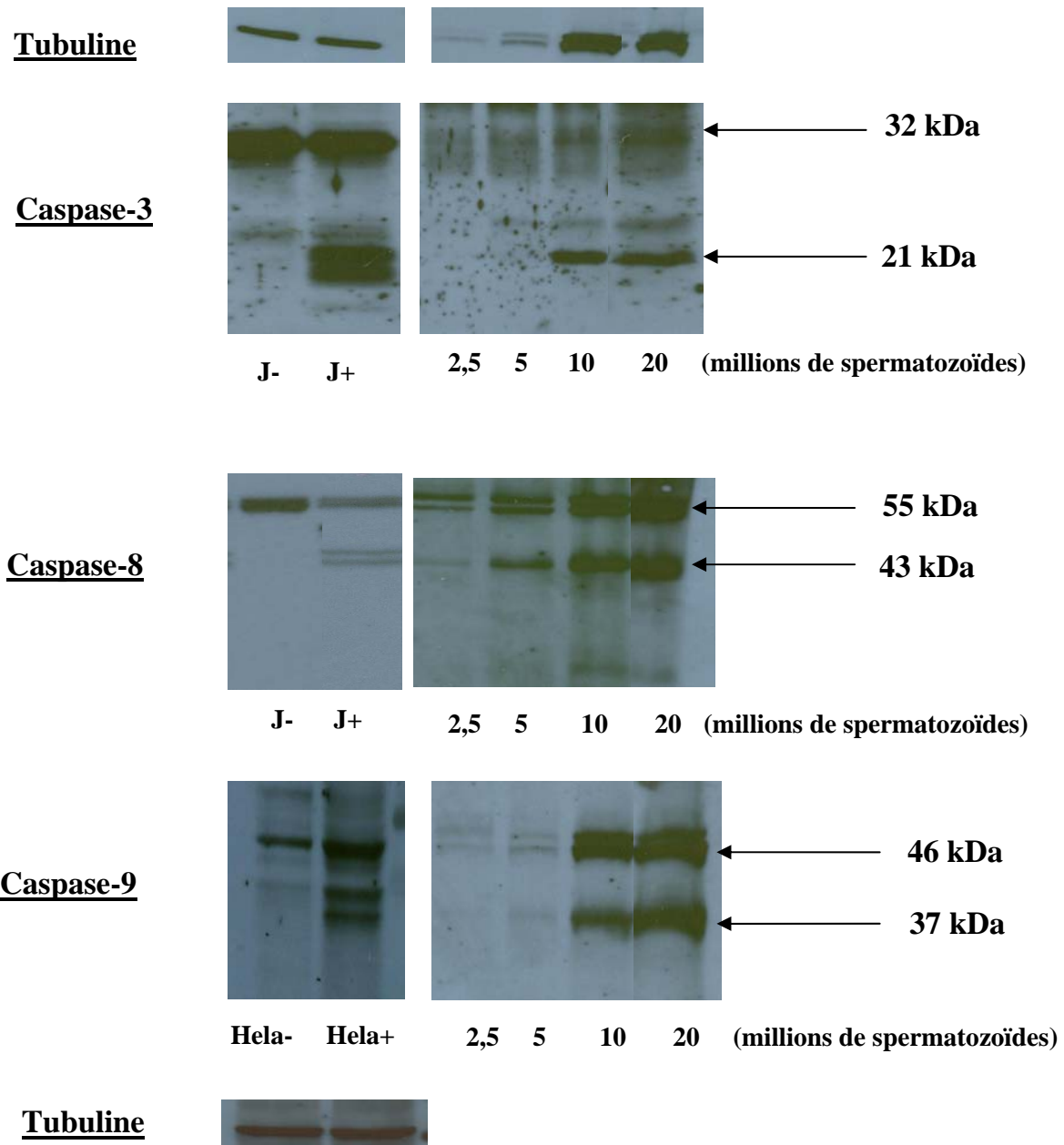


Figure 18

Immunodétection par *western blot* de la caspase-3, -8 et -9 activée sur des spermatozoïdes éjaculés de patients fertiles à spermogramme normal

Les extraits protéiques analysés proviennent :

- de cellules de Jurkat (30 μ g) ayant été soumises (J+) ou non (J-) à une induction de l'activation de la caspase-3 et -8 (camptothécine, 4 μ M, 4 heures, 37°C)
- de cellules HeLa (40 μ g) ayant été soumises (Hela+) ou non (Hela-) à une induction de l'activation de la caspase-9 par un traitement par une forme recombinante de TRAIL contenant un tag histidine (his-TRAIL, 1 μ g/ml, 5 heures, 37°C)
- d'un pool de spermatozoïdes éjaculés congelés-décongelés et sélectionnés par gradient de densité (P90) provenant de patients fertiles à spermogramme normal.

spermatozoïdes. Nous avons utilisé un pool de spermatozoïdes provenant d'hommes fertiles à spermogramme normal et un autre de sujets infertiles présentant une oligoasthénotérazoospermie. Les 3 immunodétections (caspase-3, -8 et -9 activée) ont été réalisées sur la même membrane qui a été lavée (TTBS + azide de sodium 0,1%) avant chaque incubation avec l'anticorps primaire correspondant.

L'analyse d'une quantité croissante d'extraits protéiques de spermatozoïdes (2,5 ; 5 ; 10 .10⁶ spermatozoïdes) issus de la fraction P90 de pools de prélèvements de spermes éjaculés congelés-décongelés des hommes fertiles et infertiles présentant un spermogramme altéré (oligoasthénotérazoospermie) montrait que les quantités minimums de spermatozoïdes (Figures 17 et 18) pour détecter les caspases activées -3, -8 et -9 respectivement chez les sujets fertiles et infertiles sont :

→ La caspase-3 sous forme zymogène (p32) et clivée (p21) :

10.10⁶ et 2,5.10⁶ spermatozoïdes.

→ La caspase-8 sous forme zymogène (p55) et clivée (p43) :

5.10⁶ et 2,5.10⁶ spermatozoïdes.

→ La caspase-9 sous forme zymogène (p46) et clivée (p37) :

10.10⁶ et 10.10⁶ spermatozoïdes.

Des analyses individuelles de spermes provenant de 3 patients fertiles et infertiles présentant une oligoasthénozoospermie ont confirmé ces seuils.

Même si l'expression des caspases -3, -8 et -9 activées est plus importante dans les spermatozoïdes des sujets infertiles, pour obtenir sur le même échantillon une immunodétection par *western blot* de ces caspases activées, un minimum de 10.10⁶ spermatozoïdes sélectionnés après migration sur gradient de densité semble nécessaire

Contrôle de dépôt
(tubuline)

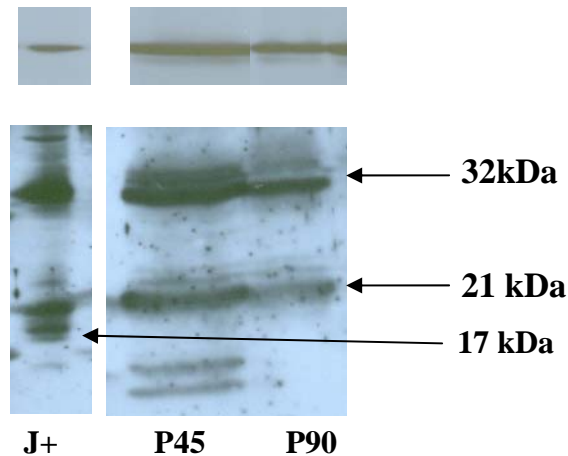


Figure 19

Immunodétection par *western blot* de la caspase 3 activée dans la fraction P90 et P45 d'un prélèvement de sperme éjaculé congelé-décongelé d'un patient présentant une oligoasthénozoospermie

Les extraits protéiques analysés proviennent de

- la suspension cellulaire P45 qui contenait $4 \cdot 10^6$ spermatozoïdes et $3,6 \cdot 10^6$ cellules rondes (dont $3 \cdot 10^5$ polynucléaires).
- la suspension cellulaire P90 qui contenait $4 \cdot 10^6$ spermatozoïdes et $0,6 \cdot 10^6$ cellules rondes (0 polynucléaire).
- de cellules de Jurkat (J+, $30 \mu\text{g}$) dont l'activation de la caspase-3 a été induite par une incubation dans de la camptothécine ($4 \mu\text{M}$, 4 heures, 37°C).

Conclusion

Les éjaculats contiennent des populations cellulaires hétérogènes et le niveau d'expression des caspases activées mesurée par *western blot* dépend de la fraction de spermatozoïdes étudiée. Une sélection permettant d'obtenir une fraction relativement homogène en spermatozoïdes s'avère donc nécessaire. Cependant, cela présente certains inconvénients. Cette sélection entraîne une perte de spermatozoïdes et ainsi limite son application à des spermes contenant une quantité importante de spermatozoïdes. De plus, l'analyse de spermatozoïdes matures sélectionnés ne reflète pas la qualité de l'ensemble des populations de spermatozoïdes contenus dans l'éjaculat. Ainsi, compte tenu de sa faible sensibilité et de l'expression variable des caspases activées selon les populations de spermatozoïdes analysées, la technique *western blot* n'est pas applicable aux prélèvements de spermes de patients présentant une oligoasthénozoospermie.

Etant donné la quantité importante de spermatozoïdes nécessaire pour réaliser les mesures exposées dans la publication n°4 (fragmentation de l'ADN par technique TUNEL, détection des caspases activées *in cellulo* par l'utilisation d'un inhibiteur fluorescent des caspases activées, analyse ultrastructurale par microscopie électronique, ségrégation méiotique par FISH), aucun *western blot* n'a pu être réalisé à partir des spermatozoïdes des patients inclus dans cette étude.

Apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of Robertsonian translocation carrier patients

Running title: Apoptosis in sperm of Robertsonian translocation carrier

Brugnon F^{1,2}, Janny L^{1,2}, Communal Y³, Darcha C⁴, Szcapaniak C⁵, Pellestor F⁶, Vago P^{5,7},
Pons-Rejraji H¹, Artonne C¹, Grizard G^{1,2}

¹ Université Clermont 1, UFR Médecine, EA 975, laboratoire de biologie de la reproduction, F - 63001 Clermont Ferrand Cedex 1, France.

² CHU Clermont-Ferrand, laboratoire de biologie du développement et de la reproduction, CECOS, Hôtel Dieu, F - 63058 Clermont Ferrand Cedex1, France.

³Centre Jean Perrin, laboratoire d'immunologie, F-63000 Clermont Ferrand, France.

⁴ CHU Clermont-Ferrand, laboratoire d'anatomie pathologique, F - 63058 Clermont Ferrand Cedex1, France.

⁵ Université Clermont 1, centre d'imagerie cellulaire santé (CICS), F - 63001 Clermont Ferrand Cedex 1, France.

⁶ CHU Montpellier, laboratoire de biologie de la reproduction, F-34000 Montpellier

⁷ CHU Clermont-Ferrand, laboratoire de cytogénétique, F - 63058 Clermont Ferrand Cedex1,
France.

Reprint requests : Florence Brugnon

fbrugnon@chu-clermontferrand.fr

Abstract

Background: In order to explain the infertility of Robertsonian translocation carriers, we compared the expression of markers of apoptosis markers in the ejaculated spermatozoa of infertile patients with Robertsonian translocation and fertile donors, and we studied the meiotic segregation in the spermatozoa of Robertsonian translocation carriers.

Methods: Frozen/thawed sperm samples of 7 Robertsonian translocation carriers and 7 fertile donors were analyzed. Apoptosis was evaluated for biochemical apoptosis features by evaluation of viable spermatozoa with activated caspases (poly-caspases, activated caspase-3, -8 and-9) and DNA fragmentation (Terminal Uridine Nick end-Labeling). Ultrastructural alterations were observed by electron microscopy. Meiotic segregation analysis was performed by Fluorescence In Situ Hybridization (FISH).

Results: The caspase assays in oligospermic sperm of patients with chromosomal translocation (n=7) showed a significantly increased proportion of viable spermatozoa with activated poly-caspases (p=0.004), caspase-3 (p=0.008), -8 (p=0.008) and-9 (p=0.01) compared with the control group. The rate of DNA fragmentation was higher in samples from translocation carriers (26.3%,n=5) than in donor samples (12.8%, n=7; p=0.04). Sperm ultrastructural examination highlighted a higher percentage of immature (28.0% vs. 10.0%) and apoptotic (24.5% vs. 18.5%) spermatozoa of Robertsonian translocation carriers than in donor samples. Meiotic analysis showed a predominance of alternate segregation resulting in the production of normal/balanced spermatozoa (78.34-85.53%)

Conclusions: Our data show a predominant proportion of balanced and normal gametes and higher amounts of spermatozoa showing immaturity and apoptosis features in oligospermic Robertsonian translocation carriers than in fertile donors. This suggests defects in spermatogenesis and especially spermiogenesis of these infertile patients. Combined analysis of ultrastructure, apoptotic markers and meiotic segregation provide complementary measurements for the evaluation of sperm quality and may help to predict the ART outcome of these patients.

Keywords

Apoptosis/ Robertsonian translocation/ caspase/DNA fragmentation/ transmission electron microscopy/ Meiotic segregation/

1 ***Introduction***

2 The impairment of spermatogenesis of men with Robertsonian translocation induces not only
3 alterations in ejaculated sperm parameters but also ultrastructural modifications and higher
4 expression of markers of apoptosis in ejaculated spermatozoa (Baccetti *et al.*, 2005; Brugnon
5 *et al.*, 2006). Moreover, most infertile Robertsonian translocation carriers have a higher rate
6 of balanced and/or normal spermatozoa than the estimated theoretical meiosis risk (Pellestor
7 *et al.*, 2001; Perrin *et al.*, 2008). This suggests the involvement of a selective process
8 excluding a proportion of unbalanced germinal cells during spermatogenesis (Anton *et al.*,
9 2004). Among different hypotheses given to explain the impairment of spermatogenesis of
10 these patients, disruption of the apoptotic process has been suggested (Eaker *et al.*, 2001,
11 Brugnon *et al.*, 2006).

12 Indeed, in a previous study we described a high prevalence of balanced gametes in
13 oligozoospermic sperm samples of infertile Robertsonian translocation carriers associated
14 with higher DNA fragmentation and plasma membrane translocation of phosphatidylserine
15 rates than in healthy donors, suggesting apoptosis may be associated with infertility in these
16 patients (Brugnon *et al.*, 2006). Although these markers are typically considered to be signs
17 of apoptosis in somatic cells (Vermes *et al.*, 1995; Gorcyca *et al.*, 1994), their significance
18 and specificity in spermatozoa have been discussed (Kotwicka *et al.*, 2002; Sakkas *et al.*,
19 2002). Therefore, the combination with measurements for other markers in spermatozoa in
20 order to assess the biochemical and ultrastructural modifications involved in apoptosis may
21 analysis of whether apoptosis is really involved in the infertility of these patients more robust.
22 Caspases are found to be major transducers and effectors within the different pathways of
23 apoptosis signaling network in somatic cells. They comprise a family of highly specific
24 proteases which contain the amino acid cysteine in their active sites. After proteolytic
25 activation in a cascade, their targets are cleaved after the amino acid aspartate. From a

1 functional point of view, caspases involved in apoptosis act either as initiators (caspase 8, 9
2 and 10) or as effectors (caspase 3, 6 and 7). Caspase 8 was identified as the most important
3 initiator enzyme of the extrinsic pathway triggered by activation of membrane death
4 receptors (CD95 or tumor necrosis factor receptor) whereas caspase 9 is described as mainly
5 associated with activation of the intrinsic apoptotic pathway via activation of the
6 mitochondrial pathway. These initiator caspases are activators of downstream caspases.
7 Caspase 3, the most important among them, executes the final disassembly of the cell by
8 cleaving a variety of cell structure proteins and generating DNA strand breaks (Ekert *et al.*,
9 1999). Although the key role of activated caspases is well-documented for the transduction of
10 the cell apoptotic signal, recent data have shown their additional involvement in the sperm
11 maturation and differentiation process (Arama *et al.*, 2003; Cayli *et al.*, 2004).

12 Beside activation of different molecular signaling pathways, apoptosis is characterized by
13 ultrastructural alterations of the different spermatozoa components which can be observed by
14 transmission electron microscopy. Previous ultrastructural analysis revealed high expression
15 of not only apoptosis but also immaturity features in ejaculated spermatozoa of Robertsonian
16 translocation carriers (Baccetti *et al.*, 2002; Baccetti *et al.*, 2005).

17 In order to clarify the possible relationship between the high proportion of balanced
18 spermatozoa and the apoptotic process in ejaculated spermatozoa, we performed semen
19 analysis in infertile men with different Robertsonian translocations and compared the data
20 with those obtained in fertile men. For this purpose, the expression of biochemical (DNA
21 fragmentation, expression of activated caspases) and ultrastructural features of apoptosis
22 were analyzed in ejaculated spermatozoa from both groups of subjects; meiotic segregation
23 was evaluated in spermatozoa of Robertsonian translocation carriers.

1 ***Materials and Methods***

2 ***Patients***

3 The men included in our study belonged to couples who visited the Center for Reproductive
4 Medicine of the university hospital, Clermont Ferrand, France, for infertility. All couples
5 received genetic counseling. The female partners did not have any intercurrent disease or
6 endocrine problem, and had a normal karyotype (46, XX). Chromosomal analysis for
7 karyotype was performed on cultures of peripheral blood lymphocytes by the standard
8 method (Rooney and Czepulowski).

9 Written consent for the analysis was obtained for all patients.

10 Seven carriers of a Robertsonian translocation were included in this study. A control
11 population consisted of seven fertile donors, who showed normal semen parameters
12 according to the criteria of the World Health Organization (WHO, 1999).

13

14 ***Semen samples***

15 Sperm samples were collected by masturbation into sterile plastic jars, after 3-5 days of
16 sexual abstinence. They were allowed to liquefy for 30 min at 37°C, and were then evaluated
17 according to WHO criteria (1999). The variables taken into consideration in fresh sperm were
18 concentration, progressive motility (a + b), morphology according to David's criteria and the
19 concentration of round cells. Leucocytes were counted and differentiated among round cells
20 by peroxidase staining with benzidine.

21 For the patients with Robertsonian translocations, IVF or ICSI were performed and the
22 surplus semen was used for this study. All samples were cryopreserved until analysis for
23 practical reasons. For cryopreservation, the sperm samples were diluted (v/v) with
24 cryoprotective medium (Cysperm, Biomédia, France). Samples were maintained for 15 min
25 at room temperature for equilibration and sealed in straws. The straws were frozen following

1 a standard freezing protocol (Grizard *et al.*, 1999) in a Minicool LC 40 (Air Liquide Santé,
2 France). Afterwards, they were plunged into liquid nitrogen at -196°C. The straws were
3 thawed at 37°C for 3 min. After gentle addition of Earle's medium (Cryobiosystem, France),
4 the cryoprotectant was removed by a washing procedure (750g, 5 min, room temperature),
5 then sperm concentration and motility assessments were carried out.

7 ***Detection of biochemical markers of apoptosis***

8 *Material*

9 The detection of spermatozoa with activated caspases and DNA fragmentation was
10 performed with flow cytometry. These flow experiments were performed on an EPICS XL
11 cytofluorometer (Beckman Coulter, Villepinte, France). The excitation wavelength was 488
12 nm supplied by an argon laser. Green (FAM or FITC derived fluorescence) and red
13 fluorescence (Propidium Iodide, PI) were detected with FL1 and FL3 detectors using a 525
14 and 675 nm filter. FL1 and FL3 fluorescence signals were recorded after logarithmic
15 amplification. A minimum of 20 000 spermatozoa was examined for each assay. The sperm
16 population was gated using a 90-degree and forward-angle light scatter to exclude debris and
17 aggregates. Selection of the area corresponding to spermatozoa was determined beforehand
18 by analysis of purified thawed spermatozoa recovered after selection on a two-step gradient
19 (Puresperm 90% and 45%, Nidacon International).

20 *Caspase assays*

21 The proportion of frozen/thawed spermatozoa with activated caspases in frozen-thawed
22 sperm was detected through the use of different specific carboxyfluorescein-labeled (FAM)
23 caspase inhibitors: FAM-VAD-fmk (poly-caspases: caspase-1, -3, -4, -5, -6, -7, -8, and 9),
24 FAM-DEVD-fmk (caspase 3, executioner apoptotic pathway), FAM-LETD-fmk (caspase 8,
25 extrinsic apoptotic pathway), FAM-LEHD-fmk (caspase 9, intrinsic apoptotic pathway).

1 These cell-permeable and non cytotoxic fluorescent caspase inhibitors (FLICA) recognize
2 specific amino acid sequences of activated caspases and bind covalently (Ekert *et al.*, 1999)
3 by fluromethylketone (fmk). The fluorogenic substrate (FAM) becomes fluorescent upon
4 cleavage by the caspases (Vaux and Korsmeyer, 1999).

5 The caspase assay procedure was performed according to the manufacturer's instruction
6 manual (Apoptosis detection kit assay, Serotec, France). The procedure was similar for each
7 FLICA.

8 Briefly, a 150-fold stock solution of the inhibitor was prepared in dimethyl sulfoxide and
9 stored at -20°C. It was further diluted in phosphate-buffered saline (PBS) to make a 30-fold
10 working solution (10µl). Spermatozoa ($3 \cdot 10^5$ spermatozoa) were exposed to 10µl of the
11 working solution and incubation took place in 300µl of PBS at 37°C under 5%CO₂ for 1
12 hour. After incubation, the samples were washed with the rinse buffer (700g, 5min, room
13 temperature) provided with the kit and vital staining by PI ($10 \mu\text{gml}^{-1}$) was performed in the
14 dark, at room temperature, for 15 min. After labeling, all samples were analyzed by flow
15 cytometry (Brugnon *et al.*, 2007).

16 Four patterns were measured:

17 (1) Viable spermatozoa without staining of activated caspases: Casp-/PI-

18 (2) Dead spermatozoa without staining of activated caspases: Casp-/PI+ .

19 (3) Viable spermatozoa with staining of activated caspases (early apoptotic spermatozoa):
20 Casp+/PI-.

21 (4) Dead spermatozoa with staining of activated caspases (late apoptotic spermatozoa):
22 Casp+/PI+.

23 Human neutrophils ($5 \cdot 10^6$ cells), whose apoptosis was induced after treatment with 1mM
24 cycloheximide for 6h, were used as positive controls for the staining (Paravthenani *et al.*,

1 1998; Weng *et al.*, 2002). The negative controls were processed by replacing the FLICA with
2 10µl of PBS (Sigma, France) to assess the auto-fluorescence of unstained spermatozoa.

3 4 *TUNEL assay*

5 DNA fragmentation in frozen/thawed spermatozoa was detected by the “in-situ cell death
6 detection kit” (Roche, France) according to the manufacturer's protocol with minor
7 modifications. Briefly, 1.5×10^6 washed sperm cells were fixed with 2% paraformaldehyde
8 (Sigma, France) for 30 minutes at room temperature. Afterwards, cells were washed in
9 phosphate buffered saline (PBS) followed by permeabilization in 100µl of a solution
10 containing 0.1% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate for 3 minutes on ice. After a washing
11 procedure with PBS 1%BSA (500g, 5min., room temperature), the labeling was performed
12 by incubation for 1h at 37°C with 50µl labeling solution containing dUTP and 50µl of
13 enzyme solution (terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT). Then the sperm suspension
14 was washed in PBS and counterstained by Propidium Iodide (2mg ml^{-1}) to check the
15 permeabilization.

16 For each sample, a negative control was carried out by omitting the TdT enzyme from the
17 reaction mixture. The positive control was obtained by incubating 2 IU DNase I (Sigma,
18 France) for 15 minutes at 37°C in Tris-HCl buffer before labeling.

19 Detection of the treated samples was performed by flow cytometry.

20 *Ultrastructural analysis of spermatozoa*

21 *Electron microscopy*

22 After thawing, sperm samples of 3 patients with Robertsonian translocation and 3 fertile
23 donors were fixed in glutaraldehyde (1.6%) with red ruthenium (0.09%) in cacodylate buffer
24 at 4°C for 2h. Fixed semen were washed in cacodylate buffer (0.2M, pH 7.4) and postfixated
25 for 1h at 4°C in buffered osmium tetroxide, dehydrated and embedded in epon Araldite.

1 Ultrathin sections were made with an ultramicrotome (UC6, Leica, France), mounted onto
2 copper grids, stained with uranyl acetate and lead citrate and observed with a Hitachi H-7650
3 Transmission electron microscope (Hitachi, Elexience, France) and photographed with a
4 CCD AMT HR camera (Hamamatsu, 1024×1024 pixels). For each patient, a minimum of 300
5 spermatozoa were assessed in ultrathin sections by two different observers who were blind to
6 the experiment. Four different patterns were observed and defined according to previously
7 described criteria (Baccetti *et al.*, 1996; Baccetti *et al.*, 2002; Baccetti *et al.*, 2005):

8 (1) Intact spermatozoa: spermatozoa devoid of ultrastructural defects. All the ultrastructural
9 components of the spermatozoa (nucleus, plasma membrane, cytoplasm, acrosome,
10 axoneme, mitochondria, accessory fibers, fibrous sheath) are normal and intact.

11 (2) Immature spermatozoa. Nucleus: irregularly shaped, binucleate or multinucleate.
12 Cytoplasmic residue. Plasma membrane: intact. Acrosome: absent or short or badly shaped.
13 Disorganized mitochondrial helix. Axoneme: disorganized, frequently with absent central
14 tubules and/or with doublets having incomplete or absent dynein arms. Accessory fibers and
15 fibrous sheath are well organized.

16 (3) Apoptotic spermatozoa. Nucleus: altered with marginated chromatin, irregularly shaped,
17 may be embedded in cytoplasmic residue, binucleate or multinucleate. Cytoplasmic residues
18 may be observed. Plasma membrane: intact. Deformed acrosome. Disorganized and swollen
19 mitochondria. Axoneme: disorganized, frequently with absent central tubules and/or with
20 doublets having incomplete or absent dynein arms. Accessory fibers and fibrous sheath are
21 well organized.

22 (4) Necrotic spermatozoa. Nucleus: misshapen with necrotic chromatin which may be
23 embedded in cytoplasmic residue. Plasma membrane: broken. Acrosome: absent or
24 deformed. Dispersed and swollen mitochondria. Axoneme: disorganized, frequently with

1 absent central tubules and/or with doublets having incomplete or absent dynein arms.
2 Accessory fibers and fibrous sheath are disorganized.

3

4 ***Meiotic segregation analysis***

5 *Fluorescence in-situ hybridization (FISH)*

6 In order to evaluate meiotic segregation, FISH was performed according to the method
7 described previously by Moradkhani *et al.*, 2006, in sperm nuclei of five selected patients.

8 After fixation in acetic acid:methanol (1:3) at -20°C, the sperm suspensions were then
9 dropped onto clean microscope slides and air-dried. Slides were aged 2 days at room
10 temperature before use for *in situ* chromosomal labeling.

11 Before the FISH procedure, the slides were immersed for 10 min in a pepsin solution (50
12 ng/ml in 0.01 M HCl) prewarmed at 37°C, washed for 2 min in PBS and dehydrated through
13 an ethanol series and air-dried. The sperm nucleus decondensation and DNA denaturation
14 were performed by slide incubation in NaOH solution (0.5M) at room temperature for 8 min,
15 followed by washing in 2× SSC and dehydration through an ethanol series. After this the
16 slides were immersed in 70% formamide/2×SSC solution for 3 min at 73°C. Finally, the
17 slides were washed in 2×SSC, dehydrated through an ethanol series and air-dried.

18 For hybridization, commercial whole chromosome painting (WCP) probes (Vysis, Abbott
19 molecular France, Rungis), labeled with Spectrum Orange or Green were used. According to
20 the sample, the appropriate probe mixtures were prepared according to the manufacturer's
21 instructions. The probes were denatured for 7 min at 75°C in a water bath. Each probe
22 mixture was applied to the denatured slides, covered with coverslips, sealed with rubber
23 cement and then hybridized overnight in a dark, moist chamber at 37°C. After hybridization,
24 the coverslips were gently removed and the slides washed in 0.4× SSC/0.3%NP40, pH7 for 2
25 min at 72°C in 2× SSC/0.1%NP40, pH7 for 1 min at room temperature and finally mounted

1 with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (100ng.ml^{-1}) in antifade solution. The slides
2 were analyzed by two independent observers using a Leitz fluorescence microscope DMRA2.
3 Only individual and well-delineated sperm nuclei were scored. Overlapping sperm nuclei,
4 disrupted or large nuclei with diffuse signals were not taken into account. Sperm nuclei were
5 scored as having two identical signals when the spots were of equal size and intensity and
6 separated by at least the diameter of one hybridization domain.

7 8 *Statistical analysis*

9 Analysis of the data was carried out using the Stat View (SAS Institute, 1998) program.
10 Values were compared by the Mann-Whitney test and correlations were studied by the
11 Spearman test. For all tests, p-values <0.05 were considered statistically significant.

12 To optimize correlation of the Spearman test and given the low number of semen samples
13 analyzed in each group for DNA fragmentation, the correlations between the percentage of
14 spermatozoa with DNA fragmentation and whole spermatozoa with staining of caspases or
15 dead spermatozoa with staining of activated caspases were assessed by an analysis grouping
16 infertile Robertsonian translocation carriers and fertile donors.

17 For comparison of the percentage of the different patterns observed by transmission electron
18 microscopy for ultrastructural analysis of spermatozoa, no statistical analysis was performed,
19 but only a descriptive analysis due to the low number of samples measured for this parameter
20 respectively in patient (n=3) and control (n=3) group.

1 **Results**

2 ***Semen analysis***

3 The results of the semen analysis are summarized in Table I. Significantly higher values of
4 concentration ($p=0.002$), forward motility ($p=0.006$) and normal morphology ($p=0.002$) were
5 found for the fertile donors ($n=7$) than in ejaculated samples of Robertsonian translocation
6 carriers ($n=7$). All samples of the Robertsonian group showed oligoasthenoteratozoospermia.
7 Compared with fertile donors, higher concentrations of round cells were observed in the
8 ejaculates of the men with Robertsonian translocation ($p<0.05$). In sperm samples of fertile
9 donors and infertile patients with Robertsonian translocations, none leucocyte was observed by
10 benzidine staining.

11 ***Study of apoptosis by analysis of caspase activation, DNA fragmentation and***
12 ***ultrastructural defects***

13 The low sperm number in samples of Robertsonian translocation carriers did not always
14 allow for the different tests to be performed. Depending on the initial semen concentration,
15 the different techniques were applied (caspases assays, TUNEL reaction, electron microscopy
16 and FISH). The list of assays applied to each sperm sample is presented in Table II.

17 ***Caspase assays***

18 The results of caspase assays performed on frozen/thawed spermatozoa of Robertsonian
19 translocation and fertile donors are summarized in the Tables IIIa and IIIb.

20 Robertsonian translocation carrier samples showed a higher proportion of spermatozoa
21 ($\text{Casp+}/\text{PI-} + \text{Casp+}/\text{PI+}$) with activated poly-caspases ($p=0.004$), caspase 3 ($p=0.008$),
22 caspase 8 ($p=0.008$) and caspase 9 ($p=0.01$) than those from fertile donors. Moreover, a
23 higher proportion ($p<0.03$) of viable spermatozoa with activated caspases ($\text{Casp+}/\text{PI-}$, early
24 apoptotic spermatozoa) and a lower proportion ($p<0.01$) of intact spermatozoa ($\text{Casp-}/\text{PI-}$)

1 were observed for all measured caspases in sperm samples of Robertsonian translocation
2 patients compared with fertile donors.

3 No significant difference was observed for the pattern of viable spermatozoa without
4 staining of activated caspase(s) (Casp-/ PI-) for each tested caspase both in fertile donors and
5 Robertson translocation carriers.

6 In sperm samples of Robertsonian translocation patients or fertile donors, the proportion of
7 stained spermatozoa for activated poly-caspases were respectively higher than the proportion
8 of spermatozoa stained for activated caspase-3, -8 or-9 ($p < 0.05$) but no difference was
9 observed between the proportion of spermatozoa stained for caspases 3, 8 and 9.

10 *TUNEL assay*

11 The results are summarized in the Tables IIIa and IIIb. The rates of DNA fragmentation
12 investigated by TUNEL reaction were higher (median: 26.3% vs 12.8%; $p = 0.04$) in samples
13 of Robertson translocation carriers ($n = 5$) than in sperm samples of fertile donors ($n = 7$).

14 *Correlation between the percentage of spermatozoa with staining of activated caspases and* 15 *DNA fragmentation.*

16 Strong positive correlations were found between respectively the percentage of whole
17 spermatozoa (Casp+= Casp+/PI- + Casp+/PI+) with staining of activated poly-caspases ($r =$
18 0.7 ; $p = 0.03$), caspase-3 ($r = 0.7$; $p = 0.03$), caspase-8 ($r = 0.6$; $p = 0.03$), caspase-9 ($r = 0.6$;
19 $p = 0.03$), and the percentage of spermatozoa with DNA fragmentation in ejaculated sperm
20 samples of Robertson chromosomal carrier patients and fertile patients.

21 Moreover, positive correlations were observed between respectively the percentage of dead
22 spermatozoa (Casp+/PI+) with staining of activated poly-caspases ($r = 0.7$; $p = 0.02$), caspase-
23 3 ($r = 0.5$; $p = 0.01$), caspase-8 ($r = 0.4$; $p = 0.03$), caspase-9 ($r = 0.6$; $p = 0.03$) and the
24 percentage of spermatozoa with DNA fragmentation in ejaculated frozen-thawed sperm
25 samples of both Robertsonian translocation carriers and fertile patients.

1 No significant correlation was observed between the proportion of viable spermatozoa with
2 staining of activated caspases (for each activated caspase staining process applied) and the
3 proportion of ejaculated spermatozoa with fragmented DNA in samples of patients and
4 control populations.

5
6 *Ultrastructural analysis by electron microscopy*

7 Sperm ultrastructure was evaluated by transmission electron microscopy (Figure 1, Table IV)
8 in frozen-thawed ejaculated samples of fertile donors (n=3) and infertile patient carriers of
9 Robertson translocation (n=3). The percentage of sperm devoid of ultrastructural defects was
10 higher in ejaculates of fertile donors compared with infertile patients with Robertsonian
11 translocation (median: 49.0% vs. 27.0%). Moreover, the percentages of immature (median:
12 28.0% vs. 10.0%) and apoptotic spermatozoa (median: 24.5% vs. 18.5%), characterized by
13 nuclei with marginated chromatin, swollen mitochondria irregularly organized into large
14 cytoplasmic residues and intact plasma membrane were higher in spermatozoa of
15 translocation carriers than those of donors. Many binucleate spermatozoa were observed in
16 sperm of translocation carriers but not in semen samples of fertile donors.

17 *Study of meiotic segregation by FISH in spermatozoa of patients with Robertson*
18 *chromosomal translocation*

19 The results of meiotic segregation evaluated by FISH are summarized in Tables V. From 882
20 to 5330 sperm nuclei from the translocation carriers were observed. The rate of normal and
21 balanced spermatozoa resulting from the alternate mode ranged from 78.34 to 85.85% and
22 was predominant.

1 ***Discussion***

2 Previous studies have demonstrated that ejaculated human spermatozoa showed evidence of DNA
3 fragmentation, caspase activation (Weng *et al.*, 2002; Marchetti *et al.*, 2004) and ultrastructural
4 modifications (Baccetti *et al.*, 1996) described in somatic cells as typical of programmed cell
5 death. As an extension of a previous work (Brugnon *et al.*, 2006), in this study we analyzed these
6 biochemical and ultrastructural apoptotic features in ejaculated spermatozoa of Robertsonian
7 translocation carrier patients to assess whether apoptosis may be one of the underlying
8 mechanisms which may explain the infertility and the process excluding unbalanced germ cells
9 during meiosis in these patients. To analyze the data obtained, the same measurements were
10 applied to semen samples of fertile donors.

11 For practical reasons, we used frozen-thawed semen samples. Although the freezing may activate
12 an apoptosis-like process, previous data showed that activation of caspases (Paasch *et al.*, 2004)
13 and DNA fragmentation (De Paula *et al.*, 2006; Brugnon *et al.*, 2006) in response to
14 cryopreservation and thawing was fairly uniform.

15 In our study, the quality of the ejaculated spermatozoa from common and uncommon Robertsonian
16 translocation carriers was analyzed using morphological and biochemical apoptotic features which
17 taken together can provide complementary information to explain the oligoasthenozoospermia of
18 these patients. During spermatogenesis and/or epididymal maturation, defects may occur in the
19 cytoplasm or nuclear compartment which can result in the production of immature and/or apoptotic
20 spermatozoa. It is unclear what proportion of developing sperm is represented by the apoptotic and
21 immature ejaculated sperm (Cayli *et al.*, 2004).

22 The meiotic segregation analysis of the ejaculated spermatozoa by FISH showed a predominance
23 of gametes derived from alternate segregation. This finding is consistent with previous published
24 data (Frydman *et al.*, 2001; Escudero *et al.*, 2003; Baccetti *et al.*, 2005; Moradkhani *et al.*, 2006)
25 and may suggest strong selection against unbalanced chromosomal germ cells which interfere with

1 spermatogenesis. One hypothesis to explain such a result may be activation of apoptosis during
2 spermatogenesis (Brugnon *et al.*, 2006). Indeed, apoptosis is an important and necessary process
3 during normal spermatogenesis (Rodriguez *et al.*, 1997). Moreover, Eaker *et al.*, 2003, suggested
4 the presence of a meiotic spindle checkpoint mechanism in male germ cells which could identify
5 aberrant meiosis and allow activation of apoptosis. However, this process may not be totally
6 efficient in eliminating germ cells because some aneuploid spermatozoa were observed. Therefore,
7 if the removal mechanism fails or the germ cells escape this removal mechanism, these earmarked
8 spermatozoa would contribute to poor sperm quality.

9 In most studies, sperm morphological quality has been evaluated by light microscopy, but some
10 subcellular sperm anomalies can only be detected by electron microscopy. Numerous previous
11 studies (Baccetti *et al.* 19996; Baccetti *et al.*, 2002; Baccetti *et al.*, 2005) have established the
12 criteria which are characteristic of healthy, immature, apoptotic and necrotic spermatozoa. These
13 criteria are similar to those described in apoptotic somatic cells (Taatjes *et al.*, 2008). In our study,
14 the same criteria have been applied to distinguish the different categories of spermatozoa.
15 Ultrastructural examination of sperm from infertile Robertsonian translocation patients showed a
16 lower proportion devoid of structural defects and a higher proportion of apoptotic and/or immature
17 spermatozoa compared with fertile donors. These data are in agreement with previous reported
18 studies (Baccetti *et al.*, 2002; Baccetti *et al.*, 2005) indicating impairment during spermatogenesis
19 and especially during spermiogenesis. Moreover, the high expression of DNA fragmentation and
20 caspase activation in the spermatozoa of Robertsonian translocation carriers confirm this
21 observation. Indeed, these markers are not only markers of apoptosis but also of immaturity of
22 spermatozoa.

23 DNA fragmentation in human spermatozoa can be a consequence of apoptosis activation, as can
24 occur during or after DNA packaging in spermiogenesis (Sakkas *et al.*, 1999; Sergerie *et al.*, 2005)
25 or reflect oxidative damage (Bennets and Aitken, 2005). So it is actually not quite correct to speak

1 about apoptotic events when DNA fragmentation only is determined. In this study, the rates of
2 DNA damage in fertile donors and infertile Robertsonian translocation patients are consistent with
3 those previously reported in the literature (Brugnon *et al.*, 2006; Perrin *et al.* 2008). Since
4 combination with measurements of other markers of apoptosis may strengthen the analysis of
5 sperm apoptosis (Said *et al.*, 2004), we measured the percentages of spermatozoa with activated
6 caspases. Indeed, previous data demonstrated a positive correlation between DNA fragmentation
7 and the rate of activated caspase-3 in human ejaculated spermatozoa (Weng *et al.*, 2002; Marchetti
8 *et al.*, 2004). Our study showed evidence of a strong positive correlation not only between the
9 DNA fragmentation rate and the proportion of dead spermatozoa with staining of activated
10 caspase-3 but also with staining of activated-caspase-8 or caspase-9 in sperm of fertile and infertile
11 Robertsonian translocation carrier patients. To the best of our knowledge, the relationship between
12 DNA fragmentation and activated caspase-8 or caspase-9 rates measured by FLICA (fluorescent
13 inhibitor of activated caspases) assay in human ejaculated spermatozoa has never been
14 investigated.

15 Caspases are widely considered to be the key mediators of apoptosis. A wide spectrum of cell
16 cytoskeletal proteins and membrane components have been shown to be targets of executioner
17 caspase-3 whose activation is induced by initiator activated caspase-8 and/or caspase-9 (Fischer *et*
18 *al.*, 2003). The significance of the activated caspases in spermatozoa is still unclear (Grunewald *et*
19 *al.*, 2005). Indeed, recent studies indicate that their presence in cytoplasm could be the
20 consequence of apoptosis and/or immaturity (Amara *et al.*, 2003; Cayli *et al.*, 2004). The high
21 percentage of spermatozoa with staining of activated caspases in semen samples of infertile
22 Robertsonian patients corroborates the ultrastructural study performed in these infertile men and
23 the high proportion of round cells (corresponding to immature germ cells) measured in these
24 ejaculates.

1 The activated caspases can be detected in sperm using a cell permeable fluorescent inhibitor of
2 activated caspase (FLICA). Use of the appropriate cell permeable fluorescent inhibitor of activated
3 caspase allows detection of the mainly (poly-caspases) or individual activated caspase-3, -8, -9 by
4 binding to the optimal sequence of amino acid of the respective active site on the enzyme(s)
5 (Smolewski *et al.*, 2001; Grunewald *et al.*, 2008). Moreover, FLICA labeling withstood cell
6 fixation and did not require permeabilization, which made it possible to combine this test with vital
7 staining by propidium iodide (Smolewski *et al.*, 2002; Brugnon *et al.*, 2008). However, it has been
8 recently been demonstrated that binding of FLICA reagents to cells undergoing apoptosis was not
9 fully consistent with the expected specificity, namely, it was not restricted to enzymatic centers of
10 respective activated caspases given the extremely close specificity shared by the different members
11 of the apoptotic caspase family (Kuzelova *et al.*, 2007; Darzynkiewicz *et al.*, 2007). Therefore, it
12 would be prudent to support this test with other specific methods for the detection of activated
13 caspases such as western blot or measurement of caspase activity (Brugnon *et al.*, 2008). However,
14 given the low sensitivity of the western blot method and the low caspase activity in human
15 ejaculated spermatozoa (Taylor *et al.*, 2004; Marchetti *et al.*, 2004; Wundrich *et al.*, 2006), it is
16 necessary to extract proteins of at least $10 \cdot 10^6$ spermatozoa (data not shown) to optimize
17 immunodetection. Moreover, it is necessary to select spermatozoa suspension by density migration
18 to avoid interference of possible expression of activated caspases from other contaminated cells
19 (round cells) in ejaculate. Therefore the western blot technique for the detection of activated
20 caspases in semen samples of infertile men with oligoasthenoteratozoospermia does not appear to be
21 suitable.

22 In semen samples of both fertile donors and Robertsonian translocation carriers, the percentages of
23 sperm devoid of staining of activated caspase-3, -8 and-9 were not significantly different.
24 Measurements by FLICA might be inappropriate to measure individual cellular expression of each
25 activated caspase tested, given the lack of specificity of this marker (Kuzelova *et al.*, 2007;

1 Darzynkiewicz *et al.*, 2007). Moreover, the lack of predominance of any one activated caspase
2 pathway in the present study may be explained however by the biochemical activation pathway
3 described in somatic cells between activated caspase-8 and -9 (Nagata, 1999; Scorrano *et al.*,
4 2002). Indeed, activated caspase-8 can act indirectly by cleaving a cytosolic factor called t-Bid,
5 leading to the release of cytochrome c by mitochondria followed by subsequent activation of
6 executioner caspase-3. Although this mechanism has well been described in somatic cells, it has
7 not yet been established in human spermatozoa (Oehninger *et al.*, 2003).

8 Previous studies described the possibility to separate ejaculated spermatozoa with
9 phosphatidylserine externalization by magnetic cell sorting (MACS) conjugated with annexin V
10 (Said *et al.*, 2008). These spermatozoa with a deteriorated membrane are characterized by an
11 increase in activated caspases (Paasch *et al.*, 2003) and DNA fragmentation (Paasch *et al.*, 2004).
12 It has been demonstrated that the exclusion of spermatozoa presenting with these apoptosis
13 features by techniques such as annexin-V magnetic activated cell sorting may increase sperm
14 fertilizing capacity (Grunewald *et al.*, 2007) and may improve ART (Assisted Reproductive
15 Technologies) success rates. Moreover, in order to evaluate the possible relationship between the
16 expression of these apoptotic markers and meiosis in spermatozoa of Robertsonian translocation
17 carriers, it could be interesting to select spermatozoa by this method and afterwards analyze their
18 meiotic behavior by FISH. Indeed FISH analysis performed on spermatozoa provides a better
19 understanding of the meiotic process and could contribute to provide adequate reproductive and
20 genetic counseling for carriers of chromosomal translocation (Egozcue *et al.*, 2000; Vegetti *et al.*,
21 2000).

22 In conclusion, this study demonstrated a predominant population of balanced gametes and a higher
23 amount of spermatozoa showing immaturity and/or apoptosis features in oligospermic
24 Robertsonian translocation carriers compared with fertile donors. It suggests that spermatogenesis
25 and especially spermiogenesis of these infertile patients may be altered. Combined analysis of

1 ultrastructure, apoptotic markers and meiotic segregation provides complementary measurements
2 for the evaluation of sperm quality and may help to predict the ART outcome of these patients. To
3 better understand the pathophysiology of the infertility and enhance the ART success of patients
4 with Robertsonian translocation, it could be interesting to select the spermatozoa by further
5 investigations (by the annexine V-MACS method for example) with the aim of analyzing their
6 meiotic behavior by FISH and their fertilizing capacity.

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

1 **References**

2 Anton E, Blanco J, Egozcue J and Vidal F (2004) Sperm FISH studies in seven male carriers of
3 Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10). Hum Reprod 19, 1345-1351.

4 Arama E, Agapite J and Steller H (2003) Caspase activity and a specific cytochrome c are required
5 for sperm differentiation in drosophila. Dev Cell 4, 687-697.

6 Baccetti B, Collodel G and Piomboni P (1996) Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae
7 seminologicae 9). J Submicrosc Cytol Pathol 28, 587-596.

8 Baccetti B, Capitani S, Collodel G, Estenoz M, Gambera L and Piomboni P (2002) Infertile
9 spermatozoa in a human carrier of robertsonian translocation 14;22. Fertil Steril 78, 1127-1130.

10 Baccetti B, Collodel G, Marzella R, Moretti E, Piomboni P, Scapigliati G and Serafini F (2005)
11 Ultrastructural studies of spermatozoa from inertile males with Robertsonian translocations and 18,
12 X, Y aneuploidies. Hum Reprod 20, 2295-2300.

13 Bennets LE and Aitken RJ (2005) A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian
14 spermatozoa. Mol Reprod Dev 71, 77-87.

15 Brugnon F, Van Assche E, Veheyen G, Sion B, Boucher D, Pouly JL, Janny L, Devroey P,
16 Liebaers I and Van Steurteghem A (2006) Study of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated
17 sperm of chromosomal translocation carrier patients. Hum Reprod 21, 685-693.

18 Brugnon F, Ouchchane L, Verheyen G, Communal Y, Van der Elst J, Tournaye H, Janny L and
19 Grizard G (2007) Fluorescence microscopy and flow cytometry in measuring activated caspases in
20 human spermatozoa. Int J Androl. Epub ahead of print.

21 Cayli S, Sakkas D, Vigue L, Demir R and Huszar (2004) Cellular maturity and apoptosis in human
22 sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl-xl levels in mature and diminished maturity sperm. Mol
23 Hum Reprod 10, 365-372.

24 Darzynkiewicz Z and Pozarowski P (2007) All that glitters is not gold: all that FLICA binds is not
25 caspase. A caution in data interpretation-and new opportunities. Cytometry 71A, 536-537.

- 1 De Paula TS, Bertolla RP, Spaine DM, Cunha MA, Schor N and Cedenho AP (2006) Effect of
2 cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with
3 ologozoospermia. *Fertil Steril* 86, 597-600.
- 4 Eaker S, Pyle A, Cobb J and Hande MA (2001) Evidence for meiotic spindle checkpoint from
5 analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. *J Cell Sci* 114,
6 2953-2965.
- 7 Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F and Egozcue J
8 (2000) Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa
9 and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 6, 93-105.
- 10 Ekert PG, Silke J and Vaux DL (1999) Caspase inhibitors. *Cell Death Differ* 6, 1081-1086.
- 11 Escudero T, Abdelhadi I, Sandalinas M and Munné S (2003) Predictive value of sperm
12 fluorescence in situ hybridization analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis for
13 translocations. *Fertil Steril* 79, 1528-1534.
- 14 Fischer U, Janicke RU and Schulze-Osthoff K (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update
15 of caspase substrates. *Cell Death Differentiation* 10, 76-100.
- 16 Frydman N, Romana S, Le Lorc'h M, Vekemans M, Frydman R and Tachdjian G (2001) Assisting
17 reproduction of infertile men carrying a Robertsonian translocation. *Hum Reprod* 16, 2274-2277.
- 18 Gorczyca W, Tuziak T, Kram A, Melamed MR and Darzynkiewicz Z (1994) Detection of
19 apoptosis-associated DNA strand breaks in fine needle aspiration biopsies by in situ end labelling
20 of fragmented DNA. *Cytometry* 15, 169-175.
- 21 Grizard G, Chevalier V, Griveau JF, Le Lannou D and Boucher D (1999). Influence of seminal
22 plasma on cryopreservation of human spermatozoa in a biological material-free medium: study of
23 normal and low-quality semen. *Int J Androl* 22, 190-196.

- 1 Grunewald S, Paasch U, Said TM, Sharma RK, Glander HJ and Agarwal A (2005) Caspase
2 activation in human spermatozoa in response to physiological and pathological stimuli. *Fertil Steril*
3 83, 1106-1112.
- 4 Grunewald S, Said TM, Paasch U, Glander HJ and Agarwal A (2007) Relationship between sperm
5 apoptosis signalling and oocyte penetration capacity. *Int J Androl* 31, 325-330.
- 6 Grunewald S, Rasch M, Reinhardt M, Baumann T, Paasch U and Glander HJ (2008) Stability of
7 fluorochrome bases assays to measure subcellular sperm functions. *Asian J Androl* 10, 455-459.
- 8 Kotwicka M, Jendraszak M, and Warchol JB (2002) Plasma membrane translocation of
9 phosphatidylserine in human spermatozoa. *Folia Histochem Cytobiol* 40, 111-112.
- 10 Kuzelova K, Grebenova D and Hrkal Z (2007) Labeling of apoptotic JURK-MK1 cells by
11 fluorescent caspase-3 inhibitor FAM-DEVD-fmk occurs mainly at sites different from Caspase-3
12 active site. *Cytometry* 71A, 605-611
- 13 Marchetti C, Gallego MA, Defossez A, Formstecher P and Marchetti P (2004) Staining of human
14 sperm with fluorochromes-labeled inhibitor of caspases to detect activated caspases: correlation
15 with apoptosis and sperm parameter. *Hum Reprod* 19, 1127-1134.
- 16 Moradkhani K, Puechberty J, Bhatt S, Lespinasse J, Vago P, Lefort G, Sarda P, Hamamah S and
17 Pellestor F (2006) Rare Robertsonian translocations and meiotic behaviour: sperm FISH analysis
18 of t(13;15) and t(14;15) translocations: A case report. *Hum Reprod* 12, 3193-3198.
- 19 Nagata S (1999) Bidable death. *Nat Cell Biol* 1, E143-E145.
- 20
21 Oehninger S (2003) Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human
22 ejaculated spermatozoa. *RBMonline* 7, 469-476.
- 23 Paasch U, Grunewald S, Fitzl G and Glander HJ (2003) Deterioration of plasma membrane is
24 associated with activated caspases in human spermatozoa. *J Androl* 24, 246-252.

- 1 Paasch U, Sharma RK, Gupta AK, Grunewald S, mascha EJ, Thomas AJ, Glander HJ and Agarwal
2 A (2004) Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic
3 machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biol Reprod* 71, 1828-1837.
- 4 Parvathenani LK, Buescher ES, Chacon-Cruz E and Beebe SJ (1998) Type I cAMP-dependent
5 kinase delays apoptosis in human neutrophils at a site upstream of caspase-3. *J Biol Chem* 273,
6 6736-6743.
- 7 Pellestor F, Imbert I, Andréo B and Lefort G (2001) Study of the occurrence of interchromosomal
8 effect in spermatozoa of chrosomal rearrangement carriers by fluorescence in-situ hybridization
9 and primed in-situ labelling techniques. *Hum Reprod* 16, 1155-1164.
- 10 Perrin A, Caer E, Olivier-Bonet M, Navarro J, Benet J, Amice V and de Braekelleer M (2008)
11 DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural
12 abnormality. *Fertil Steril*, Aug 13, Epub ahead of print.
- 13 Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I and Vassalli P (1997) An early and massive wave of
14 germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *The Embo J*
15 16, 2262-2270.
- 16 Rooney DE and Czepulowski BH (eds). *Human cytogenetics. A practical approach. Voll1:*
17 *Constitutional analysis.* Oxford, IRL Press.
- 18 Said TM, Paasch U, Glander HJ and Agarwal A (2004) Role of caspases in male infertility. *Hum*
19 *Reprod Update* 10, 39-51.
- 20 Said TM, Agarwal A, Zborowski M, Grunewald S, Glander HJ and Paasch U (2008) Utility of
21 magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J Androl* 29, 134-142.
- 22 Sakkas D, Mariethoz E and St John JC (1999) Abnormal sperm parameters in humans are
23 indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-Mediated pathway. *Exp Cell Res*
24 251, 350-355.

- 1 Sakkas D, Moffat O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N and Bizzaro D (2002) Nature of DNA
2 damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod*,
3 66, 1061-1067.
- 4 Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA and Horsmeyer SJ (2002) A
5 distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilises cytochrome c during apoptosis. *Dev*
6 *Cell* 2, 55-67.
- 7 Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F and Bleau G (2005) Sperm DNA fragmentation:
8 threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 20, 3446-3451.
- 9 Smolewski P, Grabarek J, Halicka HD and Darzynkiewicz Z (2002) Assay of caspase activation in
10 situ combined with probing plasma membrane integrity to detect three distinct stages of apoptosis.
11 *J Immunol Methods* 265, 111-121.
- 12 Smolewski P, Bedner E, Du L, Hsieh TC, Wu JM, Phelps DJ and Darzynkiewicz Z (2001)
13 Detection of caspases activation by fluorochrome-labeled inhibitors: multiparameter analysis by
14 laser scanning cytometry. *Cytometry* 44, 73-82.
- 15 Taatjes DJ, Sobel BE and Budd RC (2008) Morphological and cytochemical determination of cell
16 death by apoptosis. *Histochem Cell Biol* 129, 33-43.
- 17 Taylor SL, Weng SL, Fox P, Duran EH, Morshedi MS, Oehninger S and Beebe SJ (2004) Somatic
18 cell apoptosis markers and pathways in ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm
19 quality. *Mol Hum Reprod* 10, 825-834.
- 20 Vaux DL and Korsmeyer SJ (1999) Cell death in development. *Cell* 96, 245-254.
- 21 Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, Liebaers I and Van
22 Steirteghem A (2000) Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates
23 investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod* 15, 351-365.

- 1 Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H and Reutelingsperger C (1995) A novel assay for
2 apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using
3 fluorescein labelled annexinV. *J Immunol Methods* 184, 39-51.
- 4 Weng SL, Taylor SL, Morshedi M, Schuffner A, Duran EH, Beebe S and Oehninger S (2002)
5 Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod* 8, 984-991.
- 6 World Health Organization (1999) WHO Laboratory Manual for the Examination of Human
7 Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction, 4th edn. Cambridge University Press, Cambridge.
- 8 Wundrich K, Paasch U, Leicht M and Grunewald HJ (2006) Activation of caspases in human
9 spermatozoa during cryopreservation- An immunoblot study. *Cell tissue banking* 7, 81-90.

Table I. Characteristics of the sperm samples of Robertsonian translocation carriers and fertile donors.

Sample	Karyotype	Concentration (10^6ml^{-1})	Motility a+b (%)	Morphology (David's criteria) (%)	Round cells (10^6ml^{-1})
Robertsonian translocation carriers					
1	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	18.00	39	19	6.0
2	45,XY,der(14;21)(q10;q10)	14.00	29	7	5.0
3	45,XY,der(14;22)(q10;q10)	13.00	40	3	4.0
4	45,XY,der(14;22)(q10;q10)	11.00	37	10	8.4
5	45,XY,der(14;21)(q10;q10)	5.00	32	2	1.0
6	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	1.2	30	4	0.9
7	45,XY,der(13;15)(q10;q10)	0.12	8	1	2.8
Median		11.00	32	4	4.0
Fertile donors					
I	46,XY	240.00	55	32	1.0
II	46,XY	153.00	57	32	0.4
III	46,XY	150.00	65	34	0.5
IV	46,XY	72.00	55	30	0.2
V	46,XY	65.00	43	30	0.8
VI	46,XY	44.00	69	31	1.0
VII	46,XY	28.00	35	29	0.2
Median		72.00	55	31	0.5

Table II. Assays applied on sperm samples of Robertsonian translocation carriers and fertile donors.

Sample	Karyotype	Expression of activated caspases	DNA fragmentation analysis	Ultrastructural analysis	Chromosomal segregation
Robertsonian translocation carriers		Caspase assays	TUNEL	Electron microscopy	FISH
1	45,XY,der(13;14) (q10;q10)	yes	yes	no	yes
2	45,XY,der(14;21) (q10;q10)	yes	yes	yes	yes
3	45,XY,der(14;22) (q10;q10)	yes	yes	no	yes
4	45,XY,der(14;22)(q10;q10)	yes	yes	yes	yes
5	45,XY,der(14;21) (q10;q10)	yes	yes	no	no
6	45,XY,der(13;14) (q10;q10)	yes	no	yes	no
7	45,XY,der(13;15) (q10;q10)	yes	no	no	yes
Fertile donors					
I	46,XY	yes	yes	no	no
II	46,XY	yes	yes	no	no
III	46,XY	yes	yes	yes	no
IV	46,XY	yes	yes	no	no
V	46,XY	yes	yes	yes	no
VI	46,XY	yes	yes	yes	no
VII	46,XY	yes	yes	no	no

Tables III a. and III b. Measurements of proportion of spermatozoa with activated caspases and DNA fragmentation in ejaculated sperm from patients with Robertson chromosomal translocation (III A.) and control group (III B.).

Patient-karyotype	Caspase Assays (Measurements of proportion of spermatozoa with activated caspases)				TUNEL
	Casp+/PI- (%)	Casp+/PI+ (%)	Casp-/PI+ (%)	Casp-/PI- (%)	DNA fragmentation (%)
Poly-caspases					
1- 45,XY,der(13;14)(q10;q10)	71.6	14.1	10.1	4.2	26.3
2- 45,XY,der(14;21)(q10;q10)	57.4	29.5	2.7	10.4	38.4
3- 45,XY,der(14;22)(q10;q10)	47.7	50.0	1.1	1.2	47.6
4- 45,XY,der(14;22)(q10;q10)	62.0	28.6	3.0	6.4	20.5
5- 45,XY,der(14;21)(q10;q10)	62.4	25.2	4.4	8.0	21.7
6- 45,XY,der(13;14)(q10;q10)	43.2	34.4	16.0	6.4	NM
7- 45,XY,der(13;15)(q10;q10)	24.0	35.2	3.5	37.3	NM
Median	57.4	29.5	3.5	6.4	26.3
Caspase 3					
1- 45,XY,der(13;14)(q10;q10)	14.3	70.9	4.3	10.5	
2- 45,XY,der(14;21)(q10;q10)	44.2	38.6	5.8	11.4	
3- 45,XY,der(14;22)(q10;q10)	34.0	57.3	2.3	6.4	
4- 45,XY,der(14;22)(q10;q10)	69.8	24.4	1.8	4.0	
5- 45,XY,der(14;21)(q10;q10)	58.0	25.2	8.5	8.3	
6- 45,XY,der(13;14)(q10;q10)	43.5	21.4	15.1	20.0	
7- 45,XY,der(13;15)(q10;q10)	15.0	31.0	16.7	37.3	
Median	43.5	31.0	5.8	10.5	
Caspase 8					
1- 45,XY,der(13;14)(q10;q10)	13.6	67.2	5.2	14.0	
2- 45,XY,der(14;21)(q10;q10)	44.7	39.3	3.5	12.5	
3- 45,XY,der(14;22)(q10;q10)	31.4	56.3	3.4	8.9	
4- 45,XY,der(14;22)(q10;q10)	61.2	25.3	8.5	5.0	
5- 45,XY,der(14;21)(q10;q10)	63.0	25.4	3.0	8.6	
6- 45,XY,der(13;14)(q10;q10)	44.4	12.6	21.1	21.9	
7- 45,XY,der(13;15)(q10;q10)	17.7	41.4	5.6	35.3	
Median	44.4	39.3	5.2	12.5	
Caspase 9					
1- 45,XY,der(13;14)(q10;q10)	15.7	68.8	7.0	8.5	
2- 45,XY,der(14;21)(q10;q10)	42.4	40.7	4.7	12.2	
3- 45,XY,der(14;22)(q10;q10)	29.8	55.2	7.7	7.3	
4- 45,XY,der(14;22)(q10;q10)	52.1	36.1	3.8	8.0	
5- 45,XY,der(14;21)(q10;q10)	60.0	26.4	6.3	7.3	
6- 45,XY,der(13;14)(q10;q10)	46.9	14.6	18.1	20.4	
7- 45,XY,der(13;15)(q10;q10)	9.7	33.3	13.2	43.8	
Median	42.4	36.1	7.0	8.5	

III a.

	Caspases Assays (Measurements of proportion of spermatozoa with activated caspases)				TUNEL
Fertile donor	Casp+/PI- (%)	Casp+/PI+ (%)	Casp- /PI+ (%)	Casp-/PI- (%)	DNA fragment ation (%)
Poly-caspases					
I	25.8	29.8	15.0	29.4	15.8
II	17.4	9.9	9.6	63.1	16.8
III	29.1	25.2	6.2	39.5	9.6
IV	16.1	48.4	9.3	26.2	12.1
V	27.6	27.1	17.6	27.7	18.8
VI	26.4	17.7	17.5	38.4	12.8
VII	19.3	48.4	8.3	24.0	6.8
Median	25.8	27.1	9.6	29.4	12.8
Caspase 3					
I	8.7	39.2	25.0	27.1	
II	9.7	14.0	15.0	61.3	
III	13.4	23.4	25.8	37.4	
IV	14.5	45.0	24.5	16.0	
V	13.1	43.1	16.6	27.2	
VI	15.6	22.2	20.7	41.5	
VII	14.1	47.3	11.2	27.4	
Median	13.4	39.2	20.7	27.4	
Caspase 8					
I	6.4	38.8	23.0	31.8	
II	11.1	12.9	16.6	59.4	
III	9.7	37.7	15.6	37.0	
IV	17.1	38.6	25.3	19.0	
V	19.8	39.6	13.3	27.3	
VI	32.1	14.3	13.8	39.8	
VII	21.6	45.1	8.3	25.0	
Median	17.1	38.6	15.6	31.8	
Caspase 9					
I	8.4	40.5	21.2	29.9	
II	8.4	16.5	12.2	62.9	
III	8.2	29.4	13.9	48.5	
IV	12.7	42.2	25.9	19.2	
V	10.0	45.2	15.5	29.3	
VI	13.7	31.9	21.4	33.0	
VII	14.9	46.6	10.2	28.3	
Median	10.0	40.5	15.5	29.9	

III b.

Casp+/PI-: viable spermatozoa with staining of activated caspase(s); Casp+/PI+: dead spermatozoa with staining of activated caspases; Casp-/PI+: dead spermatozoa without staining of activated caspase; Casp-/PI-: intact and viable spermatozoa; NM: no measurement.

Table IV. Ultrastructural spermatozoa analysis of infertile Robertsonian translocation and fertile donors

Patient-karyotype	Intact (%)	Immature (%)	Apoptotic (%)	Necrotic (%)
Infertile Robertson translocation carriers				
2- 45,XY,der(14;21)(q10;q10)	20.0	28.0	35.0	17.0
4- 45,XY,der(14;22)(q10;q10)	29.5	31.0	24.5	15.0
6- 45,XY,der(13;14)(q10;q10)	27.0	7.0	18.0	48.0
Median	27.0	28.0	24.5	17.0
Fertile donors				
III- 46,XY	49.0	20.0	18.5	12.5
V- 46,XY	45.0	10.0	14.0	31.0
VI- 46,XY	58.0	3.0	22.0	17.0
Median	49.0	10.0	18.5	17.0

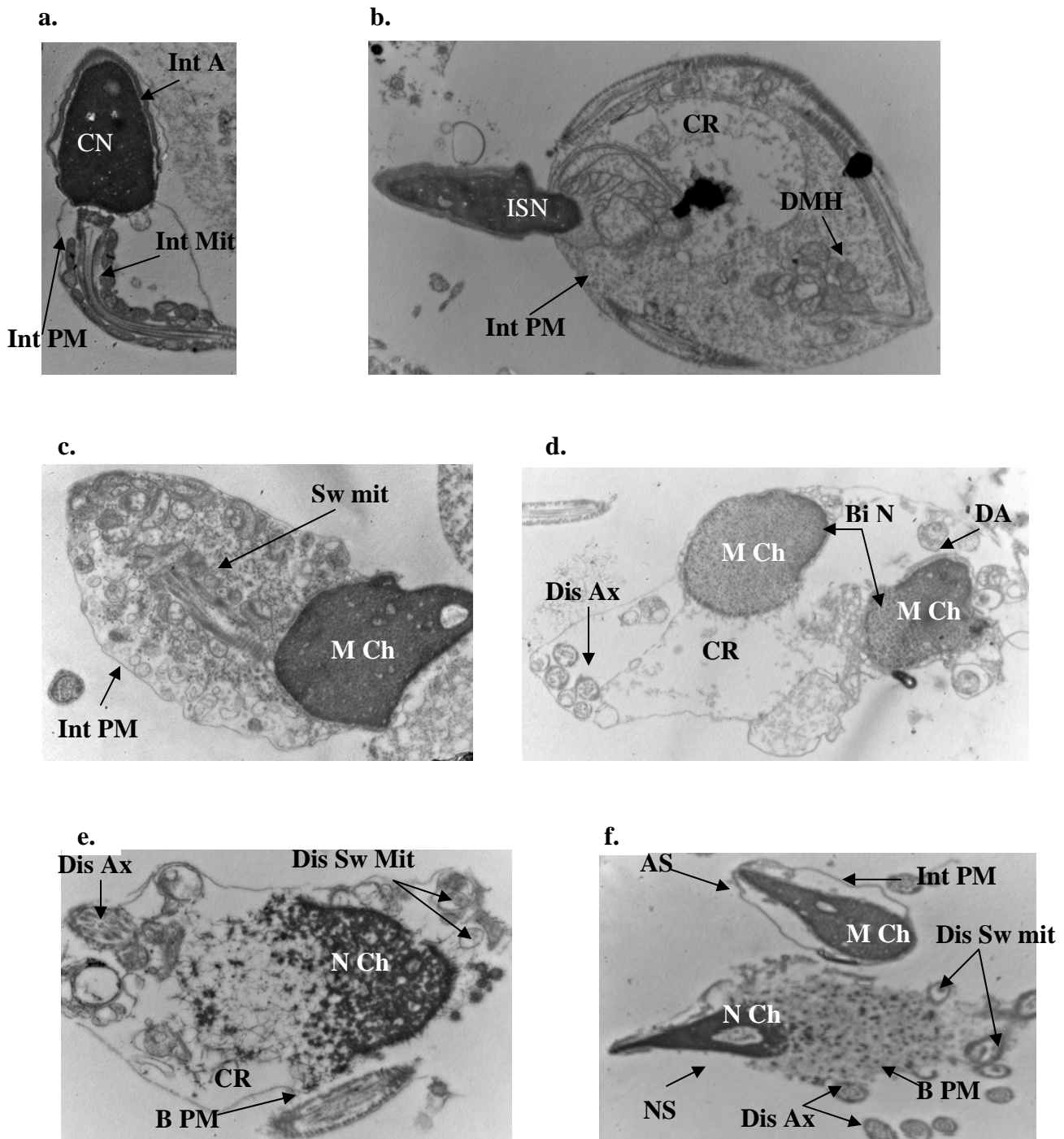


Figure 1. Transmission electron microscopy micrographs of ejaculated spermatozoa of Robertsonian translocation carriers

a/ Intact spermatozoa : condensed nucleus (CN), plasma membrane (Int PM), acrosome (Int A) and mitochondria (Int Mit) are intact. **b/ Immature spermatozoa**: irregularly shaped nucleus (ISN) Cytoplasmic residue (CR). Intact plasma membrane (Int PM). Badly shaped acrosome (BSA). Disorganized mitochondrial helix (DMH). **c et d/ Apoptotic spermatozoa**: altered nucleus with marginated chromatin (M Ch), irregularly shaped and embedded in cytoplasmic residue (CR), binucleate (Bi N). Intact plasma membrane (Int PM). Deformed acrosome (DA). Disorganized and swollen mitochondria (Sw Mit). Disorganized Axoneme (Dis Ax), frequently with absent central tubules and/or with doublets having incomplete or absent dynein arms. **e/ Necrotic spermatozoa**: Misshapen nucleus with necrotic chromatin (N Ch) embedded in cytoplasmic residue (CR). Broken plasma membrane (B PM). Absent acrosome. Dispersed and swollen mitochondria (Dis Sw Mit). Disorganized axoneme (Dis Ax). **f/ Apoptotic spermatozoa (AS)**: altered nucleus with marginated chromatin (M Ch). Intact Plasma membrane (Int PM). **Necrotic spermatozoa (NS)**: misshapen nucleus with necrotic chromatin (N Ch). Broken plasma membrane (B PM). Deformed acrosome (DA). Dispersed and swollen mitochondria (Dis Sw Mit). Disorganized axoneme (Dis Ax).

Table V. Meiotic segregation analysis with FISH technique in spermatozoa from patients with Robertson translocation.

sp	karyotype	n	alternate (%)	Chromosome A		Chromosome B		Diploidy
				Normal and balanced	Nullisomy (%)	Disomy (%)	Nullisomy (%)	
1	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	4970	85.53	4.24	2.85	4.64	2.37	0.37
2	45,XY,der(14;21)(q10;q10)	4602	85.85	3.02	3.49	3.73	3.13	0.78
3	45,XY,der(14;22)(q10;q10)	3279	79.69	3.45	7.26	3.84	5.43	0.33
4	45,XY,der(14;22)(q10;q10)	5330	81.76	3.79	6.77	3.30	3.73	0.65
7	45,XY,der(13;15)(q10;q10)	882	78.34	2.04	7.94	5.90	4.76	1.02

sp: sample; n: count of spermatozoa analyzed by FISH technique.

A is the first chromosome described in the karyotype, and B the second.

Discussion

1. Limites, adaptation et interprétation des techniques de mesure des marqueurs apoptotiques du spermatozoïde humain

1.1 Nécessité d'une étude multiparamétrique pour mesurer l'apoptose du spermatozoïde humain

Dans notre travail, les marqueurs d'apoptose que nous avons appliqués aux spermatozoïdes humains ont été validés par des études rapportées au préalable sur des cellules somatiques sur lesquelles l'apoptose avait été induite expérimentalement. Toutefois, il n'existe pas de marqueur réellement spécifique de l'apoptose :

→ Les caspases, en plus de leur implication dans l'activation de l'apoptose, ont également été décrites dans la régulation des processus de différenciation et de maturation cellulaires, en particulier pour les cellules germinales mâles (Arama *et al.*, 2003 ; Carlile *et al.*, 2004 ; Cayli *et al.*, 2004 ; Huh *et al.*, 2004).

→ La fragmentation de l'ADN du spermatozoïde humain peut être le témoin : (i) d'une activation des voies effectrices de l'apoptose (Oehninger, 2003), (ii) d'une compaction nucléaire incomplète secondaire à un défaut de transition histone-protamines lors des étapes de différenciation et maturation des spermatozoïdes (Mc Pherson and Longo, 1993), (iii) d'altérations du spermatozoïde ayant subi un stress oxydant (Whittington and Ford, 1999 ; Marchetti *et al.*, 2002 ; Agarwal *et al.*, 2008)

→ L'externalisation de la phosphatidylsérine est décrite dans les cellules somatiques comme un phénomène de reconnaissance par les cellules phagocytaires. Dans le spermatozoïde humain, ce phénomène est également associé à la capacitation du spermatozoïde (De Vries *et al.*, 2003) et à l'induction de la réaction acrosomique (Martin *et al.*, 2005).

Finalement, pour parler d'apoptose dans le spermatozoïde humain, plusieurs marqueurs doivent donc être mesurés simultanément.

1.2 Cryoconservation des spermatozoïdes et marqueurs d'apoptose

Pour des raisons pratiques, nous avons réalisé la mesure de l'expression des caspases activées et de la fragmentation de l'ADN sur des spermatozoïdes cryoconservés. Bien que la congélation-décongélation des spermatozoïdes humains induit une augmentation de l'expression des marqueurs caractéristiques d'apoptose, des résultats rapportés dans la littérature montrent que cet effet n'influence pas l'interprétation des résultats si les spermatozoïdes sont congelés et décongelés dans les mêmes conditions pour la mesure de l'expression des caspases activées (Paasch *et al.*, 2004b) et de la fragmentation de l'ADN (Duru *et al.*, 2001 ; Oehninger *et al.*, 2003). Par contre, il est aujourd'hui clairement démontré que le stress cellulaire induit par la congélation-décongélation induit des altérations membranaires (Grizard *et al.*, 1999) des spermatozoïdes et provoque notamment l'externalisation de la PS (Duru *et al.*, 2001 ; Sion *et al.*, 2004). Dans notre étude, l'analyse de l'externalisation de la PS a uniquement été réalisée sur des éjaculats non cryoconservés.

1.3 Les différents marqueurs d'apoptose mesurés

→ Les caspases activées

Dans une population de spermatozoïdes, la mesure d'expression globale des caspases ou de chaque caspase activée(s) peut être réalisée (1) sur chaque cellule en utilisant des inhibiteurs fluorescents et des moyens de détection adapté (analyse *in cellulo*) ; (2) sur des extraits protéiques préparés à partir de l'ensemble des spermatozoïdes en utilisant soit une immunodétection des caspases activées (*western blot*), soit une mesure de l'activité enzymatique par l'utilisation d'un substrat fluorogénique.

L'analyse *in cellulo* est une technique de mesure sensible qui permet d'évaluer dans la population cellulaire la proportion de spermatozoïdes exprimant la caspase activée.

L'utilisation d'un inhibiteur fluorescent spécifique de la caspase mesurée (FLICA) permet la détection : des principales caspases activées dans l'apoptose (FAM-VAD-fmk qui par définition se lie aux caspase-1, -3, -4, -5, -6, -7, -8, et 9 activées), ou de façon spécifique de la caspase -3 (FAM-DEVD-fmk) , -8 (FAM-LETD-fmk) ou -9 (FAM-LEHD-fmk) activée. Le FLICA reconnaît et se lie de façon covalente à une séquence d'acides aminés spécifiques du site actif de la caspase mesurée. L'utilisation de ce type de marquage pénétrant et non cytotoxique pour la cellule ne rend pas nécessaire une fixation et/ou une perméabilisation cellulaire préalable et permet de l'associer à une coloration vitale par le propidium iodide pour différencier les spermatozoïdes vivants des morts. Cependant, des études récentes ont montré sur des cellules somatiques dont l'apoptose a été induite que ce type de marquage par FLICA manquait de spécificité. En effet, la liaison du FLICA ne semble pas limitée au centre actif de la caspase étudiée (Kuzelova *et al.*, 2007 ; Darzynkiewicz and Pozarowski, 2007). Ceci pourrait s'expliquer par l'homologie de structure des protéines de la famille des caspases. Il paraît donc prudent de valider les mesures réalisées par cette technique par des méthodes plus spécifiques basées sur d'autres propriétés des caspases activées : activité enzymatique mesurée par fluorométrie ou activité antigénique par *western blot*.

Compte-tenu de la faible sensibilité de la technique *western blot* et de la faible activité caspase dans le spermatozoïde humain (Weng *et al.*, 2002 ; Marchetti *et al.*, 2004a ; Wundrich *et al.*, 2006) pour réaliser l'immunodétection en *western blot*, il est nécessaire de disposer d'une quantité relativement importante de spermatozoïdes pour obtenir suffisamment d'extrait protéique. De plus, pour être le plus spécifique possible, cet extrait protéique doit être obtenu à partir d'une population spermatozoïdes purifiée pour éviter des interférences éventuelles avec la détection de caspases activées présentes dans les cellules somatiques et/ou germinales environnantes pouvant contaminer les échantillons

spermatiques. Cette sélection a cependant des limites puisque après migration sur gradient de densité, la population de spermatozoïdes sélectionnée présente une proportion de spermatozoïdes présentant des caspases activées qui ne reflète pas véritablement celle contenue dans la population de spermatozoïdes initiale. En outre, une sélection qualitative, le rendement de sélection des spermatozoïdes par migration sur gradient de densité n'est pas optimal notamment pour les spermés altérés. La technique *western blot* n'est pas applicable aux prélèvements présentant une oligoathénozoospermie sévère puisque dans nos conditions expérimentales, la quantité minimum de spermatozoïdes pour détecter les caspases-3, -8 et -9 est de l'ordre de $10 \cdot 10^6$.

L'utilisation combinée d'un inhibiteur spécifique des caspases activées, couplé à un fluorochrome vert et d'un colorant vital fluorescent rouge (propidium iodide) nous a permis de détecter *in cellulo* l'expression des caspases activées dans les spermatozoïdes vivants d'une part et dans les spermatozoïdes morts d'autre part. Cette analyse nécessite peu de spermatozoïdes et est applicable aux éjaculats de patients oligozoospermiques, aux prélèvements testiculaires ou épидидymaires. Nous avons comparé deux méthodes de détection du marquage : la cytométrie en flux et la microscopie à fluorescence. La cytométrie en flux est une technique automatisée et rapide permettant l'analyse de plusieurs milliers de cellules. A l'opposé, la microscopie à fluorescence est une technique observateur dépendante, longue et permettant l'analyse au mieux de quelques centaines de cellules. Néanmoins, il est possible pour l'observateur de distinguer les différents types cellulaires marqués et en particulier d'identifier les spermatozoïdes. Elle est donc bien adaptée aux prélèvements testiculaires où la cytométrie en flux ne permet pas de différencier les spermatozoïdes des autres cellules (germinales et/ou somatiques) environnantes.

L'analyse de concordance que nous avons réalisée (*cf.* publication n°1) a montré une bonne reproductibilité des mesures en microscopie à fluorescence et une bonne concordance

entre les deux techniques de détection. Cependant, comparé à la cytométrie en flux, les valeurs mesurées pour les spermatozoïdes vivants marqués par le FLICA sont systématiquement plus faibles en microscopie à fluorescence. Cette différence pourrait s'expliquer par la sensibilité plus faible de la détection (œil dépendante), la quantité plus faible de cellules analysées et le temps de lecture plus long, qui peut générer une baisse de la fluorescence.

Enfin, étant donné la résistance des spermatozoïdes humains une induction de l'activation des caspases par les molécules inductrices habituellement utilisées pour les cellules somatiques (ex : cycloheximide), le contrôle positif a été réalisé sur des cellules somatiques activées. Nous avons utilisé des polynucléaires sanguins dont les voies caspases dépendantes ont été activées par une incubation dans du cycloheximide (1mM, 6 heures, 37°C) (Parvathenani *et al.*, 1998 ; Weng *et al.*, 2002).

→ **Détection de la fragmentation de l'ADN.**

La fragmentation de l'ADN peut être mesurée par l'analyse globale d'une suspension cellulaire (électrophorèse en gel d'agarose et technique comet) d'une part ou par une technique de détection *in cellulo* (technique TUNEL).

L'électrophorèse en gel d'agarose est la seule méthode permettant de visualiser la fragmentation internucléosomique de l'ADN, spécifique de l'activation de l'apoptose, donnant un aspect d'échelle (Schlegel and Paduch, 2005). Cependant, cette méthode peu sensible, nécessite de disposer de plusieurs millions de spermatozoïdes ; ce qui en limite l'intérêt pour les spermés de patients oligozoospermiques. De plus, l'analyse est globale et ne permet pas de déterminer la proportion de spermatozoïdes avec une fragmentation de l'ADN.

Par la technique comet, il est possible de mesurer les cassures de l'ADN double et simple brin(s) à pH alcalin (Singh *et al.*, 1988 ; Hughes *et al.*, 1997 ; Irvine *et al.*, 2000).

Nous n'avons pas appliqué cette méthode car même si elle semble très sensible, elle est difficile de réalisation, manque de standardisation méthodologique et nécessite un logiciel adapté pour la lecture.

La technique TUNEL (Tdt-mediated dUTP-biotin nick end labeling) utilise l'activité spécifique de la terminale désoxynucléotidyle transférase (TdT) pour incorporer un complexe biotine-désoxyuridine après perméabilisation cellulaire. Les extensions de nucléotides biotinylés sont ensuite visualisées après incubation avec des conjugués de type streptavidine ou par l'addition de streptavidine couplée à la fluorescéine. Avec un marquage enzymatique, la microscopie optique permet de détecter les cellules marquées et avec un marquage fluorescent, la détection peut se faire en microscopie à fluorescence ou en cytométrie en flux. Le type de détection utilisé dépend de la quantité de spermatozoïdes analysés. Pour la cytométrie en flux, après optimisation de la technique, nous avons obtenu de bons résultats avec un minimum de $2 \cdot 10^6$ spermatozoïdes. Cette détection ne peut donc pas s'appliquer chez des patients présentant une oligozoospermie sévère (cf. publication n°3). La technique TUNEL appliquée aux spermatozoïdes humains est aujourd'hui démontrée comme étant sensible, spécifique et reproductible (Sergerie *et al.*, 2005 ; Dominguez-Fandos *et al.*, 2007).

Une autre méthode permettant la mesure de la sensibilité de l'ADN spermatique à la dénaturation en milieu acide a été décrite. Le niveau de condensation est évalué par un marquage à l'acridine orange (technique SCSA, Sperm Chromatin Structure Assay) de la chromatine (Ballachey *et al.*, 1988 ; Evenson *et al.*, 1999 ; Januskauska *et al.*, 2001 ; Alvarez and Lewis, 2008), ou par l'analyse du halo de dispersion de la chromatine après coloration de Wright pour une lecture en microscopie en champ clair (Velez de la Calle *et al.*, 2008) ou après un marquage au DAPI (Fernandez *et al.*, 2005) pour une analyse en microscopie à épifluorescence (technique SCD : Sperm Chromatin Dispersion). Les techniques SCSA et SCD ne permettent pas une mesure directe de la fragmentation de l'ADN mais les taux de

spermatozoïdes présentant des anomalies de condensation chromatinienne mesurées par ces méthodes sont corrélés aux taux de spermatozoïdes avec une fragmentation de l'ADN mesurée par la technique TUNEL (Perera *et al.*, 2002 ; Chohan *et al.*, 2006).

→ **Détection de l'externalisation de la phosphatidylsérine**

La proportion des spermatozoïdes exprimant une externalisation de la PS a été évaluée en utilisant un marquage par l'annexine V couplée à un fluorochrome vert (FITC) et un colorant vital fluorescent rouge (propidium iodide, PI), permettant de distinguer quatre types de spermatozoïdes (spermatozoïde vivant et intact, spermatozoïde vivant ayant externalisé la PS, spermatozoïde mort ayant externalisé la PS, spermatozoïde mort sans externalisation de la PS). En raison de l'oligospermie des patients porteurs d'une translocation chromosomique, notre étude a été réalisée par microscopie à fluorescence (*cf.* publication n°3). Les concordances inter et intra- observateur de nos mesures ont été préalablement vérifiées.

→ **Analyse ultrastructurale des spermatozoïdes**

L'étude ultrastructurale par microscopie électronique permet de définir différents profils des spermatozoïdes à partir de critères basés sur les altérations préalablement observées sur des cellules somatiques dont l'apoptose a été stimulée (Ziegler and Groscurth, 2004) et des spermatozoïdes éjaculés d'hommes infertiles présentant des altérations de la spermatogenèse (Baccetti *et al.*, 1996 ; Baccetti *et al.*, 2002a). Il n'est cependant pas totalement démontré que les modifications ultrastructurales observées dans le spermatozoïde humain soient pathognomoniques de l'apoptose. Compte-tenu de la proportion importante de spermatozoïdes éjaculés présentant à la fois des altérations ultrastructurales d'apoptose et d'immaturité chez les patients infertiles porteurs d'une translocation Robertsonienne, une

relation possible entre la mise en jeu des processus d'apoptose et de maturation et/ou de différenciation des cellules germinales peut être envisagée.

2. Signification des marqueurs d'apoptose dans le spermatozoïde humain

Même s'il est aujourd'hui clairement démontré dans la littérature que les spermatozoïdes éjaculés expriment des signes d'apoptose, leur signification n'est pas clairement comprise. En effet, l'expression de ces marqueurs pourrait être la conséquence d'une apoptose testiculaire initiée et avortée (Sakkas *et al.*, 1999 ; Lin *et al.*, 2008) ou être le témoin d'une activation de l'apoptose durant le transit des spermatozoïdes dans les voies génitales (Oehninger, 2003). Les résultats de notre travail ont permis de montrer une expression des caspases activées dans les spermatozoïdes prélevés à différents niveaux du tractus génital (testicule, épididyme et éjaculat).

Bien que notre étude n'a pas été réalisée dans des conditions physiologiques (prélèvements provenant de patients présentant une ABCD) et que les spermatozoïdes analysés (éjaculés, épидидymaires ou testiculaires) provenaient de patients différents et ont été cryoconservés, nos résultats apportent des informations nouvelles. A notre connaissance, l'expression des caspases activées dans des spermatozoïdes testiculaires et épидидymaires humains n'avait jamais été mise en évidence auparavant. De plus, il semble que les spermatozoïdes épидидymaires ne soient pas capables d'initier l'apoptose. Par ailleurs, Lachaud *et al.*, 2004, ont montré que les spermatozoïdes éjaculés seraient incapables d'initier spontanément leur apoptose *in vitro*. L'ensemble de ces données seraient en faveur d'une initiation de l'apoptose dans le testicule durant la spermatogenèse (Pentikainen *et al.*, 1999 ; Hikim *et al.*, 2003b) et les spermatozoïdes exprimant des caspases activées dans l'épididyme ou l'éjaculat auraient échappés à ce processus (apoptose avortée).

Outre leur rôle dans l'initiation de l'apoptose, les caspases pourraient être aussi impliquées dans le processus de maturation et de différenciation des cellules germinales (Kim *et al.*, 2001 ; Cayli *et al.*, 2004 ; Aziz *et al.*, 2007). En effet, lors de la spermiogenèse, la différenciation des spermatides en spermatozoïdes implique des modifications ultrastructurales proches de l'apoptose. Chez le rat, certains marqueurs apoptotiques (caspases, externalisation de la PS) ont été localisés essentiellement au niveau des corps résiduels qui se détachent lors de la maturation des spermatides (Blanco-Rodriguez and Martinez-Garcia, 1999). Chez la drosophile, l'activation des caspases et la mise en jeu du cytochrome c sont nécessaires à la différenciation des spermatides en spermatozoïdes (Arama *et al.*, 2003 ; Huh *et al.*, 2004). Chez l'homme, des études ont été réalisées sur différentes populations de spermatozoïdes éjaculés (Weng *et al.*, 2002 ; Taylor *et al.*, 2004) sélectionnées par migration sur gradient de densité. Les pourcentages de spermatozoïdes exprimant des marqueurs d'apoptose (fragmentation de l'ADN, caspase-3, -7 et -9 activée, externalisation de la PS) sont plus élevés dans les fractions cellulaires de faible densité contenant une proportion importante de spermatozoïdes immatures, comparée aux fractions cellulaires de haute densité contenant des proportions plus importantes de spermatozoïdes matures. De plus, chez des patients infertiles des analyses ultrastructurales par microscopie électronique à transmission des spermatozoïdes ont permis de montrer l'existence d'une proportion importante de spermatozoïdes présentant des stigmates d'immaturité et/ou d'apoptose (Baccetti *et al.*, 1996 ; Baccetti *et al.*, 2002b). Nos résultats obtenus chez des sujets infertiles porteurs d'une translocation Robertsonienne confirment ces données (cf. publication n^{os} 3 et 4).

3. Apports de la mesure des marqueurs d'apoptose du spermatozoïde en biologie de la reproduction

3.1 Amélioration de la compréhension de l'infertilité masculine

De nombreuses études préliminaires ont démontré une proportion plus importante de spermatozoïdes exprimant des marqueurs d'apoptose dans les spermes éjaculés de patients infertiles comparé à des donneurs fertiles (Weng *et al.*, 2002 ; Taylor *et al.*, 2004 ; Marchetti *et al.*, 2004a ; Varum *et al.*, 2007). La mesure de ces marqueurs, en particulier les caspases activées, apporterait des informations complémentaires aux paramètres spermologiques standards sur la qualité des spermatozoïdes et leur pouvoir fécondant (Marchetti *et al.*, 2004 ; Grunewald *et al.*, 2007 ; Grunewald *et al.*, 2008).

Chez des patients infertiles porteurs d'un translocation chromosomique autosomique (translocation réciproque ou Robertsonienne), l'expression des marqueurs d'apoptose sur les spermatozoïdes éjaculés associés à l'analyse de la ségrégation méiotique nous a permis d'avancer des hypothèses quant aux mécanismes responsables de l'altération des paramètres spermologiques et des caractéristiques de la ségrégation méiotique (prépondérance de spermatozoïdes équilibrés sur le plan chromosomique). Chez ces patients, nos résultats (cf. publications n^{os} 3 et 4) montrent une proportion plus élevée de spermatozoïdes présentant une externalisation de la PS et une fragmentation de l'ADN. De plus, la proportion de spermatozoïdes exprimant des caspases activées (poly-caspases, caspase-3, -8 et -9) et de spermatozoïdes présentant des modifications ultrastructurales typiques d'apoptose et/ou d'immaturité est aussi plus élevée chez ces patients, comparé aux hommes fertiles. Ces résultats montrent donc clairement qu'il existe une altération de la spermatogenèse et une augmentation de l'apoptose qui serait responsable notamment de l'élimination des spermatozoïdes présentant un déséquilibre chromosomique. A partir d'une étude portant sur

l'analyse de spermatozoïdes épидидymaires de souris mâles porteuses d'une translocation Robertsonienne, l'hypothèse de l'existence d'un point de contrôle du fuseau méiotique qui permettrait la reconnaissance des déséquilibres chromosomiques lors de la ségrégation méiotique et qui initierait l'activation de l'apoptose des cellules germinales a été émise (Eaker *et al.*, 2001).

Finalement, dans l'éjaculat, les spermatozoïdes portent des stigmates d'apoptose qui peuvent être le témoin d'une apoptose initiée et « avortée ». Actuellement, les mécanismes qui ont éventuellement permis à ces spermatozoïdes d'échapper à la mort par apoptose ne sont pas connus. Par ailleurs, par nos mesures, il n'est pas possible de savoir si ces spermatozoïdes sont ceux qui présentent un déséquilibre chromosomique. En effet, une proportion de spermatozoïdes, bien que plus faible que celle théoriquement attendue, présentant une aneuploïdie persiste dans l'éjaculat. Par ailleurs, une proportion élevée des spermatozoïdes des patients porteurs d'une translocation Robertsonienne présente des signes d'immaturité caractéristiques d'une spermatogenèse altérée.

Ces données tendant donc à démontrer que l'existence d'une translocation chromosomique, en particulier de type Robertsonienne, semble interférer avec la spermatogenèse et en particulier avec la différenciation des spermatozoïdes induisant l'existence d'une proportion plus importante de spermatozoïdes immatures et /ou présentant des marqueurs d'apoptose dans l'éjaculat de ces patients. Ces résultats corroborent ceux rapportés par Baccetti *et al.*, (2002b, 2003, 2005), qui décrivent des altérations ultrastructurales caractéristiques d'apoptose dans les spermatozoïdes éjaculés de patients porteurs d'une translocation chromosomique autosomique. De plus, très récemment, Perrin *et al.*, 2008, ont observé des taux de fragmentation de l'ADN plus élevés dans les spermatozoïdes de patients porteurs d'une translocation chromosomique réciproque ou Robertsonienne, comparé à des hommes fertiles.

3.2 Amélioration de la compréhension des résultats obtenus en assistance médicale à la procréation

Dans la littérature, les études portent essentiellement sur les spermatozoïdes éjaculés et analysent la relation entre la fréquence des spermatozoïdes présentant une fragmentation de l'ADN et les taux de fécondation, la qualité du développement embryonnaire précoce et les taux de grossesse en assistance médicale à la procréation (Lopes *et al.*, 1998 ; Host *et al.*, 2000 ; Bechaib *et al.*, 2003 Sergerie *et al.*, 2005). Seules deux études ont analysé la relation entre la proportion des spermatozoïdes testiculaires (Ramos *et al.*, 2002 ; Greco *et al.*, 2005) et épидидymaires (Ramos *et al.*, 2002) humains présentant une fragmentation de l'ADN et les résultats obtenus en ICSI.

Toutes ces études montrent que les résultats en assistance médicale à la procréation sont d'autant meilleurs que la proportion de spermatozoïdes avec un ADN fragmenté est faible. Cependant ce seul marqueur ne permet pas d'établir une relation entre apoptose et résultats en AMP d'autant plus qu'aucune différenciation entre spermatozoïdes vivants et morts présentant un ADN fragmenté n'est possible par les techniques habituellement utilisées (Perreault *et al.*, 2003 ; Alvarez and Lewis, 2008 ; Lin *et al.*, 2008).

Récemment, des données ont montré la relation possible entre la proportion des spermatozoïdes éjaculés exprimant des caspases activées et leur pouvoir fécondant (Marchetti *et al.*, 2004a ; Grunewald *et al.*, 2007). Notre travail a pour originalité de porter sur l'analyse de ce marqueur sur des spermatozoïdes testiculaires et épидидymaires humains utilisés en ICSI (cf. publication n°2). Le critère essentiel de sélection des spermatozoïdes injectés en ICSI reposant sur l'appréciation de la vitalité (Van Steirteghem *et al.*, 1993 ; Sallam *et al.*, 2005), il nous a semblé important de combiner notre méthode de mesure à un marquage de vitalité (propidium iodide) afin de distinguer les spermatozoïdes vivants exprimant ou non un

marquage des caspases activées. Nos résultats suggèrent pour la première fois l'intérêt de l'évaluation des caspases activées dans ces spermatozoïdes pour une meilleure compréhension des résultats obtenus après ICSI (taux de fécondation, qualité de développement embryonnaire et taux de grossesses évolutives).

Aujourd'hui l'utilisation des paramètres spermiologiques standards (WHO, 1999) n'est pas suffisante pour prédire les résultats des techniques d'assistance médicale à la procréation utilisant des spermatozoïdes éjaculés, épидидymaires ou testiculaires. La mesure de marqueurs d'apoptose comme l'expression des caspases activées, mais aussi d'autres marqueurs d'apoptose comme la variation du potentiel mitochondrial ($\Delta\Psi_m$), montré comme étant une mesure sensible pour l'évaluation de la qualité fonctionnelle et du pouvoir fécondant des spermatozoïdes (Barroso *et al.*, 2006 ; Gallon *et al.*, 2006) apporterait donc un moyen complémentaire d'évaluation de l'infertilité masculine et permettrait d'optimiser la prise en charge de ces patients, en particulier en assistance médicale à la procréation. Néanmoins, avant d'envisager la pratique de ces mesures dans les laboratoires de biologie de la reproduction clinique, il serait nécessaire de confirmer ces mesures par une étude prospective à grande échelle.

Conclusion / Perspectives

Les différentes approches de notre étude ont montré clairement une expression des marqueurs d'apoptose dans les spermatozoïdes testiculaires, épидидymaires, et éjaculés. L'activation des caspases représentant un élément majeur dans le processus apoptotique, nos travaux ont porté, pour une part, sur la validation et la réalisation des mesures de leur expression dans les spermatozoïdes humains. Compte-tenu des faibles concentrations de spermatozoïdes présents dans les éjaculats des hommes infertiles et dans les prélèvements testiculaires et épидидymaires, nous avons adapté aux spermatozoïdes humains une méthode sensible, basée sur la liaison des caspases activées par un inhibiteur conjugué à un fluorochrome qui reconnaît soit une séquence d'acides aminés commune à la majorité des caspases actives (VAD), soit une courte séquence d'acides aminés spécifique de chaque caspase étudiée. Pour mieux définir le rôle du transit des spermatozoïdes sur l'initiation et/ou l'évolution du processus apoptotique dans les voies génitales, nous avons combiné ce marquage avec une coloration vitale (propidium iodide). Nos résultats ont montré que ce double marquage était applicable aux spermatozoïdes humains testiculaires, épидидymaires et éjaculés. Cependant la méthode de détection (cytométrie en flux ou microscopie à fluorescence) doit être adaptée au type de prélèvement analysé. Seules les mesures effectuées par la même méthode de détection peuvent être comparées en raison de la différence de sensibilité de la microscopie à fluorescence et de la cytométrie en flux. La microscopie à fluorescence permet la distinction du type cellulaire marqué et est applicable à tous les prélèvements de sperme (testiculaires, épидидymaires et éjaculats). Elle est en particulier bien adaptée pour les prélèvements testiculaires où la cytométrie en flux ne permet pas la distinction entre les spermatozoïdes et les cellules (germinales et/ou somatiques) environnantes dans les prélèvements testiculaires. Néanmoins, contrairement à la cytométrie

en flux, cette méthode reste peu applicable en routine car très consommatrice de temps et observateur dépendante.

Par ailleurs, d'après nos résultats aucune voie principale d'activation des caspases n'a pu être mise en évidence dans le spermatozoïde humain. Pour expliquer ce résultat, une des hypothèses avancées est un manque de spécificité du marquage des caspase -3 (caspase effectrice), -8 (caspase initiatrice de la voie de signalisation extrinsèque de l'apoptose) et -9 (caspase initiatrice de la voie de signalisation intrinsèque de l'apoptose) activées par les inhibiteurs fluorescents correspondants utilisés. C'est pourquoi, nous avons mis au point l'immunodétection de ces caspases activées par technique *western blot*. Or, il s'est avéré que cette technique manque de sensibilité (quantité minimum de spermatozoïdes nécessaires : $10 \cdot 10^6$) d'autant plus qu'une sélection des spermatozoïdes est recommandée pour limiter les interférences avec d'autres cellules. Cette sélection a cependant des limites car seule une population particulière de spermatozoïdes sera analysée qui n'est pas nécessairement représentative de l'ensemble de la population spermatique. Pour une meilleure compréhension des voies de signalisation mises en jeu, une analyse des protéines impliquées plus spécifiquement dans les voies de signalisation caspases dépendantes pourrait être envisagée : voie extrinsèque (Fas, TRAIL) ; voie intrinsèque (Bcl-2, Bax, Bak,...).

L'analyse comparative que nous avons menée sur des spermatozoïdes provenant de prélèvements congelés-décongelés de patients présentant une ABCD a permis de montrer une proportion plus importante de spermatozoïdes vivants ou morts exprimant des caspases activées dans les prélèvements testiculaires que dans les prélèvements épидидymaires suggérant une initiation du processus apoptotique dans les testicules et une incapacité des spermatozoïdes épидидymaires congelés-décongelés à initier l'apoptose. Etant donné la proportion significativement plus importante de spermatozoïdes vivants avec des caspases activées dans les prélèvements testiculaires, le risque d'injecter un spermatozoïde apoptotique

dans un ovocyte est plus élevé et pourrait expliquer les résultats après ICSI de moins bonne qualité avec les prélèvements testiculaires. Une étude prospective sur un échantillon important de patients doit être envisagée pour mieux définir les relations entre les résultats d'ICSI et la qualité des spermatozoïdes testiculaires, épидидymaires ou éjaculés présentant des stigmates d'apoptose.

L'analyse des spermatozoïdes éjaculés congelés-décongelés de patients infertiles porteurs d'une translocation chromosomique a révélé une expression plus importante des modifications ultrastructurales et des marqueurs biochimiques d'apoptose (caspases activées, fragmentation de l'ADN, externalisation de la PS) associée à des signes d'immaturité ultrastructurale, comparé aux spermatozoïdes éjaculés d'hommes fertiles. Il semblerait donc que les marqueurs d'apoptose exprimés par les spermatozoïdes éjaculés soient le reflet d'une altération de la spermatogenèse avec une apoptose testiculaire initiée et avortée associée à des anomalies de maturation et différenciation qui ont été probablement acquises durant la spermiogenèse. Pour comprendre pourquoi certains spermatozoïdes éjaculés auraient initié leur apoptose dans le testicule et échappés à la mort, la mesure de facteurs inhibant l'activité des caspases (IAP ; Hsp-27, -70 et -90) sur des spermatozoïdes testiculaires, épидидymaires et éjaculés pourrait être développée.

Enfin, nous avons montré que la proportion des spermatozoïdes éjaculés présentant des signes d'apoptose est plus élevée chez les patients porteurs d'une translocation chromosomique autosomique que chez les témoins. Malgré cette expression importante de l'apoptose, il persiste dans l'éjaculat de ces patients des spermatozoïdes aneuploïdes. Pour savoir si ce sont les mêmes spermatozoïdes qui sont porteurs de ces anomalies, une sélection des spermatozoïdes pourrait être envisagée. Des études récentes (pour revue, Said *et al.*, 2008 ; Dirican *et al.*, 2008) ont décrit l'utilisation et l'intérêt d'un système de sélection des spermatozoïdes par des billes magnétiques recouvertes d'annexine V permettant de séparer

les spermatozoïdes ayant externalisé leur PS des autres spermatozoïdes contenus dans le prélèvement de sperme. Des analyses comparatives de ces deux populations de spermatozoïdes a permis de montrer une proportion importante de spermatozoïdes exprimant d'autres marqueurs d'apoptose (caspases activées, fragmentation de l'ADN, diminution du $\Delta\Psi_m$) dans la population de spermatozoïdes ayant externalisé leur PS, liés aux billes (Grunewald *et al.*, 2001 ; Paasch *et al.*, 2005, Said *et al.*, 2006), et un pouvoir fécondant plus important (Grunewald *et al.*, 2007) des spermatozoïdes contenus dans la population des spermatozoïdes non liés. L'application d'un tel système aux prélèvements de sperme des patients porteurs d'une translocation chromosomique, combinée à l'analyse de la ségrégation méiotique sur les deux populations sélectionnées permettrait de savoir s'il existe un lien entre déséquilibre chromosomique et apoptose sur les spermatozoïdes. Par ailleurs, cette technique permettrait d'évaluer le pouvoir fécondant de chaque population de spermatozoïdes et en fonction des résultats, d'envisager à plus long terme son utilisation pour la sélection des spermatozoïdes utilisés en assistance médicale à la procréation.

Références bibliographiques

Adachi M, Suematsu S, Kondo T, Ogasawara J, Tanaka T, Yoshida N and Nagata S (1995) Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. *Nat Genet* 11, 294-300.

Adams JM and Cory S (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326.

Agarwal A, Saleh RA and Bedaiwy MA (2003) Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 79, 829-843.

Agarwal A and Said T (2005) Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU Int* 95, 503-507

Agarwal A, Makker K and Sharam R (2008) Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol* 59, 2-11.

Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z and Irvine DS (1998) Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 59, 1037-1046.

Aitken RJ, Nixon B, Lin M, Koppers A, Lee Y and Baker MA (2007) Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Asian J Androl* 9, 554-564.

Alvarez and Lewis S (2008) Sperm chromatin structure assay parameters measured after density gradient centrifugation are not predictive of the outcome of ART. *Hum Reprod* 23, 1235-1236.

Almasan A and Ashkenazi A (2003) Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine growth factor review* 14, 337-348.

Almeida C, Cardoso MF, Sousa M, Vina P, Goncalves A, Silva J and Barros A (2005) Quantitative study of caspase-3 activity in semen and after swim-up preparation in relation to sperm quality. *Hum Reprod* 20, 1307-1313.

American Society for Reproductive Medicine (2006) The clinical utility of sperm DNA integrity testing. *Fertil Steril* 86, S35-S37.

Anzar M, He L, Buhr M, Kroetsch TG and Pauls KP (2002) Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol Reprod* 66, 354-360.

Arama E, Agapite J and Steller H (2003) Caspase activity and a specific cytochrome c are required for sperm differentiation in drosophila. *Dev Cell* 4, 687-697.

Aravindan GR, Bjordahl J, Jost LK and Evenson DP (1997) Susceptibility of human sperm to *in situ* DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single cell electrophoresis. *Exp Cell Res* 231-237.

Ashkenazi A and Dixit VM (1998) Death receptors: signalling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.

- Aziz N, Said T, Paasch U and Agarwal A (2007) The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Hum Reprod* 22, 1413-1419.
- Baccetti B, Collodel G and Piomboni P (1996) Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). *J Submicrosc Cytol Pathol* 28, 587-596.
- Baccetti B, Capitani S, Collodel G, Estenoz M, Gambera L and Piombini P (2002a) Infertile spermatozoa in a human carrier of robertsonian translocation 14;22. *Fertil Steril* 78, 1127-1130.
- Baccetti B, Capitani S, Collodel G, Strehler E, Piombini P (2002b) Recent advances in human sperm pathology. *Contraception* 65, 283-287.
- Baccetti B, Bruni E, Collodel G, Gambera L, moretti E, Marzella R and Piombini P (2003) 10,15 reciprocal translocation in an infertile man: ultrastructural and fluorescence in-situ hybridization sperm study: case report. *Hum Reprod* 18, 2302-2308.
- Baccetti B, Collodel G, Marzella R, Moretti E, Piombini P, Scapigliati G and Serafani F (2005) Ultrastructural studies of spermatozoa from infertile males with Robertsonian translocations and 18, X, Y aneuploidies. *Hum Reprod* 20, 2295-2300.
- Baccetti B, Bruni E, Capitani S, Collodel G, Mancini S, Piombini P and Moretti E (2006) Studies on varicocele III: ultrastructural sperm evaluation and 18, X and Y aneuploidies. *J Androl* 27, 94-101.
- Ballachey BE, Evenson DP and Saacke RG (1988) The sperm chromatin structure assay. Relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. *J Androl* 9, 109-115.
- Barroso G, Morshedi M and Oehninger S (2000) Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserines and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 15, 1338-1344.
- Barroso G, Taylor S, Morshedi M, Manzur F, Gavino F and Oehninger S (2006) Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. *Fertil Steril* 85, 149-154.
- Beere HM, Wolf BB, Cain K, Moser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Tailor P, Morimoto RI, Cohen GM and Green DR (2000) Heat shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2, 469-475.
- Bejarono I, Lozano G, Ortiz A, Garcia JF, Paredes SD, Rodriguez AB and Pariente JA (2008) Caspase-3 activation in human spermatozoa in response to hydrogen peroxide and progesterone. *Fertil Steril* Epub ahead of print.
- Benchai M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H and Guérin JF (2003) Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 18, 1023-8.

Bertin J, Armstrong R C, Otilie S, Martin D A, Wang Y, Banks S, Wang G H, Senkevich G, Alnemri E S, Moss B, Lenardo M J, Tomaselli K J and Cohen J I (1997). Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U SA* 94, 1172-6.

Bienvenu T, Beljord C, Adjiman M and Kaplan JC (1993) Male infertility as the only presenting sign of cystic fibrosis when homozygous for the mild mutation R117H. *J Med Genet* 30, 797.

Billig H, Futura I, Rivier I, Tapanainen J, Parvinen M and Hsueh AJW. (1995) Apoptosis in the testis germ cells : developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 136, 5-12.

Blanc-Layrac G, Bringuier AF, Guillot R and Feldmann G (2000) Morphological and biochemical analysis of cell death in human ejaculated spermatozoa. *Cell Mol Biol* 46, 187-197.

Blanco-Rodriguez J and Martinez-Garcia C (1999) Apoptosis is physiologically restricted to a specialized cytoplasmic compartment in rat spermatids. *Biol Reprod* 61, 1541-1547.

Blanco-Rodriguez J, Martinez-Garcia C and Porras A (2003) Correlation between DNA synthesis in the second, third and fourth generations of spermatogonia and the occurrence of apoptosis in both spermatogonia and spermatocytes. *Reproduction* 126, 661-668.

Bland MJ and Altman DG (1986) Statistical methods for assessing between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1, 307-310.

Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C and Coticchio G (2006) Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod* 11, 2876-2881.

Bozec A, Amara S, Guarmit B, Selva J, Albert M, Rollet J, El Sirkhasi M, Vialard F, Bailly M, Benahmed M and Mauduit C (2008) Status of the executioner step of apoptosis in human with normal spermatogenesis and azoospermia. *Fertil Steril*, Epub ahead of print.

Brenner C and Kroemer G (2000) Apoptosis. Mitochondria- the death signal integrators. *Science* 289, 195-202.

Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnaud L, Susin SA, Diaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E and Garrido C (2000) Hsp 27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2, 645-652.

Brugnon F, Bilan F, Heraud MC, Grizard G, Janny L and Creveaux I (2008) Outcome of ICSI for a couple in which the man is carrier of CFTR p.[R74W;V201M;D1270N] and p.P841R mutations and his spouse a heterozygous carrier of p.F508del mutation of CFTR gene. *Fertil Steril*, Epub ahead of print.

Budde WJ, Verjaal M, Hamerlynck JV and Bobrow M (1984) Familial occurrence of azoospermia and extreme oligozoospermia. *Clin Genet* 26, 555-562.

Bump N J, Hackett M, Hugunin M, Seshagiri S, Brady K, Chen P, Ferenz C, Franklin S, Ghayur T and Li P (1995). Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science* 269, 1885-1888.

Burrello N, Calogero AE, Perdichizzi A, Salmeri M, D'Agata R and Vicari E (2004) Inhibition of oocyte fertilization by assisted reproductive techniques and increased sperm DNA fragmentation in the presence of *Candida Albicans*: a case report. *RBMonline* 8, 569-573.

Cao WL, Wang YX, Xiang ZQ and Li Z (2003) Cryopreservation-induces decrease in heat shock protein 90 in human spermatozoa and its mechanism. *Asian J Androl* 5, 43-46.

Carlile GW, Smith DH and Wiedmann M (2004) Caspase-3 has a non-apoptotic function in erythroid maturation. *Blood* 103, 4310-4316.

Castro A, Parodi D, Morales I, Madariaga M, Rios R and Smith R (2004) Absence of Fas protein detection by flow cytometry in human spermatozoa. *Fertil Steril* 81, 1019-1025.

Cayli S, Sakkas D, Vigue L, Demir R and Huszar (2004) Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl-XL levels in mature and diminished maturity sperm. *Mol Hum Reprod* 10, 365-372.

Chater S, Amara S, Moussata D, Bozec A, Omezzine A, Romestang P, Chapet O, Gerard JP, Mornex F, Benahmed M and Mauduit C (2007) Differential effects of ionizing radiation and platinum-derivative chemotherapy on apoptotic pathways in testicular germ cells. *Int J Radiat Biol* 83, 269-278.

Chatterjee R, Haines GA, Perera DM, Goldstone A and Morris ID (2000) Testicular and sperm DNA damage after treatment with fludarabine for chronic lymphocytic leukaemia. *Hum Reprod* 15, 762-766.

Chen CH, Lee SS, Chen DC, Chien HH, Chen IC, Chu YN, Liu JY, Chen WH and Wu GJ (2004) Apoptosis and kinematics of ejaculated spermatozoa in patients with varicocele. *J Androl* 25, 348-353.

Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge C and Carrell DT (2006) Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* 27, 53-59.

Christova Y, James PS, Cooper TG and Jones R (2002) Lipid diffusion in the plasma membrane of mouse spermatozoa: changes during epididymal maturation, effects of pH, osmotic pressure and knockout of the *c-ros* gene. *J Androl* 384-392.

Cisternas P and Moreno RD (2006) Comparative analysis of apoptotic pathways in rat, mouse and hamster spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 73, 1318-1325.

Claustres M (2005) Symposium: Genetic aspects of male (in)fertility: Molecular pathology of the *CFTR* locus in male infertility. *RBMonline* 10, 14-41.

Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis; *Biochem J* 326, 1-16.

Cooper TG (1998) Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl* 53, 119-136.

Cory S and Adams JM (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life or death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-656.

Creagh EM, Sheehan D and Cotter TG (2000) Heat shock proteins-modulators of apoptosis in tumour cells. *Leukemia* 14, 1161-1173.

Crompton M (2000) Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. *J Physiol* 529, 11-21.

Czeizel A (1985) Congenital aplasia of the vas deferentia of autosomal recessive inheritance in two unrelated sib-pairs. *Hum Genet* 70, 88.

Dacheux JL and Paquignon M (1980) Relations between the fertilizing ability, motility and metabolism of epididymal spermatozoa. *Reprod Nutr* 20, 1085-1099.

Dacheux JL, Gatti JL and Dacheux F (2003) Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microscopy Research and Techniques* 61, 7-17.

Dadoune JP (2006) *Biologie de la reproduction humaine*. Edition Ellipses, pages 25-50.

Dakouane M, Albert M, Bereger M, Sabbagh C, Brayotel F, Vialard F, Lombroso R, Bicchieray L and Selva J (2005) Aging and spermatogenesis: an histologic, cytogenetic and apoptosis study. *Gyn Obst Fertil* 33, 659-664.

D'Alessio A, Riccioli A, Lauretti P, Padula F, Muciaccia B, De Cesaris P, Filippini A, Nagata S and Ziparo E (2001) fas l is expressed by sperm cells. *Proc Natl Acad sci USA* 98, 3316-3321.

Darzynkiewicz Z and Pozarowski P (2007) All that glitters is not gold: all that FLICA bins is not caspase. A caution in data interpretation-and new opportunities. *Cytometry* 71A, 536-537.

David, Bisson JP, Czyglik F, Jouannet P and Gemigon C (1975) Anomalies morphologiques du spermatozoïde humain, proposition pour un système de classification. *J Gyn Obstet Biol Reprod* 4, 17-36.

De Braekeleer M and Dao TN (1991) Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 6, 245-250.

Delobel B, Djelati R, Gabriel-Robez O, Croquette MF, Rousseaux-Prevost R, Rousseaux J, Rigot JM and Rumpler Y (1998) Y-autosome translocation and infertility : usefulness of molecular, cytogenetic and meiotic studies. *Hum Genet* 102, 98-102.

De Rooij DG and De Boer (2003) Specific arrests of spermatogenesis in genetically modified and mutant mice. *Cytogenet Genome Res* 103, 267-276.

Deveraux QL and Reed JC (1999) IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13, 239-252.

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

Dirican EK, Ozgun OD, Akarsu S, Akm KO, Ercan O, Ugurlu M, Camsari C, Kanylmaz O, Kaya A and Unsal A (2008) Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet*, Epub ahead of print.

Djelati R, Schubert B, Tchirkov A, Goumy C, Brugnon F, Grizard G, Janny L and Vago P (2005) Etude de l'appariement méiotique chez deux hommes porteurs d'un Y(q) dicentrique en mosaïque par analyse des complexes synaptonémaux au stade pachytène. Présentation orale XXII^{ème} congrès de la Société d'Andrologie de Langue Française (Marseille).

Dominguez-Fandos D, Camejo MI, Balleca JL and Oliva R (2007) Human sperm DNA fragmentation: correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. *Cytometry* 71A, 1011-1018.

Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM and Venkatachalam MA (1997) Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am J Pathol* 151, 1205-1213.

Donnelly ET, O'Connell M, McClure N and Lewis SE (2000) Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. *Hum Reprod* 15, 1552-1561.

Dumur V, Gervais R and Rigot JM (1990) Abnormal distribution of delta F 508 allele in azoospermic men with congenital aplasia of epididymis and vas deferens. *Lancet* 336, 512-518.

Dundar M, Kocak I, Culhaci N and Erol H (2005) Determination of apoptosis through bax expression in cryptorchid testis: an experimental study. *Pathol Oncol Res* 11, 170-173.

Duru NK, Morshedi MS, Schuffner A and Oehninger S (2001) Cryopreservation-Thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. *J Androl* 22, 646-651.

Eaker S, Pyle A, Cobb and Hande MA (2001) Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. *J Cell Sci* 114, 2953-2965.

Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F and Egozcue J (2000) Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 6, 93-105.

Eid NA, Shibata MA, Ito Y, Kusakabe K, Hammad H and Otsuki Y (2002) Involvement of Fas system and active caspases in apoptotic signalling in testicular germ cells of ethanol-treated rats. *Int J Androl* 25, 159-167.

- Eley A, Pacey AA, Galdiero M and Galdiero F (2005) Can *Chlamydia trachomatis* directly damage your sperm? *Lancet Infect Dis* 5, 53-57.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A and Nagata S (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.
- Erata GO, Toker NK, Durlanik O, Kadioglu A, Aktan G and Toker GA (2008) The role of heat shock protein 70 (Hsp70) in male infertility: is it a line of defense against sperm DNA fragmentation? *Fertil Steril* 90, 322-327.
- Escudero T, Lee M, Carel D, Blanco J and Munné S (2000) Analysis of chromosome abnormalities in sperm and embryos from two 45,XY,t(13;14)(q10;q10). *Prenat Diagn* 20, 599-602.
- Escudero T, Abdelhadi I, Sandalinas M and Munné S (2003) Predictive value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis for translocations. *Fertil. Steril* 79, suppl 3, 1528-1534.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z and Melamed MR (1980) Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210, 1131-1133.
- Evenson DP, Kost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P and Claussen OP (1999) Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 14, 1039-1049.
- Evenson DP, Jost LK, Corzett M and Balhorn R (2000) Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. *J Androl* 21, 739-746.
- Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML and Henson PM (1998) The role of phosphatidylserines in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell death Differ* 5, 551-562.
- Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA and Henson PM (2000) A receptor for phosphatidylserines-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405, 85-90.
- Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Enciso M, LaFramboise M and de Jonge C (2005) Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril* 84, 833-842.
- Forejt J (1974) Non-random association between a specific autosome and the X chromosome in meiosis of the male mouse: possible consequence of the homologous centromere's separation. *Cytogenet Cell Genet* 13, 369-383.
- Forejt J (1979) Meiotic studies of translocations causing male sterility in mouse double heterozygotes for robertsonian translocations. *Cytogenet Cell Genet* 23, 163-170.

Francavilla S, D'Abrizio P, Rucci N, Silvano G, Properzi G, Straface E, Cordeschi G, Decozione S, Gnessi L and Arizzi M (2000) Fas and Fas ligand expression in fetal and adult human testis with normal or deranged spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 2692-2700.

Francavilla S, D'Abrizio P, Cordeschi G, Pelliccione F, Necozone S, Ulisse S, Properzi G and Francavilla F (2002) Fas expression correlates with human germ cell degeneration in meiotic and postmeiotic arrest of spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* 8, 213-220.

Furuchi T, Masuko K, Nishimune Y, Obinata M and Matsui Y (1996) Inhibition of testicular germ cell apoptosis and differentiation in mice misexpressing Bcl-2 in spermatogonia. *Development* 122, 1703-1709.

Gabriel-Robez O and Rumpler Y (1994) The meiotic pairing behaviour in human spermatocytes carrier of chromosome anomalies and their repercussions on reproductive fitness. *Ann Genet* 39, 17-25.

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

Gaillard DA, Carré-Pigeon F and Lallemand A (1997) Normal vas deferens in fetuses with cystic fibrosis. *J Urol* 158, 1549-1552.

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

Gallon F, Marchetti C, Jouy N and Marchetti P (2006) The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capacity. *Fertil Steril* 86, 1526-1530.

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

Garrido C, Ottavi P, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Chauffert B and Mehlen P (1997) HSP 27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs. *Cancer Res* 57, 2661-2667.

Glander and Schaller J (1999) Binding of annexin V to plasma membrane of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol Hum Reprod* 5, 109-115.

Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H and Darzynkiewicz Z (1993) Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells : analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 207, 202-205.

Gorga F, Galdiero M, Buommino E and Galdiero E (2001) Porins and lipopolysaccharide induce apoptosis in human spermatozoa. *Clin Diagn Lab Immunol* 8, 206-208.

- Grataroli R, Vindrieux D, Selva J, Felenheld C, Ruffon A, Decaussin M and Benahmed M (2004) Characterization of tumour necrosis factor- α -related apoptosis-inducing ligand and its receptor in the adult human testis. *Mol Hum Reprod* 10, 123-128.
- Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Franco G, Anniballo N, Mendoza C and Tesarik J (2005) Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 20, 226-230.
- Green DR and Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death; *Science*, 305, 626-629.
- Grizard G, Chevalier V, Griveau JF, Le Lannou D and Boucher D (1999) Influence of seminal plasma on cryopreservation of human spermatozoa in a biological material-free medium: study of normal and low-quality semen. *Int J Androl* 1999, 190-196.
- Grizard G, Ouchchane L, Roddier H, Artonne C, Sion B, Vasson MP, Janny L (2006) In vitro alachlor effects on reactive oxygen species generation, motility patterns and apoptosis markers in human spermatozoa. *Reprod Toxicol* 23, 55-62.
- Grunewald S, Paasch U, Said TM, Sharma RK, Glander HJ and Agarwal A (2005) Caspase activation in human spermatozoa in response to physiological and pathological stimuli. *Fertil Steril* 83, 1106-1112.
- Grunewald S, baumann T, Paasch U and Glander HJ (2006) Capacitation and acrosome reaction in non apoptotic human spermatozoa. *Ann NY Acad sci* 1090, 138-146.
- Grunewald S, Said TM, Paasch U, Glander HJ and Agarwal A (2007) Relationship between sperm apoptosis signalling and oocyte penetration capacity. *Int J Androl* 31, 325-330.
- Grunewald S, Rasch M, Reinhardt M, Bauman T, Paasch U and Glander HJ (2008) Stability of fluorochrome based assays to measure subcellular functions. *Asian J Androl* 10, 455-459.
- Guichaoua MR, Quack B, Speed RM, Noel B, Chandley AC and Luciani JM (1990) Infertility in human males with autosomal translocations: meiotic study of a 14;22 Robertsonian translocation. *Hum Genet* 86, 162-166.
- Guichaoua MR, Delafontaine D, Noel B and Luciani JM (1993) Chromosomal infertility in human male. *Contracept Fertil Sex* 21, 113-121.
- Hengartner MO, Ellis RE and Horvitz HR (1992) *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 356, 494-499.
- Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.
- Henkart P (1996) ICE family proteases: mediators of all apoptotic cell death? *Immunity* 4, 195-201.
- Hikim AP, Lue Y, Yamamoto CM, Vera Y, Rodriguez S, Yen PH, Soeng K, Wang C and Swerdloff RS (2003a) Key apoptotic pathways for heat-induced programmed cell death in the testis. *Endocrinology* 144, 3167-3175.

Hikim AP, Lue Y, Diaz-Romero m, Yen PH, Wang C and Swedloff RS (2003b) Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis. *J Ster Bioch Mol Biol* 85, 175-182.

Hirata H, Takahashi A, Kobayashi S, Yonehara S, Sawai H, Okazaki T, Yamamoto K and Sasada M (1998) Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J Exp med* 187, 587-600.

Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N and Marzo I (1997) The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 15, 1573-1581.

Holsclaw DS, Lober B, Jockin H and Schwachman H (1971) Genital abnormalities in male patients with cystic fibrosis. *J Urol* 106, 568-574.

Homolka D, Ivanek R, Capkova J, Jansa P and Forejt J (2007) Chromosomal rearrangement interferes with meiotic X chromosome inactivation. *Genome Res* 17, 1431-1437.

Hoogendijk CF, Kruger TF, Bouic PJD and Henkel RR (2008) A novel approach for the selection of human sperm using annexin V-binding and flow cytometry. *Fertil Steril*, Epub ahead of print.

Horvitz HR (1999) Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer res* 59, 1701s-1706s.

Holsclaw DS, Lober B, Jockin H and Schwachman H (1971) Genital abnormalities in male patients with cystic fibrosis. *J Urol* 106, 568-574.

Honarpour N, Du C, Richardson JA, Hammer RE, Wang X and Herz J (2000) Adult Apaf-1-deficient mice exhibit male infertility. *Dev Biol.* 15,248-58.

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

Host E, Lindenberg S and Smidt-Jensen S (2000) The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand* 79, 599-563.

Hsu H, Xiong J and Goeddel DV (1995) The TNF receptor 1 associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81, 495-504.

Hu S, Vincenz C, Ni J, Gentz and Dixit VM (1997). I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1 and CD-95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272, 17255-7.

Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ and Thompson W (1997) Reproducibility of human sperm DNA measurements using the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res.* 1997 Mar 21;374(2):261-8.

Huh JR, Vernooij SY, Yu H, Yan N, Shi Y, Guo M and Hay BA (2004) Multiple apoptotic caspase cascades are required in nonapoptotic roles for drosophila spermatid individualization. *PLoS Biol* 2, E15.

Humeau C and Arnal F (2005) *Reproduction et développement*. Editions sauramps médical. Pages 61-80.

Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ and Thompson W (1996) A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Mol Hum Reprod* 2, 613-619.

Inohara N, Ding L, Chen S and Nunez G (1997). Harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *Embo J* 16, 1686-94.

Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA and Aitken RJ (2000) DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *Int J Androl* 21, 33-44.

Itoh N and Nagata S (1993) A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 268, 10932-10937.

Jahnukainen K, Chrysis D, Hou M, Parvinen M, Eksborg S and Soder O (2004) Increased apoptosis occurring during the first wave of spermatogenesis is stage-specific and primarily affects midpachytene spermatocytes in rat testis. *Biol Reprod* 70, 290-296.

Janny L and Menezo YJ (1994) Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. *Mol Reprod Dev* 38, 36-42.

Januskauska A, Johannisson A and Rodriguez-Martinez H (2001) Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. *Theriogenology* 55, 947-961.

Johnson L, Petty CS and Neaves WB (1983) Further quantification of human spermatogenesis: germ cell loss during prophase of meiosis and its relationship to daily sperm production. *Biol. Reprod* 29, 207-215.

Johnson L (1986) Spermatogenesis and aging in the human. *J Androl* 7, 331-354.

Juriscova A, Lopes S, Meriano J, Oppedisano L, Casper RF and Varmuza S (1999) DNA damage in round spermatids of mice with a targeted disruption of the Pp1cy gene and in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod* 5, 323-330.

Kalthur G, Kumar Adiga S, Upadhy D, Rao S and Kumar P (2008) Effects of cryopreservation on sperm DNA integrity in patients with teratospermia. *Fertil Steril* 89, 1723-1727.

Karp GC (2004) *Biologie cellulaire et moléculaire*. Editions de Boeck, p609-620.

Kemp CJ, Sun S and Gurley KE (2001) p53 induction and apoptosis in response to radio- and chemotherapy in vivo is tumor-type-dependent. *Cancer Res* 61, 327-332.

Kerr JFR, Wyllie AH and Curie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.

- Kierszenbaum AL (2001) Apoptosis during spermatogenesis: the thrill of being alive. *Mol Reprod Dev*, 58, 163.
- Kim JM, Ghosh SR, Weil AC and Zirkin BR (2001) Caspase-3 and caspase-activated deoxyribonuclease are associated with testicular germ cell apoptosis resulting from reduced intratesticular testosterone. *Endocrinology* 142, 3809-3816.
- Kim ED, Barqawi AZ, Seo JT and Meacham RB (2002) Apoptosis: its importance in spermatogenic dysfunction. *Urol Clin N Am* 29, 755-765.
- Kim SK, Yoon YD, Park YS, Seo JT and Kim JH (2007a) Involvement of the Fas-Fas ligand system and active caspases-3 in abnormal apoptosis in human testes with maturation arrest and Sertoli cell-only syndrome. *Fertil Steril* 87, 547-553.
- Kim JM, Ghosh SR, Weil ACP and Zirkin BR (2007b) Caspase-3 and caspase-activated deoxyribonuclease are associated with testicular germ cell apoptosis resulting from reduced intratesticular testosterone. *Endocrinology* 142, 3809-3816.
- Kimura M, Itoh N, Takagi S, Sasao T, Takahashi A, Masumori N and Tsukamoto T (2003) balance of apoptosis and proliferation of germ cells related to spermatogenesis in aged men. *J androl* 24, 185-191.
- Kirchoff C and Hale G (1996) Cell-to cell transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins during sperm maturation. *Mol Hum Reprod* 2, 177-184.
- Knudson CM, Tung KSK, Tourtelotte WG, Brown GAJ and Korsmeyer SJ (1995) Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 270, 96-99.
- Kobayashi H, Larson K, Sharma RK, Nelson Dr, Evenson DP, Toma H, Thomas AJ and Agarwal A (2001) DNA damage in patients with untreated cancer as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 75, 469-475.
- Kohane AC, Gonzales Echeverria FM, Pineiro L and Blaquier JA (1980) Interaction of proteins of epididymal origin with spermatozoa. *Biol Reprod* 23, 737-742.
- Kotwicka M, Jendraszak M and Warchol JB (2002) Plasma membrane translocation of phosphatidylserine in human spermatozoa. *Folia Histochem Cytobiol* 40, 111-112.
- Koykul W, Baguma-Nibasheka King WA and Basrur PK (2000) Meiosis and apoptosis in germ cells of X-autosome translocation carrier boars. *Mol Reprod Dev* 56, 448-457.
- Krajewska M, Wang H G, Krajewski S, Zapata J M, Shabaik A, Gascoyne R and Reed JC (1997). Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res* 57, 1605-13.
- Ku JH, Shim HB, Kim SW and Paick JS (2005) The role of apoptosis in the pathogenesis of varicocele. *BJU Int* 96, 1092-1096.

Kurz A, Viertel D, Herrmann A and Muller K (2005) Localization of phosphatidylserine in boar sperm cell membranes during capacitation and acrosome reaction. *Reproduction* 130, 615-626.

Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneiter R, Green DR and Newmeyer DD (2002) Bid, Bax and lipis cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111, 331-342.

Kuzelova K, Grebenova D and Hrkal Z (2007) Labeling of apoptotic JURL-MK1 cells by fluorescent caspase-3 inhibitor FAM-DEVD-fmk occurs mainly at sites different from Caspase-3 active site. *Cytometry* 71A, 605-611

Lachaud C, Tesarik J, Canadas ML and Mendoza C (2004) Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod* 19, 607-610.

Lee J, Richburg JH, Younkin SC and Boekelheide K (1997) The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* 138, 2081-2088.

Lee K K, Murakawa M, Nishida E, Tsubuki S, Kawashima S, Sakamaki K and Yonehara S (1998). Proteolytic activation of MST/Krs, STE20-related protein kinase, by caspase during apoptosis. *Oncogene* 16, 3029-37.

Lejeune J (1963) Autosomal disorders. *Pediatrics* 32, 326-337.

Le Lannou D, Jézéquel P and Blayau M (1995) Obstructive azoospermia with agenesis of the vas deferens or with bronchiectasia : a genetic approach. *Hum Reprod* 10, 338-341.

Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S and Nicotera P (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 185, 1481-1486.

Lemasters JJ (1999) The mitochondrial permeability transition and the calcium, oxygen and pH paradoxes: one paradox after another. *CardioVasc Res* 44, 470-473.

Levy R and Seifer-Aknin I (2001) Place de l'apoptose au cours de la spermatogenèse et dans le sperme éjaculé : relations avec la fécondation. *Ann. Biol. Clin.*, 59, 531- 543.

Li LY, Luo X and Wang X (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99.

Li H, Xu L, Dunbar JC and Dhabuwala CB (2003) Role of mitochondrial cytochrome c in cocaine-induced apoptosis in rat testes. *Urology* 61, 646-650.

Lifschytz E and Lindsley DL (1972) The role of X-chromosome inactivation during spermatogenesis. *Proc Natl Acad sci USA* 69, 182-186.

Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM, Lipshultz LI and Kim ED (1997) In situ end-labelling of human testicular tissue demonstrates increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis. *Fertil Steril* 68, 1065-1069.

Lin MH, Kuo-Kuang Lee R, Li SH, Lu CH, Sun FJ and Hwu YM (2008) Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil Steril* 90, 352-359.

Liu X, Li P, Widlak P, Zou H, Luo X, Garrard WT and Wang X (1998) The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 8461-8466.

Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J and Casper RF (1998) Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 69, 528-32.

Luciani JM, Guichaoua MR, Mattei A and Morazzani MR (1984) Pachytene analysis of a man with a 13q;14Q translocation and infertility. *Cytogenet Cell Genet* 38, 14-22.

Luciani JM, Guichaoua MR, Delafontaine D, Noth MO, Gabriel-Robez O and Rumpler Y (1987) Pachytene analysis in a 17;21 reciprocal translocation carrier: role of the acrocentric chromosomes in male sterility. *Hum Genet* 77, 246-250.

Luciani JM and Guichaoua MR (1990) Consequences of structural chromosomal abnormalities on human spermatogenesis. *Reprod Nut Dev suppl* 1, 95-103.

Machev N, Gosset P, Warter S, Treger M, Schillinger M and Viville S (2005) Fluorescence in situ hybridization sperm analysis of six translocation carriers provides evidence of an interchromosomal effect. *Fertil Steril* 84, 365-373.

Maeda Y, Schiratsuchi A, Namiki M and Nakanishi Y (2002) Inhibition of sperm production in mice by annexin V microinjected into seminiferous tubules: possible etiology of phagocytic clearance of apoptotic spermatogenic cells and male infertility. *Cell death Differ* 9, 742-749.

Mahfouz RZ, Sharma RK, Poenicke K, Jha R, Paasch U, Grunewald S and Agarwal A (2008) Evaluation of poly (ADP-ribose) polymerase cleavage (cPARP) in ejaculated human sperm fractions after induction of apoptosis. *Fertil Sterile*, epub ahead of print

Marchetti P, Castedo M, Susin SA, Zamzami N, Hirsch T, Macho A, Haeffner A, Hirsch F, Geuskens M and Kroemer G (1996) Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J exp Med* 184, 1155-1160.

Marchetti C, Obert G, Defossez A, Formstecher P and Marchetti P (2002) Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum Reprod* 17, 1257-1265.

Marchetti C, Callego MA, Defossez A, Formstecher P and Marchetti P (2004a) Staining of human sperm with fluorochrome-labeled inhibitor of caspases to detect activated caspases: correlation with apoptosis and sperm parameters. *Hum Reprod* 19, 1127-1134.

Marchetti C, Jouy N, Leroy-Martin B, Defossez A, Formstecher P and Marchetti P (2004b) Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential with sperm mobility. *Hum Reprod* 19, 2267-2276.

Marchetti P (2005a) L'apoptose: bases fondamentales et applications médicales. *Gyn Obs Fertil* 33, 632-641.

Marchetti (2005b) Detection of apoptotic markers in human ejaculated spermatozoa as new methods in human reproductive biology. *Gyn Obs Fertil* 33, 6669-677.

Marcon L, Haled B and Robaire B (2008) Reversibility of the effects of subchronic exposure to the cancer chemotherapeutics Bleomycin, Etoposide and Cisplatin on spermatogenesis, fertility and progeny outcome in the male rat. *J Androl* 29, 408-417.

Marmar JL (2001) Varicocele and male infertility. The pathophysiology of varicoceles in the light of current molecular and genetic information. *Hum Reprod Update* 7, 461-472.

Marti E, Perez-Pé R, Colas C, Muino-Blanco T and Cebrian-Perez JA (2008) Study of apoptosis-related markers in ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 106, 113-132.

Martin G, Sabido O, Laurent JL and Levy R (2003) Apoptose dans le sperme éjaculé: revue. *Andrologie* 13, 217-227.

Martin G, Sabido O, Durand P and Levy R (2004) Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod* 71, 28-37.

Martin G, Sabido O, Durand P and Levy R (2005) Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction. *Hum Reprod* 20, 3459-3468.

Martin G, Cagnon N, Sabido O, Sion B, Grizard G, Durand P and Levy R (2007) Kinetics of occurrence of some features of apoptosis during the cryopreservation process of bovine spermatozoa. *Hum Reprod* 22, 380-8.

Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK, Rodriguez I, Frankowski H and Missoten M (1994) Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 13, 1017-1030.

Mauvais-Jarvis P (1984) Médecine de la reproduction masculine. Editions Flammarion médecine/sciences. Pages 15-24.

Mc Kelvey-Martin VJ, Melia N, Walsh IK, Johnson SR, Hughes CM, Lewis SE and Thompson W (1997) Two potential clinical applications of the alkaline single-cell gel electrophoresis assay : (1) Human bladder washings and translational cell carcinoma of the bladder ; and (2) Human sperm and male infertility. *Mutat Res* 375, 93-104.

Mc Vicar C, McClure N, Williamson K, Dalzell LH and Lewis SEM (2004) Incidence of Fas positivity and deoxyribonucleic acid double-stranded breaks in human ejaculated sperm. *Fertil Steril* 81, 767-774.

Mc Pherson SMG and Longo FJ (1993) Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis : DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur J Histopathol* 37, 109-128.

- Mercier B, Verlingue C, Lissens W, Silber SJ, Novelli G, Bonduelle M, Audrezet MP and Ferec C (1995) Is congenital bilateral absence of the vas deferens a primary form of cystic fibrosis. Analyses of CFTR in 67 patients. *Am J Hum Genet* 56, 272-277.
- Merino D, Lalaoui N, Morizot A, Schneider P, Solary E and Micheau O (2006) Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Mol Cell Biol* 26, 7046-7055.
- Meschede D, Lemcke B, Exeler JR, De Geyter C, Behre HM and Nieschlag E (1998) Chromosome abnormalities in 447 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection-prevalence, types, sex distribution and reproductive relevance. *Hum. Reprod.*, 13, 576-582.
- Miklos GG (1974) Sex chromosome pairing and male fertility. *Cytogen Cell Genet* 13, 558-577.
- Moradkhani K, Puechberty J, Bhatt S, Lespinasse J, Vago P, Lefort G, Sarda P, Hamamah S and Pellestor F (2006) Rare Robertsonian translocations and meiotic behaviour: sperm FISH analysis of t(13;15) and t(14;15) translocations: A case report. *Hum Reprod* 21, 3193-3198.
- Morel F, Roux C and Bresson JL FISH analysis of the chromosomal status of spermatozoa from three men with 45,XY,der(13;14)(q10;q10) karyotype (2001) *Mol Hum Reprod* 7, 483-488.
- Morris ID (2002a) Sperm DNA damage and cancer treatment. *Int J Androl* 25, 255-261.
- Morris ID, Ilott S, Dixon L and Brison DR (2002b) The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 17, 990-998.
- Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Fung J, Gianaroli L and Cohen J (2000) Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Fertil Steril* 73, 1209-1218.
- Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, Gambera E, Baccetti, B, Biagiotti R, Forti G and Maggi M (2000) Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl* 21, 903-912.
- Muratori M, Porazzi I, Luconi M, Marchiani S, Forti G and Baldi E (2004) Annexin V binding and merocyanine staining fail to detect human sperm capacitation. *J Androl* 25, 797-810.
- Muriel L, Garrido N, Fernandez JL, Remohi J, Pellicer A, de los Santos MJ and Meseguer M (2006) Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 85, 371-83.
- Nagata S and Golstein P (1995) The Fas death factor. *Science* 267, 1449-1456.
- Nagata S (1997) Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365.

- Nagata S (1999) Biddable death. *Nat Cell Biol* 1, E143-E145.
- Nakanishi Y and Shiratuchi A (2004) Phagocytic removal of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells: mechanisms and consequences. *Biol Pharm Bull* 27, 13-16.
- Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Anjomshoa M, Rozbahani S, Moulavi F and Mardani M (2005) Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reprod Biomed Online* 11,198-205.
- Navarro J, Vidal F, Benet J, Templado C, Marina S and Egozcue J (1991) XY-trivalent association and synaptic anomalies in a male carrier of a Robertsonian t(13;14) translocation. *Hum Reprod* 6, 376-381.
- NGuyen M, Millar DG, Yong VW, Korsmeyer SJ and Shore GC (1993) Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J Biol Chem* 268, 25265-25268.
- Nicholson DW (1999) Caspase structure, proteolytic substrates and function during apoptotic cell death. *Cell Deth Differ* 6, 1028-1042.
- Nishimura H, Cho C, Branciforte DR, Myles DG and Primakoff P (2001) Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin beta. *Dev Biol* 233, 204-213.
- Nolan JP and Hammstedt RH (1997) Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. *FASEB J* 11, 670-682.
- Oehninger S (2003) Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa. *RBMonline* 7, 469-476.
- Ofordeme KG, Aslan AR, Nazir TM, Hayner-Buchan A and Kogan BA (2005) Apoptosis and proliferation in human undescended testes. *BJU international* 96, 634-638.
- Oosterhuis GJ, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg E, Lambalk CB, Schoemaker J and Vermes I (2000) Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertil Steril* 74, 245-250.
- Ortega-Ferrusola C, Sotillo-Galan Y, Varela-Fernandez E, Gallardo-Bolanos JM, Muriel A, Gonzales-Fernandez L, Tapia JA and Pena FJ (2008) Detection of "apoptosis-like" changes during the cryopreservation process in equine sperm. *J Androl* 29, 213-221.
- Orth JM, Gunsalus GL and Lamperti AA (1988) Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 122, 787-794.
- Otera H, Ohsakaya S, Nagaura Z, Ishihara N and Mihara K (2005) Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *Embo J* 24, 1375-1386.
- Paasch U, Grunewald S, Fitzl G and Glander HJ (2003) Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. *J Androl* 24, 246-252.

Paasch U, Grunewald S, Dathe S and Glander HJ (2004a) Mitochondria of human spermatozoa are preferentially susceptible to apoptosis. *Ann NY Acad Sci* 1030, 403-409.

Paasch U, Sharma RK, Gupta AK, Grunewald S, Mascha EJ, Thomas AJ, Glander HJ and Agarwal A (2004b) Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biol Reprod* 71, 1828-1837.

Paasch U, Grunewald S, Agarwal A and Glander HJ (2004c) Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil Steril* 81, 802-809.

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

Palermo GD, Schlegel P, Hariprasad JJ, Ergun B, Mielnik A, Zanninovic N, Veeck LL and Rosenwaks Z (1999). Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men. *Hum Reprod* 14, 41-748.

Parvathani LK, Buescher ES, Chacon-Cruz E and Beebe SJ (1998) Type cAMP-dependent kinase delays apoptosis in human neutrophils at a site upstream of caspase-3. *J Biol Chem* 273, 6736-6743.

Patel T, Gores G J and Kaufmann S H (1996). The role of proteases during apoptosis. *Faseb J* 10, 587-97.

Pena FJ, Johannisson A, Wallgren M and Rodriguez-Martinez H (2003) Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. *Theriogenology* 60, 677-689.

Pena FJ, Saravia F, Johannisson A, Walgren M and Rodriguez-Martinez H (2005) A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa. *Int J Androl* 28, 107-114.

Pentikainen V, Erkkila K and Dunkel L (1999) Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *Am J Physiol* 276, E310-E316.

Pentikainen V, Erkkila K, Suomalainen L, Parvinen M and Dunkel L (2000) Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 2057-2067.

Perera D, Pizzey A, Campbell A, Katz M, Porter J, Petrou M, Irvine DS and Chatterjee R (2002) Sperm DNA damage in potentially fertile homozygous β -thalassemia patients with iron overload. *Hum Reprod* 17, 1820-1825.

Perreault SD, Aitken RJ, Baker HW, Evenson DP, Huszar G, Irvine DS, Morris ID, Morris RA, Robbins WA, Sakkas D, Spano M and Wyrobek AJ (2003) Integrating new tests of sperm genetic integrity into semen analysis: breakout group discussion. *Adv Exp Med Biol* 518, 253-268.

Perrin A, Caer E, Olivier-Bonet M, Navarro J, Benet J, Amice V, De Braekeller M and Morel F (2008) DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality. *Fertil Steril*, Epub ahead of print.

Perticarari S, Ricci G, Granzotto M, Boscolo R, Pozzobon C, Guarnieri S, Sartore A and Presani G (2007) A new multiparameter flow cytometric method for human semen analysis. *Hum Reprod* 22, 485-494.

Perticarari S, Ricci G, Boscolo R, de Santis M, Pagnini G, Martinelli M and Presani G (2008) Fas receptor is not present on ejaculated human sperm. *Hum reprod* 23, 1271-1279.

Print CG and Loveland KL (2000) Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays* 22, 423-430.

Ramos L, Kleingeld P, Meuleman E, Van Kooy R, Kremer J, Braat D and Wetzels A (2002) Assessment of DNA fragmentation of spermatozoa that were surgically retrieved from men with obstructive azoospermia. *Fertil Steril* 77, 233-237.

Rao L, Perez D and White E (1996) Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 135, 1441-1455.

Rao AV and Shaha C (2002) N-acetylcysteine prevents MAA induced male germ cell apoptosis: role of glutathione and cytochrome c. *FEBS Lett* 527, 133-137.

Rasper D M, Vaillancourt J P, Hadano S, Houtzager V M, Seiden I, Keen S L, Tawa P, Xanthoudakis S, Nasir J, Martinale D, Koop B F, Peterson E P, Thornberry N A, Huang J, MacPherson D P, Black S C, Hornung F, Lenardo M J, Hayden M R, Roy S and Nicholson D W (1998). Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ* 5, 271-88.

Reed JC (1997) Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387, 773-776.

Reed JC (1998) Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17, 3225-3236.

Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JM, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM and Mangelsdorf DJ (2000) Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 289, 1524-1529.

Ricci JE, Munoz-Pinedo C, Fitzgerald P, Bailly-Maitre B, Perkins GA, Yadava N, Scheffler IE, Ellisman MH and Green DR (2004) Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell* 117, 773-786.

Ricci G, Perticarari S, Boscolo R, Montico M, Guashino S and Presani G (2008) Semen preparation methods and sperm apoptosis: swim-up versus gradient-density centrifugal technique. *Fertil Steril*, Epub ahead of print

Richburg JH, Nanez A, Williams LR, Embree ME and Boekelheide KK(2000) Sensitivity of testicular germ cells to toxicant-induced apoptosis in gld mice that express a non-functional form of Fas ligand. *Endocrinology* 141, 787-793.

Rives N, Saint Clair A, Mazurier S, Sibert L, Simeon N and Joly G (1999) Relationship between clinical phenotype, semen parameters and aneuploidy frequency in sperm nuclei of 50 infertile males, *Hum Genet* 105, 266–272.

Roberts KP, Ensrud KM and Hamilton DW (2002) A comparative analysis of expression and processing of the rat epididymal fluid and sperm-bound forms of proteins D and E. *Biol reprod* 67, 525-533.

Roberts KP, Ensrud KM, Wooters JL, Nolan MA, Johnston DS and Hamilton DW (2006) Epididymal secreted protein Crisp-1 and sperm function. *Moll cell Endocrinol* 250, 122-127.

Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I and Vassalli P (1997) An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *The Embo J* 16, 2262-2270.

Rooney DE and Czepulowski BH (eds). *Human cytogenetics. A practical approach. Vol1: Constitutional analysis.* Oxford, IRL Press.

Ruffolo SC, Breckenridge DG, Nguyen M, Goping IS, Gross A, Korsmeyer SJ, Li H, Yuan J and Shore GC (2000) BID-dependent and BID-independent pathways for BAX insertion into mitochondria. *Cell Death Differ* 7, 1101-1108.

Said TM, Paasch U, Glander HJ and Agarwal A (2004) Role of caspases in male infertility. *Hum Reprod Update* 10, 39-51.

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

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

Sakkas D, Umer F, Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi PG, Shoukir Y and Campana A (1998) Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum. Reprod* 12, 11-19.

Sakkas D, Mariethoz E and St John JC (1999) Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-Mediated pathway. *Exp Cell Res* 251, 350-355.

Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N and Bizzaro D (2002) Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 66, 1061-1067.

Salvesen GS and Duckett CS (2002) IAP proteins: blocking the road to dest's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 401-410.

Sallam HN, Farrag A, Agameya AF, El-Garem Y and Ezzeldin F (2005) The use of the modified hypo-osmotic swelling test for the selection of immotile testicular spermatozoa in patients treated with ICSI: a randomized controlled study. *Hum Repro* 20, 3435-3440.

Samali A, Gorman AM and Cotter TG (1996) Apoptosis-the story so far... *Experientia* 52, 933-941.

Sanchez-Alcazar JA, Ault JG, Khodjakov A and Schneider E (2000) Increased mitochondrial cytochrome c levels and mitochondria hyperpolarization precede camptothecin-induced apoptosis in Jurkat cells. *Cell death Differ* 7, 1090-1100.

Satta A, Stivala A, Garozzo A, Morello A, Perdichizzi A, Vicari E, Salmeri M and Calogero AE (2006) Experimental *Chlamydia trachomatis* infection causes apoptosis in human sperm. *Hum Reprod* 21, 134-137.

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Kramer PH and Peter ME (1998) Two CD95 (Apo-1/Fas) signalling pathways. *Embo J* 17, 1675-1687.

Schellen TM and Van Straaten A (1980) Autosomal recessive hereditary congenital aplasia of the vasa deferentia in four siblings. *Fertil Steril* 34, 401-404.

Schlegel PN and Paduch DA (2005) Yet another test of sperm chromatin structure. *Fertil Steril* 84, 854-859.

Schmitz I, Kirchhoff S and Kramer PH (2000) Regulation of cell death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int J biochem Cell Biol* 32, 1123-1136.

Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA and Horsmeyer SJ (2002) A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilises cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell* 2, 55-67.

Sergerie M, Bleau G, Teulé R, Daudin M and Bujan L (2005) Sperm DNA integrity as diagnosis and prognosis element of male fertility. *Gyn Obst Fertil* 33, 89-101.

Serzedello de Paula T, Pimenta Berolla R, Mantagnini Spaine D, Adelaide Cunha M, Schor N and Perreira Cedenho A (2008) Effect of cryopreservation on sperm apoptotic desoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligospermia. *Fertil Steril* 86, 597-600.

Sharpe RM (1994) Regulation of spermatogenesis In : Knobil E., and Neil J.D., editors. *The physiology of reproduction*, second edition, New York, Raven Press, pages 1363-1434.

Sheikh MS and Yuang (2003) Death receptor activation complexes: it takes two to activate TNF receptor 1. *Cell Cycle* 2, 550-552.

Shen HM, Dai J, Chia SE, Lim A and Ong CN (2002) Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod* 17, 1266-1273.

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

Shiratsuchi A, Kawasaki Y, Ikemoto M, Arai H and Nakanishi Y (1999) Role of class B scavenger receptor type I in phagocytosis of apoptotic rat spermatogenic cells by Seroi cells. *J Biol Chem* 274, 5901-5908.

Shu H B, Halpin D R and Goeddel D V (1997). Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity* 6, 751-63.

Sigg C and Hornstein OP (1995) Increased desquamation of immature germ cells in the ejaculate of infertile men. *Hautarzt* 36, 441-448.

Silber SJ, Patrizio P and Asch RH (1990) Quantitative evaluation of spermatogenesis by testicular histology in men with congenital absence of the vas deferens undergoing epididymal sperm aspiration. *Hum Reprod* 5, 89-93.

Simpson JL and Bischoff F (2002) Genetic counselling in translocations. *Urol Clin N Am* 29, 793-807.

Singh NP, Mc Coy MT, Tice RR and Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175, 184-191.

Sion B, Janny L, Boucher D and Grizard G (2004) Annexin V binding to plasma membrane predicts the quality of human cryopreserved spermatozoa. *Int J Androl* 27, 108-114.

Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green Dr and Martin SJ (1999) Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspase -2, -3, -6, -7, -8 and -10 in a caspase-9 dependent manner. *J Cell Biol* 144, 281-292.

Spierings DC, De Vries E, Vellenga E, Van den Heuvel FA, Koornstra JJ, Wesseling J, Hollema H and De Jong S (2004) Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptor. *J Histochemistry Cytochemistry* 52, 821-831.

Stahl O, Eberhard J, Jepson K, Spano M, Cwikiel M, Cavallin-Stahl E and Giwercman A (2004) The impact of testicular carcinoma and its treatment on sperm DNA integrity. *Cancer* 15, 100, 1137-1144.

Steller H (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267, 1445-1449.

Strasser A, O'Connor L and Dixit VM (2000) Apoptosis signalling. *Annu Rev Biochem* 69, 217-245.

Stuhrmann M and Dörk T (2000) CFTR gene mutations and male infertility. *Andrologia* 32, 71-83.

Sugihara A, Saiki S, Tsuji M, Tsujimura T, Nakata Y, Kubota A, Kotake T and Teroda N (1997) Expression of Fas and Fas ligand in the testis and testicular germ cell tumors: an immunohistochemical study. *Anticancer res* 17, 3861-3865.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, Prevost MC, Alzari PM and Kroemer G (1999) Mitochondrial release of caspase 2 and 9 during the apoptotic process. *J Exp Med* 189, 381-394.

Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prevost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC and Kroemer G (2000) Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 192, 571-580.

Swan SH (2006) Semen quality in fertile US men in relation to geographical area and pesticide exposure. *Int J Androl.* 2006 Feb;29, 62-68.

Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK and Hsueh AJ (1993) Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol* 7, 643-650.

Taylor SL, Weng SL, Fox P, Duran EH, Morshedi MS, Oehninger S and Beebe SJ (2004) Somatic cell apoptosis markers and pathways in ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality. *Mol Hum Reprod* 10, 825-834.

Tesarik J, Guido M, Mendoza C and Greco E (1998) Human spermatogenesis in vitro: respective effects of follicle-stimulating hormone and testosterone on meiosis, spermiogenesis and Sertoli cell apoptosis. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 4467-4473.

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

Tesarik J, Ubaldi F, Rienzi L, Martinez F, Iacobelli M, Mendoza C and Greco E (2004). Caspase-dependent and independent DNA fragmentation in Sertoli and germ cells from men with primary testicular failure: relationship with histological diagnosis; *Hum Reprod* 19, 254-261.

Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS and Dixit VM (1995) Yaama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81, 801-809.

Thatte U, Bagadey S and Dahanukar S (2000). Modulation of programmed cell death by medicinal plants. *Cell Mol Biol* 46, 199-214.

Thibault C and Levasseur MC (2001) La reproduction chez les mammifères et l'homme. INRA éditions, pages 256-315.

Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer J L, Schroter M, Scaffidi C, Krammer P H, Peter M E and Tschoop J. (1997). Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386, 517-21.

Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.

Thornberry N A, Rano T A, Peterson E P, Rasper D M, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager V M, Nordstrom P A, Roy S, Vaillancourt J P, Chapman K T and Nicholson D W (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272, 17907-11

Thornberry NA and Lazebnik Y (1998) Caspases : enemies within. *Science* 281, 1312-1316.

Toshimori K (2003) Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. *Microscopy research and technique* 61, 1-6.

Tournaye H, Camus M, Vandervorst M, Nagy Z, Joris H, Van Steirteghem A and Devroey P (1997). Surgical sperm retrieval for intracytoplasmic sperm injection. *Int J Androl* 20, 69-73.

Tres LL, Rosselot C and Kieszenbaum AL (2004) Caspase activity inhibition delays programmed spermatogenic cell death in vitro. *Ann Histol Cytol* 67, 315-324.

Troiano L, Granata AR, Cossarizza A, Kalashnikova G, Bianchi R, Pini G, Tropea F, Carani C and Franceschi C (1998) Mitochondrial membrane potential in human and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male sterility. *Exp Cell Res* 241, 384-393.

Tsujimoto Y and Shimizu (2000) VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ* 7, 1174-1181.

Tulsiani DR (2006) Glycan-modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: an overview of their potential role in sperm maturation. *Mol Cell endocrinol* 250, 58-65.

Uren RT, Dewson G, Bonzon C, Lithgow T, Newmeyer DD and Kluck RM (2005) Mitochondrial release of pro-apoptotic proteins: electrostatic interactions can hold cytochrome c but not Smac/DIABLO to mitochondrial membranes. *J Biol Chem* 280, 2266-2274.

Van Aasche E, Staessen C, Vegetti W, Bonduelle M, Vandervorst M and Van Steirteghem (1999) Preimplantation genetic diagnosis and sperm analysis by fluorescence in-situ hybridization for the most common reciprocal translocation t(11;22). *Mol Hum Reprod* 5, 682-690.

Van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B and Reutelingsperger CPM (1998) Annexin V-affinity assay : a review on an apoptosis detection system based on phospholipid exposure. *Cytometry* 31, 1-9.

Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem, A and Liebaers, I (1996) Cytogenetics of infertile men. *Hum. Reprod* 11, suppl 4, 1-24.

Van Gurp M, Fetjens N, Van Loo G, Saelens X and Vandenberghe P (2003) Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 487-497.

Van Steirteghem A, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smits J, Wisanto A and Devroey P (1993) High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 8, 1061-1066.

Varum S, Bento C, Sousa AP, Gomes Santos CSS, Henriques P, Almeida-Santos T, Teodosio C, Paiva A and Ramalho-Santos J (2007) Characterization of human sperm populations using conventional parameters, surface ubiquitination and apoptotic markers. *Fertil Steril* 87, 572-583.

Vaux DL and Korsmeyer SJ (1999) Cell death in development. *Cell* 96, 245-254.

Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM and Bonduelle M (2000) Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod* 15, 351-365.

Velez de la Calle JF, Muller A, Walschaerts M, Clavere JL, Jimenez C, Wittemer C and Thonneau P (2008) Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study. *Fertil Steril*, Epub ahead of print.

Villegas J, Schulz M, Soto L and Sanchez R (2005) Bacteria induce expression of apoptosis in human spermatozoa. *Apoptosis* 10, 105-110.

Virant-Klun I, Tomazevic T and Meden-Vrtovec H (2002) Sperm single-stranded DNA, detected by acridine orange staining, reduces fertilization and quality of ICSI-derived embryos. *J Assist Reprod Genet* 19, 319-28.

Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ Jr, Falcone T and Agarwal A (2003) Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 80, 531-535.

Waterhouse NJ and Green DR (1999) Mitochondria and apoptosis: HQ or high security prison? *J Clin Immunol* 19, 378-387.

Weil M, Jacobson M D, Coles H S, Davies T J, Gardner R L, Raff K D and Raff M C (1996). Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J Cell Biol* 133, 1053-9.

Weil M, Jacobson MD and Raff MC (1998) Are caspases involved in the death of cells with a transcriptionally inactive nucleus? *J Cell Sci* 111, 2707-2715.

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

Wente W, Brenner MB, Zitzer H, Gromada J and Efanov AM (2007) Activation of liver X receptors and retinoid X receptors induces growth arrest and apoptosis in insulin-secreting cells. *Endocrinology* 148, 1843-1849.

- Whittington K and Ford WC (1999) Relative contribution of leukocytes and of spermatozoa to reactive oxygen species production in human sperm suspensions. *Int J Androl* 22, 229-235.
- Williamson and Schlegel RA (2002) Transbilayer phospholipids movement and the clearance of apoptotic cells. *Biochem Biophys Acta* 1585, 53-63.
- World Health Organization (1999), Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction (3rd ed.), Cambridge University Press, New York.
- Wu G, Chai J, Suber TL, Wu JW, Du C, Wang X and Shi Y (2000) Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* 408, 1008-1012.
- Wu GJ, Chang FW, Lee SS, Cheng YY, Chen CH and Chen C (2008) Apoptosis-related phenotype of ejaculated spermatozoa in patients with varicocele. *Fertil Steril*, Epub ahead of print.
- Wundrich K, Paasch U, Leicht M and Glander HJ (2006) Activation of caspases in human spermatozoa during cryopreservation-an immunoblot study. *Cell and Tissue Banking* 7, 81-90.
- Wyllie AH, Kerr JF and Currie AR (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.
- Zalata A, Hafez T and Comhaire F (1995) Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility. *Hum Reprod* 10, 1444-1451.
- Zhang G, Guru V, Kain SR and Yan G (1997) Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques* 23, 525-531.
- Zhang ZH, Jin X, Zhang XS, Hu ZY, Zou RJ, Han CS and Liu YX (2003) Bcl-2 and Bax are involved in experimental cryptorchidism-induced testicular germ cell apoptosis in rhesus monkey. *Contraception* 68, 297-301.
- Zhang HB, Lu SM, Ma CY, Wang L, Li X and Chen ZJ (2008) Early apoptotic changes in human spermatozoa and their relationships with conventional semen parameters and sperm DNA fragmentation. *Asian J Androl* 10, 227-235.
- Zheng TS, Schlosser SF, Dao T, Hingorani R, Crispe IN, Boyer JL and Flavell RA (1998) Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 13618-13623.
- Zheng S, Turner T and Lysiak JJ (2006) Caspases 2 activity contributes to the initial wave of germ cell apoptosis during the first round of spermatogenesis. *Biol Reprod* 74, 1026-33.
- Zheng Y, Zhang X, Zhou J, Cheng F and Zhou B (2008) Effects of the ipsilateral testis during progression of experimental varicocele in rat. *Med Sci Monit* 14, 122-126.
- Ziegler U and Groschup P (2004) Morphological features of cell death. *News Physiol Sci* 19, 124-128

Zini A, Bielecki R, Phang D and Zenzes T (2001) Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 75, 674-677.

Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A and Wang X (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C.elegans* CED-4, participates in cytochrome-c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-413.

Zou H, Li Y, Liu X and Wang X (1999) An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274, 11549-11556.

Annexes

Annexe I : Les acides aminés et leurs symboles

A	Ala	Alanine
C	Cys	Cystéine
D	Asp	Acide aspartique
E	Glu	Acide glutamique
F	Phe	Phénylalanine
G	Gly	Glycine
H	His	Histidine
I	Ile	Isoleucine
K	Lys	Lysine
L	Leu	Leucine
M	Met	Méthionine
N	Asn	Asparagine
P	Pro	Proline
Q	Gln	Glutamine
R	Arg	Arginine
S	Ser	Serine
T	Thr	Thréonine
V	Val	Valine
W	Trp	Tryptophane
Y	Tyr	Tyrosine

Annexe II : Composition des milieux cryoprotecteurs des spermatozoïdes

Composition du milieu de congélation du sperme TYB®, Irvine Scientific

- Glycerol: 12%
- TES (*N*-trishydroxymethyl methyl-2-aminoethanesulphonic acid)
- Tris
- Jaune d'œuf (provenant de poules pondeuses spécifiquement saines de toutes pathologies)
inactivé par la chaleur 20%
- Pénicilline/streptomycine

Composition du milieu de congélation du sperme Cryosperm®, Biomedica

- Glycérol 14%
- Chlorure de sodium
- Bicarbonate de sodium
- Phosphate de sodium
- Sulfate de magnésium
- Pénicilline/streptomycine
- HEPES
- Glycine
- Glucose
- Raffinose
- Pyruvate et lactate de sodium
- Taurine
- L Glutamine

Annexe III : Milieux utilisés pour l'analyse par *western blot*

Composition du tampon RIPA

Tris HCl : 50mM
NP40 : 1%
Sodium deoxycholate : 0,25%
EDTA : 1mM
PMSF: 1mM
Aprotinine: 1µg/ml
Leupeptine: 1µg/ml
Pepsatine : 1µg/ml
Na₃VO₄ : 1mM
NaF : 1mM
pH : 7,4

Composition du tampon Laemmli

SDS : 10%
Glycérol : 50%
2-β- mercaptoéthanol : 25%
Tris-HCl : 0,312M
Bleu de bromophénol 0,01%

Composition du milieu TTBS

NaCl : 150mM
Tris HCl : 20mM
Tween 20% : 0,1%
pH :7,4

Annexe IV : Composition du milieu T6

NaCl : 99,4mM

KCl : 1,42mM

MgCl₂ - 6H₂O : 0,47mM

Na₂HPO₄- 12H₂O : 0,36mM

CaCl₂. 2H₂O : 1,78mM

NaHCO₃: 25mM

Na lactate: 24,9mM

Na pyruvate: 0,47mM

Glucose: 5,56mM

Pénicilline: 100UI/ml

Streptomycine : 50µg/ml

Rouge de phénol

APOPTOSE DU SPERMATOZOÏDE ET FERTILITE MASCULINE

RESUME

Pour mieux comprendre la signification des marqueurs d'apoptose dans les spermatozoïdes éjaculés humains, l'objectif de notre étude était de mesurer ces marqueurs dans les spermatozoïdes prélevés à différents niveaux du tractus génital masculin dans différentes situations physiopathologiques. Pour évaluer la qualité fonctionnelle de ces spermatozoïdes, des relations ont été recherchées entre l'expression de ces marqueurs et les résultats obtenus en assistance médicale à la procréation.

Les marqueurs analysés sont des facteurs mis en jeu dans l'initiation et l'activation de l'apoptose (poly-caspases, caspase-3, -8 ou -9 activée(s)), et des signes précoces (externalisation de la phosphatidylsérine, PS) ou tardifs (fragmentation de l'ADN) de l'apoptose. Pour certains échantillons, une analyse ultrastructurale des spermatozoïdes a aussi été réalisée. La mesure de l'expression des caspases activées a fait l'objet d'une mise au point compte-tenu de l'hétérogénéité des populations spermatiques et de la faible quantité de spermatozoïdes disponibles. Finalement, nous avons retenu une mesure par double marquage associant un inhibiteur fluorescent vert des caspases activées et un colorant fluorescent rouge (Propidium Iodide) avec une détection soit en cytométrie en flux soit en microscopie à fluorescence selon la nature des spermatozoïdes analysés.

Chez des patients présentant une agénésie bilatérale des canaux déférents, la proportion de spermatozoïdes vivants ou morts exprimant des caspases activées est plus élevée dans les spermatozoïdes testiculaires que dans les spermatozoïdes épидидymaires suggérant une initiation du processus apoptotique dans les testicules et une incapacité des spermatozoïdes épидидymaires à initier l'apoptose. Dans ces conditions, en ICSI, le risque d'injecter un spermatozoïde apoptotique dans un ovocyte est plus élevé avec les spermatozoïdes testiculaires et pourrait expliquer pour une part, les résultats de moins bonne qualité avec ces spermatozoïdes testiculaires qu'avec les spermatozoïdes épидидymaires.

Chez des patients infertiles, porteurs d'une translocation chromosomique réciproque ou Robertsonienne autosomique, il existe une expression plus importante des modifications ultrastructurales et des marqueurs biochimiques d'apoptose (caspases activées, fragmentation de l'ADN, externalisation de la PS) associée à des signes d'immaturité ultrastructurale, comparé aux spermatozoïdes d'hommes fertiles. Ces résultats pourraient expliquer que dans l'éjaculat de ces patients, il existe une prédominance de gamètes équilibrés sur le plan chromosomique. En effet, les gamètes présentant un déséquilibre auraient été éliminés préférentiellement par apoptose.

En conclusion, les marqueurs d'apoptose exprimés par les spermatozoïdes éjaculés seraient le reflet d'une altération de la spermatogenèse avec une apoptose initiée et avortée dans le testicule associée à des anomalies de maturation et différenciation. La mesure des marqueurs d'apoptose dans les spermatozoïdes apporterait une aide dans la compréhension et la prise en charge de l'infertilité masculine, en particulier en assistance médicale à la procréation.

Mots clés : Apoptose, spermatozoïde, homme, fertilité, caspase, ICSI

**Laboratoire de Biologie de la Reproduction, EA975
Faculté de médecine-28, Place Henri Dunant, 63000 Clermont Ferrand**

APOPTOSIS OF SPERMATOZOA AND MALE FERTILITY

ABSTRACT

In order to have better insight into the implications of apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa, the aim of our study was to measure these markers in the spermatozoa collected at different levels in the male genital tract in various physiopathological situations. To analyse the functional quality of these spermatozoa, the analysis of relationships between the expression of these markers and the results obtained after assisted reproductive technology was assessed.

The markers analysed are factors that are involved in the initiation and activation of apoptosis (activated poly-caspases, caspase-3, -8, or -9) and early (externalisation of phosphatidylsérine, PS), or late (DNA fragmentation) signs of apoptosis. Ultrastructural analysis of the spermatozoa was also carried out for some samples. Measurement of the expression of activated caspases was subject of adjustment given the heterogeneity of the sperm samples and the low quantity of spermatozoa available. Finally, we decided on measurement using a double staining associating a green fluorescent inhibitor for the activated caspases and a red fluorescent vital staining (Propidium Iodide), with detection either by flow cytometry or by fluorescent microscopy depending on the type of spermatozoa to be analysed.

In patients presenting congenital bilateral absence of vas deferens, the proportion of living or dead spermatozoa expressing activated caspases was higher in the testicular spermatozoa than in the epididymal spermatozoa suggesting that the apoptotic process started in the testicles and that epididymal spermatozoa were incapable of initiating apoptosis. Under these conditions, in case of ICSI, the risk of injecting an apoptotic spermatozoa into an ovocyte is higher with the testicular spermatozoa and could explain, in part, the different and inferior results obtained with these testicular spermatozoa, compared with epididymal spermatozoa.

In the ejaculated spermatozoa of infertile reciprocal or Robertsonian autosomal translocation carriers, the expression of ultrastructural modifications and biochemical markers of apoptosis (activated caspases, DNA fragmentation, PS externalisation) associated with signs of ultrastructural immaturity was higher than in spermatozoa of fertile men. These results could explain that in the ejaculate of these patients, there is a predominance of chromosomal balanced spermatozoa. The gametes presenting an imbalance would have been preferentially eliminated by apoptosis.

In conclusion, the apoptosis markers expressed by ejaculated spermatozoa would reflect the impairment of spermatogenesis with apoptosis initiated and aborted in the testicle associated with maturation and differentiation abnormalities. So measurement of apoptosis markers in spermatozoa could be helpful for the understanding of male infertility, particularly to predict the outcome of assisted reproductive technologies.

Key words: Apoptosis, spermatozoa, man, fertility, caspase, ICSI