Apoptose dans le sperme éjaculé : Revue

Guillaume MARTIN¹, Odile SABIDO², Jean Louis LAURENT¹, Rachel LEVY¹

¹Laboratoire de Biologie de la reproduction, Hôpital Nord, Saint-Etienne

²Centre commun de Cytométrie, Université de Saint Etienne, Saint-Etienne

RESUME

La mort cellulaire programmée consiste en l'élimination active et régulée de cellules parfaitement identifiées, débutant pendant l'embryogenèse et se poursuivant durant la vie adulte. L'apoptose est une forme particulière de mort cellulaire programmée qui comporte des caractéristiques morphologiques et biochimiques spécifiques. L'un des rôles majeurs de l'apoptose dans les cellules somatiques est d'assurer l'élimination des cellules dangereuses, (cellules anormales, lésées et non réparables ou devenues inutiles), et de maintenir l'homéostasie au sein des tissus et organes.

La présence d'apoptose dans les spermatozoïdes éjaculés reste extrêmement controversée. La microscopie électronique a permis d'observer des spermatozoïdes présentant les caractéristiques de cellules somatiques apoptotiques dans l'éjaculat de sujets fertiles et infertiles. Cependant, il s'agit d'une technique lourde, permettant l'analyse d'un nombre limité de spermatozoïdes. De nombreux travaux soulignent l'impact de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes éjaculés en AMP, sans que cette fragmentation soit reliée de façon certaine au processus apoptotique. De nouvelles techniques explorant d'autres étapes de l'apoptose, développées sur cellules somatiques, pourraient se révéler d'un intérêt majeur. Les origines et fonctions possibles de cette apoptose dans un sperme normal et en cas de pathologie seront discutées.

I. INTRODUCTION

Le terme de *mort cellulaire programmée* (MCP) ou mort cellulaire naturelle apparut dans les années soixante pour décrire la dégénérescence séquentielle des muscles inter segmentaires du ver à soie. L'exemple classiquement cité concerne l'élimination active à des moments précis de l'embryogenèse, de cellules parfaitement bien identifiées de *C. elegans*. Le terme d'*apoptose* se réfère à un phénomène programmé dans le temps. Les deux termes ne sont cependant pas synonymes. La MCP implique une élimination active et régulée des cellules pendant l'embryogenèse et la vie adulte. L'apoptose est une forme particulière de MCP avec des caractéristiques morphologiques (Tableau 1) et biochimiques (Tableau 2) spécifiques permettant de la distinguer de la nécrose : lobulation de l'enveloppe nucléaire, condensation puis dégradation de la chromatine et fragmentation de l'ADN avec une membrane cellulaire intacte, puis fragmentation de la cellule et formation de vésicules membranaires (blebs) qui se détachent et sont alors appelées corps apoptotiques, rapidement phagocytés [61]. Si l'étude de la régulation, des fonctions et des mécanismes moléculaires de l'apoptose dans le testicule apporte un nouvel éclairage sur la spermatogenèse, la présence d'apoptose dans les spermatozoïdes éjaculés a été peu étudiée, et reste extrêmement controversée [28, 30, 32, 45].

Mots clés : apoptose, fragmentation de l'ADN, spermatozoïde

Correspondance :

Dr Rachel Levy - Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Hôpital Nord, 42055 Saint Etienne. -
Tel 04.77.82.83.07 - Fax 04.77.82.84.61 -
Email rachel.levy@chu-st-etienne.fr

Tableau 1 : Caractéristiques morphologiques de l'apoptose et de la nécrose.

APOPTOSE <i>Mort cellulaire programmée</i> = suicide cellulaire (physiologique)	NECROSE <i>Mort cellulaire accidentelle</i> = agression (pathologique)
Diminution du volume cellulaire de 30%	Gonflement puis lyse de la cellule
Intégrité de la membrane plasmatique longtemps préservée.	Perte rapide de l'intégrité membranaire
Condensation et marginalisation de la chromatine.	Compaction légère de la chromatine
Corps apoptotiques	Pas de corps apoptotiques
Absence de réaction inflammatoire	Réaction inflammatoire importante
Phagocytose par cellules adjacentes	
Affecte une cellule unique	Affecte des groupes de cellules voisines
Organites intacts initialement puis condensation.	Destruction des mitochondries et lysosomes, pycnose.
Perte de contact entre cellules et avec la matrice extra cellulaire.	

Tableau 2 : Caractéristiques biochimiques de l'apoptose et de la nécrose.

APOPTOSE	NECROSE
Induction par des stimuli physiologiques	Induction par des stimuli non physiologiques
Processus régulé actif	Processus non régulé, passif
Consommateur d'énergie	Ne nécessite pas d'énergie
Activité transcriptionnelle	Pas d'activité transcriptionnelle
Activité traductionnelle	Pas d'activité traductionnelle
Fragmentation oligonucléosomique ADN (200 paires de bases)	Fragmentation aléatoire de l'ADN

II. LE PROCESSUS APOPTOTIQUE DANS LES CELLULES SOMATIQUES

1. Les trois phases du processus apoptotique

La complexité de la **phase d'induction** est liée à la diversité des signaux inducteurs (dATP, déplétion en facteurs de croissance, glucocorticoïdes, p53, TNF α , ionophores calciques, irradiation UV, agonistes du récepteur APO-1/Fas...) et de leurs modes d'action.

A une phase d'induction de durée variable, succède la **phase d'exécution**, étape effectrice commune dont la mitochondrie est l'élément central. Le fait qu'une cellule apparemment saine puisse déclencher sa propre mort évoque l'existence d'une véritable « armoire à poisons » capables d'être activés rapidement. Dans l'espace entre la membrane externe et la membrane interne de la mitochondrie sont stockés, à l'état latent, les principaux pro-facteurs de mort cellulaire : les 3 procaspases, le cytochrome c et le facteur d'induction de l'apoptose (AIF). L'induction du signal apoptotique provoque une chute du potentiel trans-

membraire ($\Delta\psi_m$) avec ouverture de mégapores et libération de ces différents « poisons ». Dans le cytoplasme, les caspases exercent leur action protéolytique alors que le cytochrome c agit comme cofacteur des caspases. L'AIF gagne le noyau et induit la fragmentation internucléosomique caractéristique de l'ADN. Les radicaux libres et les ions calcium participent à cette phase d'exécution en amplifiant le signal. La protéine Bcl-2, ancrée dans la membrane externe des mitochondries, a une action anti-apoptotique et empêche le passage du cytochrome c dans le cytoplasme. Ce passage est au contraire facilité par la protéine pro-apoptotique Bax. L'activation de la famille des caspases, protéases à cystéine, déclenche alors le clivage protéolytique de la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP), des lamines nucléaires, de l'actine, de la topoisomérase I, et de la protéine kinase dépendante de l'ADN qui aboutira, entre autres, à la fragmentation de l'ADN et à la formation des corps apoptotiques.

Le processus apoptotique s'achève par une **phase de dégradation** avec fragmentation de la cellule en corps apoptotiques, rapidement phagocytés par des cellules voi-

sines compétentes, macrophages ou cellules épithéliales, qui reconnaissent la cellule en apoptose. Des signaux, parfois très précoces, indiquent aux cellules voisines que la cellule est engagée dans la voie de l'apoptose : clivage des acides sialiques terminaux, exposition de saccharides sub-terminaux, translocation des résidus de phosphatidylsérine (PS) depuis la face interne de la membrane plasmique à la surface externe, et expression d'une glycoprotéine ABC1 (*ATP binding cassette*) [7].

2. Contrôle génétique et contrôle social

Si les protéines effectrices de l'apoptose sont présentes à l'état inactif dans les cellules vivantes sous la forme d'une « armoire à poisons », leur potentiel « tueur » doit être sans cesse annihilé. Raff a ainsi proposé en 1992 un modèle d'organisation sociale où les cellules sont programmées pour s'autodétruire, leur survie dépendant de signaux extérieurs émis en continu par d'autres cellules [43].

Les principaux gènes impliqués dans le contrôle de l'apoptose ont été identifiés grâce aux travaux sur *C. elegans*, ver constitué de 1091 cellules dont 131 meurent par apoptose. Le programme de mort cellulaire de *C. elegans* fait intervenir au moins 14 gènes : parmi eux, un gène anti-apoptotique *ced 9* et deux gènes pro-apoptotiques *ced 3* et *ced 4*. Leurs homologues chez les mammifères sont : Bcl-2 et sa famille (*ced 9*), la famille des caspases (*ced 3*) et les *apoptosis protease-activating factors* (APAF) (*ced 4*) qui jouent un rôle de chaperon en catalysant l'activation des caspases (Tableau 3).

III. COMMENT DÉTECTER LES CELLULES APOPTOTIQUES DANS L'ÉJACULAT ?

Dans les cellules somatiques, de nombreuses techniques de détection des cellules en apoptose ont été développées. Certaines ont été adaptées au spermatozoïde éjaculé. Chaque technique évalue un aspect du processus apopto-

tique, et présente des avantages et des inconvénients.

1. Critères morphologiques et colorations vitales

Les critères morphologiques classiques décrits en microscopies optique et électronique exigent une identification longue et laborieuse. En microscopie électronique, les spermatozoïdes éjaculés apoptotiques présentent certaines des caractéristiques propres aux cellules somatiques en apoptose : chromatine partiellement fragmentée ou condensée à la périphérie de l'enveloppe nucléaire, rupture partielle ou disparition de la membrane nucléaire, acrosome vide, de forme lobulée, à distance du noyau, ou absent, ballonnisation des mitochondries compactées dans la pièce intermédiaire, axonème enroulé [2]. Outre les spermatozoïdes apoptotiques, des spermatides apoptotiques (jeunes) et des corps apoptotiques, phagocytés par des macrophages peuvent être également observés.

En microscopie optique, les colorations vitales des cellules mortes manquent de spécificité pour les cellules en apoptose et colorent des cellules déjà mortes plutôt que des cellules en voie d'apoptose.

2. Fragmentation de l'ADN

a) Origine de la fragmentation de l'ADN dans le spermatozoïde éjaculé

Plusieurs théories permettent d'expliquer l'origine des lésions de la chromatine du spermatozoïde. L'une fait référence à l'étape de compaction de l'ADN durant la spermiogénèse : elle associe une maturité nucléaire incomplète avec anomalie de la transition histones - protamines (P) [48]. Les spermatides en élongation présentent de nombreuses cassures physiologiques, mais transitoires, de leur ADN double brin par une nucléase endogène, l'ADN topoisomérase II (topo II) indispensable à la mise en place des protamines. Ces cassures disparaissent normalement avant la fin de la spermiogénèse et l'éjaculation. Une ano-

Tableau 3 : Principaux éléments du contrôle génétique de l'apoptose.

C elegans	Mammifères	Mode d'action
Ced-9	Bcl-2 (anti-apoptotique), Bcl-X, Bax (pro-apoptotique), Bad, Bak.	Régulateurs des canaux transmembranaires intracellulaires et de protéines de la transduction du signal apoptotique.
Ced-4	APAF (apoptosis protease activating factor).	Activateur de caspases.
Ced-3	ICE (caspase-1), ICH1 (caspase-2), CPP32 (caspase-3).	Protéase à cystéine (caspases).

malie de constitution ou de fonctionnement de la topoisomérase II pourrait aboutir à une fragmentation persistante de l'ADN dans les spermatozoïdes matures éjaculés. Outre la topo II, une modification du rapport P1/P2 avec augmentation de la proportion d'une forme immature de P2 (indispensable dans la régulation des ponts disulfures et des structures en doigt de zinc) pourrait être incriminée. En faveur de cette hypothèse, on retient une corrélation entre pourcentage de spermatozoïdes à ADN fragmenté et pourcentage de spermatozoïdes à équipement en protamines défectueux (chromomycine A3) [35].

Les altérations de l'ADN nucléaire du spermatozoïde pourraient également être liées au processus d'apoptose. Dès 1993, il est établi que les cellules somatiques en apoptose présentent outre une sensibilité accrue de leur ADN à une dénaturation acide, des cassures dans leur ADN double brin [19]. Gorczyca a ainsi appliqué aux spermatozoïdes ces deux tests lors d'une première étude en cytométrie en flux sur 25 sujets infertiles et observé une nette corrélation entre le pourcentage de spermatozoïdes à ADN fragmenté et le pourcentage de spermatozoïdes présentant une sensibilité accrue de l'ADN à la dénaturation. Ce travail évoquait pour la première fois l'existence de cellules germinales mâles apoptotiques à ADN fragmenté sur le même modèle que celui des cellules somatiques (après action d'endonucléases endogènes), l'apoptose permettant « l'inactivation » de spermatozoïdes éjaculés anormaux, potentiellement dangereux [19].

L'analyse récente de l'expression de Fas à la surface de spermatozoïdes humains éjaculés conclue à une nette différence entre spermes normaux (moins de 10% des spermatozoïdes expriment Fas) et anormaux (OAT ; dans plus d'un cas sur deux, plus de 10% des spermatozoïdes expriment Fas) [47-49]. Des corrélations similaires ont été observées lors d'une étude plus récente pour Fas, TUNEL et p53 mais pas pour Bcl-x [47-49]. L'analyse des doubles marquages ne retrouve pas de corrélation entre ADN fragmenté et les marqueurs d'apoptose étudiés, suggérant deux types différents de dysfonctionnements [49]. Selon Sakkas, la présence de spermatozoïdes éjaculés exprimant des marqueurs « apoptotiques » comme Fas (seuil de 10%), Bcl-x (seuil de 20%) ou p53 (seuil de 20%) pourrait indiquer une apoptose avortée, liée à une anomalie du remodelage cytoplasmique lors de la spermiogenèse. Ainsi, chez le rat, Blanco-Rodriguez assimile les restes cytoplasmiques à des corps apoptotiques [6]. De même, les spermatozoïdes porteurs de résidus cytoplasmiques présentent, en microscopie électronique, un gonflement des mitochondries évocateur d'apoptose [40]. Enfin, l'existence d'une corrélation positive entre la localisation *in situ* de la caspase-3 active au niveau de la pièce intermédiaire du spermatozoïde et la fragmentation de l'ADN suggère que si l'origine de l'apoptose se situe au niveau du reste cytoplasmique ou des

mitochondries, l'exécution du signal se manifeste au niveau du noyau [60]. Les lésions de l'ADN relèveraient plutôt d'un remodelage nucléaire inadéquat au cours du remplacement des histones par les protamines lors de la spermiogenèse [49].

b) Détection de la fragmentation de l'ADN dans le spermatozoïde éjaculé

La fragmentation de l'ADN peut être détectée au niveau d'une population par une électrophorèse en gel d'agarose et au niveau de chaque cellule par l'une des nombreuses méthodes d'évaluation *in situ*. Les plus utilisées sont :

- 1) la technique TUNEL,
- 2) les techniques COMET,
- 3) le test à l'acridine orange et la technique de dénaturation de l'ADN en milieu acide (SCSA). A ce jour, aucune étude n'a comparé ces différentes techniques sur les mêmes prélèvements.

• Electrophorèse en gel d'agarose

La fragmentation de l'ADN oligonucléosomique obtenue après action des endonucléases peut être objectivée, après électrophorèse en gel d'agarose, par un profil caractéristique : disparition progressive des bandes de haut poids moléculaire et apparition de bandes correspondant à de petits fragments de 200 paires de bases, donnant un aspect en barreaux d'échelle ou « DNA Ladder ». C'est le seul examen permettant de visualiser la fragmentation interoligonucléosomale de l'ADN, spécifique de l'apoptose. Cependant, l'électrophorèse en gel d'agarose nécessite de disposer de plusieurs millions de spermatozoïdes, ce qui en limite l'intérêt dans les pathologies humaines type OATS. De plus, la séparation des fragments d'ADN fournit une approche globale de la population, mais aucune information sur ce qui se passe réellement *in situ* pour chacune des cellules. Par ailleurs cette technique est peu sensible et ne détecte une fragmentation que lorsque au moins la moitié des cellules possèdent un ADN fragmenté [5].

• Technique TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*)

Les techniques *in situ* de détection de la fragmentation de l'ADN sont les techniques de référence pour la mise en évidence de l'apoptose dans les cellules somatiques. Il est possible de détecter *in situ* les cassures du brin d'ADN sur des spermatozoïdes grâce à l'incorporation de nucléotides biotinylés aux extrémités des cassures de l'ADN par action de polymérases comme la *deoxynucleotide terminal transferase* (TdT). Les extensions de nucléotides biotinylés sont ensuite visualisées après incubation avec des conjugués de type streptavidine ou des anticorps anti-digoxigénine couplés à un fluorochrome. Un marquage de l'ADN avec l'iodure de propidium (IP) combiné à la technique TUNEL permet d'analyser apoptose et décondensa-

tion de l'ADN des spermatozoïdes éjaculés en cytométrie en flux [17].

La spécificité de la technique TUNEL est discutée. Il existe des formes d'apoptose sans fragmentation d'ADN et une fragmentation de l'ADN dans la nécrose secondaire.

• Technique SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*)

Dès 1993, Gorczyca a appliqué aux spermatozoïdes le principe de la dénaturation *in situ* en milieu acide suivie d'une coloration par acridine orange (AO) et a observé une nette corrélation entre ADN fragmenté (TUNEL) et sensibilité accrue de l'ADN à la dénaturation [19]. Ce principe a été développé dans des conditions expérimentales très précises, permettant une excellente reproductibilité, à un coût moindre. L'AO est un colorant métachromatique qui possède une longueur d'onde de réémission différente selon qu'il se lie à un acide nucléique simple brin (rouge) ou double brin (vert). Le taux de dénaturation de l'ADN est ainsi évalué par le calcul de α_t (α_t = nombre de spermatozoïdes à ADN simple brin / nombre total de spermatozoïdes) [15]. L'index de fragmentation (DFI) est alors déduit. Cet index semble corrélé aux cassures des brins d'ADN mesurées par COMET [39] et TUNEL [42]. Il est ainsi possible de distinguer 4 groupes de patients avec un pronostic en matière de fertilité allant de : excellent (DFI < 15%), bon (DFI 15-24%), médiocre (DFI 25-30%) et réservé (DFI > 30%) [15]. Une étude sur 700 FIV et ICSI souligne qu'un DFI > 30% n'a permis l'obtention d'une grossesse que dans moins d'1% des cas ; c'est également dans le groupe DFI > 30% que les fausses couches sont les plus nombreuses, suggérant un facteur paternel affectant tous les spermatozoïdes [15]. Par ailleurs, le DFI augmente de façon significative après 46 ans [15].

• Technique COMET (*Single Cell Gel Electrophoresis SCGE*) (Tableau 4)

Pour cette technique, les spermatozoïdes sont placés dans un microgel très fin d'agarose déposé sur une lame, puis sont lysés *in situ*, soumis à une électrophorèse et marqués par un colorant fluorescent de l'ADN. L'ADN fragmenté migre de la tête du spermatozoïde vers l'anode, donnant un aspect de comète. L'intensité de fluorescence (% ADN) et la longueur de la queue (μm) de la comète ainsi dessinée sont proportionnelles aux cassures des brins d'ADN des spermatozoïdes. Une centaine de spermatozoïdes sont analysés pour chaque échantillon (entre 100 et 120). Cette technique (Tableau 4) peut être effectuée sous différentes conditions de pH (8,2 à 13) avec des résultats différents [14, 24, 26, 39, 53]. L'utilisation d'un pH neutre (visualisant les cassures de l'ADN double brin) est aujourd'hui privilégiée aux conditions alcalines (visualisant à la fois les cassures de l'ADN simple et double brin). La technique COMET, d'un coût modéré, reproductible, est très utilisée

Tableau 4 : Les différentes modalités du test COMET.

COMET	Commentaires
pH alcalin = 13 [24, 53]	Pas de différence entre sujet à sperme normal, fertile et infertile, et sujet présentant une asthénozoospermie. Effet des rayons X (5-30Gys) et de l' H_2O_2 (40 μM).
pH alcalin = 12,3 [26]	Plus de cassures d'ADN chez les sujets infertiles.
pH neutre = 9 [14]	Comparaison de différentes techniques de congélation.
pH neutre = 8,2 [39]	Corrélation avec l'âge, formes atypiques et mobilité ; ICSI : corrélation négative avec la concentration et le taux de clivage embryonnaire (mais le taux de fécondation est normal).

dans le domaine de la toxicologie (effets mutagènes après exposition aux rayons X, radicaux libres et chimiothérapie), pour évaluer les effets de différents modes de cryoconservation de sperme ou de traitement de sperme sur l'ADN des spermatozoïdes [9, 14].

c) Les résultats : de grandes variations... mais un consensus

Dès 1996, Baccetti retrouve des cellules apoptotiques dans tous les spermes éjaculés mais en pourcentages très variables : donneurs fertiles, 0,1% ; infections du tractus génital, 8% ; SIDA, 3-8% ; varicocèle, 1-10% ; têtes rondes, 10% ; cryptorchidie, 15-20% ; ataxie cérébelleuse, 15-20% ; stérilité inexpliquée, 25% ; séminome testiculaire, 50% [2]. Une étude plus récente confirme la présence de spermatozoïdes éjaculés à ADN fragmenté, mais avec des pourcentages nettement différents : 2,5% chez les sujets normospermiques, et environ 10% en cas d'oligo-asthénospermie, maladie de Hodgkin ou cancer testiculaire [17].

Toutes les techniques citées soulignent le fait qu'une fragmentation importante de l'ADN n'exclut pas une possible fécondation : or, à ce jour, il reste impossible de sélectionner un spermatozoïde selon l'intégrité de son ADN au moment de son injection dans le cytoplasme de l'ovocyte.

Ainsi, sans négliger l'impact de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes en AMP, il est prématuré d'assimiler apoptose et cassures double brin de l'ADN : il est ainsi fortement recommandé d'associer à la fragmentation de l'ADN d'autres méthodes pour détecter l'apoptose.

3. Externalisation des phosphatidylsérines (PS)

La PS n'est pas un banal composant de la membrane plasmique : elle joue un rôle important dans la coagulation, la fusion membranaire, la reconnaissance cellulaire et l'apoptose. Dans une cellule vivante, l'asymétrie membranaire de la PS (localisée sur la face interne) est associée à un faible taux de Ca^{2+} intracellulaire. L'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire *in vitro* peut induire l'apoptose cellulaire, en faisant intervenir des translocases Ca^{2+} dépendantes, agissant selon un mode « flip-flop ». La modification de l'asymétrie membranaire avec externalisation des PS permet la reconnaissance de la cellule apoptotique et sa phagocytose par les cellules voisines. La translocation de la PS en dehors de la cellule permet l'envoi d'un signal destiné aux macrophages proches [16].

Les résidus de PS exposés par la membrane plasmique peuvent être détectés grâce à leurs ligands : l'Annexine V. Cette interaction est calcium-dépendante. L'Annexine V couplée à un fluorochrome permet ainsi la visualisation ou la quantification des cellules à un stade précoce de l'apoptose, par immunofluorescence *in situ* ou en cytométrie en flux. La présence de cellules Annexine V positives mais TUNEL négatives suggère que la translocation des PS vers la membrane externe précède la fragmentation de l'ADN [58].

L'Annexine V - FITC a ainsi été utilisée pour comparer différents cryoprotecteurs [18] et des spermicides [8]. L'étude des fractions obtenues après sélection en gradient de densité aboutit à des résultats apparemment contradictoires. Si le pourcentage de spermatozoïdes à ADN fragmenté et produisant des radicaux libres est plus élevé dans la fraction spermatique à mobilité médiocre (45%), aucune différence dans l'expression des PS n'a pu être observée. Il est possible que les cellules exprimant les résidus de PS soient à un stade très précoce du processus apoptotique, précédant la fragmentation de l'ADN et la production excessive de radicaux libres. Il est également possible que l'expression des résidus de PS soit modifiée par les techniques de préparation du sperme et/ou soit le reflet du processus de capacitation [4].

4. Changement d'états mitochondriaux

La mitochondrie du spermatozoïde est l'organelle essentielle pour la production d'énergie (métabolisme cellulaire) sous forme d'ATP. Paradoxalement, c'est aussi la clé de la phase effectrice de l'apoptose dans les cellules somatiques, et de son contrôle. Bien plus qu'une perte de fonction par déficit énergétique, il s'agit d'un processus actif impliquant différentes protéines mitochondriales. La mitochondrie dans la cellule en apoptose subit ainsi plusieurs modifications : chute de la différence de potentiel transmembranaire mitochondrial, ouverture de pores spécialisés appelés

mégapores et re-largage de facteurs apoptotiques (AIF, cytochrome c, et plus récemment, Smac/DIABLO, endonucléase G, Omi/HtrA2) [29, 57]. Seul le cytochrome c a été retrouvé dans la membrane interne de la mitochondrie des spermatozoïdes humains. Une étude multiparamétrique de la mort cellulaire du spermatozoïde associant l'analyse du potentiel de membrane de la mitochondrie ($\Delta\psi_m$), de la production des radicaux libres, de la fragmentation de l'ADN et de la viabilité retrouve ainsi une corrélation positive entre le pourcentage de cellules à $\Delta\psi_m$ élevé et les paramètres classiques spermatiques (mobilité, concentration). De plus, les cellules qui ont le plus faible taux de fragmentation et le $\Delta\psi_m$ le plus élevé permettent l'obtention des taux de fécondation les plus importants en FIV [37].

5. Autres voies d'étude

a) Les facteurs intervenant dans la régulation de l'apoptose

Peu d'études abordent la régulation du processus apoptotique dans les spermatozoïdes éjaculés. Les protéines Bcl-2 (anti-apoptotique), Bax (pro-apoptotique), HSP 70 et PARP sont exprimées dans le sperme de sujets normospermiques [5]. Weil retrouve l'expression de la caspase-3 active dans 8 % seulement des 25% de spermatozoïdes morts (marquage *in situ* par immunofluorescence) et défend l'hypothèse de l'activation d'un programme de mort cellulaire indépendante des caspases dans le sperme [59]. Au contraire, selon Weng, une apoptose dépendante des caspases dans les spermatozoïdes est démontrée par la mise en évidence (1) d'une activité enzymatique caspase (clivage d'un substrat fluorogénique DEVD-afc) et (2) de la présence de la caspase-3 sous forme inactive (pro-caspase-3 de 32 kDa) et sous forme active (caspase-3 de 17 kDa) en immunoblot [60].

b) Les inducteurs et inhibiteurs de l'apoptose

Il est possible de déclencher ou d'inhiber l'apoptose dans des modèles et des conditions expérimentales précises dans les cellules somatiques [38]. Une fragmentation de l'ADN des cellules germinales testiculaires de souris a pu être induite par des radiations [21], la chimiothérapie (hydroxyurée, cyclophosphamide, mitomycine C, cisplatine) [41, 51], les antagonistes de la GnRH [22], la testostérone [56], la chaleur (43°C pendant 15 minutes) [25], ou après cryptorchidie [27] et vasectomie induites [52]. Weil souligne l'impossibilité d'induire l'apoptose dans les spermatozoïdes de l'épididyme de souris à l'aide de la staurosporine [59]. Peu d'études d'induction ont été effectuées directement sur les spermatozoïdes éjaculés : notons, chez l'humain, l'induction d'une fragmentation de l'ADN (TUNEL) des spermatozoïdes éjaculés après exposition à des porines et LPS [20], et l'étude multiparamétrique de l'apoptose

induite après exposition à différents agents spermicides [8]. Une étude originale utilise pour la première fois la technique des puces ADN pour analyser l'effet de la chaleur (40°C pendant 4 heures) sur des spermatozoïdes humains lavés et distingue deux populations spermatiques : des cellules à ADN fragile, avec de mauvais paramètres de capacitation et de réaction acrosomique, subissant une apoptose thermo-induite, et une population de cellules correctement capacitées, capables d'induire la libération de chaperons comme hsp 70 pour la protéger de l'apoptose [36].

Dans les cellules somatiques, les radicaux libres de l'oxygène (RLO) interviennent comme inducteurs du signal apoptotique et amplifient le signal produit. A taux physiologique, les RLO ont un effet bénéfique sur les fonctions spermatiques, en particulier sur la fonction cinétique (hyperactivation) et la fusion (peroxydation lipidique). A taux plus élevés, les RLO induisent une fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes humains [12, 33]. Les centrifugations induisent la production de radicaux libres nocifs et augmentent le pourcentage de spermatozoïdes à ADN fragmenté (TUNEL+). La centrifugation en présence d'antioxydants permettrait de limiter la production de radicaux libres et de protéger l'ADN des spermatozoïdes. Deux études récentes soulignent les effets des leucocytes sur la structure de la chromatine et l'index d'apoptose. Une corrélation entre le rapport *leucocytes CD45+/spermatozoïdes* et l'index d'apoptose (*ANN+IP-/IP-*) a été établie [44]. De plus, de sévères lésions de la chromatine (SCSA, index de fragmentation variant de 8 à 67%) ont été observées en présence de leucocytes [1].

c) La technique SUTI (*Sperm Ubiquitin Tag Immunoassay*)

Il existe, dans l'épididyme, un mécanisme de contrôle de qualité du sperme dépendant de l'ubiquitine. L'ubiquitine est un marqueur protéolytique universel qui se lie de façon covalente à des lysines de protéines destinées à une dégradation. Suite à cette liaison covalente, de multiples molécules d'ubiquitine s'associent, formant des chaînes de poly-ubiquitine. La protéolyse dépendante de l'ubiquitine survient à un stade précis du cycle cellulaire. Dans l'épididyme, l'ubiquitine est sécrétée sur un mode apocrine par les cellules de l'épithélium de l'épididyme et se fixe à la surface des spermatozoïdes anormaux. Cependant, des spermatozoïdes porteurs de l'ubiquitine peuvent être retrouvés dans le sperme éjaculé.

On ne connaît rien du signal d'ubiquitination d'un spermatozoïde anormal. L'une des hypothèses est qu'un spermatozoïde apoptotique, avec une membrane plasmique modifiée, une membrane mitochondriale perméabilisée et un ADN fragmenté, soit reconnu par l'ubiquitine. L'étude conjointe de l'ubiquitination par le test SUTI et de la frag-

mentation de l'ADN par TUNEL permet d'étayer cette hypothèse. Seulement 20-40% des spermatozoïdes marqués par l'anticorps anti-ubiquitine ont un ADN fragmenté alors que tous les spermatozoïdes à ADN fragmenté sont SUTI positifs. Ainsi, les spermatozoïdes à ADN fragmenté seraient reconnus dès leur transit dans l'épididyme, marqués, et destinés à une destruction par une voie dépendante de l'ubiquitine [55].

IV. APPLICATIONS

1. Efficacité thérapeutique : contrôle hormonal de l'apoptose dans le sperme éjaculé

Un effet positif du traitement par FSH (12 jours ; 150 UI de FSH HP ; SC) sur le nombre de cellules apoptotiques dans le sperme de 23 patients infertiles a pu être observé. Cette amélioration des caractéristiques ultrastructurales des spermatozoïdes examinés après traitement par FSH suggère un rôle des gonadotrophines, et notamment de la FSH, sur le contrôle de l'apoptose dans les cellules du sperme [3].

2. Analyse du sperme

De nombreuses études retrouvent une corrélation entre le pourcentage de spermatozoïdes à ADN fragmenté et la plupart des paramètres spermatiques : concentration, mobilité, atypies [26, 48, 50, 63].

3. Préparation du sperme

Parmi les différentes techniques de préparation du sperme testées (Tableau 5), le gradient de densité semble plus efficace pour sélectionner des spermatozoïdes à ADN non fragmenté que la migration ascendante [10, 17, 31, 46, 62].

4. Congélation de sperme humain

Peu d'études ont analysé les marqueurs de l'apoptose dans le sperme humain avant et après congélation (Tableau 6). La décongélation s'accompagne de changements membranaires avec externalisation des résidus de PS sans augmentation de la fragmentation de l'ADN ni des RLO [11, 13, 18].

5. Assistance Médicale à la Procréation (AMP)

a) FIV

L'analyse des préparations de spermatozoïdes recueillis après lavage-migration ascendante note un taux de spermatozoïdes à ADN fragmenté de 5 à 40%. Il existe (1) une corrélation négative entre taux de spermatozoïdes TUNEL+ (sperme traité) et concentration, mobilité et pourcentage de formes normales (éjaculat), (2) une corrélation négative entre spermatozoïdes TUNEL+ et taux de fécondation et de clivage embryonnaire [54].

Tableau 5 : Effet de la préparation du sperme sur l'apoptose des spermatozoïdes.

Préparation de sperme	Technique d'analyse de l'ADN	Résultats
Gradient de densité [31]	SCSA	Diminution des spermatozoïdes anormaux.
Migration ascendante [17]	TUNEL sur lames	Diminution des spermatozoïdes à ADN fragmenté.
Gradient de densité (GD) Migration ascendante [46]	TUNEL et CMA ₃ sur lames	Après GD, diminution des spermatozoïdes CMA ₃ et des cassures d'ADN. Aucune amélioration significative après MA.
Gradient de densité [10]	COMET, TUNEL, JC-1	Après GD, meilleure intégrité de l'ADN, moins d'ADN fragmenté et meilleur $\Delta\psi_m$.
Migration ascendante [62]	TUNEL	Diminution des spermatozoïdes à ADN fragmenté après MA : 2,4 à 1,1%.

Tableau 6 : Effet de la congélation du sperme sur les paramètres de l'apoptose.

Références	Techniques utilisées	Résultats obtenus
Glander et al. [18]	Annexine V - FITC/IP	Comparaison de 3 techniques de congélation de sperme.
Duru et al. [13]	Annexine V - FITC/IP TUNEL	La congélation de sperme entraîne des changements membranaires (externalisation de PS) mais pas sur l'ADN.
Duru et al. [11]	Annexine V - FITC/IP TUNEL Détection des RLO	<ul style="list-style-type: none"> • les taux de RLO sont supérieurs avant congélation. • translocation de PS après congélation.

b) ICSI

En cas d'ICSI, le pourcentage de spermatozoïdes avec fragmentation de l'ADN dans la préparation varie de 0,5 à 75% [34]. On note (1) une corrélation négative entre le taux de spermatozoïdes TUNEL+ (sperme traité) et le taux de fécondation en ICSI, (2) une corrélation négative entre le taux de spermatozoïdes TUNEL+ après traitement et le taux de formes mobiles et atypiques dans l'éjaculat. L'impact de la fragmentation d'ADN après ICSI n'est toutefois pas retrouvé par toutes les études [23].

L'étude d'ovocytes non fécondés 20 heures après ICSI a permis de retrouver dans 50% des ovocytes une fragmentation d'ADN : l'origine de cet ADN fragmenté est spermatique dans 25,8% des cas et ovocytaire dans 24,4% des cas. La micro injection d'un spermatozoïde à ADN fragmenté pourrait expliquer certains échecs de fécondation en ICSI [34].

V. CONCLUSION

Différentes techniques de détection de l'apoptose, développées dans les cellules somatiques, peuvent être adaptées à l'analyse de l'apoptose dans des spermatozoïdes éjaculés. L'impact du pourcentage de spermatozoïdes éjaculés présentant spontanément une fragmentation de l'ADN est important en AMP. Cependant, nous ne disposons pas de preuves suffisantes pour assimiler fragmentation spontanée de l'ADN et apoptose du spermatozoïde éjaculé. Les deux processus pourraient relever de deux dysfonctionnements différents : (1) remodelage nucléaire pour les lésions de la chromatine, (2) remodelage cytoplasmique pour l'apoptose. Ces deux dysfonctionnements pourraient être associés dans certains cas d'oligo-asthénospermies. Il est important de développer d'autres stratégies d'étude, évaluant les phases précoces et les mécanismes moléculaires de l'apoptose dans les spermatozoïdes éjaculés.

REFERENCES

1. ALVAREZ J.G., SHARMA R.K., OLLERO M. et al. : Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertil. Steril.*, 2002, 2 : 319-329.
2. BACCETTI B., COLLODEL G., PIOMBONI P. : Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 1996, 4 : 587-596.
3. BACCETTI B., STREHLER E., CAPITANI S. et al. : The effect of follicle stimulating hormone therapy on human sperm structure (Notulae seminologicae 11). *Hum. Reprod.*, 1997, 9 : 1955-1968.
4. BARROSO G., MORSHEDI M., OEHNINGER S. : Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 2000, 6 : 1338-1344.
5. BLANC-LAYRAC G., BRINGUIER A.F., GUILLOT R., FELDMANN G. : Morphological and biochemical analysis of cell death in human ejaculated spermatozoa. *Cell. Mol. Biol.*, 2000, 1 : 187-197.
6. BLANCO-RODRIGUEZ J., MARTINEZ-GARCIA C. : Apoptosis is physiologically restricted to a specialized cytoplasmic compartment in rat spermatids. *Biol. Reprod.*, 1999, 6 : 1541-1547.
7. CHIMINI G. : Apoptosis : repulsive encounters. *Nature*, 2002, 6894 : 139-141.
8. D'CRUZ O.J., DONG Y., UCKUN F.M. : Spermicidal activity of oxovanadium (IV) complexes of 1, 10-phenanthroline, 2,2'-bipyridyl, 5'-bromo-2'-hydroxyaceto-phenone and derivatives in humans. *Biol. Reprod.*, 1999, 2 : 435-444.
9. DONNELLY E.T., MCCLURE N., LEWIS S.E. : Cryopreservation of human semen and prepared sperm : effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil. Steril.*, 2001, 5 : 892-900.
10. DONNELLY E.T., O'CONNELL M., MCCLURE N., LEWIS S.E. : Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 2000, 7 : 1552-1561.
11. DURU N.K., MORSHEDI M., SCHUFFNER A., OEHNINGER S. : Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa and plasma membrane translocation of phosphatidylserine. *Fertil. Steril.*, 2001, 2 : 263-268.
12. DURU N.K., MORSHEDI M., SCHUFFNER A., OEHNINGER S. : Semen treatment with progesterone and/or acetyl-L-carnitine does not improve sperm motility or membrane damage after cryopreservation-thawing. *Fertil. Steril.*, 2000, 4 : 715-720.
13. DURU N.K., MORSHEDI M.S., SCHUFFNER A., OEHNINGER S. : Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. *J. Androl.*, 2001, 4 : 646-651.
14. DUTY S.M., SINGH N.P., RYAN L., et al. : Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm. *Hum. Reprod.*, 2002, 5 : 1274-1280.
15. EVENSON D.P., LARSON K.L., JOST L.K. : Sperm chromatin structure assay : its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J. Androl.*, 2002, 1 : 25-43.
16. FADOK V.A., VOELKER D.R., CAMPBELL P.A., COHEN J.J., BRATTON D.L., HENSON P.M. : Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.*, 1992, 7 : 2207-2216.
17. GANDINI L., LOMBARDO F., PAOLI D. et al. : Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 2000, 4 : 830-839.
18. GLANDER H.J., SCHALLER J. : Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa : a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol. Hum. Reprod.*, 1999, 2 : 109-115.
19. GORCZYCA W., TRAGANOS F., JESIONOWSKA H., DARZYNKIEWICZ Z. : 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.*, 1993, 1 : 202-205.
20. GORGA F., GALDIERO M., BUOMMINO E., GALDIERO E. : Porins and lipopolysaccharide induce apoptosis in human spermatozoa. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2001, 1 : 206-208.
21. HASEGAWA M., ZHANG Y., NIIBE H., TERRY N.H., MEISTRICH M.L. : Resistance of differentiating spermatogonia to radiation-induced apoptosis and loss in p53-deficient mice. *Radiat. Res.*, 1998, 3 : 263-270.
22. HIKIM A.P., WANG C., LEUNG A., SWERDLOFF R.S. : Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology*, 1995, 6 : 2770-2775.
23. HOST E., LINDENBERG S., SMIDT-JENSEN S. : The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 2000, 7 : 559-563.
24. HUGHES C.M., LEWIS S.E., MCKELVEY-MARTIN V.J., THOMPSON W. : A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Mol. Hum. Reprod.*, 1996, 8 : 613-619.
25. IKEDA M., KODAMA H., FUKUDA J. et al. : Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol. Reprod.*, 1999, 2 : 393-399.
26. IRVINE D.S., TWIGG J.P., GORDON E.L., FULTON N., MILNE P.A., AITKEN R.J. : DNA integrity in human spermatozoa : relationships with semen quality. *J. Androl.*, 2000, 1 : 33-44.
27. TO K., TANEMURA K., GOTOH H., KUROHMARU M., HAYASHI Y. : Apoptosis-like cell death in experimentally-induced cryptorchidism in adult mice. *J. Vet. Med. Sci.*, 1997, 5 : 353-359.
28. JOHNSON L., CHATURVEDI P.K., WILLIAMS J.D. : Missing generations of spermatocytes and spermatids in seminiferous epithelium contribute to low efficiency of spermatogenesis in humans. *Biol. Reprod.*, 1992, 6 : 1091-1098.
29. JOZA N., KROEMER G., PENNINGER J.M. : Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. *Trends Genet.*, 2002, 3 : 142-149.

30. KERR J.B. : Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis : assessment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle. *J. Reprod. Fertil.*, 1992, 3 : 825-830.
31. LARSON K.L., BRANNIAN J.D., TIMM B.K., JOST L.K., EVENSON D.P. : Density gradient centrifugation and glass wool filtration of semen remove spermatozoa with damaged chromatin structure. *Hum. Reprod.*, 1999, 8 : 2015-2019.
32. LEVY R., SEIFER-AKNIN I. : Apoptose au cours de la spermatogenèse et dans le sperme éjaculé. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, 2001, 5 : 531-545.
33. LOPES S., JURISICOVA A., SUN J.G., CASPER R.F. : Reactive oxygen species : potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 1998, 4 : 896-900.
34. LOPES S., SUN J.G., JURISICOVA A., MERIANO J., CASPER R.F. : Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 1998, 3 : 528-532.
35. MANICARDI G.C., TOMBACCO A., BIZZARO D., BIANCHI U., BIANCHI P.G., SAKKAS D. : DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assays. *Histochem. J.*, 1998, 1 : 33-39.
36. MANN S.L., PATTON W.C., KING A., CHAN P.J. : Comparative genomic hybridization analysis of sperm DNA apoptosis after exposure to heat shock. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2002, 4 : 195-200.
37. MARCHETTI C., OBERT G., DEFFOZEZ A., FORMSTECHE P., MARCHETTI P. : Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum. Reprod.*, 2002, 5 : 1257-1265.
38. MOOR A.C. : Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2000, 1 : 1-13.
39. MORRIS I.D., ILOTT S., DIXON L., BRISON D.R. : 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.*, 2002, 4 : 990-998.
40. MURATORI M., PIOMBONI P., BALDI E., et al. : Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J. Androl.*, 2000, 6 : 903-912.
41. NAKAGAWA S., NAKAMURA N., FUJIOKA M., MORI C. : Spermatogenic cell apoptosis induced by mitomycin C in the mouse testis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1997, 2 : 204-213.
42. PERERA D., PIZZEY A., CAMPBELL A. et al. : Sperm DNA damage in potentially fertile homozygous beta-thalassaemia patients with iron overload. *Hum. Reprod.*, 2002, 7 : 1820-1825.
43. RAFF M.C. : Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, 1992, 6368 : 397-400.
44. RICCI G., PERTICARARI S., FRAGONAS E. et al. : Apoptosis in human sperm : its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Hum. Reprod.*, 2002, 10 : 2665-2672.
45. ROYERE D., GUERIF F., ROCHEREAU DE REVIERS M.T., PANTHIER S., LANSAC J. : Apoptose dans les gonades mâles. *Contracept. Fertil. Sex.*, 1998, 7-8 : 517-521.
46. SAKKAS D., MANICARDI G.C., TOMLINSON M. et al. : The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Hum. Reprod.*, 2000, 5 : 1112-1116.
47. SAKKAS D., MARIETHOZ E., MANICARDI G., BIZZARO D., BIANCHI P.G., BIANCHI U. : Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev. Reprod.*, 1999, 1 : 31-37.
48. SAKKAS D., MARIETHOZ E., ST JOHN J.C. : Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp. Cell. Res.*, 1999, 2 : 350-355.
49. SAKKAS D., MOFFATT O., MANICARDI G.C., MARIETHOZ E., TAROZZI N., BIZZARO D. : Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol. Reprod.*, 2002, 4 : 1061-1067.
50. SHEN H.M., DAI J., CHIA S.E., LIM A., ONG C.N. : Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum. Reprod.*, 2002, 5 : 1266-1273.
51. SHIN J.H., MORI C., SHIOTA K. : Involvement of germ cell apoptosis in the induction of testicular toxicity following hydroxyurea treatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1999, 2 : 139-149.
52. SHIRAISHI K., YOSHIDA K., FUJIMIYA T., NAITO K. : Activation of mitogen activated protein kinases and apoptosis of germ cells after vasectomy in the rat. *J. Urol.*, 2002, 3 : 1273-1278.
53. SINGH N.P., DANNER D.B., TICE R.R., MCCOY M.T., COLLINS G.D., SCHNEIDER E.L. : Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. *Exp. Cell. Res.*, 1989, 2 : 461-470.
54. SUN J.G., JURISICOVA A., CASPER R.F. : Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm : correlation with fertilization *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 1997, 3 : 602-607.
55. SUTOVSKY P., NEUBER E., SCHATTEN G. : Ubiquitin-dependent sperm quality control mechanism recognizes spermatozoa with DNA defects as revealed by dual ubiquitin-TUNEL assay. *Mol. Reprod. Dev.*, 2002, 3 : 406-413.
56. TESARIK J., MARTINEZ F., RIENZI L. et al. : *In vitro* effects of FSH and testosterone withdrawal on caspase activation and DNA fragmentation in different cell types of human seminiferous epithelium. *Hum. Reprod.*, 2002, 7 : 1811-1819.
57. VAN LOO G., VAN GURP M., DEPUYDT B. et al. : The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ.*, 2002, 1 : 20-26.
58. VERMES I., HAANEN C., STEFFENS-NAKKEN H., REUTELINGSPERGER C. : A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods*, 1995, 1 : 39-51.
59. WEIL M., JACOBSON M.D., RAFF M.C. : Are caspases involved in the death of cells with a transcriptionally inactive nucleus

? Sperm and chicken erythrocytes. J. Cell Sci., 1998, Pt 18 : 2707-2715.

60. WENG S.L., TAYLOR S.L., MORSHEDI M. et al. : Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. Mol. Hum. Reprod., 2002, 11 : 984-991.
61. WYLLIE A.H., KERR J.F., CURRIE A.R. : Cell death : the significance of apoptosis. Int. Rev. Cytol., 1980, 68 : 251-306.
62. YOUNGLAI E.V., HOLT D., BROWN P., JURISICOVA A., CASPER R.F. : Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. Hum. Reprod., 2001, 9 : 1950-1953.
63. ZINI A., BIELECKI R., PHANG D., ZENZES M.T. : Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. Fertil. Steril., 2001, 4 : 674-677.

ABSTRACT

Apoptosis in ejaculated spermatozoa

Guillaume MARTIN, Odile SABIDO, J.L. LAURENT,
Rachel LEVY

It has become clear in recent years that programmed cell death occurs spontaneously in the cycle of the seminiferous epithelium. Although apoptosis is a key phenomenon in the control of sperm production, the existence and role of apoptosis in ejaculated sperm cells remain controversial.

Apoptosis - as determined by DNA fragmentation and ultrastructural analysis - is abnormally frequent in the sperm cells of the ejaculate of sterile men. In this review, we discuss the possible origins of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the consequences of this DNA damage when apoptotic spermatozoa are used for ICSI.

Percentages of DNA fragmentation in human ejaculated sperm are correlated with fertilization rates after IVF or ICSI assay. Detection of DNA fragmentation in human sperm could provide additional information about the biochemical integrity of sperm and may be used in future studies for fertilization failures not explained by conventional sperm parameters. However, the analysis of new markers of apoptosis (Fas, ANNEXINE V) and molecular mechanisms is now necessary to assess the role of apoptosis in human ejaculated sperm cells.

***Key-Words:* apoptosis, DNA fragmentation, spermatozoa**