

Analyse de la structure chromatinienne du sperme par la cytométrie en flux à l'acridine orange. - intérêt clinique.

Y. SOFFER (1), L. M. LEWIN (2)

(1) Centre d'infertilité masculine, Centre médical Assaf Harofe, Zérifin (2) Département de biochimie clinique, Faculté de médecine Sackler, Université de Tel Aviv, Ramat Aviv, Israël.

RÉSUMÉ

L'ADN nucléosomal du spermatozoïde, lié à des histones, se transforme durant la spermatogénèse en une forme spéciale liée à des protéines basique, les protamines. Ce processus permet au noyau du spermatozoïde de se condenser pour devenir mature. Cette maturation s'achève dans l'épididyme. Lorsque le spermatozoïde pénètre dans l'ovocyte, les protamines se détachent pour être remplacées par des histones et le noyau peut se déployer pour former le pronucléus mâle. La cytométrie en flux à l'acridine orange est une technique objective particulièrement bien adaptée à l'investigation de la structure de la chromatine, tant à l'échelon de chacun des spermatozoïdes, qu'à l'échelon de tout l'éjaculat. Elle permet de tracer les noyaux des cellules jeunes durant toute la spermatogénèse, du stade diploïde, passant par le stade tétraploïde, jusqu'au stade haploïde du spermatozoïde mature. Elle permet aussi de suivre le processus de maturation des spermatozoïdes durant la traversée de l'épididyme. Elle permet d'identifier des défauts de condensation de la chromatine spermatique de types divers: hypo-condensation, hyper-condensation, aberrations diverses ainsi que des troubles de la décondensation de la chromatine, détectables par une épreuve *in vitro*. Ces défauts sont susceptibles de perturber le pouvoir fécondant des spermatozoïdes, même après micro-injection dans l'ovocyte. Une meilleure compréhension des conditions assurant l'intégrité et la stabilité de la chromatine nucléaire pourrait dans l'avenir, nous aider à améliorer la qualité des techniques utilisées en procréation médicalement assistée.

Mots-clés : cytométrie en flux; acridine orange; spermatogénèse; maturation des spermatozoïdes; pouvoir fécondant des spermatozoïdes; assistance médicale à la procréation; hypo-condensation; hyper-condensation; aberrations de la chromatine spermatique; défauts de décondensation de la chromatine.

I. INTRODUCTION

Le spermatozoïde est une cellule fort spéciale dont la fonction essentielle est de transférer l'ADN du génome masculin à l'ovocyte. L'ADN du noyau du spermatozoïde est compacté sous une forme liée à de petites protéines basique, les protamines. Cette liaison entre les protamines et l'ADN crée une différence avec la structure caractéristique du nucléosome dans les cellules somatiques. Les différences structurales entre ce nucléosome et la chromatine spermatique ont été répertoriées et schématisées [59].

Les changements structurels de la chromatine surviennent durant la spermiogénèse. La chromatine produite à la suite de la méiose dans les spermatides rondes est du type nucléosomal dans lequel l'ADN est encore lié aux histones. Dans les étapes ultérieures, les histones se détachent de l'ADN pour être remplacées d'abord par des protéines de transition et

Correspondance : Dr. Yigal Soffer Centre d'infertilité masculine Centre Médical Assaf Harofé 70300, Zerifin, Israël
Tel : 972 89 77 96 90 Fax : 972 8 77 96 91
E-mail: ysoffer@asaf.health.gov.il

ensuite par des protamines [13, 23].

Ce processus permet à la tête du spermatozoïde de se condenser et de prendre une forme aérodynamique pour nager plus vite. Lorsque le spermatozoïde pénètre dans l'ovocyte, les protamines se détachent pour être remplacées par des histones et le noyau peut se déployer. Ce processus implique l'activité des nucléoplasmines, protéines chaperons, présents dans le cytoplasme de l'ovocyte [44, 45]. Ainsi, la chromatine du pronucléus mâle peut reprendre la structure nucléosomale indispensable au développement ultérieur de l'oeuf fécondé. Ce bref rappel des transformations de la chromatine qui se produisent durant la genèse du spermatozoïde ainsi qu'après son entrée dans l'ovocyte nous permet de mieux comprendre pourquoi des défauts de condensation ou de décondensation de sa chromatine peuvent entraîner des troubles fonctionnel graves.

La cytométrie en flux est une technique particulièrement bien adaptée à l'investigation des changements susmentionnés de la chromatine spermatique. Dans cette technologie, des cellules en suspension passent en file indienne à travers un faisceau de lumière laser. Les variations de réfraction provoquées par chacune d'elles sur ce faisceau sont analysées, sauvegardées sur ordinateur et peuvent être reprises ultérieurement. Evenson et coll. [16, 18] ont mesuré la condensation de la chromatine en soumettant ces cellules à des colorations fluorescentes à l'acridine orange ou à l'iodure de propidium qui se lie à l'ADN.

Ces colorants s'intercalent en effet entre les bases des doubles chaînes d'ADN et réagissent à la lumière laser en émettant des fluorescences de longueurs d'onde spécifiques. La liaison de protéines aux chaînes d'ADN diminue l'accès des colorants à ces chaînes et diminue l'intensité de la fluorescence. Evenson [18] s'est servi de cette baisse de fluorescence dans l'étude de la condensation de la chromatine spermatique, tandis qu'à l'inverse, Samocha-Bone et coll. [51] ont utilisé l'augmentation de la fluorescence pour suivre le processus de décondensation de la chromatine.

Nous passerons en revue des études riches en

références bibliographiques sur l'analyse structurale de la chromatine spermatique en cytométrie en flux. L'accent sera mis sur la condensation et la décondensation nucléaire ainsi que sur des applications cliniques possibles.

1. Les méthodes d'analyse de la chromatine spermatique :

Diverses méthodes ont été utilisées pour examiner la structure de la chromatine. Bartoov [5] et Dadoune [13] se sont servi de la microscopie électronique de transmission. Haidl et Schill, [25] ont utilisé la coloration des histones au bleu d'aniline.

Dans l'une des études pionnières ayant utilisé la cytométrie en flux, Janca et coll. [29] ont suivi les modifications nucléaires des cellules de la lignée germinale de la souris durant la première onde de spermatogenèse. Elle a été suivie par des travaux similaires chez la souris, le rat, le singe et le hamster [1, 33, 35]. Cette technique, capable de détecter des cellules haploïdes, diploïdes ou tétraploïdes dans des suspensions de cellules testiculaires, a également permis de détecter le temps précis d'apparition des spermatides dans la première vague de spermatogenèse. Elle a aussi permis de calculer la proportion des cellules haploïdes, diploïdes et triploïdes dans ces suspensions. Ce type d'investigation a été utilisé par différents groupes pour étudier des facteurs affectant la spermatogenèse [54, 47, 55]. Chez un homme qui présentait une déficience de la réduction méiotique, Weissenberg et coll. [61] ont récemment démontré par la cytométrie en flux et l'hybridation *in situ* (FISH) la nature diploïde de la plupart des spermatozoïdes éjaculés. De nombreux chercheurs se sont servi de la cytométrie en flux avec divers colorants fluorescents de l'ADN tels que l'iodure de propidium [14, 37] et le bromure d'éthidium [40]. C'est Ballachey et coll. [3] qui ont proposé l'acridine orange pour la cytométrie en flux de la chromatine spermatique.

2. Définitions des anomalies structurales de la chromatine :

Les valeurs du quotient de la fluorescence rouge par la somme des fluorescences verte et

rouge ainsi que de sa déviation standard sont très utiles pour étudier la vulnérabilité de l'ADN spermatique à la dénaturation acide in situ. Evenson et coll. [19] ont rapporté dans le sperme de donneurs, des cytogrammes verts et rouges bien définis et stables à longue échéance.

Nous avons également utilisé la coloration d'Evenson, mais nous nous sommes servi de critères complémentaires, le pourcentage de cellules projetées dans diverses bandes de l'aire de dispersion, selon leur fluorescence rouge et verte (Fig. 1). À l'aide de la coloration d'Evenson et de ces critères, des investigations faites sur des spermatozoïdes prélevés de régions proximales et distales de l'épididyme, nous ont permis, chez le hamster [58] et chez l'homme [20], d'évaluer la proportion de spermatozoïdes ayant achevé leur maturation épидидymaire. Durant ce processus de condensation, une baisse parallèle de l'intensité des deux fluorescences, rouge et verte, a été observée, le quotient rouge - vert restant constant. Ainsi, chez l'homme, ce quotient ne mesure pas le degré de condensation de la chromatine spermatique.

Nous avons mesuré chez l'homme [21] le degré de condensation de la chromatine spermatique dans des éjaculats divers. Des différences ont été observées entre les spermés normaux (Fig. 2) et certains éjaculats d'hommes infertiles (Fig. 3, 4, 5). Des travaux en cours fondés sur le cytogramme de fluorescence rouge et verte, il ressort, chez l'homme, que la cytométrie en flux à l'acridine orange permet d'évaluer la qualité de la chromatine spermatique et de découvrir dans certains éjaculats divers types d'anomalies :

1. Excès de spermatozoïdes hypocondensés (Fig. 3), le pourcentage des spermatozoïdes ayant complété leur condensation nucléaire étant présenté en pourcentage de maturité.
2. Excès de spermatozoïdes hypercondensés (Fig. 4).

Ces deux types d'anomalies ont également été mis en évidence chez l'homme par une méthode de coloration différente [14] au bromure d'éthidium et à la mithramycine.

3. Présence de sous-groupes satellites de spermatozoïdes avec un quotient de fluorescence rouge - vert plus élevé que celui des cellules qui se projettent dans la bande normale (Fig. 5). Dans le système d'Evenson et coll. [19], ses sous-groupes satellites ont un quotient de fluorescence plus élevé que la normale et correspondraient sans doute à la population marginale, fortement colorée à l'iodure de propidium, rapportée par Pasteur et coll. [40], et qui représenterait, selon eux, un groupe de spermatozoïdes à condensation nucléaire altérée et à chromatine instable. Peluso et coll. [42] rapportent également un pourcentage de spermatozoïdes avec ADN dénaturé plus élevé chez des sujets inféconds que chez les hommes normaux. Les populations satellites à quotient élevé de fluorescence rouge - verte (Fig. 5) correspondraient aux spermatozoïdes à têtes rouges. Ce type de spermatozoïdes a été également observé au microscope après coloration à l'acridine orange [48, 56]. Des études complémentaires sont nécessaires pour élucider la nature de la condensation de l'ADN dans ces cellules.

3. Rôle de l'épididyme dans la condensation du noyau :

La possibilité aujourd'hui d'injecter dans les ovocytes des spermatozoïdes très difficiles à trouver et à peine mobiles d'un éjaculat pratiquement azoospermique et de générer toutefois un pronucléus mâle et un développement embryonnaire normal a bouleversé nos conceptions sur le traitement de l'infertilité. La possibilité d'injecter également avec succès des spermatozoïdes non-éjaculés, aspirés de la tête de l'épididyme ou prélevés d'une biopsie du testicule ou même, chez l'animal, des spermatides testiculaires comme l'ont fait Uehara et Yanagimachi en 1977 [57], nous invite à une réflexion renouvelée. Quelle est l'importance du processus physiologique de maturation et du rôle de l'épididyme tel qu'il a été rapporté par Cooper en 1993 [12].

L'analyse de microphotographies électroniques a permis à Auger & Dadoune en 1993 [2], de montrer que les spermatozoïdes de la tête de l'épididyme n'étaient pas très différents des spermatozoïdes testiculaires. Par contre, des différences notables étaient discernées entre

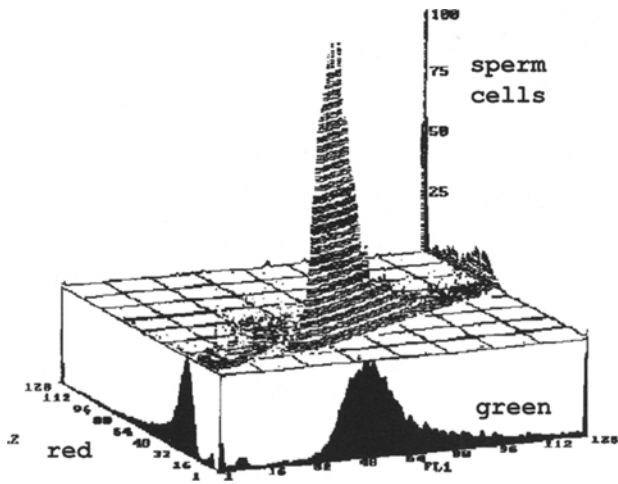


Figure 1. Aire de dispersion en fonction des fluorescences émises, rouge et verte. L'acridine orange émet une fluorescence verte avec l'ADN à bande double et une fluorescence rouge avec l'acide nucléique à bande unique. L'un des avantages de la cytométrie en flux est de présenter les résultats de l'échantillon examiné à un double échelon, individuel, pour chaque spermatozode, et global, pour toutes les cellules (valeurs moyennes).

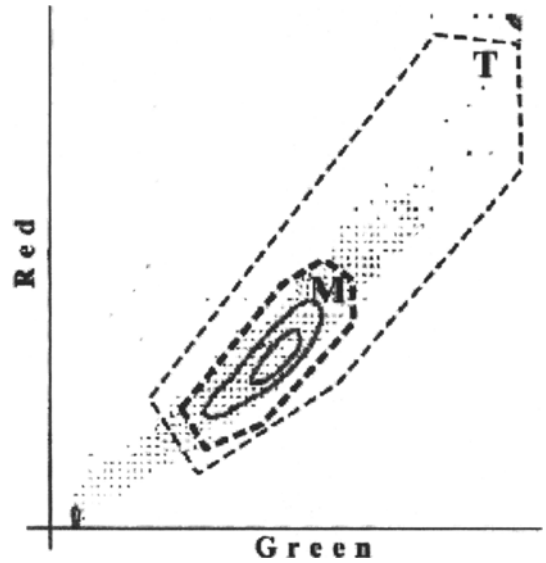


Figure 2 : Aire de dispersion des spermatozoïdes d'un groupe de référence normal. L'échantillon de sperme coloré à l'acridine orange a été analysé par la cytométrie en flux. 80 à 90 % des spermatozoïdes d'échantillons normaux se dispersent dans une bande bien définie (T). Le pourcentage de spermatozoïdes concentrés dans la zone M, 65 à 80 %, correspond aux spermatozoïdes bien matures de la queue de l'épididyme. Les axes -x- et -y- représentent l'intensité respective de chacune des fluorescences émises, verte ou rouge. (Golan et coll.: *Molecular Human Reproduction*, 1997, 3 (1): 47-54, avec permission)

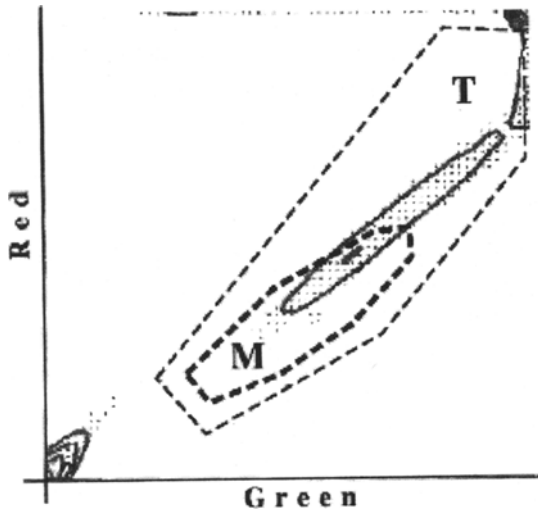


Figure 3 : Echantillon de sperme coloré à l'acridine orange et analysé par la cytométrie en flux. L'aire de dispersion montre un pourcentage élevé de spermatozoïdes hypocondensés (Golan et Coll.: *Molecular Human Reproduction*, 1997, 3 (1): 47-54, avec permission).

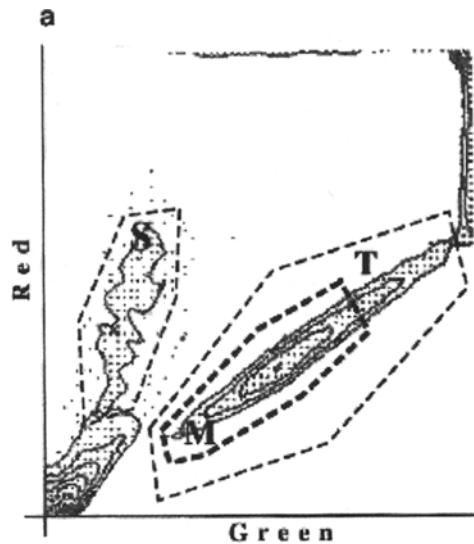


Figure 4. Aire de dispersion en cytométrie en flux à l'acridine orange d'un échantillon de sperme contenant un pourcentage élevé de spermatozoïdes hypercondensés. (Golan et Coll.: *Molecular Human Reproduction*, 1997, 3 (1): 47-54, avec permission).

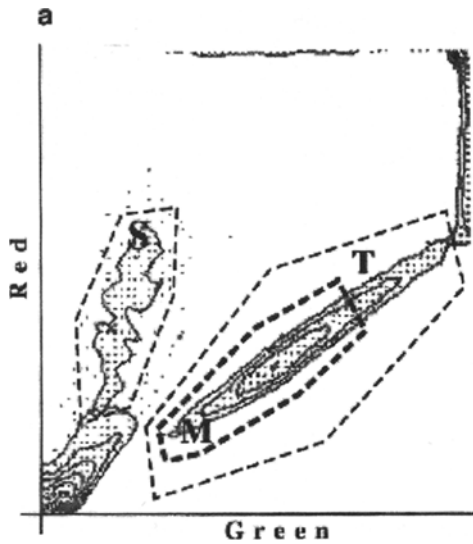


Figure 5. Aire de dispersion en cytométrie en flux à l'acridine orange d'un échantillon de sperme contenant un pourcentage accru de spermatozoïdes aberrants. Ces spermatozoïdes se concentrent dans une zone satellite (S) avec un quotient de fluorescence rouge - vert plus élevé que la normale. On note également des débris cellulaires près de l'origine des axes x et y. Les spermatozoïdes à quotient normal de fluorescence se trouvent dans la bande principale (T. Golan et coll.; *Molecular Human Reproduction*, 1997, 3 (1): 47-54, avec permission)

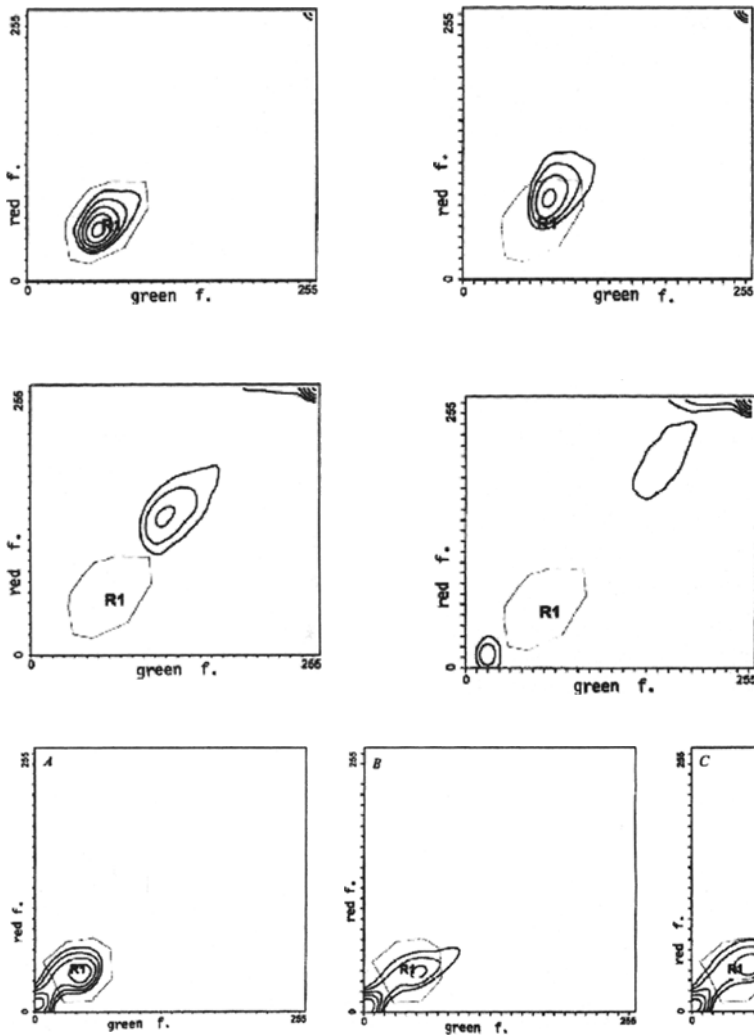


Figure 6 : Aires de dispersions de spermatozoïdes du groupe de référence normale. L'échantillon de sperme soumis à une épreuve de décondensation de 30 minutes a été examiné en cytométrie en flux à l'acridine orange aux temps 0(A), 10(B), 20(C) et 30 minutes (D). La zone incluse dans la fenêtre R1 correspond aux spermatozoïdes bien matures. L'intensité des deux fluorescences augmente avec la durée de l'épreuve. (Samocha-Bone et coll.; *Molecular Human Reproduction*, 1998, 4 (2): 133-37, avec permission)

Figure 7. Aires de dispersion des spermatozoïdes présentant une décondensation nucléaire déficiente. L'éjaculat, soumis à une épreuve de décondensation de 30 minutes, a été examiné par la cytométrie en flux à l'acridine-orange aux temps 0(A), 20(B) et 30 minutes (C). La zone incluse dans la fenêtre R1 correspond aux spermatozoïdes matures. L'intensité des deux fluorescences n'augmente sensiblement pas avec la durée de l'épreuve. (Samocha-Bone et coll., *Molecular Human Reproduction*, 1998, 4 (2): 133-37, avec permission)

les spermatozoïdes de la tête et ceux de la queue de l'épididyme.

Il ressort aussi de nos travaux [21, 22] chez l'homme que, au terme du processus de la spermatogenèse dans le testicule, la condensation de l'ADN est encore incomplète dans le spermatozoïde. Pour la plupart des spermatozoïdes, la condensation du noyau s'achève durant leur passage dans l'épididyme. De nombreux indices laissent à penser que les anomalies de condensation de la chromatine pourraient être d'origine épидидymaire. Selon Evenson [17], Yossefi [58] et Golan [20, 21, 22] chez la souris, le rat, le hamster, le singe et l'homme, la cytométrie en flux confirme le fait que le processus de condensation de la chromatine des spermatozoïdes se déroule en grande partie durant leur transit épидидymaire. Ces auteurs ont montré, que la chromatine des spermatozoïdes prélevés des portions proximales de l'épididyme était moins condensée que celle des spermatozoïdes prélevés à distance de la queue épидидymaire.

Ces observations sont à rapprocher du succès de la fécondation *in vitro* (FIV) pratiquée avec des spermatozoïdes épидидymaires. Dans plusieurs espèces, des spermatozoïdes immatures pourraient féconder des ovocytes, mais seraient incapables de générer des embryons viables [36]. Il semblerait que cela soit également vrai chez l'homme. En effet, à l'époque où l'on pratiquait la FIV classique dans les cas d'obstruction vaso-épидидymaire, les spermatozoïdes aspirés des régions proximales de l'épididyme donnaient un taux de grossesse plus faible [41, 52] que ceux qui avaient été prélevés de régions plus distales.

Applications cliniques :

De nombreux travaux [5, 14, 15] avaient déjà montré que le processus de condensation nucléaire pouvait être incomplet dans certains éjaculats. La qualité de la chromatine spermatique, facteur important de la fécondation, est particulièrement critique lorsqu'il faut sélectionner arbitrairement un spermatozoïde pour micro-injection ovocytaire. Roux et Dadoune [48] ont trouvé dans le sperme une bonne corrélation entre la maturité nucléaire et la stabilité de la chromatine. Dans le sperme

réchauffé et soumis à la cytométrie en flux à l'acridine orange, Evenson et coll. [19] ont trouvé chez des sujets inféconds, un degré plus fort de dénaturation de l'ADN que chez des hommes normaux. Ces auteurs [19] ont fait des observations similaires chez le taureau. Chez des donneurs de sperme, Spanò et coll. [54] ont récemment étudié en cytométrie en flux à l'acridine orange l'influence de facteurs ambiants divers sur la chromatine spermatique.

À la suite de nombreuses études chez l'homme et l'animal [3, 14, 15, 19, 29, 53], Golan et coll. [20] ont évalué dans l'éjaculat, selon le degré de condensation de la chromatine en cytométrie en flux à l'acridine orange, le pourcentage de spermatozoïdes ayant achevé la maturation épидидymaire. Outre les anomalies de condensation, d'autres défauts ont été révélés, susceptibles de causer un échec en micro-injection. Dans une autre étude utilisant la même technique [21] et portant sur 121 éjaculats de sujets inféconds adressés par divers centres d'infertilité, neuf contenaient un pourcentage élevé de spermatozoïdes hypocondensés et six, un pourcentage élevé de spermatozoïdes hypercondensés. Dans 15 éjaculats, d'autres aberrations étaient mises en évidence, telles qu'un rapport anormalement élevé de fluorescence rouge et verte dans des groupes satellites de spermatozoïdes. Ces éjaculats présentaient pour la plupart des anomalies multiples de numération, de mobilité ou de morphologie mais ne formaient pas un échantillon randomisé et représentatif. Aussi, le pourcentage des anomalies chromatiniennes découvertes ne peut refléter leur fréquence réelle dans les populations étudiées. Ce travail a néanmoins mis au point une méthode fiable qui peut permettre une analyse systématique des anomalies de la chromatine dans des entités cliniques bien déterminées.

Confirmant les travaux plus anciens de Le Lannou et Blanchard [32], les techniques de sélection de spermatozoïdes, migration ascendante ou centrifugation sur gradient de Percoll, ont permis dans certains éjaculats d'augmenter la proportion de spermatozoïdes à structure chromatinienne normale. À l'aide d'une technique différente, le dosage des

nucléoprotéines en électrophorèse, Collet et coll. [11] ont également confirmé chez l'homme que ces deux techniques de sélection amélioreraient la qualité de la chromatine du sperme.

On peut mettre en évidence les défauts de liaison des protamines à l'ADN en soumettant les noyaux des spermatozoïdes à des réactifs appropriés avant de les colorer à l'acridine orange. Chez le hamster, la phosphatase alcaline renforcerait la condensation nucléaire des spermatozoïdes prélevés des régions proximales de l'épididyme [58] mais n'aurait aucun effet sur les spermatozoïdes des régions distales. Cette enzyme libérerait les phosphates de la protamine phosphorylée et resserreraient les liaisons des protamines à l'ADN. L'application similaire à des éjaculats humains d'un traitement à la phosphatase alcaline, n'a pas augmenté le degré de condensation de la chromatine bien que, chez certains sujets inféconds, elle pouvait affecter la chromatine de sous-groupes satellites. L'oxydation de certains radicaux sulfhydriques des protamines pourrait aussi renforcer la condensation de la chromatine [6, 30]. La diamide renforcerait également la condensation de la chromatine spermatique chez le hamster [58] tandis que le dithiothréitol, agent réducteur, aurait un effet opposé. Le dithiothréitol renforcerait la double fluorescence verte et rouge et déplacerait les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme hors de la bande des spermatozoïdes matures. Par contre, le traitement à la diamide ne modifie pas le pourcentage de la chromatine mature dans les éjaculats de sujets normaux ou inféconds. L'oxydation des radicaux sulfhydriques ne serait donc pas le facteur bloquant de la maturation de la chromatine dans les éjaculats examinés.

Les défauts de décondensation du noyau spermatique :

Pour Sakkas et coll. [50] qui ont examiné des ovocytes non fécondés après micro-injection, des défauts de condensation de la chromatine, ainsi que d'autres altérations, pourraient perturber la décondensation spermatique indispensable au déroulement normal du processus de la fécondation. De nos jours, le rôle prépondérant de la micro-injection dans l'assistance médicale à la procréation souligne l'intérêt de

l'analyse de la chromatine dans certains éjaculats redevables de cette technologie. Pour Philpott [44, 45] et Perrault [43], les liens sulfhydriques des protamines sont réduits lorsque le spermatozoïde pénètre dans le cytoplasme ovocytaire et les nucléoplasmines ovocytaires libèrent les protamines de l'ADN et leur substituent les histones ovocytaires. C'est ce qui permet à la tête du spermatozoïde de se déployer.

Plusieurs groupes, [4, 8, 10, 28, 31, 34, 38, 39, 46] ont étudié la décondensation de la chromatine spermatique par l'observation au microscope des modifications de forme et de taille des noyaux spermatiques. Pour obtenir des résultats significatifs, ces techniques subjectives requièrent un examen long et patient de cellules aussi nombreuses que possible. Il est également fort difficile d'établir des critères de décondensation précis et admis par tous. Aussi, la cytométrie en flux constitue l'alternative de choix.

Jager et coll. [28] ont essayé diverses techniques *in vitro* pour imiter le processus de décondensation. Zucker et coll. [62] ont induit la décondensation des spermatozoïdes du rat et du hamster avec le dodecyl-sulfate de soude et l'agent réducteur dithiothréitol. La décondensation a été évaluée par la mesure de la diffraction lumineuse.

La technique de Montag et coll. [38], permet d'induire la décondensation de la chromatine spermatique à l'aide de l'héparine, riche en charges négatives, et du beta-mercapto-éthanol qui réduit les liens sulfhydriques de la protamine. Samocha-Bone et coll. [51] ont appliqué cette technique à des spermatozoïdes humains normaux. La cytométrie en flux à l'acridine orange a montré une augmentation de fluorescence des spermatozoïdes. Cette augmentation se traduit par le déplacement des cellules à droite de la zone [21] des spermatozoïdes matures où se concentrent les cellules à chromatine condensée. Ce déplacement se mesure d'une manière très fiable et avec une excellente répétitivité, par la baisse du pourcentage de cellules restées dans la zone mature (Fig. 6).

Plusieurs équipes, [7, 9, 24, 34, 50], ayant uti-

lisé la technique d'examen microscopique, ont suggéré qu'une condensation défectueuse de la chromatine pourrait être mise en évidence dans certains cas d'infertilité. Il serait donc utile, dans certains éjaculats, d'évaluer le pourcentage de spermatozoïdes présentant une chromatine inapte à se décondenser et susceptibles, même après micro-injection, de ne pas féconder l'ovocyte.

Néanmoins, Hamamah et coll. [26] n'ont trouvé en micro-injection aucune différence du pourcentage des spermatozoïdes à chromatine normale entre les cas ayant eu une grossesse et les autres.

La technique de Samocha-Bone et coll. [51] a permis de détecter d'une manière rapide et efficace des éjaculats contenant un pourcentage élevé de spermatozoïdes incapables de se décondenser (Fig. 7). Il s'agissait de trois éjaculats de paraplégiques sur six, obtenus par électro-éjaculation. Il se pourrait que, durant leur rétention prolongée dans la queue de l'épididyme, un nombre accru de spermatozoïdes aient subi une oxydation de leurs radicaux sulfhydriques. De plus, sur trois éjaculats qui présentaient des taux de pénétration insuffisants dans l'épreuve du hamster, l'un d'eux montrait aussi une décondensation ralentie dans l'épreuve de décondensation.

Possibilités d'avenir :

La congélation de spermatozoïdes non-éjaculés, prélevés chirurgicalement, est pratiquée de plus en plus fréquemment et permet des cycles de fécondation assistée supplémentaires sans réintervention chirurgicale. Pour Royère et coll. [49] il faudrait améliorer les techniques de cryo-préservation, en tenant compte non seulement des critères habituels de mobilité, viabilité et d'intégrité des membranes plasmatiques mais surtout de l'intégrité et de la stabilité de la chromatine nucléaire.

Dans des cas à haut risque d'échec en fécondation assistée, des recherches futures pourraient contribuer à mettre au point des traitements *in vitro* applicables à des éjaculats défectueux avant la micro-injection. On pourrait par exemple, traiter les spermatozoïdes

avec des agents réducteurs de liens sulfhydriques ou bien sélectionner d'une manière efficace les spermatozoïdes aptes à se décondenser. La cytométrie en flux pourrait trier les cellules selon les caractéristiques de leur fluorescence. Il devrait donc être possible, dans un avenir plus ou moins proche, de traiter un éjaculat de mauvaise qualité à l'aide de marqueurs appropriés et de sélectionner les spermatozoïdes à des fins thérapeutiques en fonction de la qualité de leur chromatine. Il faudrait cependant que ces marqueurs fluorescents soient non toxiques et lavables avant la micro-injection. Il faut relever à ce propos, l'observation faite par Hoshi et coll. [27] sur des noyaux de spermatozoïdes qui, soumis à des modifications ambiantes violentes sont restés capables de former un pronucléus dans des ovocytes de hamster et d'induire un développement embryonnaire précoce. Des travaux complémentaires chez l'animal sont indispensables avant d'envisager chez l'homme l'application de tels procédés de sélection qui pourraient prendre la relève de la migration ascendante ou de la centrifugation sur gradient de Percoll.

REFERENCES

1. ARAVINDAN G.R., RAVINDRANATH N., GOPALAKRISHNAN K., MOUDGAL N.R. : DNA flow cytometric analysis of testicular germ cell populations of the Bonnet Monkey (*Macaca radiata*) as a function of sexual maturity. *J Reprod Fertil.*, 1990, 89:397-406.
2. AUGER J., DADOUNE J.-P.: Nuclear status of human sperm cells by transmission electron microscopy and image cytometry: changes in nuclear shape and chromatin texture during spermatogenesis and epididymal transit. *Biol Reprod*, 1993, 49:166-75.
3. BALLACHEY B.E., EVENSON D.P., SAACKE R.G. : The Sperm Chromatin Structure Assay. *J. Androl.*, 1988, 9: 109-15.
4. BANERJEE S., HULTEN M.A.J.: Sperm nuclear chromatin transformations in somatic cell-free extracts. *Mol. Reprod. Dev.* , 1994, 37: 305-17.
5. BARTOOV B., ELTES F., WEISSENBERG R., LUNENFELD, B.: Morphological characterization of abnormal human spermatozoa using transmission electron microscopy. *Arch. Androl.*, 1980, 5: 305-22.
6. BEDFORD J.M, CALVIN, H.I.: The occurrence and possible functional significance of S-S crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *J. Exp. Zool.*, 1974 188: 137-56.
7. BROWN, D.B., NAGAMANI, M.: Use of *Xenopus lae-*

- vis frog egg extract in diagnosing human male unexplained infertility. *Yale J. Biol. Med.*, 1992, 65: 29-38.
8. CAMERON L.A., POCCIA D.L. : In vitro development of the sea urchin male pronucleus. *Dev. Biol.*, 1994, 162: 568-78.
 9. CHAN P.J., TREDWAY D.R. : Association of human sperm nuclear decondensation and in vitro penetration ability. *Andrologia*, 1992, 24: 77-81.
 10. CHITALE A.R., RATHAUR R.G.: Nuclear decondensation of sperm head and failure at in vitro fertilization: An ultrastructural study. *Hum. Reprod.*, 1995, 10: 594-8.
 11. COLLEU D., LESCOAT , GOURANTON J. : Nuclear maturity of human spermatozoa selected by swim-up or by Percoll gradient centrifugation procedures. *Fertil. Steril.*, 1996, 65, 160-4.
 12. COOPER T. G. : The human epididymis - is it necessary? *J. Androl.*, 1993, 16, 245-250.
 13. DADOUNE J.P. : The nuclear status of human sperm cells. *Micron.*, 1995, 26:323-45
 14. ENGH, E., CLAUSEN, O.P., SCHOLBERG, A., TOLLEFSRUD, A., PURVIS, K. : Relationship between sperm quality and chromatin condensation measured by DNA fluorescence using flow cytometry. *Int. J. Androl.*,1992, 15:407-15.
 15. EVENSON, D.P., MELAMED M.R.: Rapid analysis of normal and abnormal cell types in human semen and testis biopsies by flow cytometry. *J. Histochem. Cytochem.* 1983, 31(1A Suppl) : 248 253.
 16. EVENSON D.P., DARZYNKIEWICZ Z., JOST, L., JANCA F., BALLACHEY B. : Changes in accessibility of DNA to various fluorochromes during spermiogenesis. *Cytometry*, 1986, 7: 45-53.
 17. EVENSON D.P., BAER R.K., JOST L.K. : Flow cytometric analysis of rodent epididymal sperm chromatin condensation and loss of free sulfhydryl groups. *Mol. Reprod. Dev.*, 1989, 1:283-8
 18. EVENSON, D.P. : Flow cytometric analysis of male germ cell quality. *Methods Cell Biol.*,1990, 33: 401-10.
 19. EVENSON, D.P., JOST, L.K., BAER, R.K., TURNER, T.W. AND SCHRADER, S.M. Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the Sperm Chromatin Structure Assay. *Reproductive Toxicology*,1991, 5: 115-25.
 20. GOLAN R., COOPER T.G., OSCHRY Y., et coll.: Changes in chromatin condensation of human spermatozoa during epididymal transit as determined by flow cytometry. *Human Reprod*, 1996,11: 1457-62.
 21. GOLAN R., SHOCHAT L., SOFFER Y. et coll. : Evaluation of chromatin condensation in human spermatozoa: a flow cytometric assay using acridine orange staining. *Mol Human Reprod*, 1997a, 3: 47-54.
 22. GOLAN R., COOPER T.G., OSCHRY Y., WEINBAUER G. F., SHOCHAT L. , LEWIN L.M.: Epididymal maturation of chromatin in spermatozoa from control monkeys (*Macaca fascicularis*) and those treated with Cetrorelix, a gonadotrophin-releasing-hormone antagonist. *Biol. Reprod.*,1997b, 57:534-539.
 23. GREEN G.R., BALHORN R., POCCIA D.L., HECHT N.B.: Synthesis and processing of mammalian protamines and transition proteins : *Mol. Reprod. Dev.*, 1994, 37 : 255-63.
 24. GRIVEAU, J.F., CHARBONNEAU, M., BLANCHARD, Y. et al.: Decondensation of human sperm nuclei and HP1 protamine degradation from normospermia and asthenospermia in *Xenopus* egg extracts. *Archives Androl.*, 1992, 29: 127-36
 25. HAIDL, G., SCHILL, W.B. (1994) Assessment of sperm chromatin condensation: an important test for prediction of IVF outcome. *Arch. Androl.* 32:263-266.
 26. HAMAMAH S., COUET M.L., CORCIA L., POINDRON J., ROYERE D., LANSAC J. Does human sperm quality and the time of ICSI injection following HCG administration influence the ICSI outcome? Abstract Vol. P-071, *Human Reprod*, 1998, 13: 165.
 27. HOSHI K., YANAGIDA K., KATAYOSE H. YAZAWA H., SATO A., YANAGIMACHI R. : Change of function during sperm maturation. In: "Perspectives on Assisted Reproduction, Mori, T., Aono, T., Tominaga, T., Hiroi, M. eds. Rome, Ares-Serono Symp. Pubs, 1994, 617-24.
 28. JAGER S., WIJCHMAN J. , KREMER J. : Studies on the decondensation of human, mouse and bull sperm nuclei by heparin and other polyanions. *J. Exp. Zool.*,1990, 256: 315-22.
 29. JANCA F.C., JOST L.K., EVENSON D.P.: Mouse testicular and sperm cell development characterized from birth to adulthood by dual parameter flow cytometry. *Biol Reprod.* ,1986, 34: 613-23.
 30. KOSOWER, N. S., KATAYOSE, H., YANAGIMACHI, R. : Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J. Androl.*, 1992,13: 342-8.
 31. LASSALLE B., TESTART J. : Sequential transformation of human sperm nucleus in human egg. *J. Reprod. Fertil.*,1991, 91: 393-402.
 32. LE LANNOU D., BLANCHARD Y. : Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by Percoll density gradient centrifugation or swim-up procedure. *J. Reprod. Fertil.*, 1988, 84: 551-6.
 33. LEWIN L. M., SHOCHAT L. & GOLAN R. (1998) Surfing the first spermatogenic wave: A flow cytometric investigation. *Isr. Fert. Soc. Ann. Meeting. Abstract Vol. P18.*
 34. LIPITZ, S., BARTOOV, B., RAJUAN, C. et coll. Sperm head ultramorphology and chromatin stability of males with unexplained infertility who fail to fertilize normal human ova in vitro. *Andrologia*,1992, 24: 261-69.
 35. MALKOV M., FISHER Y, DON J. Developmental

- schedule of postnatal rat testis determined by flow cytometry. *Biol Reprod.*,1998 59: 84-92._
36. MIEUSSET R.: Spermatozoa and embryo development. In: Hamamah S, Mieusset R., Dacheux JL eds. *Frontiers in endocrinology. Epididymis: Role and importance in male infertility treatment.* Rome, Ares Serono Symposia, 1995: 105-28.
 37. MOLINA J., CASTILLA J.A., GIL T., HORTAS M.L., VERGARA F., HERRUZO, A.: Influence of incubation on the chromatin condensation and nuclear stability of human spermatozoa by flow cytometry. *Human Reprod.*,1995, 10:1280-6.
 38. MONTAG M., TOK V., LIOW S.L. et coll.: In vitro decondensation of mammalian sperm and subsequent formation of pronuclei-like structures for micromanipulation. *Mol. Reprod. Devel.*, 1992, 33: 338-346.
 39. MORCOS Y., SWAN M.A. : Reactivated movement of decondensed rat sperm models and a description of their ultrastructure. *J. Exp. Zool.*, 1994, 270: 388-98.
 40. PASTEUR X., METEZEAU P., MAUBON I., SABIDO O., KIEFER H. : Identification of two human sperm populations using flow and image cytometry. *Mol. Reprod. Dev.*, 1994, 38:303-9.
 41. PATRIZIO P, ORD T, SILBER S J , ASCH R H (1994) Correlation between epididymal length and fertilization rate of men with congenital absence of the vas deferens. *Fertil. Steril.*,61:265-8.
 42. PELUSO J.J., LUCIANO A.A. AND NULSEN J.C.: The relationship between alterations in spermatozoal deoxyribonucleic acid, heparin binding sites, and semen quality. *Fertil. Steril.*, 1992, 57: 665-70.
 43. PERRAULT S.D. : Chromatin remodeling in mammalian zygotes. *Mutat. Res.*, 1992, 296:43-55.
 44. PHILPOTT A., LENO G.H., LASKEY R.A. : Sperm decondensation in *Xenopus* egg cytoplasm is mediated by nucleoplasmin . *Cell*, 1991, 65 : 569-78.
 45. PHILPOTT A., LENO G.H. : Nucleoplasmin remodels sperm chromatin in *Xenopus* egg extracts. *Cell*, 1992, 69 : 759-67.
 46. REYES R., Sanchez-Vazquez M.L., Merchant-Larios H. et al. : Effect of heparin-reduced glutathione on hamster sperm DNA unpacking and nuclear swelling. *Arch. Androl.*, 1996, 37: 33-45.
 47. ROSIEPEN G., WEINBAUER G.F., SCHLATT S., BEHRE H.M., NIESCHLAG E. : Duration of the cycle of the seminiferous epithelium estimated by the 5-bromo-deoxy-uridine technique in laboratory and feral rats. *J Reprod Fertil.*, 1994, 100 : 299-306.
 48. ROUX C., DADOUNE J. P. : Use of acridine orange staining on smears of human spermatozoa after heat-treatment: evaluation of the chromatin condensation. *Andrologia*,1989, 21: 275-81.
 49. ROYERE D., BARTHELEMY C., HAMAMAH S., LANSAC J. Cryopreservation of spermatozoa : a 1996 review. *Human Reprod Update*,1996, 2: 553-9.
 50. SAKKAS D., URNER F., BIANCHI P.G. et coll. : Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reprod.*, 1996, 11: 837-43.
 51. SAMOCHA-BONÉ D., LEWIN L.M., WEISSENBERG R et coll. : In vitro human spermatozoa nuclear decondensation. *Mol Human Reprod*, 1998, 4: 133-7.
 52. Schlegel P.N., Alikani M., Berkeley A.S. et coll. Epididymal micropuncture with in vitro fertilization and oocyte micromanipulation for the treatment of unreconstructable obstructive azoospermia. *Fertil. Steril.*,1994, 61, 895-901.
 53. SPANO M. & EVENSON D.P. : Flow cytometric analysis for reproductive biology. *Biol. Cell*, 1993, 78 : 53-62.
 54. SPANÒ M., KOLSTAD A.H., LARSEN S.B., et coll. The applicability of the flow cytometric sperm chromatin structure assay in epidemiological studies. *Human Reprod*, 1998, 13:2495-2505.
 55. SUTER L., KOCH E., BECHTER R., BOBADILLA M. (1997) Three parameter flow cytometric analysis of rat spermatogenesis. *Cytometry* 27:161-168.
 56. TEJADA R. I., MITCHELL J. C., NORMAN A., MARIK J. J., FRIEDMAN S. : A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil. Steril.*, 1984, 42: 87-91.
 57. UEHARA T. , YANAGIMACHI R. : Behaviour of nuclei of testicular, caput and cauda epididymal spermatozoa injected into hamster eggs. *Biol. Reprod.*,1977, 16, 315-21.
 58. YOSSEFI S, OSCHRY Y AND LEWIN L. M. : Chromatin condensation in hamster sperm: a flow cytometric investigation. *Mol Reprod Devel.*,1994, 37, 93-8.
 59. WARD W.S.: Chromosome Organization in Mammalian Sperm Nuclei. In: Barratt C., De Jonge C., Mortimer D., Parinaud J. eds. *Genetics of Human Male Fertility.* Paris, Editions E.D.K., 1997:147-163,
 60. WEISSENBERG R., YOSSEFI S., BELLA R., LEWIN L. M. : Changes during puberty in chromatin condensation, morphology and fertilizing ability of epididymal sperm of the golden hamster. *Andrologia*, 1995, 27:341-4
 61. WEISSENBERG R., AVIRAM A., GOLAN R. et coll. : Concurrent use of flow cytometry and fluorescence in-situ hybridization techniques for detecting faulty meiosis in a human spermatozoa sample. *Mol Human Reprod*, 1998, 4 : 61-6
 62. ZUCKER R.M., PERREAULT S.D. , ELSTEIN K.H.: Utility of light scatter in the morphological analysis of sperm. *Cytometry*, 1992, 13 : 39-47.

ABSTRACT

Assessment of sperm chromatin structure using flow cytometry with acridine orange staining. Clinical interest.

Y. SOFFER , L. M. LEWIN.

During spermatogenesis, sperm nucleosomal DNA type, linked to histones, is transformed into a special form bound to small basic proteins, the protamines. This process allows sperm nucleus to condense and mature. This maturation process is achieved in the epididymis. When a spermatozoon enters an oocyte, protamines are released and replaced by histones, enabling the sperm nucleus to expand into a male pronucleus. Flow cytometry using acridine orange staining is an objective and quantitative technique well-adapted for the investigation of the chromatin structure at the level of each spermatozoon, as well as the whole ejaculate. This technique allows tracing the young sperm cell nuclei from the diploid stage, through tetraploid until the final haploid stage in mature spermatozoa. It allows also following the sperm maturation process during the epididymal transit. It detects various sperm chromatin condensation defects, hypocondensation, hypercondensation or other aberrations, as well as decondensation defects by using an in vitro assay. These defects may impair sperm fertilizing ability, even after sperm microinjection into the oocyte. Better understanding of sperm chromatin integrity and stability prerequisites might help us improving the quality of various technologies used in assisted medical procreation.

Key-Words : *Flow cytometry, acridine orange, spermatogenesis, sperm maturation, sperm fertilizing ability; assisted medical procreation, sperm chromatin, hypocondensation, hypercondensation, aberrations, chromatin decondensation defects.*