



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Apport du liquide amniotique humain (LAH) comme milieu de culture en fécondation in vitro

LANNOY, Vincent

Award date:
1993

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

**FACULTES UNIVERSITAIRES N.-D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTE DES SCIENCES**



**APPORT DU LIQUIDE AMNIOTIQUE
HUMAIN (LAH) COMME MILIEU DE
CULTURE EN FÉCONDATION *IN*
*VITRO***

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques

LANNOY Vincent

Apport du liquide amniotique humain (LAH) comme milieu de culture en fécondation *in vitro*

LANNOY Vincent

Résumé

Nous avons étudié l'apport du liquide amniotique humain (LAH) comme milieu de culture en fécondation *in vitro*, en le comparant à un milieu conventionnel, le HAM F10 additionné de 7,5% de sérum humain, considéré comme référence. Au terme de notre travail nous concluons que:

- le taux de fécondation est significativement plus élevé dans le LAH que dans le HAM;

- en ce qui concerne les spermatozoïdes, on remarque une diminution plus rapide de leur motilité s'ils sont placés dans des LAH d'âges gestationnels avancés. De plus le LAH active la réaction acrosomiale des gamètes mâles;

- la coloration au rouge de Ruthénium ne nous apporte pas de renseignement sur l'apparition du hardening spontané au sein de la zone pellucide des ovocytes;

- le LAH maintient mieux que le HAM l'intégrité morphologique de l'ovocyte et de sa zone pellucide;

- l'acrosine, contrairement à la trypsine qui est inhibée rapidement, subit une inhibition lente et progressive par le LAH. Face à ce résultat nous postulons deux hypothèses:

- 1) la réduction de l'activité protéasique de l'acrosine, par le LAH, favoriserait sa liaison à la ZP2, une glycoprotéine de la zone pellucide de l'ovocyte;
- 2) le LAH contient de puissants inhibiteurs de protéases qui en agissant sur ces dernières pourraient réduire voir supprimer de phénomène de durcissement (hardening) spontané de la zone pellucide.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques (Zoologiques)

Décembre 1993

Promoteur : R. Paquay

Co-promoteur : J-L. Bister

Au terme de ce mémoire je tiens à remercier Monsieur le professeur R. Paquay, Directeur du Laboratoire de Physiologie Animale qui a accepté d'être mon promoteur, ses conseils et sa disponibilité m'ont été d'un grand secours tout au long de ce travail.

Je remercie également le Dr Jean-Loup Bister, mon co-promoteur pour son accueil et ses conseils qu'il m'a prodigués tout au long de l'année.

Je tiens également à remercier le Dr Jean-Michel Debry, pour ses remarques judicieuses et son entière disponibilité tout au long de cette recherche.

Je voudrais encore remercier Monsieur Michel Jadot, Bernadette, ainsi que tous les membres du laboratoire de Physiologie Animale et les membres du service d'andrologie de l'I.M.P.L., pour leur accueil chaleureux et leur dévouement.

Finalement, je tiens tout particulièrement à remercier mes parents et mes amis, Françoise, Sandrina, Nancy, Christophe et Laurent avec qui j'ai partagé cette belle aventure.

TABLE DES MATIÈRES

PREMIERE PARTIE: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LES GAMÈTES	1
1.1. Sperme et spermatozoïdes humains	1
1.1.1. Le sperme	1
1.1.2. Le spermatozoïde humain normal	1
1.1.2.1. La spermatogenèse ou maturation des cellules sexuelles mâles	1
1.1.2.2. Description de la cellule mature, le spermatozoïde	2
a) La tête	3
b) Le col	3
c) Le flagelle	3
1.2. L'ovocyte	4
1.2.1. L'ovogenèse	5
1.2.2. La cellule mature: l'ovule	6
2. LA FÉCONDATION	7
2.1. Introduction	7
2.2. La pénétration du cumulus oophorus	7
2.2.1. Diminution des charges négatives en surface des spermatozoïdes	8
2.2.2. Régulation de l'efflux de cholestérol membranaire	9
2.3. Interaction du spermatozoïde avec la zone pellucide	10
2.3.1. La zone pellucide	11
2.3.2. Fixation du spermatozoïde	11
2.4. Réaction acrosomiale	13
2.4.1. Etapes	13
2.4.2. Induction par la zone pellucide	15
2.4.3. L'acrosine	15
2.5. Pénétration de la zone pellucide	17
2.6. Le fusion des gamètes	17
2.7. Activation de l'ovocyte	18
2.7.1. Changement de potentiel transmembranaire et mobilisation du Ca ⁺⁺ intracellulaire	18
2.7.2. L'augmentation du pH intracellulaire active les synthèses de l'oeuf	19
2.7.3. Exocytose des granules corticaux	19

2.7.4. Achèvement de la seconde division méiotique de l'ovocyte et expulsion du second globule polaire	20
2.8. Formation, développement et migration des pronuclei	21
2.8.1. Décondensation du noyau des spermatozoïdes	21
2.8.2. Formation et développement des pronuclei	21
2.8.3. Migration des pronuclei vers le centre de l'oeuf	22
2.8.4. Etablissement du fuseau de première division	22
3. L'INSÉMINATION (MÉDICALEMENT) ASSISTÉE	23
3.1. Introduction	23
3.2. La micro insémination ou méthode invasive	24
3.2.1. Zona drilling (ZD)	25
3.2.2. Partial Zona Dissection (PZD)	25
3.2.3. Sub-Zonal Insemination (SUZI)	26
3.2.4. Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI)	26
3.3. Les méthodes non invasives	26
3.4. Discussion	28
3.5. Les risques de la micromanipulation	29
3.6. Conclusions	29

DEUXIÈME PARTIE: TRAVAIL PERSONNEL

I. Objectifs poursuivis

II. Matériel et Méthodes

1. CONDITIONS EXPERIMENTALES	31
2. PLANS EXPERIMENTAUX ET METHODES	31
2.1. Effets des milieux sur les spermatozoïdes.....	31
2.1.1. Objectifs poursuivis	31
2.1.2. Protocole expérimental	31
2.1.3. Spermés utilisés.....	32
2.1.3.1. Le sperme congelé.....	32
2.1.3.2. Le sperme frais.....	33
2.1.4. Migration ascendante ou swim-up	33
2.1.5. Préparation des milieux	34
2.1.6. Colorations pour la mise en évidence de la réaction acrosomiale.....	34
a.) La triple coloration de Talbo et Chacon.....	34
b.) Coloration au jaune de Naphthol et à l'érythrosine B.....	35
c.) Coloration par fluorescence	36
2.1.7. Comptage des spermatozoïdes motiles	37
2.2. Effets des milieux sur l'ovocyte.....	37
2.2.1. Objectifs poursuivis	37
2.2.2. Approche histologique	37
2.2.2.1. Protocole expérimental.....	38
2.2.2.2. Obtention des ovocytes	38
2.2.2.3. Coloration et préparation des ovocytes pour le TEM.....	39
2.2.3. Approche biochimique	40
2.2.3.1. Protocole expérimental.....	40
2.2.3.2. Détermination de l'activité enzymatique	41
2.3. Analyses statistiques.....	43

III. Résultats et discussions

1. RÉSULTATS DES CYCLES COMPARATIFS.....	44
2. IMPACT DES MILIEUX SUR LES GAMÈTES MÂLES.....	44
2.1. Les colorations	44
2.1.1. Triple coloration de Talbot et Chacon.....	44
2.1.2. Coloration au jaune de Naphthol et à l'erythrosine B.....	45
2.1.3. Coloration par fluorescence.....	45
2.2. Expérience 1 : comparaison HAM F10, LAH.....	46
2.2.1. Résultats.....	46
2.2.2. Discussion	47
2.3. Expérience 2 : comparaison entre différents LAH.....	48
2.3.1. Résultats	48
2.3.1.1. La motilité.....	48
a.) Effet de l'âge gestationnel	48
b.) Effet de la préparation	48
2.3.1.2. La réaction acrosomiale.....	49
2.3.2. Discussion	49
3. IMPACT DES MILIEUX SUR LES GAMÈTES FEMELLES.....	51
3.1. Approche histologique.....	51
3.1.1. Résultats	51
3.1.2. Discussion	51
3.2. Approche biochimique.....	52
3.2.1. Résultats	53
3.2.1.1. Activités enzymatiques.....	53
3.2.1.2. Tests d'inhibition.....	53
3.2.2. Discussion	54
3.2.3. Caractérisation du ou des inhibiteur(s).....	55
3.2.4. Discussion	56

IV. Discussions générales et conclusions

1. CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	57
2. PERSPECTIVES.....	58

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

PREMIÈRE PARTIE:
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

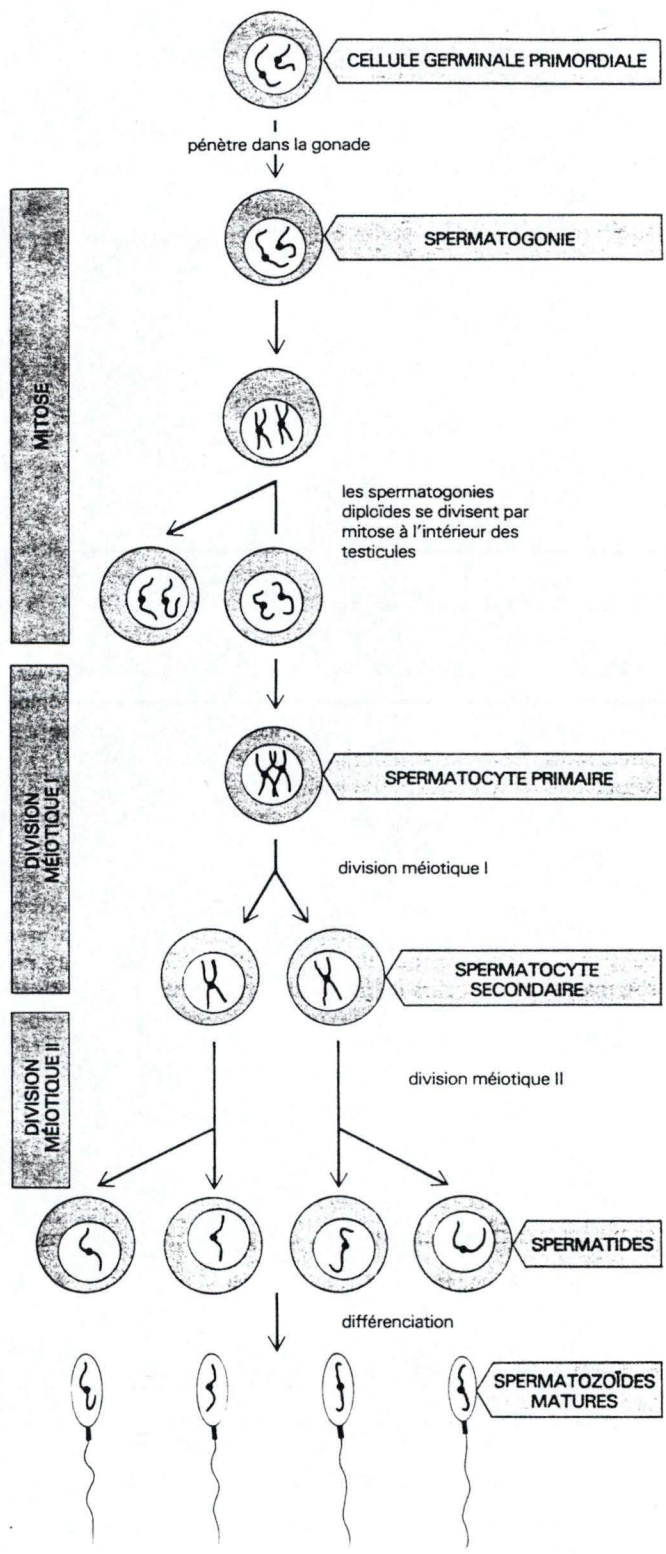


Fig. 1: Etapes de la spermatogenèse (Alberts *et al.*, 1989).

1. LES GAMÈTES

1.1. SPERME ET SPERMATOZOÏDES HUMAINS

1.1.1. Le sperme

Le sperme est constitué d'un ensemble de sécrétions d'origine testiculaire et glandulaire. Au moment de l'éjaculation, le sperme normal apparaît comme un liquide visqueux et blanchâtre dont l'odeur caractéristique est principalement due au produit d'oxydation d'un de ses constituants: la spermine. Son pH oscille entre 7 et 8. Le sperme est composé essentiellement de deux fractions:

- la fraction cellulaire comprend les spermatozoïdes et ne représente qu'une petite partie (1/100) du volume total du sperme. Outre les spermatozoïdes, on note la présence, généralement en petit nombre, d'autres cellules d'origines diverses. Celle-ci sont d'une part des leucocytes, dont le nombre est augmenté chez les individus qui présentent des infections testiculaires et du tractus génital en général et d'autre part les cellules germinales immatures.
- le liquide séminal est un mélange de sécrétions des glandes annexes du tractus génital: les vésicules séminales, la prostate et les glandes de Mery-Cowper. On peut y mettre en évidence diverses substances mais leur description dépasse le cadre de ce travail.

1.1.2. Le spermatozoïde humain normal

1.1.2.1. La spermatogenèse ou maturation des cellules sexuelles mâles

Chez l'homme, la spermatogenèse est un processus continu (Figure 1). Elle commence à la puberté et se poursuit ensuite sans interruption à partir des cellules épithéliales tapissant de très longs tubes enroulés et serrés, les tubes séminifères. Ils constituent la plus grande partie du testicule.

Les cellules germinales immatures, appelées spermatogonies, sont localisées le long de la paroi interne des tubes séminifères où elles sont reliées intimement aux cellules de Sertoli qui servent à leur maintien et à leur alimentation pendant leur

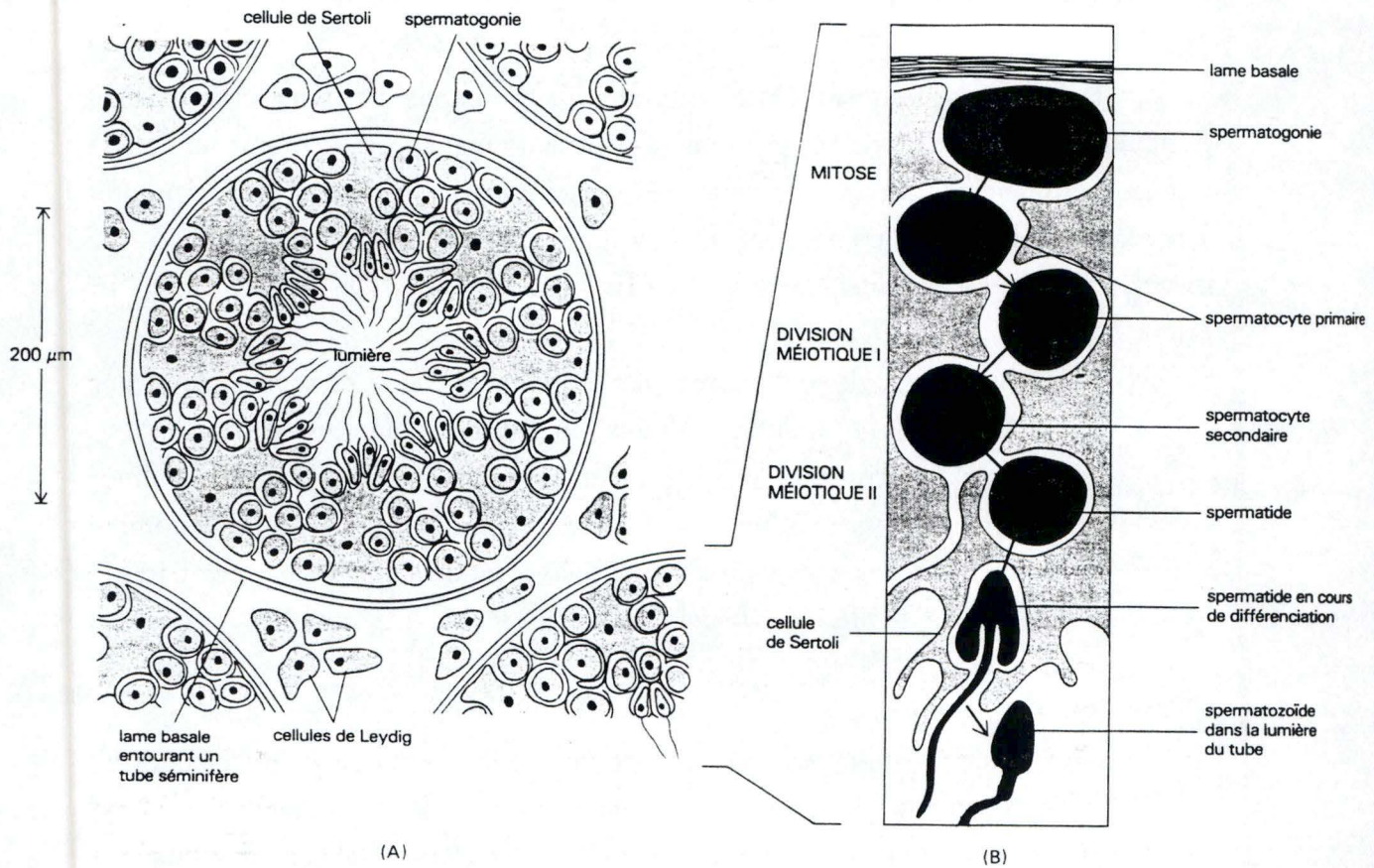


Fig. 2: (A) représentation schématique d'une coupe transversale d'un tube séminifère dans un testicule de mammifère, (B) spermatogonies en cours de division le long de la lame basale (Alberts *et al.*, 1989).

différenciation. Elles se divisent sans interruption par mitose. Certaines cellules-filles cessent de se multiplier et se différencient en spermatocytes primaires. Ces cellules entrent en première prophase méiotique. Leurs chromosomes homologues appariés y participent par enjambement. La division I de la méiose produit des spermatocytes secondaires, qui contiennent chacun des chromosomes dupliqués, 22 autosomes et un chromosome sexuel, X ou Y. Chaque chromosome est encore constitué de deux chromatides-soeurs jusqu'à ce que les deux spermatocytes secondaires subissent la division II de la méiose pour donner quatre spermatides, haploïdes.

Ces spermatides subissent alors des transformations morphologiques au cours desquelles ils se différencient en spermatozoïdes matures, qui se libèrent de la cellule de Sertoli et sont véhiculés dans la lumière du tube séminifère. Ils sont ensuite collectés par le rete testis et entreprennent leur migration dans l'épididyme, long tube enroulé de plusieurs mètres, appliqué contre une face du testicule (Alberts et *al.*, 1989).

La spermatogenèse est soumise à un contrôle extrêmement complexe et délicat. La stimulation principale provient du système hypothalamo-hypophysaire (GnRH-LH et FSH) mais l'influence d'autres hormones comme la PRL, la GH et la mélatonine est également très importante.

Cette stimulation entraîne la sécrétion d'autres hormones stéroïdiennes comme la testostérone, la dihydroxytestostérone et l'oestradiol ou peptidiques comme l'inhibine, l'activine et des facteurs de croissance (IGF 1 et 2, EGF, TGF, FGF). Ces substances agissent directement sur les productions testiculaires et en rétro-action sur le système hypothalamus-hypophyse (Almiron et Chemes, 1988; Bartlett et *al.*, 1989; Blanc, 1987; Monget, 1993).

Des contrôles para- et autocrines régulent les synergies entre les différents tissus testiculaires (Figure 2).

La description détaillée de ces mécanismes sort du contexte de ce travail.

1.1.2.2. Description de la cellule mature, le spermatozoïde

Un spermatozoïde humain est composé de trois parties (Photo 1)

- la tête, piriforme de profil et ovale de face;
- le col qui constitue une zone rétrécie de transition;
- le flagelle constitué d'une pièce intermédiaire, d'une pièce principale et d'une pièce terminale.



Photo 1: Coupe longitudinale sagittale d'un spermatozoïde de morphologie normale (24000 X).
1. memb. plasmique ; 2. memb. acrosomiale externe; 3. acrosome; 4. memb. acrosomiale interne; 5. noyau; 6. manchon cytoplasmique; 7. colonnes segmentées; 8. mitochondries; 9. axonème; 10. vacuole nucléaire.

a) La tête

La tête du spermatozoïde est essentiellement constituée d'un noyau qui occupe la presque totalité du volume et d'une quantité de cytoplasme très réduite. Le noyau contient une chromatine fortement condensée et très résistante aux agents susceptibles de la dénaturer. Le patrimoine génétique est ainsi bien protégé contre les agents physiques et chimiques auxquels le spermatozoïde peut être soumis durant son trajet à travers les voies génitales. On peut parfois observer dans le noyau des zones de moindre densité, non limitées par une membrane. Ces zones sont désignées sous le nom de vacuoles nucléaires.

Le noyau est recouvert dans ses 2/3 antérieurs par l'acrosome (Crozet, 1989). Celui-ci est d'origine golgienne et apparaît pendant la spermatogenèse. Il est composé d'une matrice homogène et dense aux électrons, délimitée par deux membranes parallèles: la membrane acrosomiale interne qui fait face à l'enveloppe nucléaire et la membrane acrosomiale externe qui est très proche de la membrane plasmique. Morphologiquement, on distingue deux parties dans l'acrosome: le segment principal (portion antérieure) comprenant les 3/4 de la longueur totale et le segment équatorial constitué du 1/4 postérieur plus mince.

L'acrosome est riche en différents enzymes ou pro-enzymes (des hyaluronidases, des enzymes protéolytiques, des hydrolases, des neuraminidases et l'acrosine qui se trouve sous forme de proacrosine avant son activation).

b) Le col

A la base du noyau, l'enveloppe nucléaire présente une structure particulière: la plaque basale. Sous cette dernière, le centriole proximal est entouré par les colonnes segmentées qui constituent l'extrémité proximale des fibres denses. Ces deux éléments constituent le col du spermatozoïde.

c) Le flagelle

Le flagelle est parcouru sur toute sa longueur par une structure axiale microtubulaire, appelée axonème et commune aux cils et flagelles de tous les eucaryotes (Alberts et *al.*, 1989).

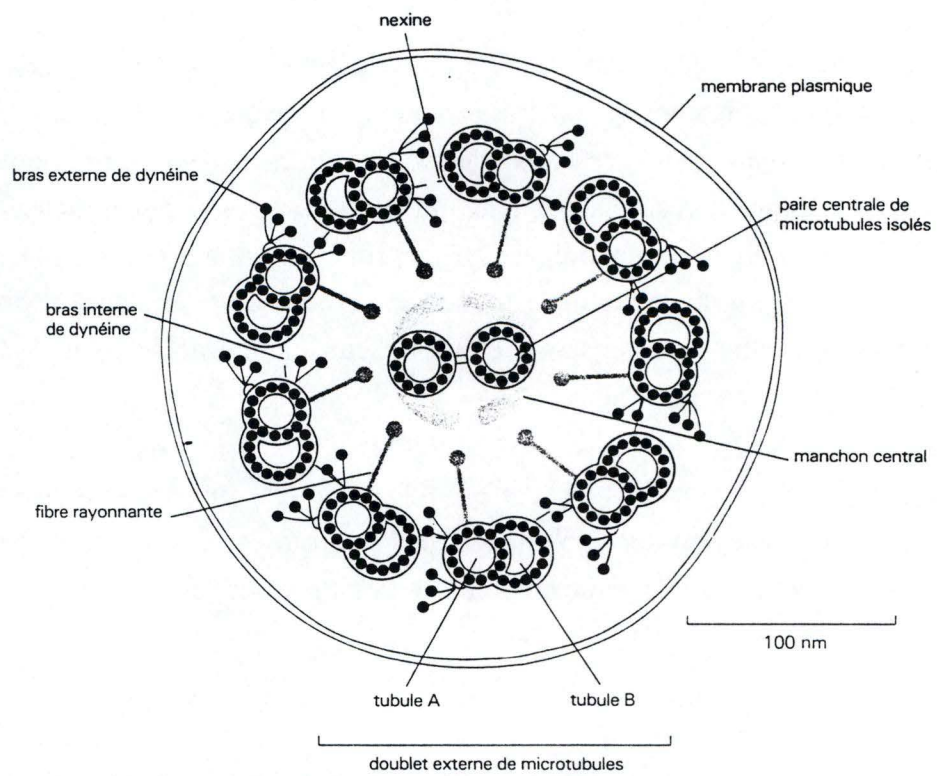


Fig. 3: Représentation schématique d'un flagelle en coupe transversale (Alberts *et al.*, 1989).

En coupe transversale (Figure 3), l'axonème apparaît constitué de microtubules (neuf paires ou doublets périphériques disposés en cercle concentrique autour de deux microtubules centraux). Chaque doublet périphérique est constitué d'un microtubule complet (sous-unité A) et d'un microtubule incomplet (sous-unité B) qui lui est attaché. Les deux microtubules centraux sont complets et séparés l'un de l'autre. Les sous-unités A et les microtubules centraux sont constitués de 13 protofilaments composés par l'empilement de dimères d' α et de β tubuline (PM de 50 000 daltons), tandis que les sous-unités B sont constituées de 10 de ces protofilaments.

On trouve, associées aux microtubules de l'axonème, toute une série de jonctions de nature protéique dont les interactions permettent de générer et de moduler l'onde flagellaire qui produit le mouvement. Les plus importantes de ces jonctions sont les bras de dynéine (PM de 500 000 daltons). Une paire de bras de dynéine est portée par chaque sous-unité A des doublets périphériques. Pour chaque paire, un bras est orienté vers l'extérieur du flagelle (bras externe), l'autre vers le centre (bras interne) et ils s'étendent en direction de la sous-unité B du doublet voisin. Grâce à leur activité ATPasique, les bras de dynéine sont capables de s'accrocher temporairement et de façon cyclique au microtubule B du doublet adjacent et, par un changement de conformation, de faire glisser les doublets les uns par rapport aux autres.

Une autre protéine appelée nexine, forme des liens permanents mais élastiques entre les doublets adjacents. Ces liens de nexine constituent une sorte de ceinture qui maintient la structure de l'axonème.

Partant également de chaque sous-unité A, un pont radiaire se termine du côté de la paire de microtubules centraux par un épaississement globulaire. Les ponts radiaires sont vraisemblablement des structures qui limitent l'amplitude du glissement en onde courbe; il semblerait que ces structures s'accrochent et se décrochent de la gaine centrale selon des cycles comparables à ceux décrits pour les bras de dynéine (Bouchard et Cosson, 1981). Enfin, les deux microtubules centraux sont ceints d'une gaine et forment avec elle le complexe central de l'axonème.

1.2. L'OVOCYTE

La maturation ovocytaire couvre l'ensemble des modifications cytologiques et métaboliques permettant à l'ovocyte d'acquérir l'aptitude à être reconnu et pénétré par le spermatozoïde, à assurer la formation des pronuclei mâle et femelle et à permettre le développement complet de l'embryon (Plachot, 1988).

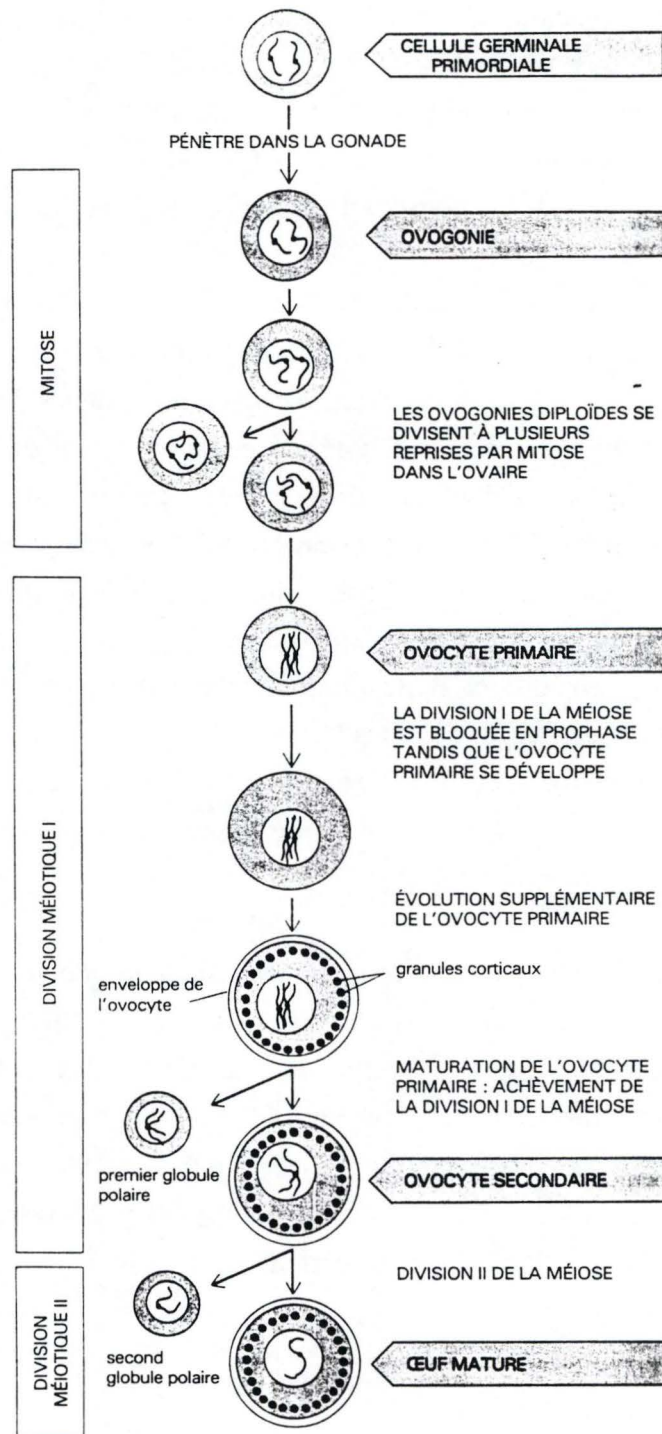


Fig. 4: Etapes de l'ovogénèse (Alberts *et al.*, 1989).

1.2.1. L'ovogenèse

Alors que les détails du développement de l'ovocyte (ovogenèse) diffèrent d'une espèce à l'autre, les étapes principales sont analogues (Figure 4). Les cellules germinales primordiales colonisent les gonades en formation pour devenir des ovogonies, qui se multiplient par mitose pendant un certain temps avant de se différencier en ovocytes primaires.

A ce stade, la première division méiotique commence: l'ADN se réplique pour aboutir au dédoublement de chaque chromosome en deux chromatides; les chromosomes homologues s'apparient sur toute la longueur de leur grand axe et un enjambement a lieu entre les chromatides de ces chromosomes appariés. Après cela, la cellule est immobilisée en prophase méiotique I, pour une période qui peut aller de quelques jours à plusieurs années, selon les espèces. Au cours de cette prophase prolongée, les ovocytes primaires synthétisent une enveloppe (la zone pellucide) et des granules corticaux. Ils accumulent également des ribosomes, le vitellus, le glycogène, les lipides et l'ARNm qui dirigera plus tard la synthèse des protéines nécessaires à la croissance embryonnaire précoce et le déroulement du programme de développement. Dans de nombreux ovocytes, ces activités sont reflétées par l'apparence des chromosomes, qui se décondensent et forment des boucles latérales, prenant l'aspect caractéristique en "écouvillon" d'un chromosome activement engagé dans la synthèse de l'ARN (Figure 5).

La phase suivante du développement de l'ovocyte est appelée maturation et ne débute en général, qu'à la puberté lorsqu'il y a stimulation par des hormones polypeptidiques; les gonadotropines. Sous le contrôle de ces hormones, la division I de la méiose se poursuit; les chromosomes se condensent à nouveau, l'enveloppe nucléaire disparaît et les chromosomes homologues répliqués se séparent à l'anaphase I en deux noyaux fils qui contiennent chacun la moitié du nombre initial de chromosomes. Pour achever la division I, le cytoplasme se divise de façon asymétrique pour produire deux ovocytes secondaires, qui sont de tailles très différentes: l'un est un globule polaire de petite taille et l'autre est une cellule volumineuse contenant tous les éléments nécessaires au développement.

A ce stade, chacun des chromosomes est toujours composé de deux chromatides-soeurs. Ces chromatides ne se séparent pas avant la division II de la méiose. Après cette séparation chromosomique finale à l'anaphase II, le cytoplasme de l'ovocyte secondaire de grande taille se divise à nouveau de façon asymétrique, pour donner l'ovule mature et un second petit globule polaire. Ils possèdent tous deux un

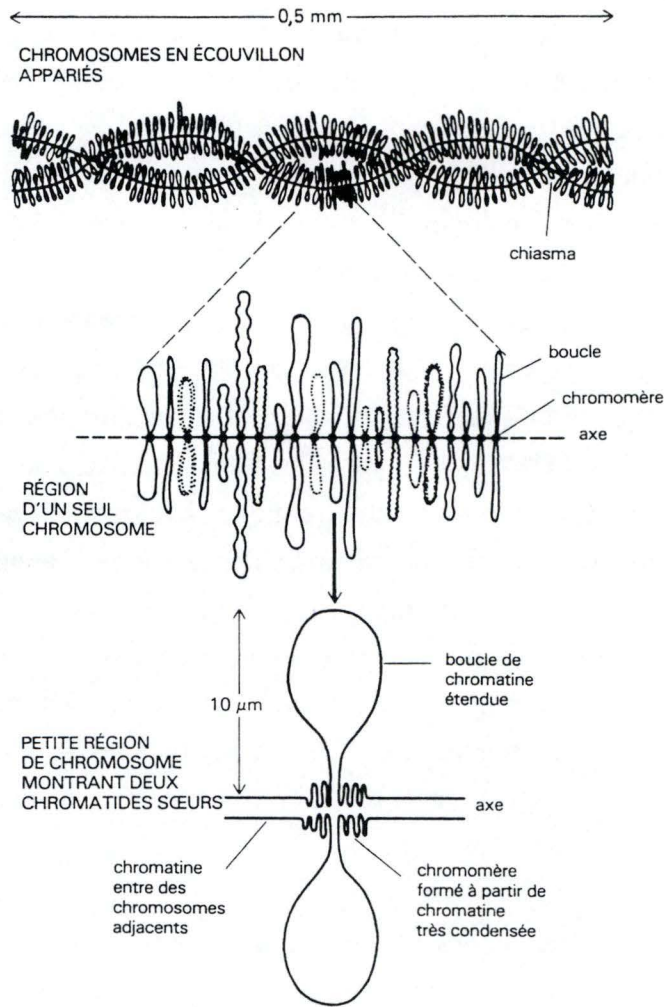


Fig. 5: Structure d'un chromosome en écouvillon (Alberts *et al.*, 1989).

nombre haploïde de chromosomes. Grâce aux deux divisions asymétriques de leur cytoplasme, les ovocytes conservent leur grande taille en dépit des deux divisions méiotiques. Les deux globules polaires engendrés par ce processus dégènèrent.

Chez la plupart des vertébrés, la maturation de l'ovocyte continue jusqu'à la métaphase II puis s'arrête. Au moment de l'ovulation, l'ovocyte secondaire immobilisé est libéré de l'ovaire et, si la fécondation se produit, l'ovocyte est stimulé pour achever sa méiose (Alberts *et al.*, 1989; Fulka *et al.*, 1989; Plachot, 1988; Thibault *et al.*, 1987).

1.2.2. La cellule mature: l'ovule

L'ovule est donc une grande cellule. Chez la femme, il mesure approximativement 100 μm .

Des photographies au microscope électronique à balayage nous révèlent la présence d'une enveloppe de glycoprotéines située autour de l'ovule; la zone pellucide (voir: la fécondation). Sous cette enveloppe nucléaire se trouve la membrane plasmique de l'ovule portant une multitude de microvillosités. Le cytoplasme de l'ovule renferme de nombreux organites: mitochondries, lysosomes et un noyau. De plus, on remarque des organites tout à fait particuliers, situés juste sous la membrane plasmique: les granules corticaux. Le cytoplasme renferme également des substances de natures protéique et nucléique, destinées à assurer le développement de l'embryon juste après la fécondation.

2. LA FECONDATION.

2.1. INTRODUCTION

Dans les systèmes de reproduction sexuée, la fécondation est l'étape qui assure la création d'un nouvel individu à partir de deux gamètes, mâle et femelle. Elle peut se définir comme l'ensemble des transformations qui aboutissent à l'association de deux lots haploïdes de chromosomes d'origine maternelle et paternelle. Chez les mammifères, la fécondation se produit naturellement dans la partie supérieure de l'oviducte, où les spermatozoïdes, libérés progressivement du réservoir que constituent l'isthme de l'oviducte et le col de l'utérus, entrent en contact avec le ou les ovocyte(s) ovulé(s).

La fécondation représente donc l'ensemble des événements permettant:

- la rencontre de l'ovocyte mûr et des spermatozoïdes capités;
- la pénétration du spermatozoïde jusque dans le cytoplasme ovocyttaire;
- la formation des pronuclei mâle et femelle.

Pour que se réalise cet enchaînement, les gamètes doivent subir une préparation aux aspects multiples et complexes: les ovocytes doivent être matures (cfr. l'ovogenèse) et les spermatozoïdes être capités.

2.2. LA PÉNÉTRATION DU CUMULUS OOPHORUS

Chez la plupart des mammifères euthériens, l'ovocyte ovulé est entouré de la zone pellucide qui le sépare de la corona radiata constituée de cellules provenant du cumulus oophorus et d'une matrice riche en acide hyaluronique. Chez certaines espèces (vache, brebis, chèvre) la corona radiata s'expande rapidement après l'ovulation et les spermatozoïdes entrent plus facilement en contact avec la zone pellucide de l'ovocyte. Cette corona, lorsqu'elle est présente, n'est traversée que par des spermatozoïdes qui sont capités.

La capacitation représente l'ensemble des modifications physiologiques subies par les spermatozoïdes dans le tractus génital femelle ou *in vitro* dans des conditions de culture adéquates et dont la finalité est l'acquisition du pouvoir fécondant (Plachot, 1988).

Pour mieux comprendre ce phénomène, nous pouvons nous référer au modèle de Langlais et Roberts (1985). Celui-ci illustre les réactions enzymatiques permettant de réguler la perméabilité et l'intégrité de la membrane plasmique qui recouvre l'acrosome, durant l'interaction entre le gamète mâle et les facteurs de capacitation présents dans le fluide du tractus génital femelle. C'est ainsi que la capacitation est vue comme un phénomène qui résulte d'une diminution des charges négatives en surface de la membrane plasmique des spermatozoïdes, suivie d'une perte de cholestérol et d'une entrée de Ca^{++} entre la membrane plasmique (MP) et la membrane acrosomiale externe (MAE).

2.2.1. Diminution des charges négatives en surface des spermatozoïdes

Parmi les modifications moléculaires subies par la MP durant la capacitation nous remarquons une altération du réservoir de charges électriques à la surface du spermatozoïde. Alors que la maturation des spermatozoïdes au cours de leur passage dans l'épididyme est accompagnée d'une augmentation des charges négatives en surface, la capacitation quant à elle coïncide avec une diminution de ces charges négatives par une perte de résidus d'acide sialique et de résidus sulfatés (Langlais *et al.*, 1981).

Actuellement on pense que des composés tels que des stéroïde-sulfatases présentes dans le tractus génital femelle, seraient impliqués dans la capacitation du sperme; ils hydrolyseraient la liaison covalente qui relie le groupement sulfate au groupe hydroxyle des stérols associés à la MP (Langlais et Roberts, 1985). De plus, il semble bien que les stérols sulfatés soient des composés qui stabilisent les membranes. En effet:

- le cholestérol sulfaté possède un effet protecteur contre les chocs osmotiques (Bleau *et al.*, 1975);
- le cholestérol sulfaté est plus efficace que le cholestérol dans la suppression des phases de transitions liquide-gel réalisées par les phospholipides (Grimellee *et al.*, 1984; cités par Langlais et Roberts, 1985);
- les stéroïdes sulfatés inhibent la capacitation en assurant un haut rapport cholestérol/phospholipides et donc inhibent la perte du cholestérol membranaire.

Les propriétés attribuées aux stéroïdes sulfatés en font de bons candidats comme facteurs de décapacitation. A l'inverse, ils attirent l'attention sur les stéroïdes

sulfatases comme facteurs de capacitation. Cette conviction a été fortement consolidée par la découverte des stéroïde-sulfatases dans le tractus génital femelle (Lalumiere *et al.*, 1976; cités par Langlais et Roberts, 1985) et par le fait que chez les femelles de hamster, l'activité de cette enzyme est cyclique, avec une augmentation immédiate après l'ovulation (Leglault *et al.*, 1980). De plus, on peut suggérer qu'en modifiant l'intégrité de la MP, les stéroïde-sulfatases pourraient jouer un rôle dans la déstabilisation de la conduction membranaire et permettre une entrée de calcium au travers la MP. Cet ion, ne l'oublions pas, est nécessaire au processus de la réaction acrosomiale qui se déroule juste après.

2.2.2. Régulation de l'efflux de cholestérol membranaire

La perméabilité et la fluidité membranaire sont régulées en partie par la composition lipidique de la membrane. Ceci est particulièrement important car la capacitation est un processus qui s'accompagne d'une perte du cholestérol membranaire, donc d'une diminution du rapport cholestérol/phospholipides, qui joue un rôle dans ces processus de perméabilité et de fluidité (Langlais *et al.*, 1981).

Ce phénomène s'accompagnerait d'une augmentation de la perméabilité membranaire au Ca^{++} , permettant l'entrée de ce dernier entre la MP et la MAE.

Le cholestérol n'est jamais transporté sous forme libre, mais est toujours lié à une protéine de transport. C'est ainsi que les échanges de cholestérol entre les membranes cellulaires et les compartiments extracellulaires sont médiés par des transporteurs de stérols présents dans le sérum. Ces derniers sont des lipoprotéines (HDL, LDL, VLDL), des apolipoprotéines (Apo A-1), de l'albumine et une enzyme, la lecithin cholesterol acyltransférase (LCAT) (Van Deenen et De Gier; 1974; cités par Langlais et Roberts, 1985).

La concentration et la distribution de ces accepteurs de stérols dans le plasma sont modifiées par les hormones gonadotropes. De ce fait nous pouvons dire que la capacitation est un phénomène hormono-dépendant (Soupart; 1972; cité par Langlais et Roberts; 1985). Dans cette régulation hormonale, les oestrogènes semblent favoriser une concentration utérine élevée en albumine et induire une élévation du taux de capacitation. Sous l'effet de la progestérone, au contraire, ces deux paramètres sont significativement diminués.

La totalité de ces transporteurs de stérols sont retrouvés dans le plasma humain et le fluide folliculaire. De plus, la LCAT ainsi que les HDL, l'Apo A-1 et l'albumine, sont impliquées dans l'estérification du cholestérol et dans la production de lysophospholipides, des lipides probablement fusogéniques qui interviendraient dans la réaction acrosomiale (Langlais et Roberts, 1985).

Pour terminer ce point, il ne faudrait pas passer sous silence le fait que la capacitation, processus essentiel pour la fécondation au même titre que la réaction acrosomiale, peut être visualisée. En effet, elle s'accompagne d'une motilité accrue des spermatozoïdes appelée l'hyperactivité. Celle-ci est caractérisée par une grande fréquence de battements du flagelle (mouvement en fouet). Des études récentes suggèrent que le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) pourrait déclencher cette hyperactivation, de même que la capacitation. C'est ainsi que l'hyperactivation induite par une combinaison - xanthine plus xanthine oxydase plus catalase - qui génère l'anion superoxyde, atteint un niveau 90 fois plus élevé que ce qui est observé avec du sérum de cordon foetal, lui-même étant reconnu pour être un inducteur de l'hyperactivation. De plus, si on ajoute de la superoxyde dismutase (SOD) au milieu inducteur de radicaux superoxydes, on bloque l'hyperactivation et la capacitation (De Lamirande et Gagnon, 1983). Ces données suggèrent donc que ce radical superoxyde joue un rôle dans l'apparition de ces processus, sans que l'on connaisse pour autant les cibles moléculaires de ce radical au niveau des spermatozoïdes (De Lamirande et Gagnon, 1983).

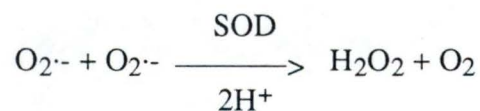


Figure 6 : Schéma représentant l'action de la SOD : la SOD catalyse cette réaction de dismutation au cours de laquelle un radical superoxyde monte d'étage d'oxydation et l'autre descend d'étage d'oxydation.

2.3. INTERACTION DU SPERMATOZOÏDE AVEC LA ZONE PELLUCIDE

Avant de pouvoir pénétrer l'ovule, le spermatozoïde doit se fixer à la surface de la zone pellucide et effectuer sa réaction acrosomiale.

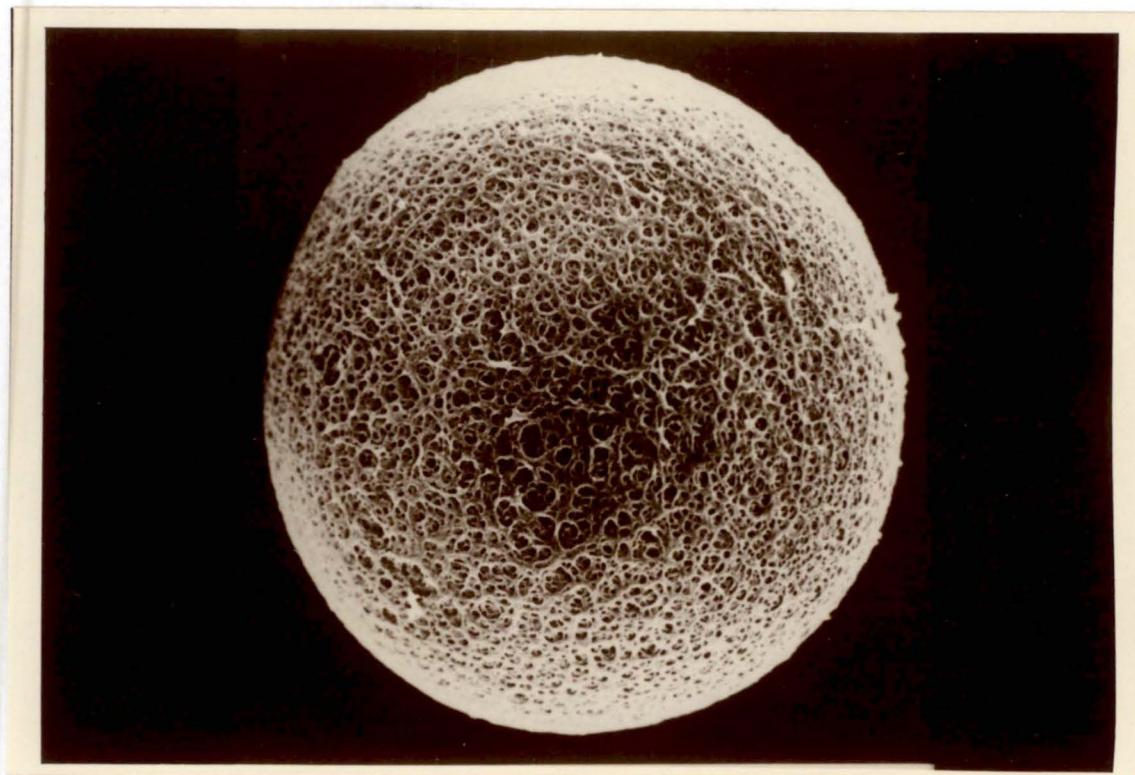


Photo 2: Cliché de la zone pellucide, enveloppe extracellulaire entourant l'ovocyte.

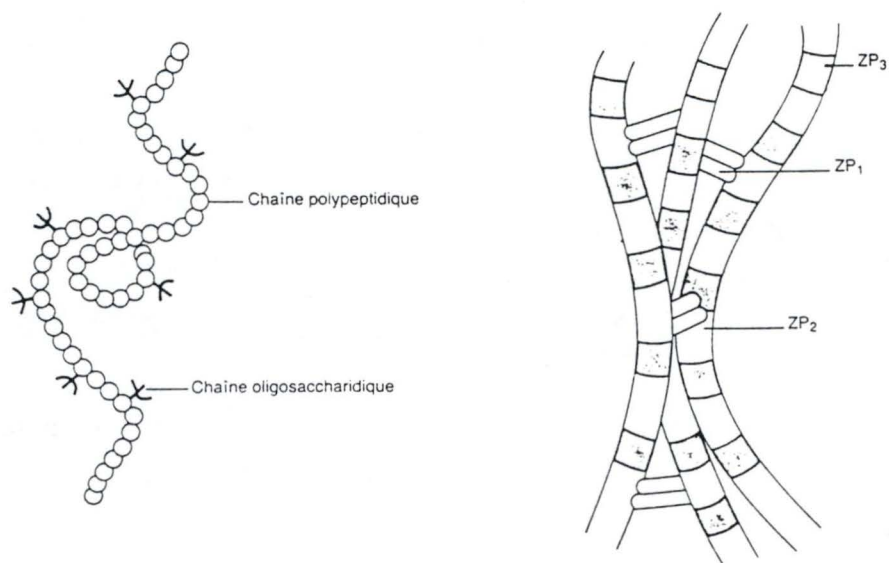


Fig. 7: Structure macromoléculaire de la ZP₃ et association des 3 glycoprotéines majeures de la zone pellucide : ZP₁, ZP₂ et ZP₃ (Crozet, 1989).

2.3.1. La zone pellucide

La zone pellucide est une enveloppe extracellulaire qui entoure l'oeuf des mammifères (Photo 2). Elle est constituée d'une matrice lacunaire dans laquelle des filaments de glycoprotéines forment un réseau (Wassarman, 1990). Ces glycoprotéines sont synthétisées et sécrétées durant la croissance de l'ovocyte. Chez la souris, la zone pellucide contient trois glycoprotéines dénommées ZP₁, ZP₂ et ZP₃ dont les poids moléculaires sont respectivement de 200, 120 et 83 KD. La ZP₃ est constituée d'une structure polypeptidique sur laquelle sont greffées des chaînes oligosaccharidiques qui contiennent notamment du fucose et des N-acetyl-glucosamines (Figure 7).

Les ZP₂ et ZP₃ sont associées pour former des filaments pontés par la ZP₁ (Figure 7), ce qui confère à la zone pellucide une structure tridimensionnelle (Crozet, 1989; Wassarman, 1992).

A la fin de la maturation ovocytaire, cette zone pellucide a une épaisseur de 7µm et contient plus ou moins 3 ng de protéines. Ses principales fonctions sont les suivantes:

- induire la réaction acrosomiale des spermatozoïdes;
- prévenir la polyspermie après la fécondation;
- protéger le nouvel embryon jusqu'à son implantation dans l'utérus (Wassarman, 1990).

2.3.2. Fixation du spermatozoïde

L'interaction des gamètes est un phénomène propre à chaque espèce qui implique des molécules complémentaires situées à la fois sur la membrane plasmique du spermatozoïde et sur la zone pellucide. La terminologie retenue est la suivante: "récepteurs spermatiques" pour la zone pellucide, "protéines de liaison" pour le spermatozoïde (Wassarman, 1992).

Dans un premier temps, les spermatozoïdes capités se fixent sur la zone pellucide. Cette fixation est lâche, réversible et non spécifique, mais l'orientation mutuelle des gamètes pendant la fixation influence probablement le fait que la liaison évolue vers une fixation irréversible, solide et spécifique (Plachot, 1988). Cette dernière est donc due à des molécules complémentaires.

Chez la souris, les sites de reconnaissance spermatique de la zone pellucide ont été clairement identifiés: il s'agit de la ZP₃ qui assure la fixation du spermatozoïde dont

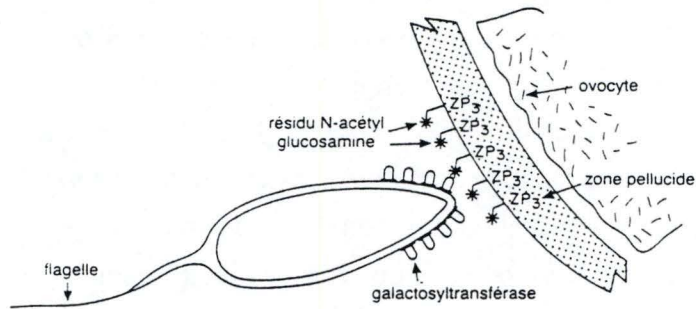


Fig. 8: Fixation du spermatozoïde à la zone pellucide. Une galactosyltransférase membranaire du spermatozoïde assure le pontage avec des résidus N-acétylglucosamine (Shur et Hall, 1982).

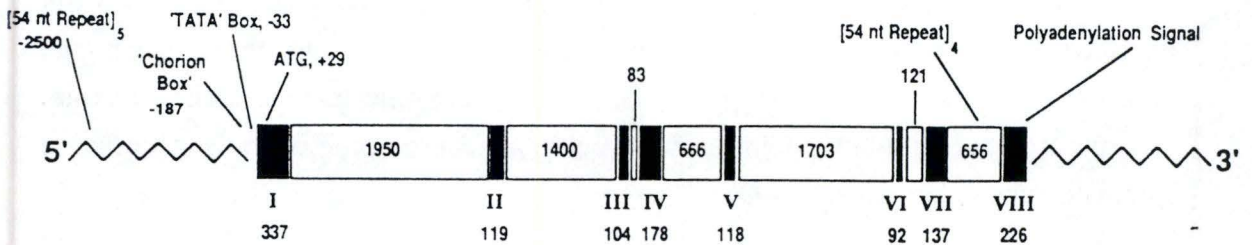


Fig. 9: Organisation du gène de ZP₃ chez le hamster : 8 exons (I-VIII) avec leur taille en nucléotides indiquée en dessous, 7 introns avec leur taille en nucléotides, positions de la TATA box, du codon initial et du signal de polyadénylation (Kinloch *et al.*, 1990).

l'acrosome est intact et de la ZP₂ qui intervient après la réaction acrosomiale pour maintenir l'attachement. Au niveau du gamète mâle, c'est une protéine qui assure la reconnaissance de la ZP₃ et l'adhésion (Crozet, 1989).

Chez la souris, plusieurs études ont mis l'accent sur l'implication d'une glycosyltransférase dans ces processus de reconnaissance et d'adhésion. Le spermatozoïde murin possède en effet une galactosyltransférase. Celle-ci catalyse le transfert de galactose de l'uridine-5'-diphosphate galactose aux résidus terminaux N-acétyl-glucosamide pour former de la N-acétyl-lactosamine.

Par ailleurs, en présence d' α -lactalbumine qui modifie spécifiquement l'activité de la galactosyltransférase, les spermatozoïdes ne se fixent plus à la zone pellucide (Shur et Hall, 1982; cités par Crozet, 1989). De même, des anticorps anti-galactosyltransférase empêchent la fixation des spermatozoïdes à la zone pellucide. Les résultats indiquent que chez la souris une galactosyltransférase portée par la membrane plasmique du spermatozoïde est probablement impliquée dans la reconnaissance et l'attachement des gamètes. La liaison spermatozoïde - zone pellucide résulterait donc d'un pontage entre la membrane plasmique du spermatozoïde et un résidu N acétylglucosamine de la ZP₃ par l'intermédiaire de cette enzyme (Figure 8).

De plus, si on enlève des chaînes d'oligosaccharides, liées de manière covalente à la partie polypeptidique, la ZP₃ perd sa propriété de récepteur spermatique. Cette observation suggère fortement que ces chaînes ont un rôle primordial dans la fonction évoquée (Wassarman, 1992).

Il semble donc bien que la glycoprotéine ZP₃ tient un rôle important dans l'adhésion des gamètes. Elle possède trois à quatre complexes d'oligosaccharides N-liés et un nombre élevé d'oligosaccharides O-liés. La chaîne polypeptidique se compose de 402 acides aminés et est exceptionnellement riche en résidus proline, serine et thréonine (Wassarman, 1990). Le gène de cette ZP₃ a été cloné et caractérisé chez la souris et le hamster. Il est composé de huit exons et de sept introns (Figure 9). De plus, il est hautement contrôlé par le fait que son expression est spécifique du sexe et n'est exprimé que pendant la croissance des ovocytes, au cours de laquelle sont synthétisées et excrétées les glycoprotéines de la zone pellucide (Kinloch *et al.*, 1990, Wassarman, 1990).

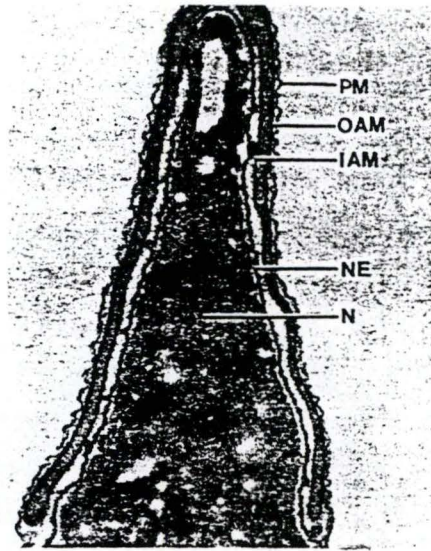


Fig. 10: Partie antérieure de la tête du spermatozoïde avec un acrosome intact : PM, (membrane plasmique); OAM, (membrane acrosomiale externe); IAM, (membrane acrosomiale interne); NE, (enveloppe nucléaire); N, (noyau). Gross: 22000 x (Nagea *et al.*, 1986).

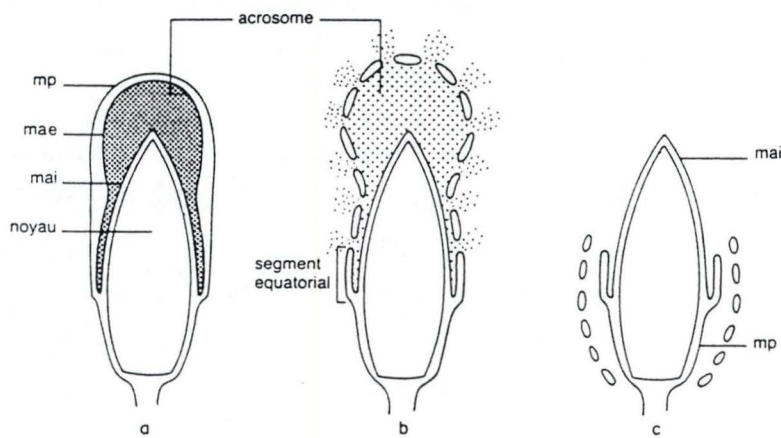


Fig. 11: Etapes de la réaction acrosomiale (a) avant réaction, le spermatozoïde avec son acrosome intact; MAI : (membrane acrosomiale interne); MAE : (membrane acrosomiale externe); MP : (membrane plasmique recouvrant l'acrosome); (b) au cours de la réaction, la fusion des membranes plasmique et acrosomiale externe entraîne la formation de vésicules membranaires et de trous par lesquels le contenu de l'acrosome, est libéré; (c) lorsque la réaction acrosomiale est achevée, le spermatozoïde abandonne les vésicules membranaires et sa membrane acrosomiale interne se trouve exposée; le segment équatorial reste intact (Nagea *et al.*, 1986).

2.4. RÉACTION ACROSOMIALE

Après de nombreuses controverses, il est maintenant établi que, chez la plupart des mammifères, la réaction acrosomiale du spermatozoïde fécondant se produit au contact de la zone pellucide de l'ovule.

2.4.1. Etapes

L'acrosome est une structure propre aux spermatozoïdes. Il s'apparente aux lysosomes. Il coiffe les 2/3 antérieurs de la tête du spermatozoïde. Cette vésicule est entourée d'une membrane dont on distingue deux feuilletts l'un du côté de la membrane plasmique et l'autre du côté du noyau. Elle est donc recouverte sur toute sa surface externe par la membrane plasmique du spermatozoïde (Figure 10) (Wassarman, 1990).

Lors de la réaction acrosomiale, certaines de ces membranes sont transformées: les membranes plasmique et acrosomiale externe fusionnent de façon progressive, menant à la mise à nu de la membrane acrosomiale interne. De manière arbitraire, ce processus a été divisé en cinq étapes, sur base de considérations morphologiques (Figure 11) (Nagae *et al.*, 1986).

- **Etape 1. Acrosome intact:** la MP et la MAE sont intactes. La matrice, quant à elle, est compacte et homogène.
- **Etape 2. Gonflement de la matrice acrosomiale:** les membranes sont toujours intactes mais la matrice apparaît morphologiquement diffuse et gonflée.
- **Etape 3. Invagination de la membrane acrosomiale externe:** cette étape est caractérisée par la présence de vésicules à l'intérieur de l'acrosome. Ces vésicules paraissent être formées par invagination de la MAE seule. Une autre caractéristique de cette étape est le plissement en de nombreux endroits des MP et des MAE.
- **Etape 4. Fusion des deux membranes:** on remarque la fusion de la MP et de la MAE en de nombreux endroits, avec pour résultat la formation, d'une part, de petites vésicules mixtes et, d'autre part, d'une "fenestration" grâce à laquelle une partie du contenu de l'acrosome, acrosine, hyaluronidase et probablement d'autres enzymes, est libérée. Les vésicules membranaires

sont ensuite abandonnées à la surface de la zone pellucide lorsque le spermatozoïde pénètre celle-ci.

- **Etape 5. Exposition de la membrane acrosomiale interne :** la membrane acrosomiale interne (MAI) se trouve exposée et peut entrer en contact direct avec la zone pellucide.

Les spermatozoïdes qui ont subi la réaction acrosomiale à la surface de la zone pellucide doivent, par la suite, rester liés à celle-ci afin de pouvoir la pénétrer. Le maintien de la liaison spermatozoïde-zone pellucide est possible grâce à une interaction entre la MAE (exposée suite à la réaction acrosomiale) et une protéine de la ZP, la ZP₂. Cette dernière sert donc de second récepteur spermatique. De plus, certaines observations suggèrent également que la liaison des spermatozoïdes ayant subi la réaction acrosomiale avec la ZP₂ est favorisée par l'acrosine, une protéase trypsine-like associée à la MAE (Wassarman, 1990).

Comparée à la première liaison possible grâce à la ZP₃, la seconde avec ZP₂ est relativement plus faible. Puisque le spermatozoïde qui a subi la réaction acrosomiale doit pénétrer la zone pellucide, il pourrait tirer avantage de cette relative faiblesse pour assurer sa progression au travers de la matrice extracellulaire (Wassarman, 1990).

La réaction acrosomiale est un processus rapide (chez les rongeurs, on estime qu'elle se produit dans les 10 à 15 minutes qui suivent l'attachement à la zone pellucide). Elle présente les caractéristiques d'une exocytose mais, si chez les invertébrés marins les mécanismes moléculaires mis en jeu sont assez bien connus, ils sont, chez les mammifères, moins bien appréhendés et compris dans leur chronologie (Wassarman, 1990).

Ce qui est certain aujourd'hui, c'est que la réaction acrosomiale est dépendante du Ca⁺⁺ et ne peut être réalisée dans des milieux qui en sont dépourvus. Selon un modèle hypothétique, proposé récemment chez le hamster, l'entrée du Ca⁺⁺ dans la cellule inactiverait des ATPases membranaires. Le rôle de ces ATPases consisterait à maintenir des concentrations intracellulaires faibles en Na⁺ et Ca⁺⁺ et élevées en K⁺ afin d'empêcher toute réaction acrosomiale prématurée qui surviendrait avant l'adhésion des gamètes. L'inactivation des ATPases au moment de la réaction acrosomiale entraînerait notamment une augmentation de la concentration intracellulaire en Na⁺ qui, à son tour, provoquerait une sortie de protons par l'intermédiaire d'un antiport Na⁺/H⁺.

Cette perte d'ions H^+ s'accompagnerait d'une augmentation du pH intracellulaire qui activerait des enzymes acrosomiales avec la transformation de la proacrosine en acrosine.

Les enzymes ainsi activées participeraient à la dispersion de la matrice acrosomiale et par ailleurs, comme nous l'avons vu, la Ca^{++} intracellulaire favoriserait la fusion des MP et des MAE. Il activerait également des phospholipases membranaires qui induisent à leur tour la formation de produits fusogènes tels que des lysophospholipides et des acides gras. Des inhibiteurs de la phospholipase A2 sont en effet capables de bloquer la réaction acrosomiale (Langlais et Robert, 1985).

2.4.2. Induction par la zone pellucide

Il a été montré chez différentes espèces (murin, hamster, humain) que les zones pellucides dissoutes induisent *in vitro* la réaction acrosomiale des spermatozoïdes homospécifiques (Crozet, 1989).

Chez la souris, c'est une glycoprotéine de la zone pellucide, la ZP₃, qui est responsable de cette induction. La ZP₃ possède donc une double fonction: d'une part, elle assure la fixation du spermatozoïde et, d'autre part, elle déclenche sa réaction acrosomiale. Alors que les chaînes oligosaccharidiques sont impliquées dans le processus d'attachement, c'est la partie protéique de la ZP₃ qui intervient dans le déclenchement de la réaction acrosomiale (Crozet, 1989; Wassarman, 1990). De plus, on remarque que cette induction de la réaction acrosomiale, réalisée par la ZP₃, est inhibée par la toxine de Pertussis. Cette observation suggère que cette induction est réalisée par un système de transduction du signal faisant intervenir des protéines G membranaires (Wassarman, 1990).

2.4.3. L'acrosine

L'acrosine est une enzyme contenue dans l'acrosome. Cette enzyme est une sérine-protéase trypsine-like. Des anticorps monoclonaux spécifiques de l'acrosine ont été utilisés pour visualiser la migration de cette enzyme durant la réaction acrosomiale. De cette façon on a pu remarquer, après la réaction, la persistance d'une certaine quantité d'acrosine dans le segment équatorial de l'acrosome et sur la MAI. Ces observations suggèrent que l'acrosine est une protéase qui pourrait intervenir, d'une part, dans l'interaction des gamètes en agissant au niveau de la zone pellucide et,

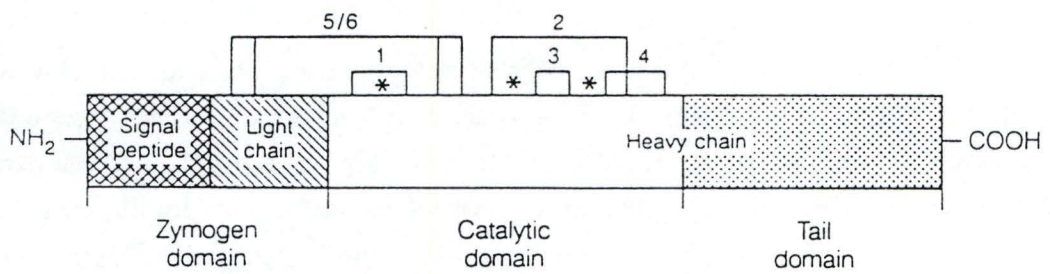


Fig. 12: Architecture générale de la proacrosine de mammifère. Les trois domaines y sont représentés : le domaine zymogène incluant le peptide signal et la chaîne légère, le domaine catalytique représentant la partie amino-terminale de la chaîne lourde et le domaine de queue correspondant à la partie carboxy-terminale de la chaîne lourde. L'arrangement putatif des ponts disulfures est représenté (numéros de 1 à 6), ainsi que la localisation des sites catalytiques indiqués par les * (Klemm *et al.*, 1991).

d'autre part, dans la pénétration de cette zone par dégradation de ses constituants (Moos *et al.*, 1991). De plus, un groupe allemand travaillant sur cette enzyme propose qu'elle pourrait se lier à l'ADN et exercer de cette façon une régulation de la transcription de certains gènes (Klemm *et al.*, 1991).

Puisque le génome du spermatozoïde ne peut être transcrit en raison de l'état de compaction de la chromatine, on peut déduire que le mRNA de l'acrosine doit être synthétisé tôt au cours de la spermatogenèse. C'est ainsi que les messagers de l'acrosine sont déjà détectables au niveau des spermatides (Klemm *et al.*, 1991).

L'acrosine comporte trois parties: la zymogène, la catalytique et la terminale. Cette dernière est particulièrement riche en proline. Parmi les sérines protéases (Figure 12) seule l'acrosine semble en contenir (Klemm *et al.*, 1991).

La synthèse de l'acrosine est sujette à discussion. On pense qu'elle est sécrétée sous une forme inactive, la proacrosine. Cette dernière porte une séquence "signal" qui est constituée d'environ 20 acides aminés hydrophobes au niveau de la terminaison NH₂. Cette séquence est un signal d'exportation qui est clivé lors du passage à travers la membrane du réticulum endoplasmique. Ce qui reste ensuite de la protéine subit une autoactivation, matérialisée par un clivage protéolytique entre l'Arg23 et la Val24, c'est-à-dire juste entre la chaîne légère (qui est la partie résiduelle de la partie zymogène) et la chaîne lourde comprenant les deux autres parties.

Les deux chaînes ne sont pas séparées pour autant car il y a formation de liaisons covalentes grâce à des ponts disulfures entre les résidus cys 6 et cys 10 de la chaîne légère et les résidus 136 et 140 de la chaîne lourde (Fock-Nüzel *et al.*, 1984; Klemm *et al.*, 1991).

Comme mentionné plus haut, la partie terminale est spécifique de l'acrosine dans le groupe des sérine-protéases. Le groupement terminal présente par ailleurs une identité remarquable avec des protéines qui se lient à l'ADN: les *DNA binding proteins*. C'est ainsi que le pourcentage d'identité est très élevé entre cette partie et une protéine connue pour être un activateur de la transcription, la CTF/NF1 (Klemm *et al.*, 1991; Mermod *et al.*, 1993). Par ce fait, certains scientifiques pensent que ce domaine de queue ou des parties de ce domaine pourraient jouer un rôle dans le développement embryonnaire en opérant la transformation du programme maternel de l'ovocyte en un programme embryonnaire (Klemm *et al.*, 1991).

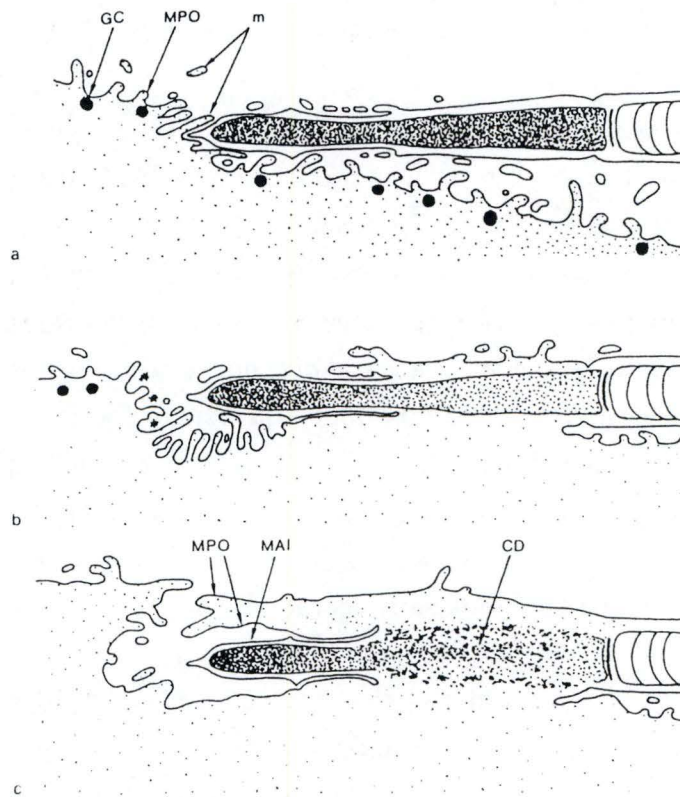


Fig. 13: Fusion entre le spermatozoïde et la membrane plasmique de l'ovocyte. (a) le spermatozoïde qui a traversé la zone pellucide entre en contact avec l'ovocyte; (b) la fusion se produit entre la membrane plasmique qui recouvre le segment équatorial et celle de l'ovocyte (mpo); (c) l'enveloppe nucléaire du spermatozoïde disparaît rapidement après la fusion et la chromatine mâle commence à se décondenser (cd) (Croset, 1989).

2.5. PÉNÉTRATION DE LA ZONE PELLUCIDE

Le spermatozoïde qui a effectué la réaction acrosomiale abandonne les vésicules membranaires, produit de la réaction, à la surface de la zone pellucide puis traverse cette enveloppe en suivant une trajectoire oblique (Crozet, 1989). Il est alors animé d'un mouvement qui lui confère une force propulsive importante. Le tracé laissé dans la pellucide par le passage du spermatozoïde présente des bordures nettes, ce qui suggère que la pénétration met en jeu un processus mécanique plutôt qu'enzymatique. Il semble toutefois que la motilité du spermatozoïde ne soit pas suffisante pour assurer à elle seule le passage à travers la pellucide. On sait que l'hyaluronidase hydrolyse l'acide hyaluronique contenu dans les mailles de la zone pellucide. L'acrosine, qui n'est pas capable de digérer des zones pellucides *in vitro* peut néanmoins hydrolyser partiellement certaines de ses glycoprotéines et modifier la texture de la zone pellucide (Dunbar *et al.*, 1985). En hydrolysant des molécules de la zone pellucide, les enzymes associés aux spermatozoïdes peuvent donc faciliter leur passage à travers cette enveloppe.

2.6. LE FUSION DES GAMÈTES

Après avoir franchi la zone pellucide, le spermatozoïde pénètre dans l'espace périvitellin, espace compris entre la zone pellucide et la membrane de l'ovocyte. Il s'immobilise alors et les deux gamètes fusionnent.

La fusion se produit entre la membrane plasmique qui recouvre le segment équatorial du spermatozoïde d'une part et la membrane plasmique de l'ovocyte d'autre part (Figure 13) (Crozet, 1989; Plachot, 1988).

Les conditions généralement relevées dans les fusions membranaires interviendraient aussi pour la fusion des gamètes. L'augmentation des concentrations en Ca^{++} , due à la réaction acrosomiale, agirait sur l'activation de phospholipases. Ces enzymes interviendraient à leur tour dans la formation d'un gradient temporaire de lysophospholipides, qui sont considérés comme des lipides fusogéniques.

De plus, il semble bien que les points de contacts entre les deux membranes soient libres de toutes protéines, ce qui ferait de la zone de fusion une zone lipidique exclusive.

Au cours de cette fusion, la MP du spermatozoïde est intégrée à celle de l'ovocyte. Par contre, la MAI est incorporée dans le cytoplasme de l'ovocyte en même

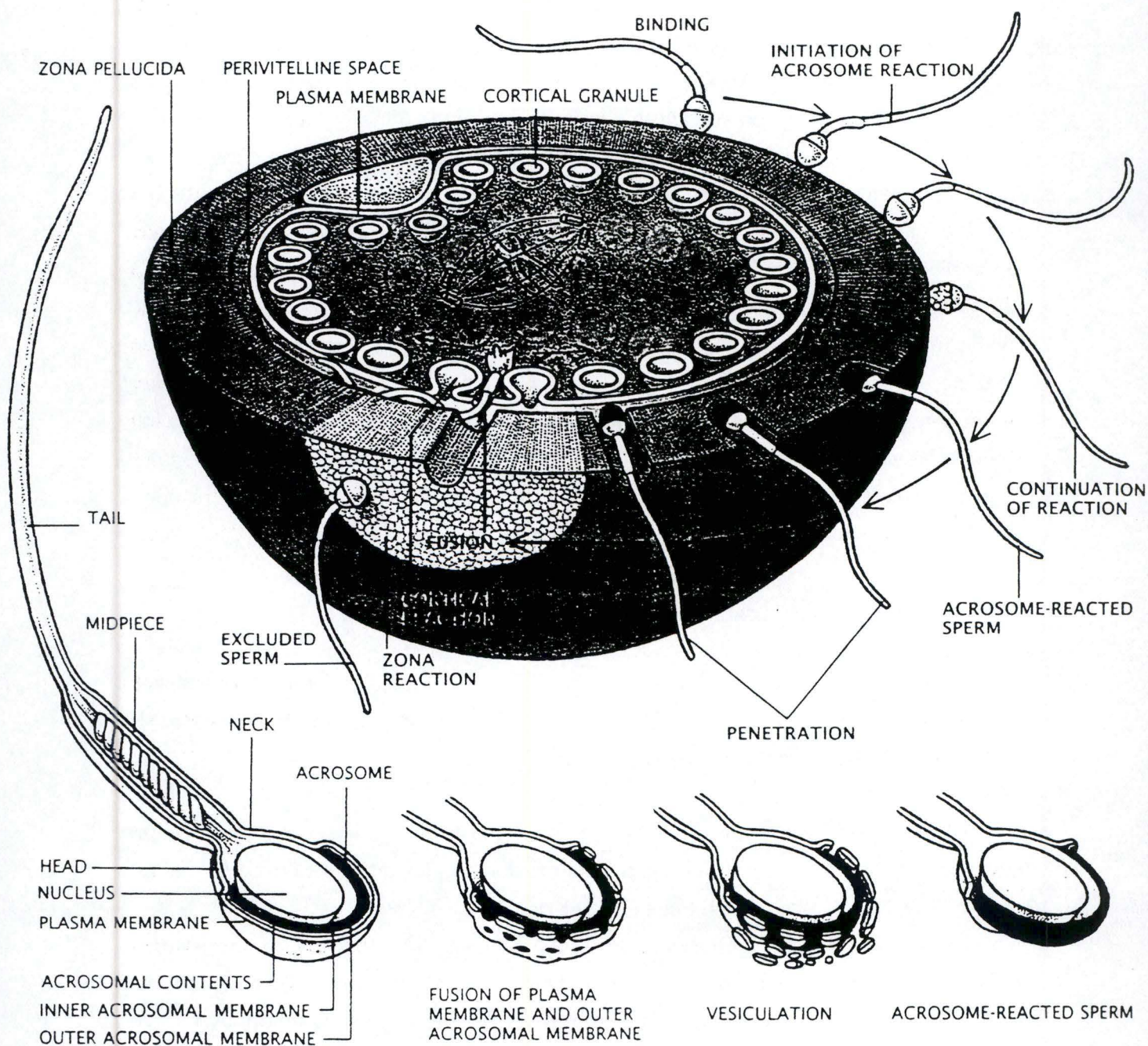


Fig. 14: Etapes de la fécondation. (1) Liaison du spermatozoïde avec son acrosome intact. (2) Initiation de la réaction acosomiale. (3) Pénétration de la zone pellucide de l'oeuf par le spermatozoïde. (4) Fusion des gamètes par leur membrane plasmique respective. (5) Réaction corticale avec expulsion du contenu des granules corticaux. (6) Initiation des modifications subies par la zone pellucide après la pénétration du spermatozoïde dans le cytoplasme de l'ovule. (Wassarman, 1990).

temps que le noyau du spermatozoïde et les mitochondries de la pièce intermédiaire (Crozet, 1989; Wasserman, 1990). Les premières étapes de la fécondation sont résumées en un schéma général par Wasserman (1990) (Figure 14).

2.7. ACTIVATION DE L'OVOCYTE

L'activation de l'ovocyte par le spermatozoïde entraîne des modifications du métabolisme de l'ovocyte, ainsi que des remaniements cellulaires importants. Bien que les mécanismes moléculaires qui interviennent dans l'activation soient assez mal connus chez les mammifères, on voit qu'un changement de potentiel transmembranaire et une mobilisation massive du Ca^{++} intracellulaire constituent deux des premières étapes de ce processus. Les manifestations cellulaires qui accompagnent l'activation, l'exocytose des granules corticaux, l'achèvement de deuxième division méiotique et la modification des propriétés corticales de l'oeuf, sont aujourd'hui bien connues.

2.7.1. Changement de potentiel transmembranaire et mobilisation du Ca^{++} intracellulaire

Chez les mammifères, les changements de potentiel membranaire se manifestent par une succession d'hyperpolarisations négatives qui se suivent à des intervalles de l'ordre de la minute chez le hamster et de plusieurs minutes chez la souris. Ces vagues d'hyperpolarisation s'accompagnent d'une diminution progressive du potentiel de base qui passe de -20 mV à -40 mV. Ces hyperpolarisations sont dues à un accroissement de la perméabilité membranaire au K^+ consécutive à l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{++} (Crozet, 1989).

La dépolarisation de la membrane qui est la première modification détectable consécutive à la fécondation, semble ne servir qu'à empêcher la polyspermie. Par ailleurs, l'augmentation momentanée de la concentration en Ca^{++} , qui se propage comme une onde à travers l'oeuf à partir du site de pénétration du spermatozoïde, aide à déclencher le programme d'activation du gamète femelle (Figure 15). Si la concentration cytosolique en Ca^{++} est artificiellement augmentée, l'ovocyte, quelle que soit l'espèce, est activé. L'injection d'EGTA, un agent chélateur de Ca^{++} qui empêche l'accroissement de sa concentration, inhibe aussi l'activation de l'oeuf après la fécondation (Albert *et al.*, 1989).

Une question se pose néanmoins: comment la fécondation conduit-elle à une augmentation de la concentration en Ca^{++} dans le cytosol ? Des résultats obtenus avec

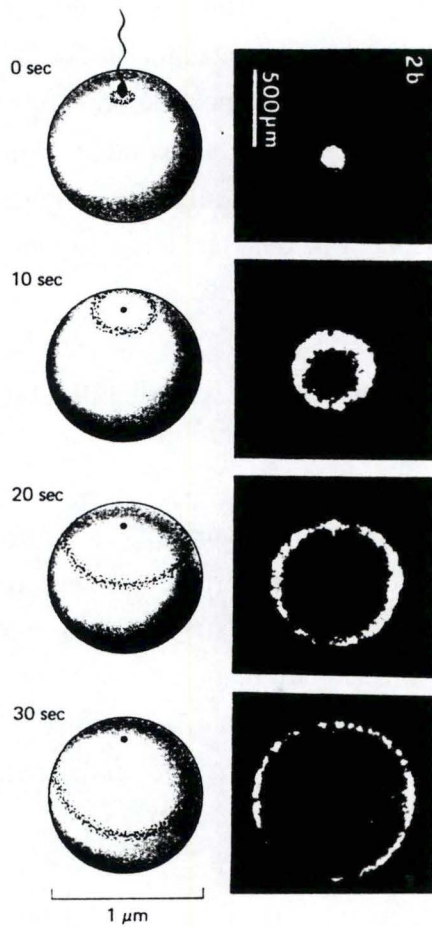


Fig. 15: Visualisation de la vague de calcium libre dans l'ovocyte. L'aequorine, protéine luminescente, émet de la lumière en présence de calcium libre. Ici, on a injecté dans un oeuf de poisson medaka de l'aequorine qui a diffusé à travers le cytosol, l'oeuf a ensuite été fécondé par un spermatozoïde et examiné à l'aide d'un amplificateur d'image. Les photographies sur la droite furent prises toutes les 10 secondes, l'objectif centré sur le site de pénétration du spermatozoïde. Elles montrent la vague de libération de calcium libre dans le cytosol à partir des réserves internes situées juste sous la membrane plasmique. Cette vague balaye l'oeuf à partir du site de pénétration du spermatozoïde, comme le montre les diagrammes de gauche (Alberts *et al.*, 1989).

des ovocytes d'oursins et de mammifères suggèrent que la fécondation augmente la concentration en Ca^{++} selon la voie suivante. Juste après la fécondation, on observe une augmentation de l'inositol -1-4-5 triphosphate (IP_3). Elle précède l'enrichissement du cytosol en Ca^{++} . Ce phénomène activé par le spermatozoïde semble avoir lieu grâce à une protéine G qui induit l'hydrolyse du phosphatidylinositol diphosphate (PIP_2) par une phospholipase C spécifique.

Le résultat de cette hydrolyse étant la formation de IP_3 et du diacylglycérol (DAG), l' IP_3 libère à son tour, dans le cytoplasme, les ions Ca^{++} retenus dans un compartiment intracellulaire tandis que le DAG active une protéine-kinase C (Figure 16). On ne sait cependant pas si le spermatozoïde se fixe à un récepteur situé dans la membrane plasmique de l'oeuf et qui est fonctionnellement couplé à une phospholipase C via une protéine G (Alberts *et al.*, 1989; Crozet, 1989).

2.7.2. L'augmentation du pH intracellulaire active les synthèses de l'oeuf

Puisque l'augmentation de la concentration en Ca^{++} dans le cytosol qui suit la fécondation est transitoire, elle ne peut pas, de toute évidence, intervenir directement dans les événements observés au cours des dernières phases de l'activation de l'oeuf. Il y a de plus en plus de raisons de penser que l'activation de la protéine-kinase C joue un rôle important dans ces derniers événements, principalement en augmentant le pH intracellulaire, par phosphorylation d'un échangeur $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ dans la membrane plasmique de l'oeuf. En effet, cette protéine de transport utilise l'énergie stockée dans le gradient Na^+ à travers la membrane, pour pomper des H^+ hors de la cellule. La sortie de ces derniers provoque une augmentation du pH intracellulaire. Il est maintenant bien établi qu'un tel processus induit une accélération des synthèses protéiques et d'ADN (Alberts *et al.*, 1989).

2.7.3. Exocytose des granules corticaux

Après la fusion des gamètes, la zone pellucide devient réfractaire à la fois à la liaison avec des spermatozoïdes et à sa pénétration par ces derniers. On appelle la "zona reaction", le processus caractérisé par des modifications touchant les glycoprotéines constitutives de la zone pellucide. Les agents responsables de ces modifications sont connus puisqu'il s'agit des granules corticaux, situés juste sous la membrane plasmique de l'ovocyte.

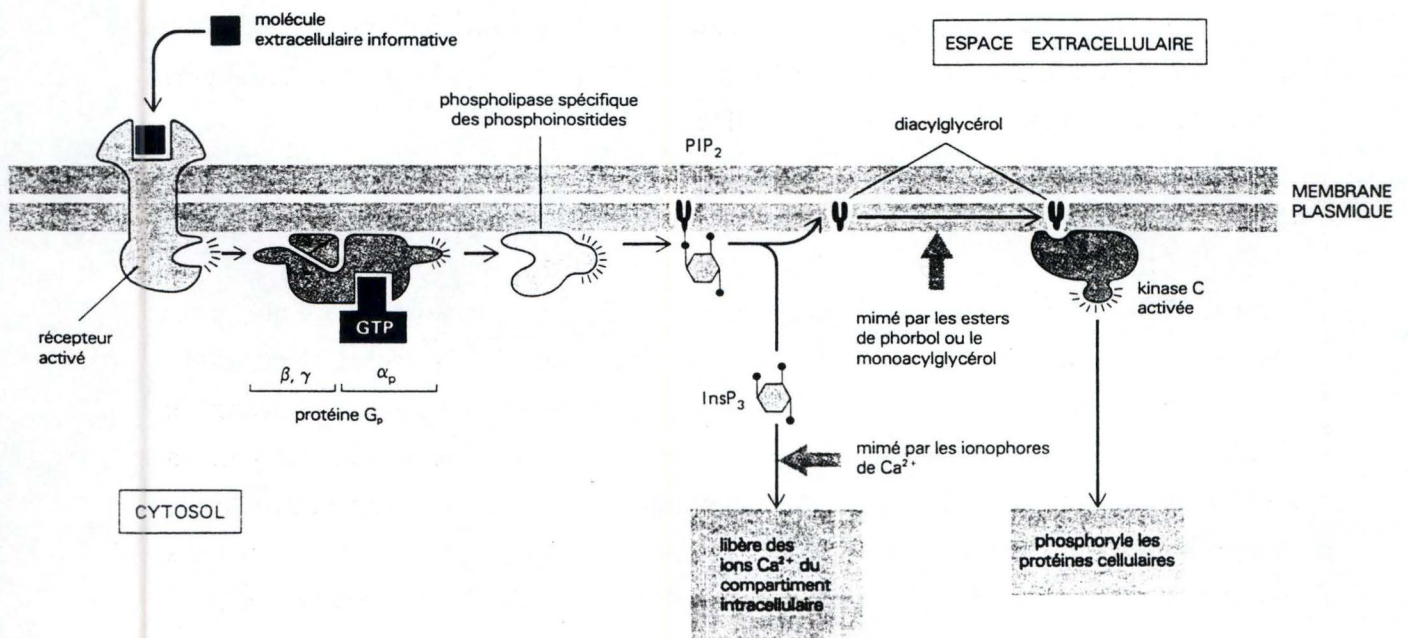


Fig. 16: Voie par laquelle la fécondation induit une augmentation de la concentration en calcium dans le cytoplasme de l'ovocyte (Alberts *et al.*, 1989).

C'est leur contenu qui, déversé dans l'espace périvitellin, modifie la zone pellucide (Wassarman, 1990). Cette dernière, dont la matrice est extrêmement lacunaire, permet un passage facilité du contenu des granules corticaux. Dès lors, des modifications apparaissent très rapidement conduisant à l'altération des fonctions de la zone pellucide. C'est ainsi que la ZP₃ d'un embryon ne montre plus les fonctions de récepteur et d'inducteur de la réaction acrosomiale.

Selon des études récentes, ces modifications seraient essentiellement le fait des oligosaccharides liés à la partie peptidique de la glycoprotéine. La ZP₃ modifiée est nommée ZP_{3f}. La ZP₂ n'échappe pas à ces modifications; elle subit une protéolyse au niveau des extrémités carboxyles et aminées, et devient ZP_{2f}. La conversion de ZP₂ en ZP_{2f} est corrélée à une diminution de la solubilité de la zone pellucide, processus plus communément appelé "hardening" de la pellucide.

Les changements de propriétés de cette dernière constitue le bloc secondaire à la polyspermie. Le bloc primaire (ou rapide) quant à lui apparaît au niveau de la membrane plasmique de l'ovocyte suite à un changement du potentiel membranaire. Ce dernier est consécutif à une modification de la perméabilité qui se produit au moment de la fusion avec le spermatozoïde fécondant (Crozet, 1989; Wassarman, 1990).

Le contenu des granules corticaux est composé de protéases et de glycoprotéases diverses, mais ces dernières sont assez mal connues. De nos jours on assimile ces petits organites, situés juste sous la membrane plasmique de l'ovocyte, à des lysosomes. Un ovocyte de souris non fécondé peut contenir jusqu'à 4500 granules corticaux qui s'accumulent pendant la croissance de l'ovocyte (Wassarman, 1990).

2.7.4. Achèvement de la seconde division méiotique de l'ovocyte et expulsion du second globule polaire

L'ovocyte mûr est arrêté en métaphase II. Sous l'effet de l'activation née par la pénétration du spermatozoïde, il termine sa seconde division méiotique, passe en anaphase, en télophase, puis se divise en deux cellules de tailles inégales: l'oeuf et le deuxième globule polaire. Elles contiennent chacune la même quantité (n) d'ADN maternel. Cette division cytoplasmique inégale présente un intérêt. Elle assure le maintien dans l'oeuf de la quasi-totalité des molécules et informations stockées lors de la croissance ovocytaire nécessaire au développement du jeune embryon.

2.8. FORMATION, DÉVELOPPEMENT ET MIGRATION DES PRONUCLEI

2.8.1. Décondensation du noyau des spermatozoïdes

Avant de redevenir fonctionnel, le noyau du spermatozoïde doit subir un certain nombre de modifications:

- dissolution de l'enveloppe nucléaire;
- réduction des ponts dissulfures des protéines associées à l'ADN;
- décondensation de la chromatine et remplacement des protamines (nucléoprotéines spécifiques du spermatozoïde) par des histones de type somatique.

La première modification survient au moment de l'incorporation du spermatozoïde dans l'ovocyte (qui est à ce moment en métaphase II). La chromatine mâle entre donc directement en contact avec le cytoplasme ovocytaire; elle se décondense durant la transition métaphase II - télophase, alors que la chromatine femelle est encore fortement condensée (Crozet, 1989).

Des études récentes montrent que le glutathion sous sa forme réduite (GSH), présent dans les ovocytes mûrs, favoriserait la réduction des ponts dissulfures des protamines et jouerait un rôle dans la décondensation du noyau du spermatozoïde (Perrault *et al.*, 1988).

2.8.2. Formation et développement des pronuclei

Les pronuclei, mâle et femelle, apparaissent dans le cortex de l'oeuf. Une enveloppe nucléaire se forme autour de la chromatine mâle décondensée et autour des chromosomes femelles qui subsistent dans l'oeuf après la deuxième division méiotique. La chromatine femelle est alors fortement condensée mais elle se décondense ensuite progressivement.

Le développement du pronucleus est contrôlé par des facteurs cytoplasmiques comme le MPGF (Male Pronucleus Growth Factor). Ce dernier n'est présent que dans les ovocytes dont la maturation cytoplasmique est complète (Plachot, 1988).

La synthèse d'ADN, correspondant à la phase S du cycle cellulaire, a lieu simultanément dans les deux pronuclei. La réplication de l'ADN ne commence cependant que lorsque les pronucléi sont complètement développés (Crozet, 1989).

2.8.3. Migration des pronuclei vers le centre de l'oeuf

Les pronuclei formés se déplacent vers le centre de la cellule, de façon à ce que les deux lots de chromosomes d'origine maternelle et paternelle puissent se rassembler sur le fuseau de la première division de segmentation.

Des recherches récentes montrent que microtubules et microfilaments sont impliqués dans cette migration. A ce propos, on a montré que les drogues qui inhibent leur polymérisation (nocodazole, colchicine) ou leur dépolymérisation (taxol) empêchent la migration des pronuclei vers le centre de l'ovocyte. Les microtubules sont également des structures dynamiques. Durant cette migration, on remarque que la duplication de l'ADN a déjà commencé.

2.8.4. Etablissement du fuseau de première division

Chez les mammifères, les pronuclei ne fusionnent pas, mais les enveloppes nucléaires des deux pronuclei deviennent étroitement jointives. Après la rupture de ces enveloppes, les chromosomes viennent s'aligner sur le fuseau de division mitotique qui se forme à partir des microtubules et des centrosomes déjà présents dans cette région cytoplasmique. La fusion des deux génomes ne se fait qu'à ce stade. Puis la première mitose se déroule de manière classique et permet la formation de deux blastomères: un nouvel embryon est né (Crozet, 1989; Plachot, 1988).

3. L'INSÉMINATION (MÉDICALEMENT) ASSISTÉE

3.1. INTRODUCTION

En l'espace d'une quinzaine d'années, les techniques de Procréation Médicalement Assistée (PMA) ont connu un essor considérable, surtout depuis l'avènement de la fécondation *in vitro* avec transfert d'embryons ou FIVETE (Steptoe et Edwards, 1978).

Réservée, à l'origine, uniquement aux indications tubaires, la FIVETE a rapidement vu s'élargir son champ d'application. C'est ainsi que, entre autres, les indications andrologiques ont été retenues. En effet, puisque dans le cadre de la technique, ovules et spermatozoïdes sont placés en étroit contact dans des volumes réduits de milieu de culture, l'occurrence d'une fécondation est en principe plus élevée que dans les voies génitales en conditions *in vivo*, en tous cas, pour les couples chez lesquels il existe un problème de sperme.

L'expérience a montré qu'il en était bien ainsi, mais certainement pas de manière absolue: si le taux normal de fécondation, en FIVETE, oscille entre 60 et 75 % en moyenne, il chute généralement en-dessous de 20 % dans les indications andrologiques. Cette valeur moyenne, pour indicative qu'elle soit, masque néanmoins le fait que dans de nombreux cas, le taux de fécondation peut être de zéro: en dépit de la présence souvent réduite, mais effective, de gamètes mâles, aucune pénétration d'ovule n'a lieu.

Grâce au progrès des connaissances d'une part, et des techniques de PMA de l'autre, on a tout naturellement tenté d'accroître le "rendement" fécondant des spermés déficients, dans le but d'atteindre la fécondation. C'est ainsi que sont nés deux types de techniques: d'une part la microinsémination ou technique invasive et d'autre part les techniques non invasives. Dans le cas de la microinsémination, diverses procédures de manipulation d'ovules et de spermatozoïdes ont été développées.

L'objectif de la microinsémination est de forcer la pénétration des enveloppes ovocytaires par les gamètes mâles. Dans le cas des techniques non invasives, par contre, on ne touche pas à l'intégrité des gamètes. Ces derniers sont simplement placés dans un milieu permettant la fécondation et les recherches sont basées sur l'étude de ces milieux.

3.2. LA MICROINSÉMINATION OU MÉTHODE INVASIVE

Si l'idée de "forcer" par voie mécanique ou biochimique la fécondation de l'ovule humain par le spermatozoïde n'est pas neuve la première réalisation publiée date seulement de 1986 (Gordon *et al.*, 1986) et la première grossesse, de 1988 (Ng *et al.*, 1988).

L'idée maîtresse du processus est de réduire ou de supprimer artificiellement les barrières naturelles à franchir par le spermatozoïde, à savoir:

- la corona radiata,
- la zone pellucide, et
- éventuellement, la membrane plasmique de l'ovocyte.

Des trois barrières, c'est sans doute la deuxième qui apparaît comme la plus significative dans le cadre de la micro-insémination. La corona, composée de petites cellules granulosales espacées, retenues par un voile de mucopolysaccharides, peut en effet être très facilement dispersée par un traitement biochimique (hyaluronidase 0,1 % en Hépès 10 mM; Cummings *et al.*, 1989) tandis que la membrane plasmique, proportionnellement beaucoup plus mince que la zone pellucide, peut facilement être pénétrée sans grand dommage par une micropipette effilée. Comme nous le verrons plus loin une seule technique, l'*Intracytoplasmic Sperm Injection* (ICSI), mène au franchissement artificiel de cette barrière.

Les techniques retenues reposent sur deux approches différentes; l'une est biochimique et l'autre, d'ordre mécanique.

La première, qui est aussi la plus ancienne, consiste en une dissolution locale de l'enveloppe protéique de l'ovule afin d'y ménager une perforation ou, au moins, un amincissement important.

L'approche mécanique est incontestablement celle qui connaît le plus de succès, manifesté, entre autre, par une multiplication des modalités de mise en oeuvre. Cela se traduit par une confusion dans les terminologies utilisées pour identifier ces modalités.

Comme pour le traitement biochimique, l'approche mécanique de la zone pellucide requiert un matériel de micromanipulation couplé à un microscope inversé: l'ovule est maintenu immobile et dans une position souhaitée grâce à une pipette de contention à bords rodés (diamètres interne et externe approximatifs: 8 et 60 microns);

quant à la perforation proprement dite, elle est pratiquée grâce à une pipette effilée à pointe acérée, dont le diamètre moyen est compris entre 2 et 5 microns.

Comme évoqué plus haut, la diversité des modalités techniques a engendré une multiplication des appellations: *zona drilling* (Gordon *et al.*, 1988), *zona cutting* (Cummings *et al.*, 1989), *zona cracking* (Edirisinghe *et al.*, 1991), *zona slitting*, *zona softening* (Simon *et al.*, 1991), *Partial Zona Dissection* ou PZD (Tucker *et al.*, 1991), *Subzonal Insemination* ou SUZI (Fishel *et al.*, 1990), *Intra-cytoplasmique Sperm Injection* ou ICSI (Palermo *et al.*, 1992), pour ne citer sans doute que les plus fréquentes. Outre qu'elles sont multiples, ces appellations sont parfois confondues par les spécialistes eux-mêmes, ce qui ajoute à la confusion. Dans un souci de simplification, nous n'avons retenu pour la suite, que les quatre dénominations qui tendent à s'imposer:

- *zona drilling* (ZD);
- *Partial Zona Dissection* (PZD);
- *Subzonal Insemination* (SUZI);
- *Intracytoplasmic Sperm Injection* (ICSI).

3.2.1. Zona drilling (ZD).

La ZD est une alternative des plus anciennes en la matière (1976); elle repose essentiellement sur un processus biochimique et plus particulièrement sur une dénaturation très localisée de la zone pellucide par une solution de Tyrode acide (pH 2,5) (Jean *et al.*, 1992), par de la trypsine ou par de la pronase (Vander Zwalmen *et al.*, 1991).

3.2.2. Partial Zona Dissection (PZD)

La PZD est une appellation générique qui rassemble tous types d'altérations mécaniques de la zone pellucide; de la plus grossière (*zona cracking*) qui consiste en une déchirure pratiquée dans l'enveloppe et dont l'ampleur est difficilement contrôlable, à la perforation simple ou double de la même enveloppe à l'aide d'une micropipette effilée. Depuis peu, le rayon laser a même été mis à contribution pour réaliser la perforation (Strohmer et Feichtinger, 1992; Tadir *et al.*, 1991).

3.2.3. Sub-Zonal Insemination (SUZI)

Comme les artifices précédents, la SUZI n'est accessible qu'avec l'appoint d'un double dispositif de micromanipulation. Son principe est simple; il consiste à aller déposer, dans l'espace périvitellin (entre la zone pellucide et la membrane ovocytaire), un ou plusieurs spermatozoïdes. Cette opération est rendue possible grâce à une micropipette effilée, d'un diamètre intérieur de 5 à 8 microns, dans laquelle un ou plusieurs gamètes mâles ont été préalablement aspirés.

3.2.4. Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI)

Paradoxalement l'ICSI, la technique la plus radicale de celle qui sont présentées ici, est celle qui a fait l'objet des premiers essais. En 1962, en effet, Hiramoto introduisait un spermatozoïde dans un ovule d'oursin. Comme pour les autres artifices, un matériel coûteux de micromanipulation est requis avec, cette fois, la nécessité de disposer d'une pipette calibrée suffisamment fine pour laisser un moindre traumatisme ovocytaire (principalement au niveau de la membrane), mais assez large pour permettre au manipulateur de happer un spermatozoïde ou, au moins, son noyau. Dans ce cas, en effet, le mouvement du gamète mâle, et donc de son flagelle, n'est plus requis; à tel point qu'on a rapidement pensé à "soniquer" les cellules c'est à dire les soumettre à des ultrasons afin de séparer les noyaux de leur organe locomoteur.

3.3. LES MÉTHODES NON INVASIVES

Il va de soi qu'une évaluation valable des techniques de microinsémination ne sera possible que lorsque de grandes séries auront été publiées. Trop de variantes existent encore dans les procédures décrites, avec des résultats particulièrement fragmentaires.

Il n'empêche que la recherche de solutions alternatives peut être entreprise. Elle existe, du reste, sous différentes formes. L'objectif est de mener à une augmentation du taux de fécondation sans avoir recours à toute la technologie invasive ou intrusive. Pour réaliser cet objectif, plusieurs voies d'approches sont à l'étude.

La première voie est l'utilisation de milieux conventionnels comme le HAM's F10, le HAM's F12, l'Earle's (Guerin, 1991), le Biggers - Whitten - Whittingham et le milieu de Tyrode complété avec de l'albumine bovine. L'utilisation de milieux

naturels commence aussi à être envisagée. C'est ainsi que des fécondations *in vitro* ont été réalisées dans du liquide amniotique humain ponctionné entre la 16^{ème} et la 18^{ème} semaine de gestation. Cette procédure montre des résultats encourageants tant sur le plan du pourcentage de fécondation que sur celui de la viabilité embryonnaire dans ce milieu (Debry, 1989; Gianaroli *et al.*, 1986 et 1989). De plus, des auteurs suggèrent que le liquide amniotique contient des substances, comme la fétuine (glycoprotéine pouvant inhiber les sérines protéases), capables de supprimer ou du moins de réduire le hardening spontané de la zone pellucide et donc de laisser les ovocytes dans un état propice à la fécondation (Schroeder *et al.*, 1990). Le processus de hardening spontané est identique au hardening classique mais il se déroule avant la fécondation et empêche toute fertilisation de l'ovocyte par un spermatozoïde.

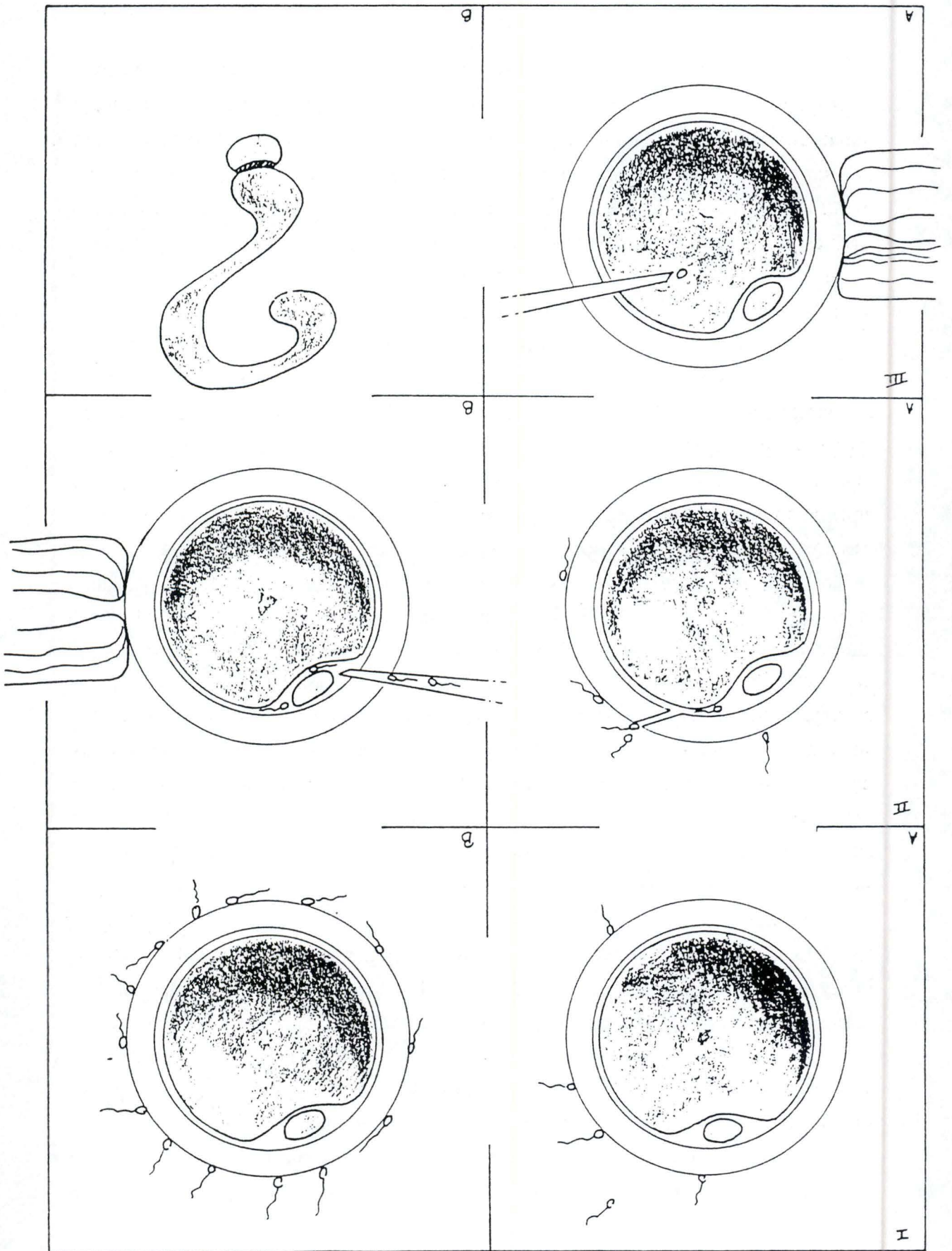
Une seconde voie d'étude est l'utilisation de cocultures. Dans ce cadre, la fécondation est réalisée sur une monocouche de cellules qui peuvent provenir de différentes sources. Dans un premier temps, les cellules utilisées étaient d'origines tubaire, endométriale et utérine, mais assez rapidement d'autres types cellulaires ont été proposés. C'est ainsi que des embryons de souris ont été cultivés sur un épithélium rénal d'origine, soit bovine (lignée MDBK), soit simiesque (lignée vero). Seule la lignée MDBK a permis l'obtention de blastocytes, avec une fréquence élevée de 68 % contre 28 % sur des cellules tubaires bovines (Guerin; 1991).

Le but de ces cocultures est d'améliorer la viabilité embryonnaire, afin de réaliser le transfert d'embryons dans la cavité utérine non plus 48 heures après la fécondation, mais environ 90 heures après cette dernière. Ceci diminuerait l'asynchronisme évident entre le stade de l'oeuf et celui de l'endomètre. En effet, *in vivo*, l'oeuf progresse encore dans l'oviducte et baigne donc dans des sécrétions tubaires spécifiques et distinctes des sécrétions utérines, dans lesquelles il est placé en cas de FIVETE, 48 heures après la fécondation (Guerin; 1991)

Le mode d'action des monocouches cellulaires sur l'embryon n'est pas entièrement élucidé, mais on peut envisager trois types d'action:

- apport de métabolites et de facteurs spécifiques de croissance;
- détoxification du milieu par élimination d'impuretés et/ou d'inhibiteurs du développement embryonnaire;
- contact direct cellules - embryon aboutissant à des échanges de signaux transmembranaires (Guerin; 1991).

Fig 17 : Représentation des trois niveaux d'approches différentiels (Debry, 1989).



3.4. DISCUSSION

Dans le domaine de l'insémination assistée, trois niveaux d'approches différentielles peuvent être définis, figurés par les trois rangées horizontales du schéma de la Figure 17.

L'approche non invasive, d'abord (I), qui n'atteint pas l'intégrité cellulaire des gamètes, en particulier de l'ovocyte. En A, il s'agit de la FIVETE "classique": spermatozoïdes et ovules sont placés dans le milieu de culture le plus approprié, de volume réduit; la promiscuité ainsi qu'un nombre élevé (si possible) de spermatozoïdes mobiles permet d'espérer la survenue de la fécondation. L'existence d'une composante andrologique sévère notamment dans l'espèce humaine rend parfois, même dans ces conditions, la fécondation aléatoire, soit que le nombre de spermatozoïdes est réduit, soit que leur mouvement de battement ciliaire est insuffisamment tonique, quand ce ne sont pas les deux en même temps. Dans de tels cas, on a tenté d'accroître la "performance fécondante" des gamètes mâles grâce à l'administration d'adjuvants au milieu de culture, ou d'un milieu d'essence "naturelle" tel que le liquide amniotique humain (Debry, 1989). C'est l'alternative présentée en I, B.

Le deuxième niveau est celui de l'approche invasive. L'enveloppe protectrice de l'ovocyte (la zone pellucide) est ouverte par micromanipulation. C'est là qu'on situe la ZD et PZD (Figure II, A) ou la SUZI (II, B). Si ces micromanipulations mènent incontestablement à des fécondations, peu probables en conditions de FIVETE habituelles (I, A), elles mènent également et dans une large mesure à des effets non désirés comme la polyspermie ou l'atrésie ovocytaire.

Le troisième et dernier niveau (III, A et B) est celui de l'approche intrusive. Non seulement l'enveloppe externe est percée et franchie, mais la membrane plasmique est également perforée afin de permettre l'introduction, dans le cytoplasme ovocytaire, d'un spermatozoïde entier ou de son seul noyau (ICSI). C'est ce qui est illustré en III, A. Quant à l'idéogramme III, B, il caractérise toute démarche additionnelle possible et probablement d'application prochaine, de nature intrusive: extraction de pronucléi surnuméraires après PZD ou ICSI, introduction d'un noyau diploïde après activation parthénogénétique de l'ovule et extraction du pronucleus femelle, etc.

3.5. LES RISQUES DE LA MICROMANIPULATION

Tous ceux qui pratiquent la fécondation *in vitro* le savent; un ovule dont la zone pellucide est ouverte est porteur de risques plus élevés d'atrésie, même en dehors de toute polyspermie majeure. Les échanges ioniques et métaboliques entre l'ooplasme et le milieu de culture, favorisés par l'existence d'une ouverture de la zone pellucide peuvent mener à une perturbation du métabolisme ovocytaire et à l'atrésie de la cellule.

Un tel processus n'est forcément pas exclu en cas de micromanipulation surtout si la membrane ovocytaire elle-même est de surcroît perforée; qu'elle le soit volontairement (ICSI) ou accidentellement.

On peut penser aussi que l'ICSI, au moins, en raison du côté aléatoire lié au choix du spermatozoïde injecté, peut induire davantage de zygotes et d'embryons génétiquement mal formés.

D'autres anomalies génétiques sont fréquemment observées, notamment la polyspermie, dont les pourcentages rapportés oscillent entre 15 et 67 %.

3.6. CONCLUSIONS

L'insémination assistée est de plus en plus utilisée, tant chez les animaux que chez l'homme, mais à des fins diverses.

Chez les animaux, les buts de ces méthodes sont économiques et tendent principalement à augmenter la pression de sélection. En général, la technique de fécondation se borne à la FIVETE "classique", mais les embryons obtenus sont éventuellement soumis à diverses manipulations (sexage, clonage, etc).

Par contre chez l'homme, le but premier est tout à fait différent, puisqu'il s'agit de répondre au désir parfois impérieux de procréer pour le couple et de porter en enfant pour la future mère. Pour ce faire les techniques sont devenues de plus en plus sophistiquées et invasives, avec les risques éthiques et biologiques qu'elles encourent. Et si, malgré la mise en oeuvre de telles solutions la fécondation ne survient pas, c'est qu'il existe un déficit majeur du processus, qui doit définitivement être considéré par le couple et l'équipe qui le prend en charge, comme le point ultime de non-retour dans la quête d'une conception intra-conjugale. Il restera alors à ceux-ci à s'orienter vers les solutions palliatives, devenus classiques, d'adoption ou d'insémination avec sperme de donneur.

Cela n'exclut évidemment pas que des recherches doivent être poursuivies, notamment dans l'étude de conditions, permettant d'accroître les aptitudes fécondantes des gamètes et le développement embryonnaire.

DEUXIÈME PARTIE:
TRAVAIL PERSONELLE

I. OBJECTIFS POURSUIVIS

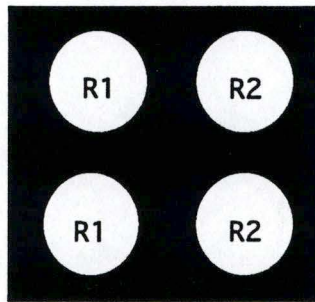
Quelques publications ont apporté des informations intéressantes sur l'utilisation bénéfique du liquide amniotique humain (LAH) comme milieu de culture dans des programmes de fécondations *in-vitro* non invasives (Gianaroli *et al.*,1986; Gianaroli *et al.*,1989; Schroeder *et al.*,1990).

De plus, au cours des 5 dernières années, à l'Institut de Morphologie Pathologique de Lovreval, 900 essais ou cycles de fécondation *in-vitro* ont été réalisés de façon comparative, soit dans du HAM F10 complété de 7,5% de sérum humain, milieu tout à fait conventionnel et considéré comme référence (Lucrecia *et al.*,1993), soit dans du LAH, milieu d'essence naturelle, prélevé entre la 16^{ème} et 18^{ème} semaine de grossesse. La composition de ces 2 milieux se trouve en annexe dans le tableau I pour le HAM F10 et dans le tableau II pour le LAH. Les résultats comparatifs de ces 900 essais ayant montré un taux de fécondation plus élevé dans le LAH que dans le HAM F10 (cfr. résultats), nous avons poursuivi le travail en recherchant les causes de cette différence. Pour ce faire, nous avons étudié l'effet différentiel des 2 milieux sur les gamètes mâles et femelles. En ce qui concerne les spermatozoïdes, nous avons suivi l'évolution de la motilité et du taux de réaction acrosomiale au cours du temps pour chacun des 2 milieux. Pour les ovocytes, nous nous sommes intéressés au hardening spontané de la zone pellucide, Schroeder *et al.*, (1990) ayant suggéré que les effets favorables du LAH pourraient provenir d'une inhibition du hardening spontané.

Puisque les substances inhibitrices du hardening spontané seraient des inhibiteurs de protéases, nous avons aussi été amenés à nous poser des questions concernant les rôles de l'acrosine dans la fécondation.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

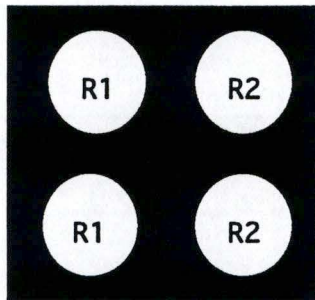
Sperme 1



HAM F10 + sérum humain 7,5%

LAH (16ème semaine)
centrifugé, filtré et
décomplémenté (56°C,30')

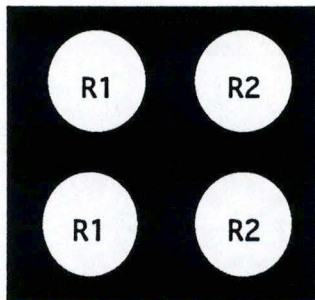
Sperme 2



HAM F10 + sérum humain 7,5%

LAH (16ème semaine)
centrifugé, filtré et
décomplémenté (56°C,30')

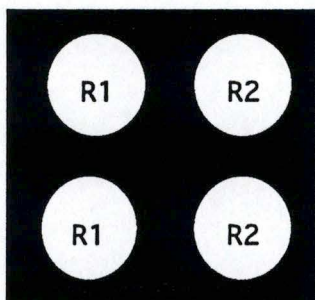
Sperme 3



HAM F10 + sérum humain 7,5%

LAH (16ème semaine)
centrifugé, filtré et
décomplémenté (56°C,30')

Sperme 4



HAM F10 + sérum humain 7,5%

LAH (16ème semaine)
centrifugé, filtré et
décomplémenté (56°C,30')

Fig. 1: Représentation schématique de l'expérience N°1. Illustration des boîtes de culture à 4 puits dont sont issus les prélèvements soumis à examen, aux temps prévus par le protocole expérimental.

1. CONDITIONS EXPERIMENTALES

Les expériences réalisées pour ce mémoire ont été effectuées à l'Institut de Morphologie Pathologique de Loverval (I.M.P.L.) et au laboratoire de Physiologie Animale des Facultés Universitaires Notre Dame de la Paix de Namur.

Les spermés utilisés sont issus de la banque de sperme de l'I.M.P.L.; quant aux ovocytes, ils ont été prélevés sur des souris venant de l'animalerie des Facultés.

2. PLANS EXPERIMENTAUX ET METHODES

2.1. Effets des milieux sur les spermatozoïdes

2.1.1. Objectifs poursuivis

Deux expériences ont été réalisées. Pour la première, les spermatozoïdes ont été mis en présence de LAH ou de HAM F10 (GIBCO). Pour la seconde, les spermatozoïdes ont été placés au contact de LAH ponctionnés à des âges gestationnels différents, et préparés de différentes façons.

Lors de chaque essai, des spermatozoïdes sont prélevés dans les différents milieux à des temps successifs, afin de quantifier l'évolution de leur motilité et de leur réaction acrosomiale.

2.1.2. Protocole expérimental

La première a été réalisée avec 4 spermés humains de bonne qualité, congelés dans l'azote liquide et prélevés dans la banque de sperme de Loverval.

Après réchauffement, ces spermés sont soumis à une technique, appelée swim-up ou migration ascendante, qui permet de ne récupérer que les spermatozoïdes mobiles.

Le milieu de culture utilisé pour ce tri sélectif contient de l'albumine sérique responsable de capacitation des gamètes mâles.

A l'issue de la sélection, 250 µl de suspension de spermatozoïdes motiles et capités sont déposés dans des *boîtes à 4 puits* (Nunc[®] 4 cell plates) qui contiennent 700 µl des milieux dont on veut tester les effets : le HAM F10 complété avec 7,5% de sérum humain et le LAH ponctionné à la 16^{ème} semaine de grossesse, filtré après centrifugation et décomplété à 56°C pendant 30 minutes (Figure 1).

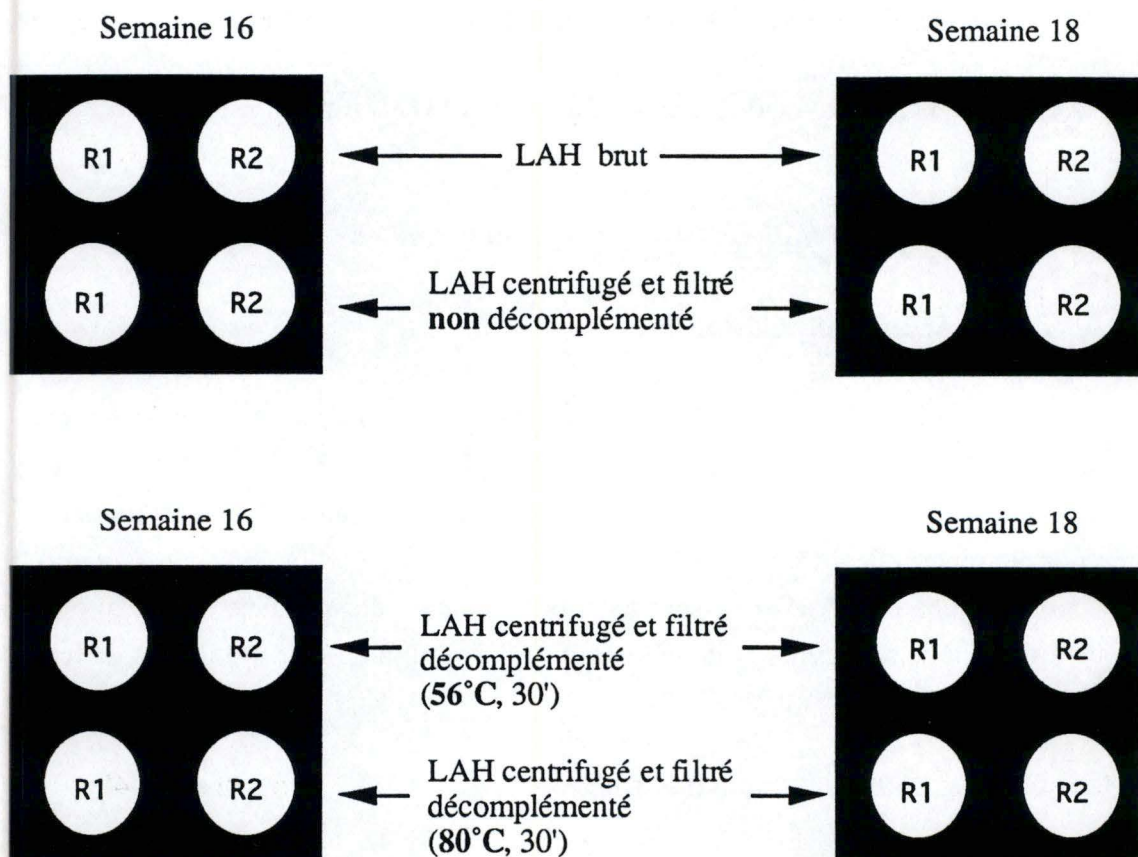


Fig. 2: Représentation schématique de l'expérience N°2.
 Les résultats relatifs au liquides amniotiques prélevés à 20 et 24 semaines de grossesse ne sont pas illustrés ici, bien que les conditions expérimentales aient été les mêmes.

Les boîtes sont ensuite placées dans une étuve à CO₂, régulée à 37°C et à 5% de CO₂. Aux temps 0, 3, 9, 18, 24 heures, des prélèvements de spermatozoïdes sont effectués dans ces boîtes, sous flux laminaire; leur motilité est étudiée sur cellule de Bürker et la réaction acrosomiale est mise en évidence par une coloration. Ces essais sont répétés deux fois.

La seconde expérience est réalisée avec un sperme humain, frais, de bonne qualité. Elle se déroule exactement selon la même procédure technique que la précédente avec, toutefois, des milieux à tester différents (Figure 2): il s'agit de LAH ponctionnés à des âges gestationnels différents et préparés de façons différentes. Les âges sélectionnés sont 16, 18, 20 et 24 semaines. Chaque fois, ces LAH sont soumis à quatre modes de préparations différents :

1. pas de préparation, LAH utilisé à l'état brut
2. LAH centrifugé, filtré, mais non décomplémenté
3. LAH centrifugé, filtré et décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes
4. LAH centrifugé, filtré et décomplémenté à 80°C pendant 30 minutes

2.1.3. Spermés utilisés

2.1.3.1. Le sperme congelé

Les spermés congelés utilisés sont de bonne qualité car ils sont tous issus d'une banque de sperme. Pour être retenu, un sperme doit contenir plus de 40·10⁶ spermatozoïdes par ml dont au moins 50% sont mobiles et autant morphologiquement normaux.

Chaque sperme retenu pour la banque subit en outre un essai de congélation, afin de s'assurer de la résistance des spermatozoïdes à ce processus de conservation.

Enfin chaque donneur subit une anamnèse et des tests sanguins qui permettent de s'assurer qu'il est en bonne santé et qu'il ne risque pas, via son sperme, de transmettre l'une ou l'autre maladie ou tare génétique.

Avant congélation le sperme est mélangé à un milieu cryoconservant puis conditionné en paillettes de 0,5 ml. En général, le rapport sperme/cryoconservant est de 2 : 1, mais peut être de 1 : 1 pour les très bons spermés. Le cryoconservant est un liquide visqueux, composé de glycérol, de glycine, de glucose, de jaune d'oeuf et de citrate de sodium mis en solution dans de l'eau distillée. Quelques gouttes de NaOH 1M sont encore ajoutées afin de porter le pH à une valeur comprise entre 7 et 7,5. Les paillettes

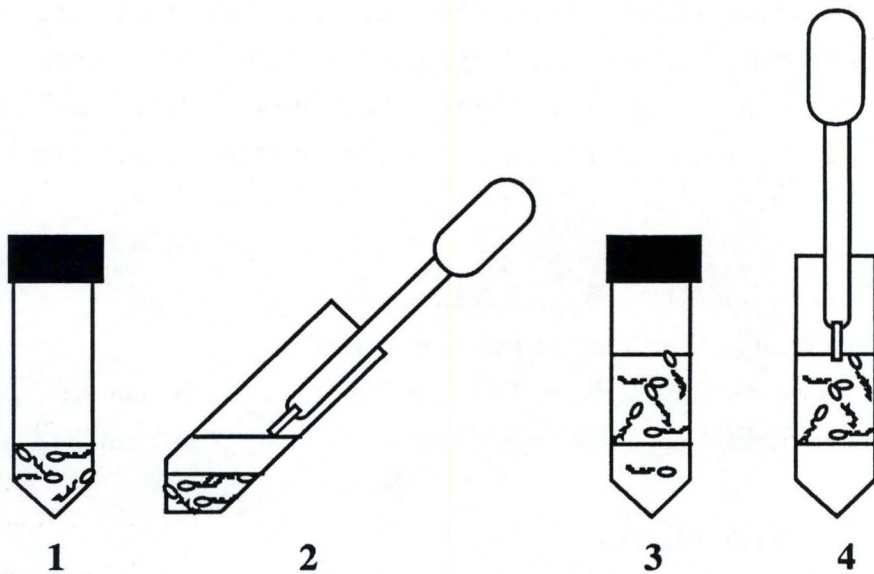


Fig. 3: schéma de la capacitation par migration ascendante ou "swim-up".

étape 1: le contenu de la paillette est déposé dans le fond du tube.

étape 2: mise en place avec précaution du milieu de capacitation au-dessus du sperme.

étape 3: migration ascendante et capacitation des spermatozoïdes mobiles progressifs (le milieu contient de la sérum Albumine).

étape 4: récupération de la fraction supérieure qui contient les spermatozoïdes mobiles progressifs.

sont bouchées avec une poudre qui polymérise au contact de l'eau. Elle sont ensuite placées au moins 10 minutes en position horizontale dans des vapeurs d'azote liquide, puis plongées dans de l'azote liquide pour une durée en principe illimitée.

2.1.3.2. Le sperme frais

Le sperme frais est émis par masturbation une heure avant son utilisation. L'éjaculat est recueilli dans un pot stérile et maintenu à 37°C. Son volume varie en général entre 2 et 5 ml. Il est fourni par un donneur dont on sait que la semence correspond aux critères de bonnes qualités nécessaires pour la conservation dans la banque.

2.1.4. Migration ascendante ou swim-up

La migration ascendante, ou swim-up, est un procédé simple qui permet de sélectionner les spermatozoïdes motiles d'un éjaculat ou d'une paillette. (Figure 3)

Comme préparation préliminaire, le sperme fraîchement éjaculé est lavé dans du milieu HAM F10 + sérum et les spermatozoïdes concentrés par centrifugation. Le sperme en paillettes est simplement décongelé dans un bain-marie à 20°C pendant une minute.

Les étapes du swim-up peuvent ensuite être schématisées comme suit:

- déposer délicatement au dessus du sperme 2 ml de HAM F10 additionné de sérum humain (7,5%) et d'antibiotiques (pénicilline + streptomycine). Cette opération est réalisée en inclinant le tube à 45°C et sans à-coups, afin d'obtenir une interface sperme-milieu très nette. Il faut en effet éviter d'homogénéiser les deux parties puisqu'à l'issue de la technique, seule la fraction supérieure sera prélevée, ne contenant normalement, que les spermatozoïdes mobiles. Afin de garantir l'asepsie, toutes ces opérations sont réalisées sous hotte à flux laminaire;
- permettre la migration durant une heure et demi dans l'étuve à CO₂ (37°C, 5% de CO₂);
- collecter la fraction supérieure du tube (celle qui contient les spermatozoïdes mobiles et capacités) sous hotte à flux laminaire;
- centrifuger la fraction supérieure pendant 5 minutes à 2700 rpm;
- éliminer le surnageant et remettre en suspension le culot dans 1,5 ml de HAM F10.

2.1.5. Préparation des milieux

Quel que soit son mode de préparation, le LAH utilisé pour les expériences résulte toujours d'un pool de plusieurs ponctions différentes réalisé en hôpital dans le but de pratiquer une amniocentèse. Le LAH brut contient donc tout les éléments cellulaires et protéiques d'origine foetale.

Après la ponction le LAH est centrifugé pendant 10 minutes à 4100 rpm puis filtré sur un filtre à 0,2 µm dans des conditions d'asepsie optimales. Ce LAH préparé contient encore tous les éléments protéiques d'origine foetale. Il peut ensuite être décomplémenté par chauffage au bain-marie pendant 30 minutes à 56°C ou dénaturé à 80°C.

Le HAM F10 est préparé de la façon suivante : 46 ml de HAM F10, 3 ml de sérum humain (mélange de plusieurs sérums) et 1 ml de solution antibiotiques (pénicilline + streptomycine).

2.1.6. Colorations pour la mise en évidence de la réaction acrosomiale

a.) La triple coloration de Talbo et Chacon

La triple coloration de Talbo et Chacon requiert, comme son nom l'indique, 3 colorants :

- le bleu trypan (colorant vital) (Jansen Chemical ref : 15174/1)
- le brun de Bismarck (Allied Chemical ref : 21000)
- le rose bengale (Jansen Chemical ref : 24289/1)

La coloration est effectuée selon la procédure suivante :

- prélever 50 µl de suspension de spermatozoïdes dans un puits à l'aide d'une pipette stérile;
- ajouter à ce prélèvement 50 µl de bleu trypan dilué à 0,4%;
- incuber ce mélange à 37°C pendant 15 minutes;
- centrifuger ce mélange à température ambiante pendant 5 minutes à 2100 rpm;
- éliminer le surnageant et remettre le culot en suspension dans du HAM F10;

- centrifuger à nouveau (toujours 5 minutes à 2100 rpm). Cette opération est répétée jusqu'à obtention d'un surnageant de couleur bleu pâle (+/- 3 lavages);
- fixer le culot spermatique pendant 30 minutes avec de la glutaraldéhyde à 3% dans du tampon cacodylate 0,1 M à pH 7,4;
- centrifuger à nouveau et resuspendre le culot spermatique dans de l'eau désionisée, répéter cette opération 2 fois;
- étaler les spermatozoïdes sur des lames (frottis : faire glisser la goutte avec une pipette);
- sécher les lames à température ambiante;
- colorer les lames avec le brun de Bismarck. Cette phase est réalisée à 37°C pendant 5 minutes. Le colorant est mis en solution à 0,8% dans de l'eau désionisée;
- laver les lames dans de l'eau désionisée pendant quelques secondes;
- colorer ensuite avec le rose bengale, à 24°C pendant 20 minutes. Le colorant est mis en solution à 0,8% dans du tampon tris 0,1 M à pH 5,3;
- laver à nouveau les lames dans de l'eau désionisée durant quelques secondes;
- déposer sur les lames une goutte de DePeX (DPX) puis une lamelle couvre objet;
- observer les lames au microscope optique.

b.) Coloration au jaune de Naphthol et à l'érythrosine B.

La coloration est réalisée par les opérations suivantes :

- réaliser sur lame un frottis de 50 µl de suspension de spermatozoïdes
- rincer la lame 10 secondes dans un bain de NaCl à 0,9%;
- colorer la lame durant 30 minutes dans une solution de jaune de Naphthol à 0,1% (Sigma, ref : F-7754). La solution de jaune doit être filtrée avant son utilisation;
- rincer 10 secondes dans une solution aqueuse d'acide acétique à 1%;
- colorer la lame 10 minutes dans un mélange à volumes identiques de jaunede Naphthol et d'érythrosine B (Sigma, ref : E-7505). Ici les 2 colorants sont en solution aqueuse à 0,2%. Le pH du mélange est

- très important; s'il est inférieur à 4,8, seul le colorant jaune agit, et s'il est supérieur à 4,8 l'érythrosine B précipite;
- rincer à l'eau distillée et sécher sur plaque chauffante ou en position verticale;
 - déposer sur la lame une goutte de DPX et une lamelle couvre objet;
 - observer la lame à l'aide d'un microscope optique.

c.) Coloration par fluorescence

La coloration par fluorescence est réalisée par une lectine de pois (*Pisum sativum*) couplée au FITC (isothiocyanate de fluorescéine) (Sigma, L-0770). Les lectines sont extraites de nombreuses plantes et de certains animaux. Elles ont, entre autres, comme propriété de se fixer à différents résidus glycosidiques grâce à leur conformation spatiale. La lectine utilisée pour cette coloration possède une affinité pour les résidus α -D glycosyl et α -D mannosyl. En fixant des molécules fluorescentes comme le FITC aux lectines on en fait de bons marqueurs des résidus à identifier.

La technique utilisée ci- dessous a été décrite par Tesarik *et al.*, (1993). Dans le cas présent, la lectine couplée au FITC se fixe à l'acrosine, une protéine de la matrice acrosomiale. Pour que ce processus survienne, les membranes des spermatozoïdes doivent au préalable être perméabilisées dans un bain de méthanol.

La coloration par fluorescence est réalisée par les opérations suivantes :

- prélever 50 μ l de spermatozoïdes dans un puits à l'aide d'une pipette stérile;
- laver deux fois cette suspension de spermatozoïdes avec du PBS 0,1M;
- réaliser un frottis;
- laisser sécher à l'air;
- placer le frottis dans un bain de méthanol à 90% pendant une minute;
- incuber les frottis 30 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante en présence de la lectine couplée au FITC, la lectine est mise en solution dans du PBS (50 μ g/ml de PBS);
- laver les frottis 15 minutes dans de l'eau, sécher et monter les lames avec du diazabicyclo 2, 2, 2, octane ou DABCO (Sigma, D-2522). Les lames sont conservées au frigo;
- observer au microscope à fluorescence. Le FITC émet une lumière verte quand il est excité par une lumière de longueur d'onde de 485 nm.

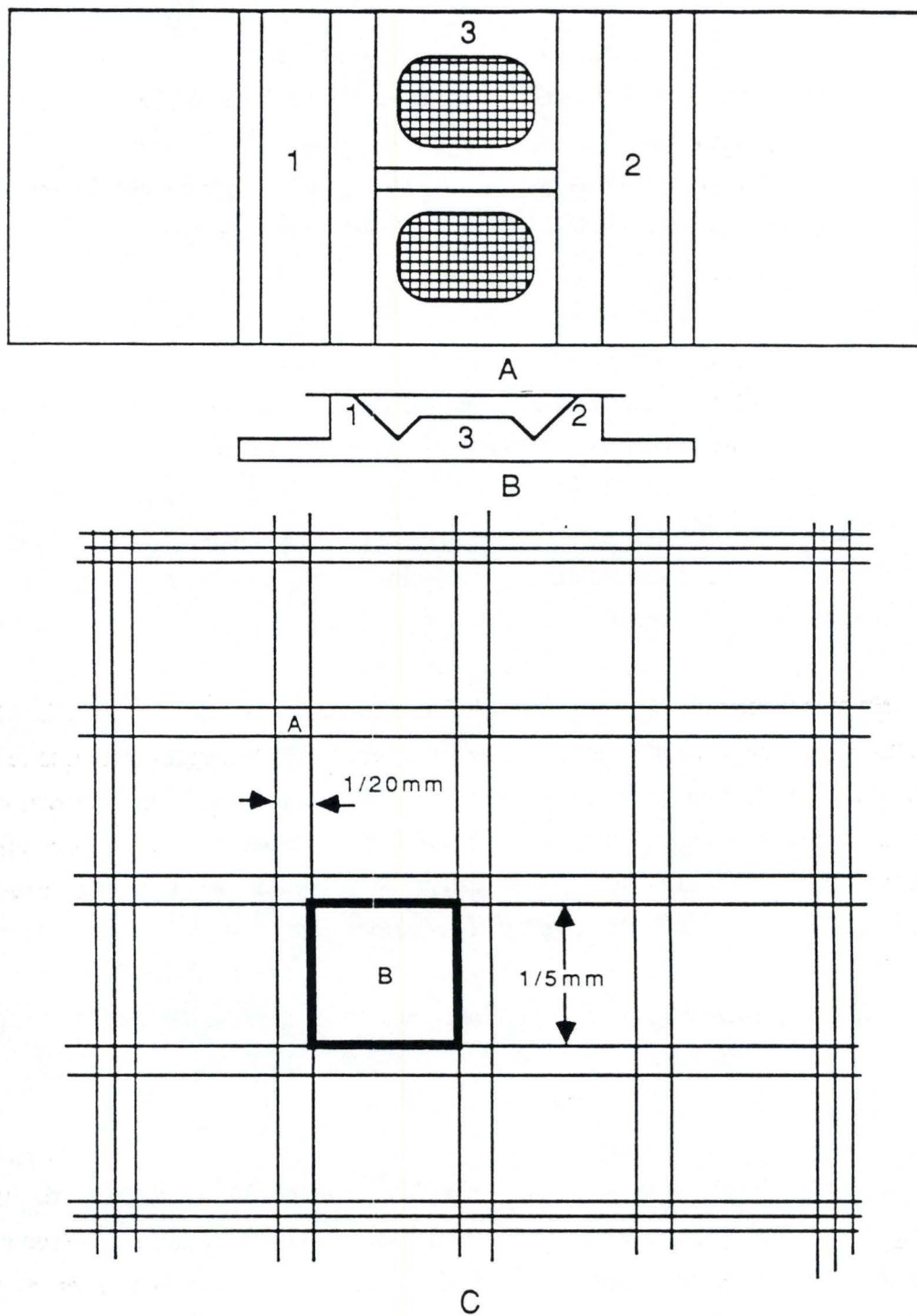


Fig. 4: La chambre de Burkert: (A) vue du dessus, (B) vue latérale, (C) schéma d'un des neuf grands carrés du quadrillage. 1 et 2: support de la lame couvre-objet, 3: plateau dans lequel sont gravés les quadrillages.

2.1.7. Comptage des spermatozoïdes motiles

Le comptage des spermatozoïdes motiles est réalisé à l'aide d'une cellule de Bürker (Figure 4). Aux temps sélectionnés, 50 µl de suspension de spermatozoïdes sont prélevés dans les *boîtes 4 puits* et déposés sur la cellule. Cinquante spermatozoïdes sont comptés en partant du bord supérieur gauche de la grille gravée sur la cellule. Trois groupes de spermatozoïdes sont distingués :

- les mobiles progressifs (motiles);
- les mobiles peu ou non progressifs (ceux qui bougent sur place);
- les immobiles.

2.2. EFFETS DES MILIEUX SUR L'OVOCYTE

2.2.1. Objectifs poursuivis

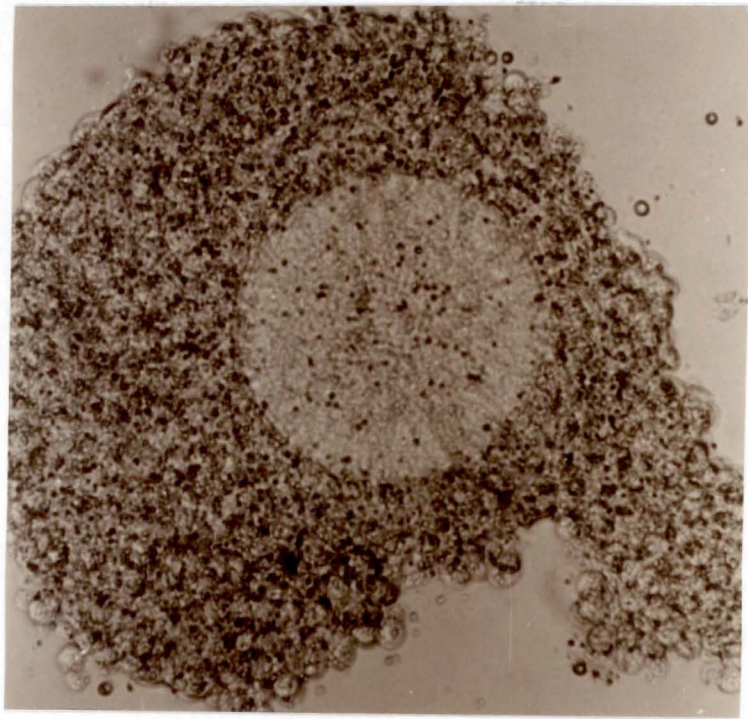
En ce qui concerne l'ovocyte, c'est le hardening spontané de la zone pellucide qui a principalement retenu notre attention. Notre idée de départ était en effet que le LAH contient des substances qui pourraient inhiber ou, au moins ralentir l'apparition du hardening spontané de la zone pellucide. Deux voies d'exploration ont donc été retenues pour aborder cette question; une voie histologique et une voie biochimique (Schroeder *et al.*, 1990).

2.2.2. Approche histologique

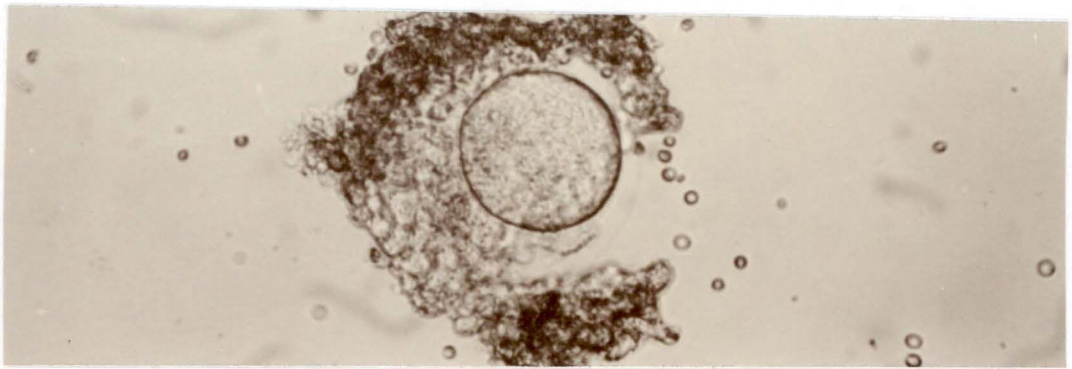
Par l'approche histologique nous avons essayé de mettre en évidence l'apparition du hardening spontané de la zone pellucide dans le HAM F10 complété avec 7,5% de sérum humain et dans du LAH, ponctionné à la 16^{ème} de grossesse, centrifugé, filtré et décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes. Pour réaliser cette objectif nous avons utilisé du rouge de Ruthénium (Sigma, R-2751), et observé, après une préparation appropriée, les ovocytes au microscope électronique à transmission (TEM).

L'intérêt de ce colorant, est le fait qu'il permet de mettre en évidence, par une différence de contraste, deux couches concentriques dans des zones pellucides d'ovocytes fécondés. Or, comme les modifications de la zone pellucide après la fécondation sont dues à l'exocytose des granules corticaux, c'est-à-dire au processus de hardening, ce colorant est un bon outil pour suivre l'apparition du hardening spontané dans la zone pellucide (Bonnie *et al.*, 1984; Schroeder *et al.*, 1990).

A.



B.



C.

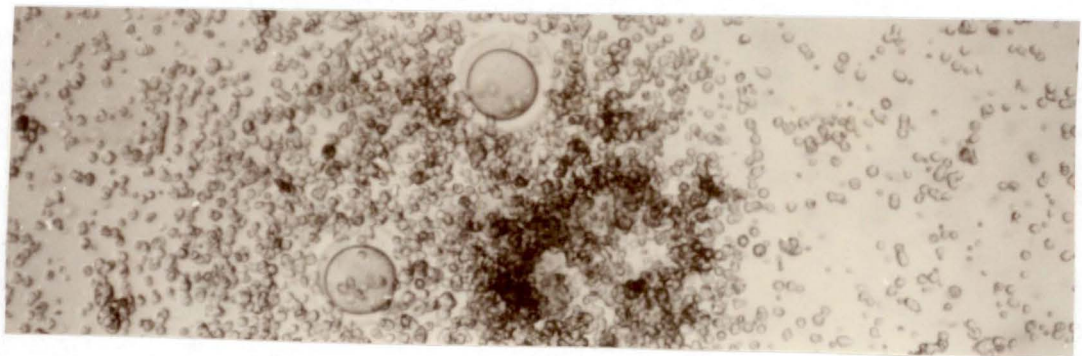


Photo 1 (A, B, C): Action de l'hyaluronidase. (A) temps 0 sec., (B) temps 30 sec. et (C) temps 1 minute.

2.2.2.1. Protocole expérimental

L'expérience est réalisée à partir de 2 souris femelles adultes venant de l'animalerie des Facultés de Namur. Ces souris subissent un traitement de superovulation et sont sacrifiées en vue de récupérer les masses ovocytaires. Celle-ci subissent ensuite un traitement enzymatique (solution d'hyaluronidase à 0,1% dans du HAM F10) afin de récupérer les ovocytes, libérés de leur corona radiata constituée de cellules provenant du cumulus oophorus baignant dans une matrice riche en acide hyaluronique.

Les ovocytes lavés dans le HAM sont ensuite incubés dans 700 µl de l'un des 2 milieux, dans des *boîtes 4 puits*. Ces dernières sont placées dans une étuve portée à 37°C et sous une atmosphère de 5% de CO₂.

Aux temps 1, 3 et 6 heures, des ovocytes sont prélevés sous hotte à flux laminaire à l'aide d'une pipette stérile et soumis à la coloration au rouge de Ruthénium ainsi qu'au conditionnement technique nécessaire à l'observation au TEM. Cette dernière permet la réalisation de clichés visualisant la zone pellucide des ovocytes.

2.2.2.2. Obtention des ovocytes

Les ovocytes sont obtenus suite à un traitement de superovulation appliqué à des souris. Deux injections sont pratiquées à 48 heures d'intervalles, la première de 50 U.I. (unité internationale) de Pregnant Mare Serum Gonadotrophin (PMSG), hormone à effet FSH-LH favorisant la superovulation et la deuxième, de 50 U.I. de Human Chorionic Gonadotrophin (HCG), hormone induisant l'ovulation.

Les souris sont sacrifiées 17 heures après la deuxième injection. La paroi abdominale est ouverte, les oviductes localisés, prélevés et déposés dans une boîte de culture contenant du HAM F10. Si elles sont importantes, les masses ovocytaires apparaissent au microscope stéréoscopique par transparence à travers la paroi distendue du conduit. Elles sont extraites par dissection puis placées dans une solution à 0,1% d'hyaluronidase (Sigma, H-3506) dans du HAM F10. Cette étape permet de récupérer les ovocytes contenu dans les masses ovocytaires (Photo 1). En quelques secondes, la masse cellulaire entourant les gamètes femelles est dispersée, et les ovocytes libres, apparaissent nettement. Le tout est pratiqué sous hotte à flux laminaire.

2.2.2.3. Coloration et préparation des ovocytes pour le TEM

Les ovocytes prélevés dans les 2 milieux subissent une coloration au rouge de Ruthénium et une préparation pour l'observation au TEM, dont les étapes sont schématisées comme suit :

Fixation et coloration:

- incuber deux heures et demi à température ambiante les ovocytes plonger dans une solution de 1 ml de glutaraldéhyde (Fluka) à 2,5% dans du tampon cacodylate 0,1 M à pH 7,4 et de 0,5 ml de rouge de Ruthénium aqueux à 1500 ppm ;
- rincer les ovocytes dans un tampon cacodylate 0,1 ml pendant 10 minutes;
- plonger ensuite les ovocytes dans une solution de post-fixation, composée de 0,5 ml de tétraoxyde d'osmium (OsO_4) à 0,1% dans de l'eau distillée, de 0,5 ml de solution de rouge de Ruthénium à 1500 ppm dans de l'eau et de 0,5 ml de tampon cacodylate à 0,2 M à pH 7,4;
- incuber les ovocytes 1 heure à température ambiante;
- rincer les ovocytes dans un tampon cacodylate 0,1 M pendant 10 minutes.

Préparation pour le TEM:

- déshydrater les ovocytes colorés par des bains de 10 minutes dans concentrations croissantes en éthanol (50%, 70%, 90% puis 3x100%);
- placer les ovocytes 2 fois 15 minutes dans de l'oxyde de propylène (Fluka), qui est le solvant du milieu d'inclusion;
- placer, à nouveau, les ovocytes 2 fois 15 minutes dans un mélange constitué à parts égales d'oxyde de propylène et d'epon 812 (résine époxy), elle constitue le milieu d'inclusion en microscopie électronique à transmission. Cette résine, liquide à température ordinaire polymérise à 60°C;
- placer ensuite les ovocytes pendant 1 heure 30 sur un agitateur rotatif à mouvement lent dans une goutte d'epon à 37°C;
- déposer les ovocytes au fond d'une capsule en plastique, recouvrir d'epon et placer une nuit, 24 heures et 72 heures dans une étuve

respectivement à 37°C, 45°C et 60°C afin de polymériser la résine. L'ovocyte est alors enfin prêt pour la coupe;

- réaliser à l'ultratome des coupes de 400 à 800 Å, recueillies sur des grilles;
- colorer les grilles 20 minutes avec une solution alcoolique d'acétate d'uranyle (Fluka) à 0,1% et 5 minutes avec du Reynolds, solution de citrate de plomb.

Examen au TEM:

Dans un microscope électronique, ce sont des électrons (et non des photons) qui constituent "la source lumineuse". Ces électrons émis par le chauffage d'un filament sont accélérés grâce à une haute tension de 60 kV. Afin d'éviter la déviation des électrons, la colonne du microscope électronique est soumise à un vide poussé. Aussi, les grilles déposées sur un porte-échantillon sont introduites dans le microscope via un sas isolant afin de ne pas rompre le vide de la colonne. Les grilles peuvent ainsi être observées et des clichés visualisant la zone pellucide de nos ovocytes peuvent être pris.

2.2.3. Approche biochimique

L'approche biochimique du phénomène de hardening spontané de la zone pellucide de l'ovocyte est basée sur la recherche de la présence d'inhibiteurs de protéases dans les 2 milieux étudiés (le HAM F10 complété avec 7,5% de sérum humain et le LAH ponctionné à la 16^{ème} semaine de grossesse centrifugé, filtré et décomplété à 56°C pendant 30 minutes). Ces inhibiteurs de protéases pourraient en effet réduire voir supprimer, le hardening spontané de la zone pellucide. En effet, la littérature mentionne que ce processus serait dû à une exocytose du contenu des granules corticaux, situés en périphérie de l'ovocyte, composés de protéases et de glycoprotéases (Schroeder *et al.*, 1990; Wassarman, 1990).

2.2.3.1. Protocole expérimental

Dans un premier temps, nous avons réalisé des essais préliminaires ayant pour but de déterminer les concentrations enzymatiques, pour lesquels la vitesse de la réaction est directement proportionnelle à la concentration en enzyme, c'est-à-dire pour lesquels $V=k[E]$.

Ces concentrations déterminées, nous avons réalisé des tests d'inhibition de l'activité de la trypsine et de l'acrosine par nos deux milieux, tels quels, ensuite dénaturé 10 minutes à 100°C.

Pour terminer, nous nous sommes intéressés aux inhibiteurs potentiels présents dans les 2 milieux afin de tester leur action sur l'activité de la trypsine et de l'acrosine. L' α_2 macroglobuline et l' α_1 antitrypsine cités dans la littérature ont été retenues.

2.2.3.2. Détermination de l'activité enzymatique

La procédure de détermination de l'activité enzymatique qui suit, est celle habituellement utilisée pour la trypsine. Elle a aussi été utilisée pour l'acrosine car cette dernière est une sérine protéase trypsine like. Cette acrosine a été partiellement purifiée au laboratoire de chimie physiologique des FNNDP à partir de sperme ovin et nous a été aimablement cédée par ce laboratoire, où les essais se sont déroulés.

Le principe de la réaction est la dégradation par nos enzymes d'un substrat chromogène le N α -Benzoyl-Arginine P-Nitroanilide (BAPNA , Sigma B-4875). Ce substrat est préparé à partir de 30 μ l de BAPNA (à 0,2 M dans du DMSO), ajoutés à 3 ml de tampon tris 0,1 M à pH 7,5 + CaCl₂ 50 mM.

Dans le cas de la trypsine nous avons utilisé une solution stock à 1000 μ g/ml à partir de laquelle nous avons effectués diverses dilutions, allant de 0,1 à 7,5 μ g de trypsine/ml.

En ce qui concerne l'acrosine, la solution stock est de 2910 μ g/ml. Les différentes dilutions réalisées vont de 0,58 à 58,20 μ g/ml.

Les diverses manipulations de la détermination de l'activité enzymatique sont schématisées comme suit :

- pipeter successivement dans des tubes Eppendorfs 400 μ l d'eau desionisée, 100 μ l d'acrosine ou 100 μ l de trypsine, 500 μ l de substrat;
- porter au bain-marie 15 minutes à 37°C;
- stopper la réaction par ajout de 150 μ l d'acide acétique à 30%;
- centrifugé pendant 10 minutes à 3000 rpm;
- lire au spectrophotomètre (Gilford), contre un blanc obtenu avant l'incubation, à 400 nm .

La procédure du test d'inhibition est identique à celle réalisée pour la mesure de l'activité enzymatique, mais l'eau désionisée est remplacée en proportions croissantes par des milieux à tester, LAH ou HAM F10 + sérum, dans ce test. La gamme de

concentration ainsi recouverte est la suivante : 0; 0,02; 0,06; 0,13; 0,26 mg/ml de protéines du LAH pour la trypsine. Le test d'inhibition de l'acrosine par le LAH est identique à celui de la trypsine, sauf que la gamme de concentration recouverte est plus grande : 0; 0,06; 0,13; 0,20; 0,33 0,67; 1,34; 2,68 mg/ml du LAH. En ce qui concerne l'inhibition par le HAM F10 + sérum, la gamme de concentration recouverte est identique pour les 2 enzymes, cette dernière est la suivante: 0; 0,01; 0,06; 0,13; 0,33; 0,66; 1,32; 2,65 mg/ml du sérum humain dans le HAM F10.

Au cours d'essais ultérieurs, ces milieux ont été remplacés par des inhibiteurs purifiés, l' α_2 macroglobuline et l' α_1 antitrypsine furent testées aux concentrations de 0,002; 0,04; 0,1; 0,2 mg/ml de protéines.

Nous avons réalisé le dosage des protéines par la méthode du Folin, schématiquement la méthode est la suivante :

Pour débiter cette procédure il nous faut une série de tubes. Certains tubes recevront 0,5 ml de LAH ou de sérum humain dilués adéquatement, deux autres tubes recevront 0,5 ml d'eau, ces tubes constitueront les blancs et pour terminer deux derniers tubes recevront 0,5 ml de solution étalon. Cette dernière étant de la BSA à 0,4 mg/ml. Ensuite, la totalité des tubes subira les étapes suivantes :

- ajouter 0,5 ml de NaOH 1M à température ambiante et attendre 30 minutes;
- ajouter 5 ml d'une solution composée de Na₂CO₃ (100 ml), tartrate NaK 1 ml et de CuSO₄ 1 ml. Ce mélange est préparé dans cet ordre juste avant son utilisation;
- mélanger au vortex et attendre 15 minutes;
- ajouter 0,5 ml de réactif de Folin dilué 2 fois, bien mélangé au vortex, déclencher le chrono à ce moment;
- lire au spectrophotomètre Gilford à 540 nm après 30 minutes;
- calculer la concentration en protéines par la formule :

$$\text{mg de protéines} = \frac{(\text{lecture-blanc}) \times \text{dilution} \times 0,2}{(\text{étalon-blanc}) \times 0,5}$$

lecture : valeur d'un tube où nous avons placé l'un des deux milieux.

2.3. ANALYSES STATISTIQUES

Les résultats obtenus lors des deux expériences réalisées avec les spermatozoïdes ont été traités selon le modèle de l'analyse de la variance à 3 critères de classification (anova 3). Les critères étudiés sont pour la première expérience : le milieu (fixe), le spermatozoïde (aléatoire) et les temps (fixe). Tous ces critères sont croisés entre-eux.

Lors de la seconde expérience, les mêmes critères ont été étudiés sauf pour le critère spermatozoïde qui est remplacé par un critère âge (fixe). Pour cette seconde expérience, l'existence de différences significatives entre les moyennes a été vérifiée par le test des contrastes de Scheffé 2 à 2.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Tabl. 1: Taux de fécondation lors des essais comparatifs réalisés dans les deux milieux.

900 cycles de fécondation in vitro

nombre de cycles	HAM			LAH		
	nombre d' ovocytes	nombre d' embryons	taux de fécondation	nombre d' ovocytes	nombre d' embryons	taux de fécondation
900	3438	1679	48,84	3474	2168	62,40

Cycles avec un facteur andrologique sévère: < 30000 spz motiles/ovocyte

nombre de cycles	HAM			LAH		
	nombre d' ovocytes	nombre d' embryons	taux de fécondation	nombre d' ovocytes	nombre d' ovocytes	taux de fécondation
83	413	113	27,36	429	204	47,55

Cycles avec plus de 30000 spz motiles/ovocyte

nombre de cycles	HAM			LAH		
	nombre d' ovocytes	nombre d' embryons	taux de fécondation	nombre d' ovocytes	nombre d' embryons	taux de fécondation
817	3025	1566	51,77	3045	1964	64,49

1. RÉSULTATS DES CYCLES COMPARATIFS

Depuis ces 5 dernières années, à l'I.M.P.L., 900 essais ou cycles de fécondation *in vitro* ont été réalisés de façon comparative, d'une part dans du HAM F10 complémenté de 7,5% de sérum humain et d'autre part dans du LAH prélevé entre la 16^{ème} et 18^{ème} semaine de gestation, centrifugé, filtré et décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes.

Les résultats de ces essais comparatifs indiquent un taux de fécondation, c'est-à-dire un nombre d'embryons, plus élevé dans le LAH que dans le HAM F10. De plus on remarque que lorsque qu'un déficite andrologique est présent et que moins de 30000 spermatozoïdes sont placés par ovocytes, dans les deux milieux, le taux de fécondation obtenu dans le LAH est encore plus élevé (Tableau 1). Une différence de 13% apparaît entre les deux séries. Les résultats ont été traités par un test d'indépendance (test de χ^2) qui a confirmé un taux de fécondation significativement ($P < 0,05$) plus élevé dans le LAH que dans le HAM F10.

2. IMPACT DES MILIEUX SUR LES GAMÈTES MÂLES

2.1. LES COLORATIONS

Rappelons que nous avons testé 3 colorations pour la mise en évidence de la réaction acrosomiale.

2.1.1. Triple coloration de Talbot et Chacon

La triple coloration de Talbot et Chacon (1981) permet d'une part de distinguer les spermatozoïdes morts des vivants et d'autre part de relever les spermatozoïdes n'ayant pas réalisé leur réaction acrosomiale. Quatre types de coloration peuvent être observés;

1. *région post-acrosomiale bleue et acrosome rose* : spermatozoïde mort et acrosome intact;
2. *région post-acrosomiale bleue et acrosome incolore* : spermatozoïde mort et réaction acrosomiale réalisée;

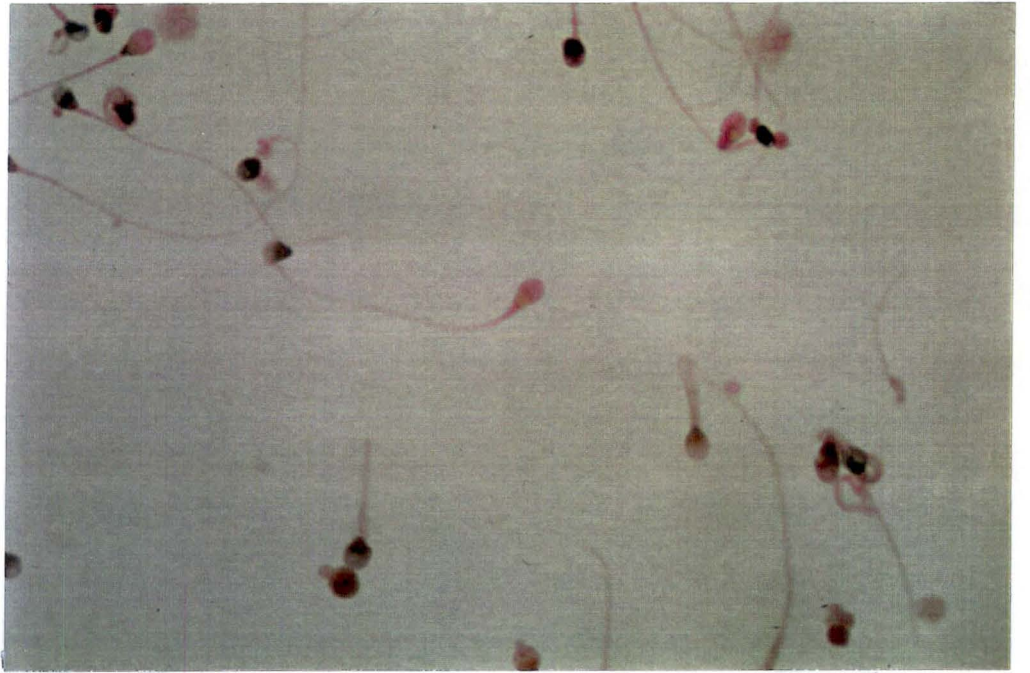


Photo 2: La triple coloration de Talbot et Chacon.

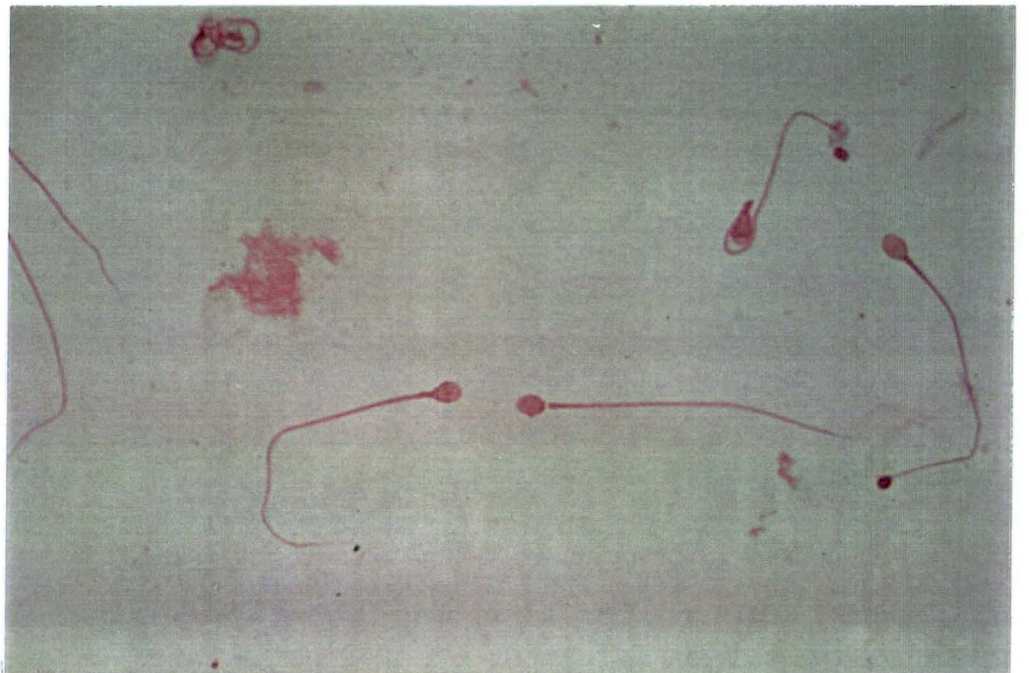


Photo 3: Coloration au jaune de Naphtol et à l'érythrosine B.

3. *région post-acrosomiale brune et acrosome rose* : spermatozoïde vivant et pas de réaction acrosomiale;

4. *région post-acrosomiale brune et acrosome incolore* : spermatozoïde vivant et réaction acrosomiale réalisée.

La photo 2 montre que les types de coloration obtenus ne sont pas aussi nets que ceux décrits dans la littérature. C'est ainsi que certaines régions post-acrosomiales sont à la fois bleues et brunes et que certaines capes acrosomiales sont de couleur rose pâle. Il existe donc un risque de confusion entre les différentes colorations et le diagnostic concernant la réaction acrosomiale devient douteux. Cette coloration n'est pas retenue.

2.1.2. Coloration au jaune de Naphthol et à l'erythrosine B

La coloration au jaune de Naphthol et à l'erythrosine B décrite par Bryan et Akruk (1982), permet d'observer deux types de colorations;

1. *coloration rose uniforme ou parfois plus intense au niveau de l'acrosome* : les spermatozoïdes n'ont pas subi la réaction acrosomiale;

2. *partie du noyau dévoilée par la réaction acrosomiale colorée en jaune pâle et la partie acrosomiale colorée en rose* : les spermatozoïdes ont terminé leur réaction acrosomiale.

La photo 3 montre que la distinction entre les deux types n'est pas aisée. En effet le jaune de Naphthol n'apparaît jamais de façon prononcée au niveau du noyau et ne permet pas d'interpréter les résultats de cette coloration. De plus, les colorants étant très sensibles au pH, celui-ci doit être impérativement de 4,8 sans quoi la coloration est différente de ce qui est attendu. Cette deuxième coloration n'a pas non plus été retenue.

2.1.3. Coloration par fluorescence

Rappelons que la coloration par fluorescence est basée sur le fait que la lectine couplée au FITC va se fixer sur l'acrosine, une protéine de la matrice acrosomiale. Trois types d'images peuvent être produits par cette coloration (Mladenovic *et al.*, 1993; Tesarik *et al.*, 1988 et 1993);

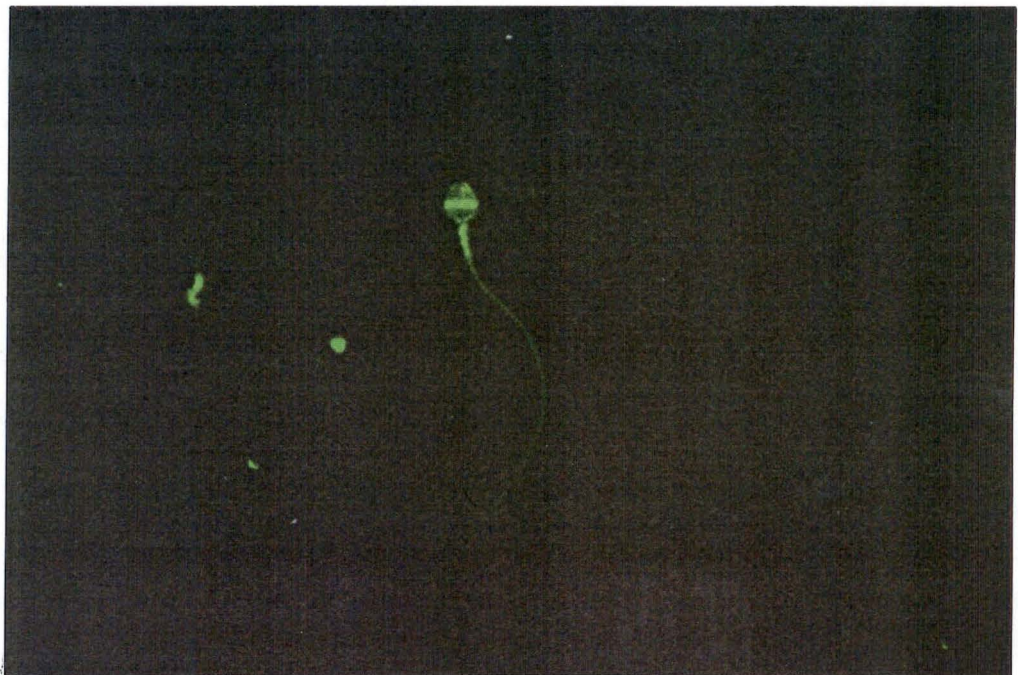
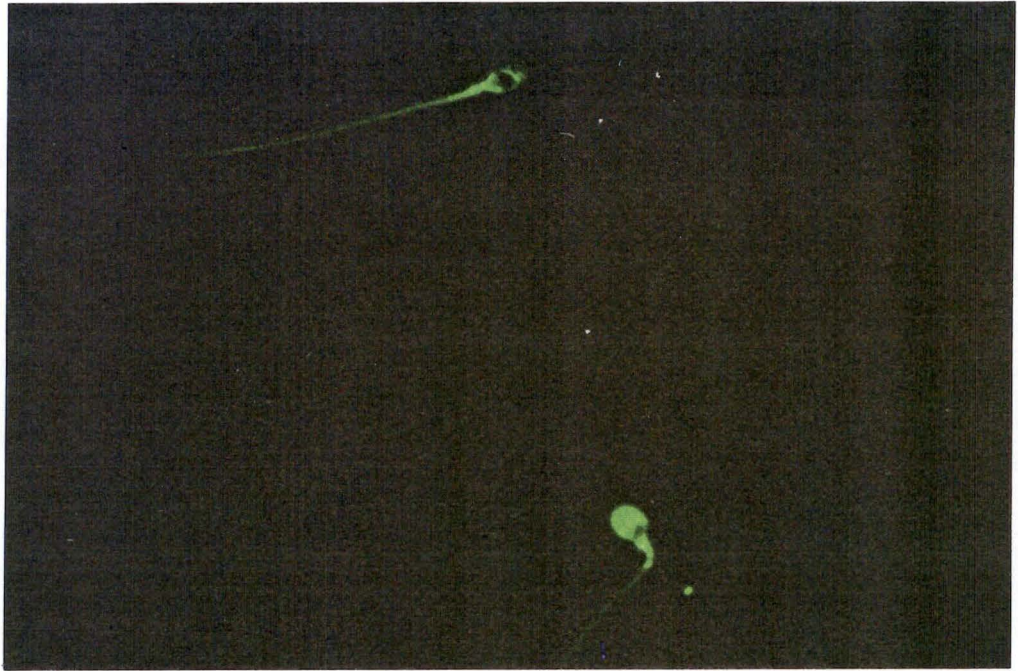


Photo 4 et 5: Coloration par fluorescence.

1. *tête et région acrosomiale colorées en vert* : pas de réaction acrosomiale, l'acrosine est uniformément répartie dans l'acrosome;
2. *région équatoriale colorée (fluorescence verte)* : la réaction acrosomiale vient de se dérouler;
3. *pas de coloration (absence de fluorescence verte)* : la réaction acrosomiale a déjà eu lieu il y a quelque temps.

Les photos 4 et 5 montrent qu'il est facile de poser un diagnostic correct en un temps très court. C'est donc elle qui est retenue pour la suite de ce travail.

2.2. EXPÉRIENCE 1 : COMPARAISON HAM F10, LAH

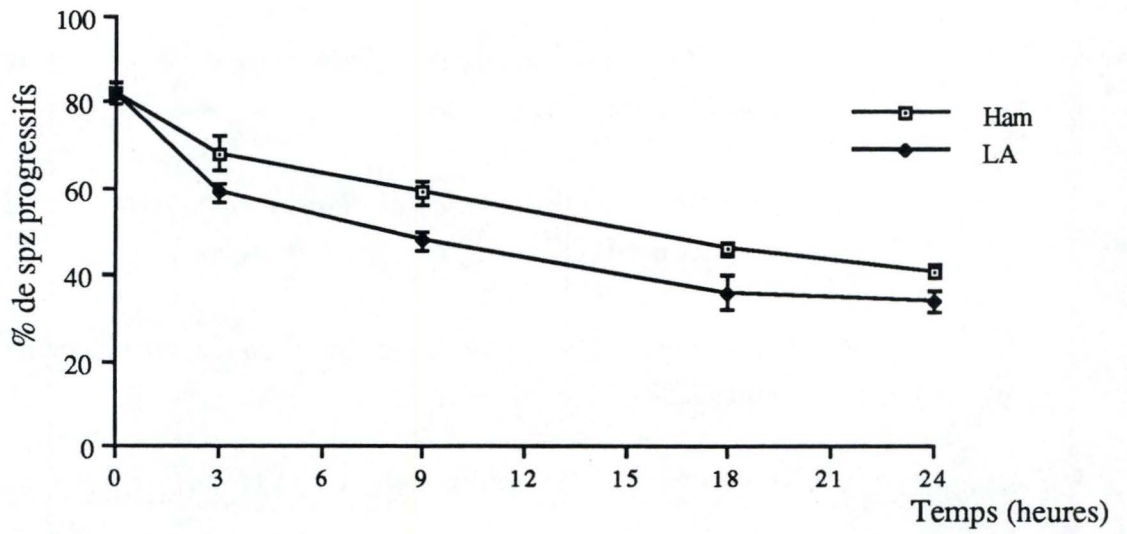
Rappelons brièvement les conditions expérimentales. Quatre bons spermatozoïdes ont été prélevés dans la banque. Après swim-up, les spermatozoïdes sont incubés dans les deux milieux, le HAM F10 complétement avec 7,5% de sérum humain et le LAH ponctionné à la 16^{ème} semaine de gestation, centrifugé, filtré et décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes. Après 0, 3, 9, 18 et 24 heures des prélèvements de spermatozoïdes sont effectués afin de suivre au cours du temps l'évolution de leur motilité et du taux de réaction acrosomiale.

2.2.1. Résultats

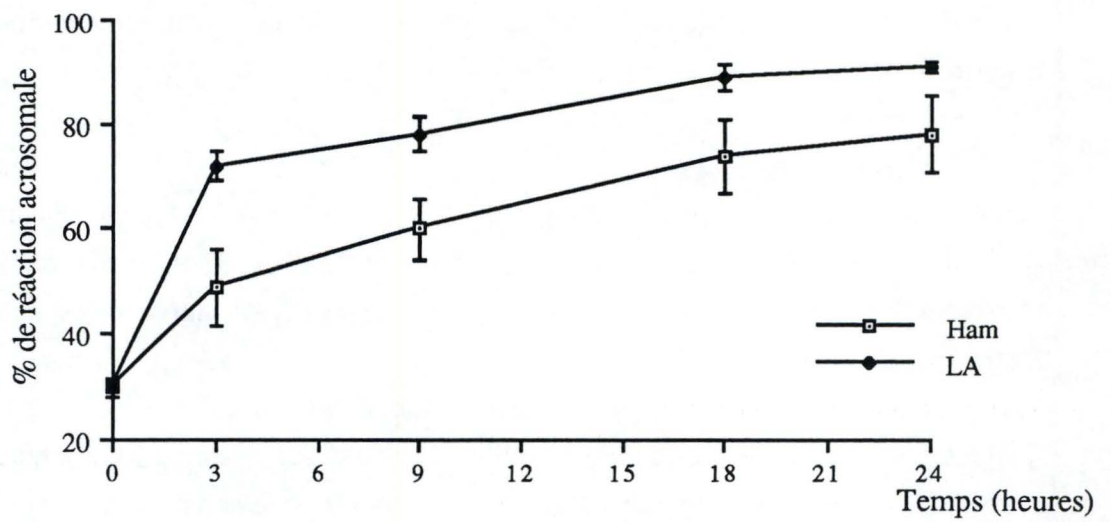
Les résultats obtenus pour la motilité et les réactions acrosomiales des spermatozoïdes sont repris dans le tableau 3 des annexes. L'évolution de ces paramètres est représentée sur la figure 5.

Au cours de l'expérience à mesure que le temps avance, la motilité des spermatozoïdes diminue dans les deux milieux (fig.5a). Cette diminution est plus rapide dans LAH. L'ANOVA 3 réalisée sur ces résultats montre que la baisse de la motilité est significativement ($P<0,01$) plus rapide dans le LAH que dans le HAM F10.

L'analyse de l'incidence des réactions acrosomiales (R.A.) montre que dès le premier prélèvement le LAH induit un grand nombre de R.A. (fig.5b). Cette différence, significative ($P<0,01$), se maintient pendant les 24 heures de l'expérience.



5a. Evolution de la motilité



5b. Evolution de la réaction acrosomiale

Fig. 5: Effets des deux milieux sur les spermatozoïdes (milieu de HAM F10 +7,5 % de sérum humain: Ham, liquide amniotique humain: LA)

2.2.2. Discussion

La motilité et la R.A. sont de bons témoins de l'état fécondant des gamètes mâles. En effet un spermatozoïde doté d'une faible motilité a peu de chance d'arriver près de l'ovocyte et encore moins de pénétrer la zone pellucide du gamète femelle. Or dans notre expérience nous remarquons que durant les 3 premières heures la diminution de la motilité est faible quel que soit le milieu (Figure 5a). Quand on sait que la fécondation survient rapidement lorsque les gamètes sont mis en présence l'une de l'autre (Crozet, 1989), on peut admettre que du point de vue de la motilité, les deux milieux sont aptes à permettre cette fécondation et que la différence entre les deux, bien que significative, n'est pas très importante.

En ce qui concerne la réaction acrosomiale, on admet généralement qu'un spermatozoïde fécondant subit cette réaction au contact des couches enveloppant l'ovocyte, zone pellucide, cellules et matrice de la corona radiata. De cette façon, l'acrosome libère une batterie d'enzymes, qui permettent au spermatozoïde de pénétrer à travers les enveloppes et de se fixer dans la zone pellucide du gamète femelle (Nagae *et al.*, 1986; Plachot *et al.*, 1984; Töpfer-Petersen *et al.*, 1988).

Dès lors on peut penser qu'un milieu, tel que le LAH, qui active la réaction acrosomiale des spermatozoïdes avant qu'ils entrent en contact avec les enveloppes de l'ovule, doit avoir un effet néfaste sur le taux de fécondation. Or nous avons montré que le taux de réussite de la FIV est supérieur dans ce milieu. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce résultat. Il est bien connu que la présence d'un grand nombre de spermatozoïdes est requis pour une fécondation *in vitro*. Chez l'homme, le nombre souhaité est de 30000 par ovocyte, en dessous de quoi l'obtention d'embryon diminue régulièrement. Cet effet de synergie est peut-être dû à la nécessité de libérer suffisamment d'acrosine pour que cette substance puisse jouer le rôle qui lui est imparti. L'induction rapide de la R.A. chez un grand nombre de spermatozoïdes pourrait ainsi avoir un effet bénéfique.

In vivo, le nombre de spermatozoïdes requis est encore beaucoup plus élevé et explique le nombre croissant d'infertilité de couple. Il est cependant difficile de savoir quel est le nombre nécessaire de spermatozoïdes qui doivent atteindre l'ovocyte, parvenir à franchir la barrière de la corona radiata et entrer en contact avec la zone pellucide.

Enfin, la FIV se passe dans des conditions assez particulière puisque la corona radiata a été dispersée et que l'ovocyte se trouve quasiment nu, enveloppé seulement de la zone pellucide. L'acrosine n'a, dans ce cas, peut-être aucun rôle enzymatique à jouer.

Evolution de la motilité dans des LAH d'âges gestationnels différents

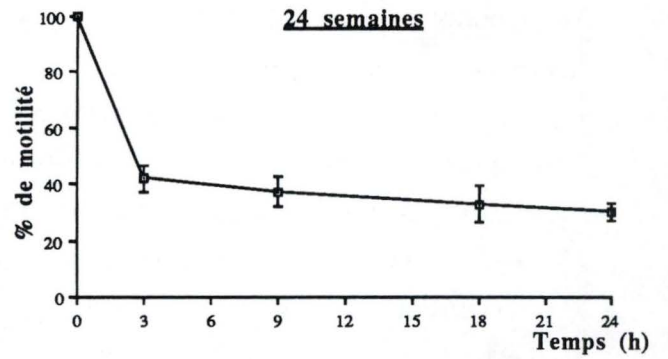
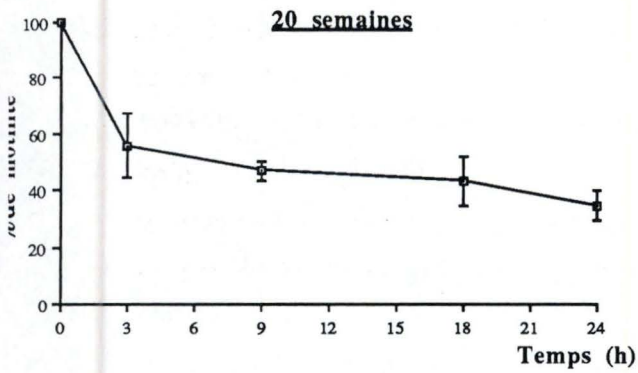
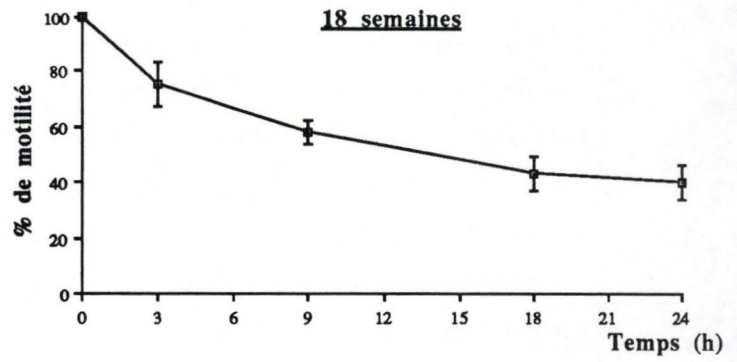
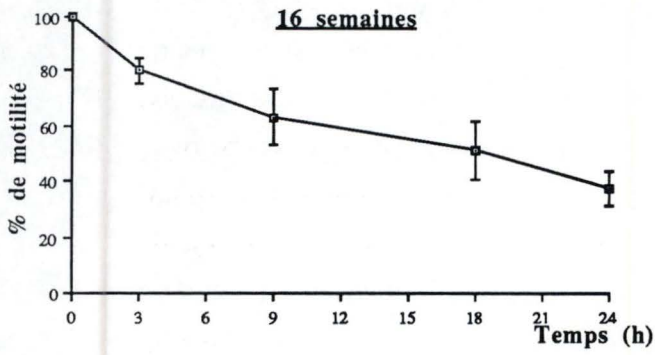
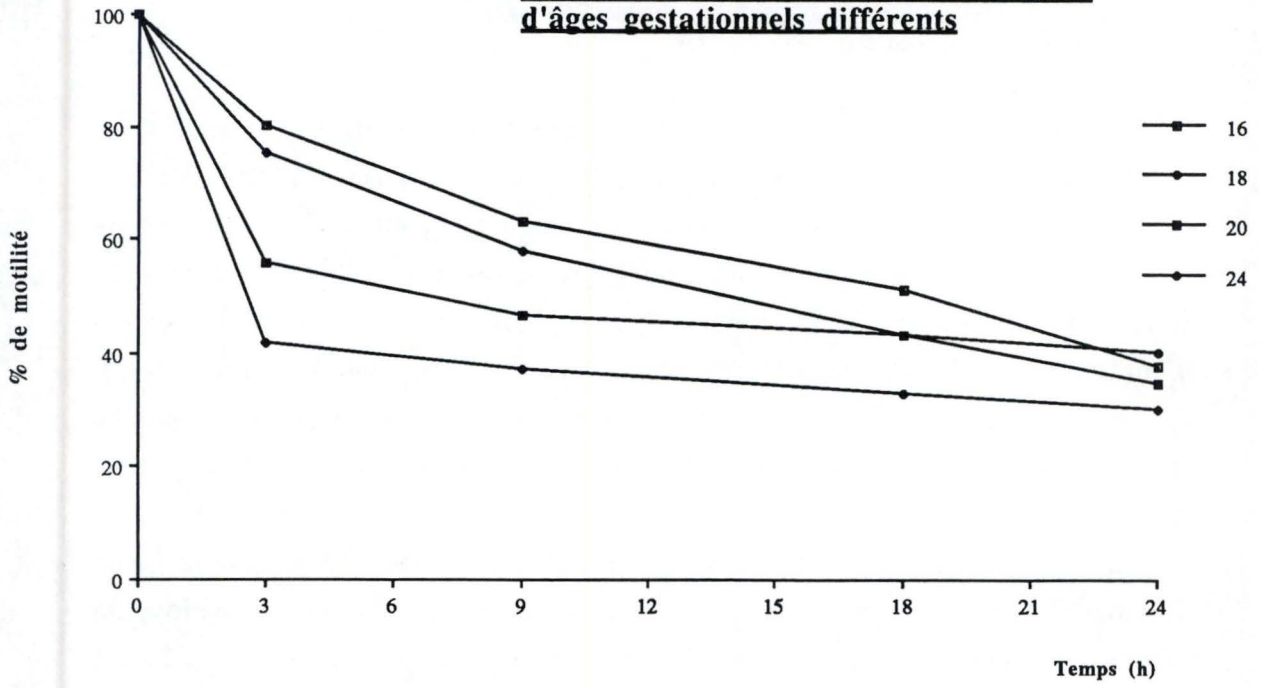


Fig. 6a

2.3. EXPÉRIENCE 2 : COMPARAISON ENTRE DIFFÉRENTS

LAH

Dans le cas présent, c'est le LAH qui constitue la variable testée. Des spermatozoïdes capotés, issus d'un même sperme de bonne qualité sont mis en suspension dans des LAH prélevés à des âges de gestations différents (16, 18, 20 et 24 semaines) et traités de différentes façons (brut, technique non décomplémenté, technique et décomplémenté soit à 56°C soit à 80°C pendant 30 minutes). Après 0, 3, 9, 18 et 24 heures de contact, une partie de la suspension est prélevée afin d'évaluer la motilité cellulaire et l'occurrence de la réaction acrosomiale.

2.3.1. Résultats

L'évolution de ces paramètres est représentée sur les figures 6 et 7.

2.3.1.1. La motilité

a.) Effet de l'âge gestationnel

Quel que soit le LAH utilisé, une diminution progressive de l'activité des spermatozoïdes est observée (fig.6a), comme lors de la première expérience. Cette baisse de la motilité, durant les 3 premières heures de l'expérience, est d'autant plus marquée plus l'âge gestationnel du LAH est avancé. Nous remarquons aussi que les différences entre les âges gestationnels s'amenuisent au fur et à mesure de l'expérience, et qu'il reste entre 40 et 50 % de spermatozoïdes progressifs après 24 heures d'incubation dans les différents milieux.

Ce paramètre a fait l'objet d'un test d'analyse statistique (ANOVA 3) qui confirme de façon significative ($P < 0,01$) une baisse plus rapide de la motilité dans les LAH prélevés à 20 et 24 semaines de grossesse par rapport à ceux qui ont été prélevés à 16 et 18 semaines. Par contre entre ces deux derniers la diminution de la motilité n'est pas significativement ($P < 0,01$) différente. Ces observations valent pour les 9 premières heures de l'expérience seulement. Passé ce temps, les différences significatives s'estompent.

b.) Effet de la préparation

Le type de préparation technique subie par le LAH n'influence pas de façon importante le paramètre de motilité (fig.6b).

Evolution de la motilité dans des LAH préparés de façons différentes

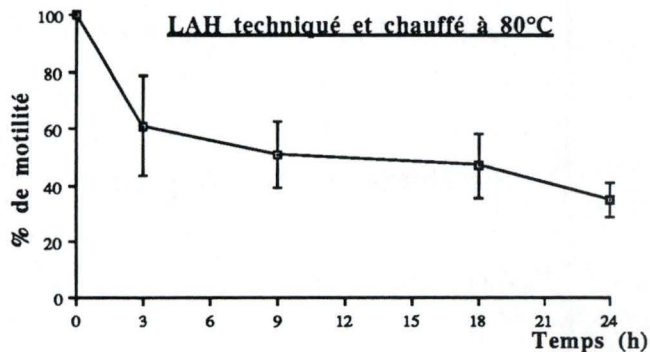
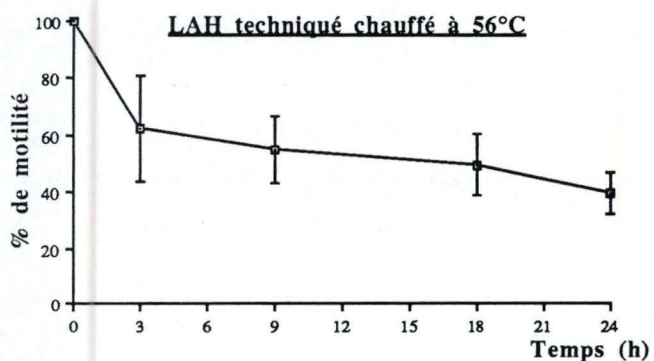
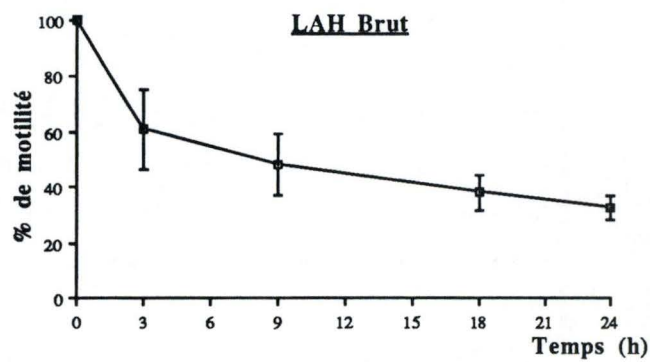
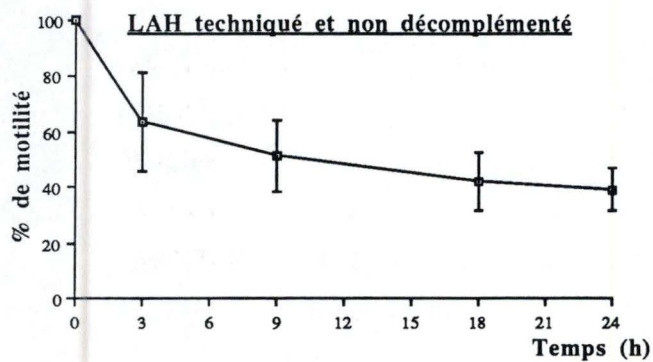
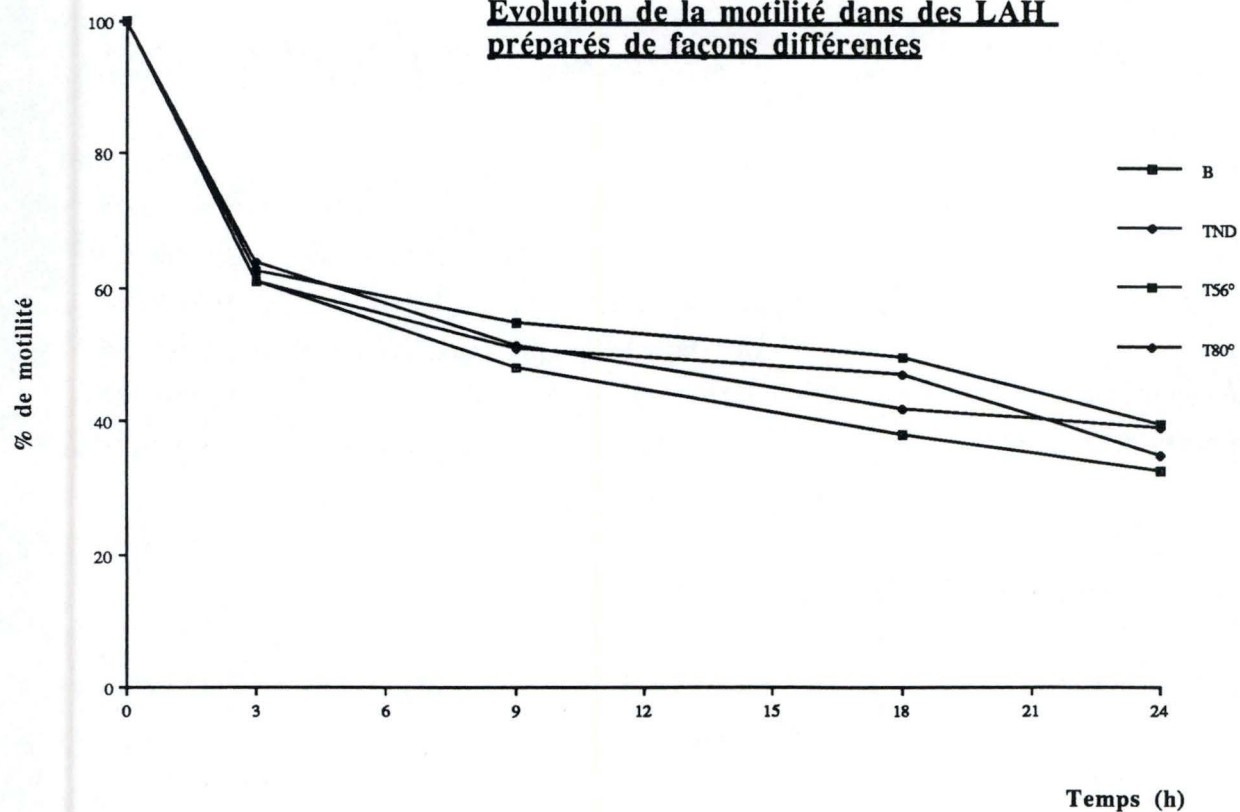


Fig. 6b

L'analyse statistique, ne révèle pas de différence significative de la motilité dans les différents types de préparations techniques.

2.3.1.2. La réaction acrosomiale

Quelles que soient les conditions expérimentales on remarque que l'incidence des réactions acrosomiales augmente à mesure que le temps passe, avec une hausse très marquée durant les 3 premières heures de l'expérience (fig.7a et b). Cette observation coïncide avec les résultats obtenus pour ce paramètre au niveau de l'expérience 1 (fig. 5b).

De plus, on note que ni l'âge gestationnel ni le type de préparation du LAH ne semble influencer l'évolution des réactions acrosomiales.

2.3.2. Discussion

La deuxième expérience réalisée pour rechercher l'action spécifique du LAH sur le sperme est très indicative en ce qui concerne la motilité. En effet, on remarque que plus l'âge gestationnel au cours duquel le LAH a été prélevé augmente, plus la motilité des spermatozoïdes diminue. Une question peut donc surgir : pourquoi ne pas avoir testé le paramètre de motilité avec un LAH d'âge gestationnel inférieur à 16 semaines ? La réponse est simple et à une origine technique. Les LAH dont nous disposons proviennent de ponction réalisées en vue d'une amniocentèse. Ces dernières ont pour but de déterminer le caryotype de l'embryon, afin de se rendre compte de sa normalité, quand une maladie génétique est suspectée. Cette opération est pratiquée en général entre la 16^{ème} et 18^{ème} semaine de gestation. Cette opération ne peut être pratiquée avant la 16^{ème} semaine de grossesse pour deux raisons : d'une part la quantité de LAH est trop faible et d'autre part la quantité de cellules embryonnaires en suspension est faible. Par contre la ponction peut-être réalisée au-delà de la 18^{ème} semaine, dans le cas où une première ponction, par exemple, n'aurait pas pu fournir les résultats attendus. C'est ainsi que nous avons pu bénéficier de LAH âgés de 20 et 24 semaines (Debry communication personnels).

Les causes de la diminution de la motilité des spermatozoïdes en fonction de l'âge gestationnel du LAH ne sont pas connues. La composition de ce milieu évolue au cours de la gestation, et il est bien connu que de nombreuses substances de diverses natures influencent la survie et l'activité des spermatozoïdes (Bousette, 1990; Lessire, 1991; Henrioul, 1993). Les essais suivants, où les éléments figurés sont retirés, où le milieu subit une décomplémentation et où les protéines sont dénaturées montrent, par l'absence d'effet de ces traitements, que la composition cellulaire et protéique du LAH n'est pas à

**Evolution de la réaction acrosomiale dans
des LAH d'âges gestationnels différents**

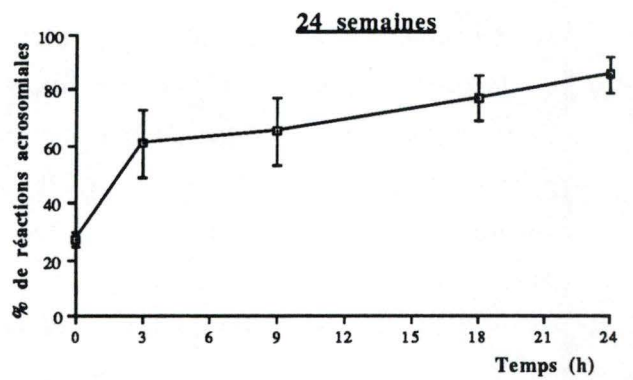
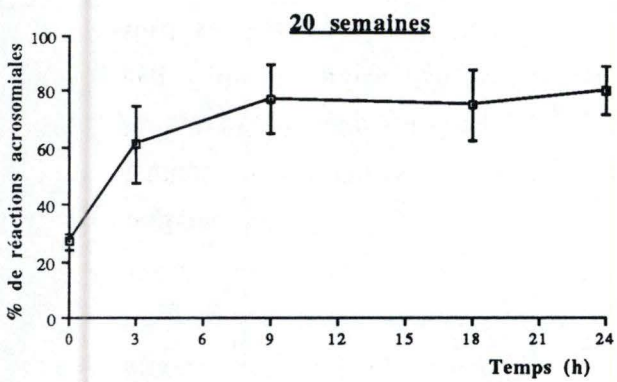
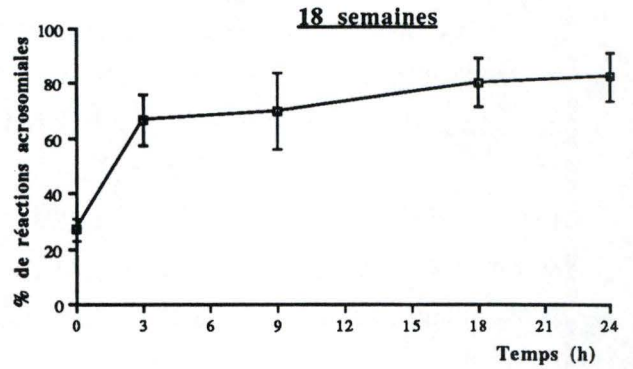
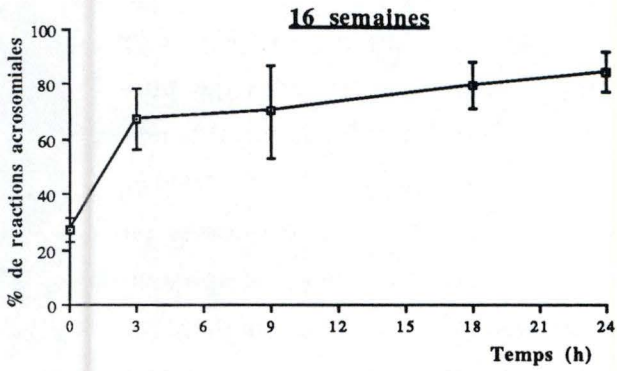
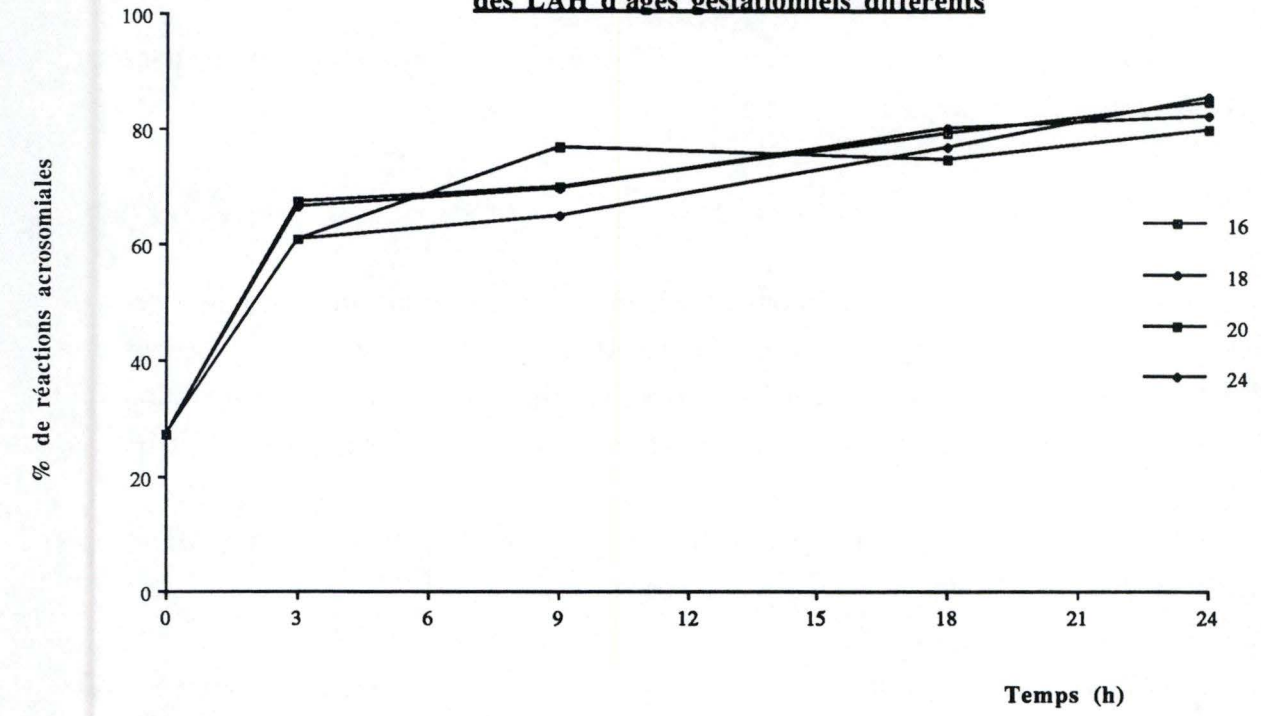


Fig. 7a

mettre en cause. D'autres paramètres doivent être invoqués, peut-être la composition ionique ou l'accumulation de déchets. La littérature nous dit que la composition du LAH en Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^+ et Cl^- ne varie pratiquement pas au cours de la grossesse (Nusbaum and Zettner, 1973) et au cours de nos essais nous avons vérifié que le pH restait toujours très proche de la neutralité. L'accumulation de déchets reste alors la principale raison que l'on puisse invoquer pour expliquer la chute de la motilité des spermatozoïdes. En effet, une élévation progressive du taux d'urée et de créatinine a été rapportée (Gustine and Zimmerman, 1972). Il est probable que d'autres substances s'accumulent aussi dans ce liquide, dont certaines pourraient être toxiques.

Enfin, le taux de glucose diminue progressivement de 65 mg/dl à la 10^{ème} semaine à 0,2 mg/dl à la 41^{ème} semaine (Drazancic and Kuvacic, 1974). Il est probable que la diminution des substrats énergétiques disponibles dans le milieu influence aussi l'activité des spermatozoïdes.

Le type de préparation technique subie par le LAH n'influence pas la motilité des spermatozoïdes (fig.6b). Grâce à cette observation on peut suggérer que la présence d'éléments cellulaires et protéiques dans le LAH brut et la présence d'éléments protéiques seuls dans le LAH centrifugé, filtré et non décomplémenté, n'influencent en aucun cas le paramètre de motilité ainsi que l'ont déjà rapporté Lucrecia *et al.*, (1993).

En ce qui concerne la réaction acrosomiale on remarque que quel que soit l'âge ou le type de préparation, le taux de R.A. n'est pas significativement différent. Dès lors on peut penser, comme nous l'avons fait pour la motilité, que la présence d'éléments cellulaires et/ou protéiques n'influencent pas le taux de réaction acrosomiale. Quoi qu'il en soit, nous remarquons de nouveau que le LAH active la réaction acrosomiale des spermatozoïdes (on passe 20 à 30% au temps 0 à 60% au temps 3 heures). Les causes de cette activation ne sont pas connues avec précision. Néanmoins, de nombreuses substances sont connues pour induire la capacitation des spermatozoïdes, qui est la première étape d'un processus apparemment irréversible qui mène à une modification du type de mobilité et à la réaction acrosomiale. Parmi elles, certaines se trouvent ou sont susceptibles de se trouver dans le LAH : l'association albumine- Ca^{++} (60% des protéines du LAH sont de l'albumine: Queenam *et al.*, 1978), l'héparine, certains sucres comme le mannitol (Lessir, 1991).

Pour conclure l'étude de ces paramètres, nous pouvons dire au sujet de la motilité que l'utilisation de LAH jeunes, c'est-à-dire ponctionnés entre la 16^{ème} et la 18^{ème} semaine de gestation, est bénéfique par rapport aux LAH plus avancés. En ce qui concerne la préparation subie par le milieu, on remarque que celle-ci n'influence pas la motilité. Au niveau de la réaction acrosomiale, cette expérience a montré que ni l'âge ni le type de préparation n'influençaient ce paramètre.

**Evolution de la réaction acrosomiale
dans des LAH préparés de façons différentes**

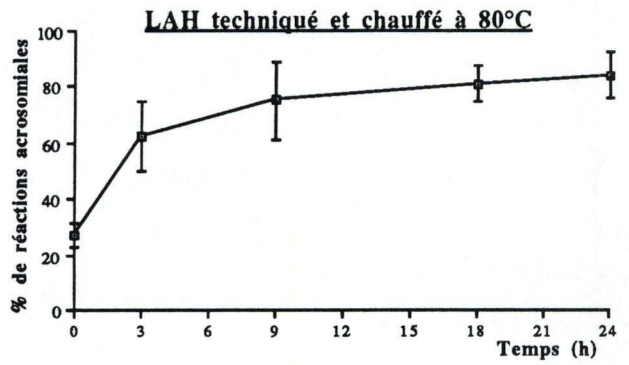
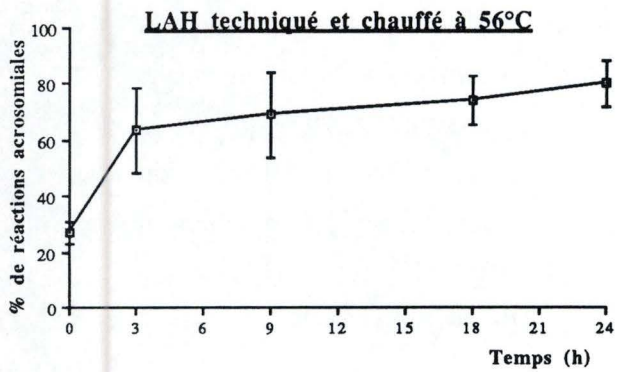
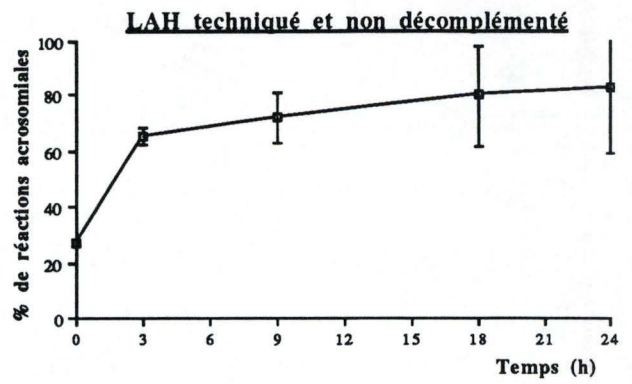
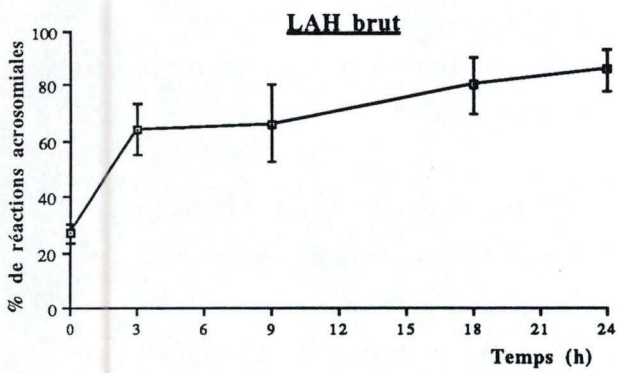
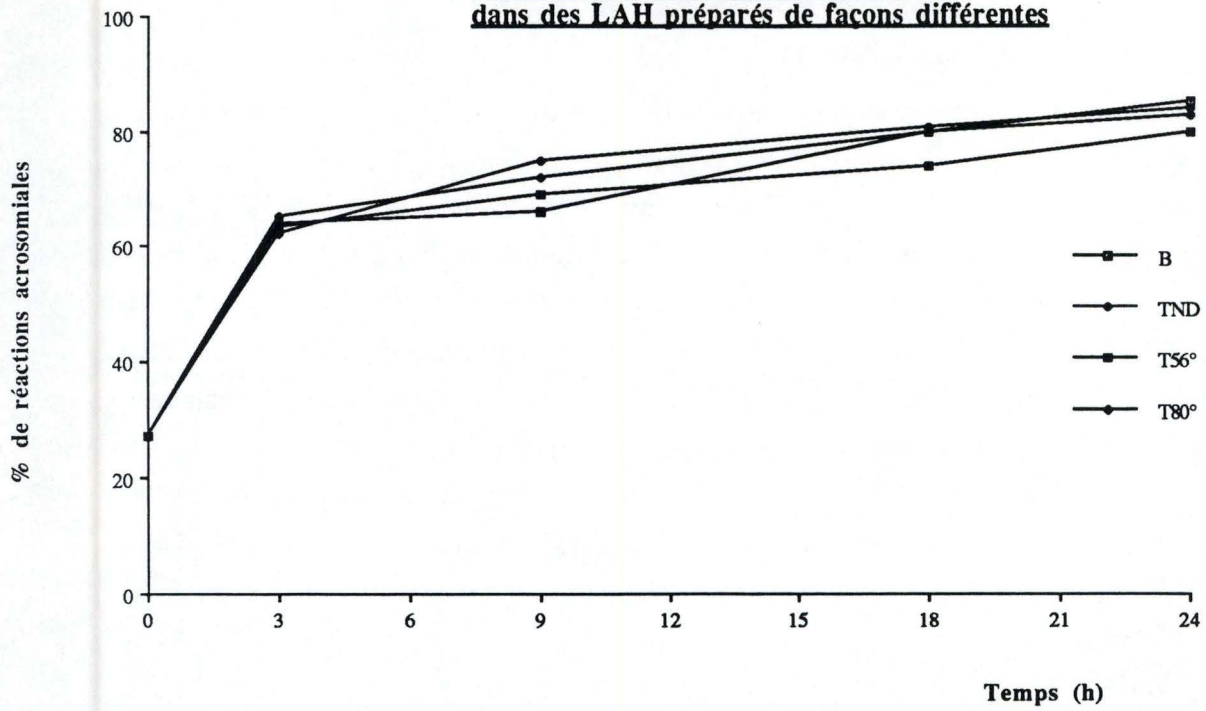


Fig. 7b

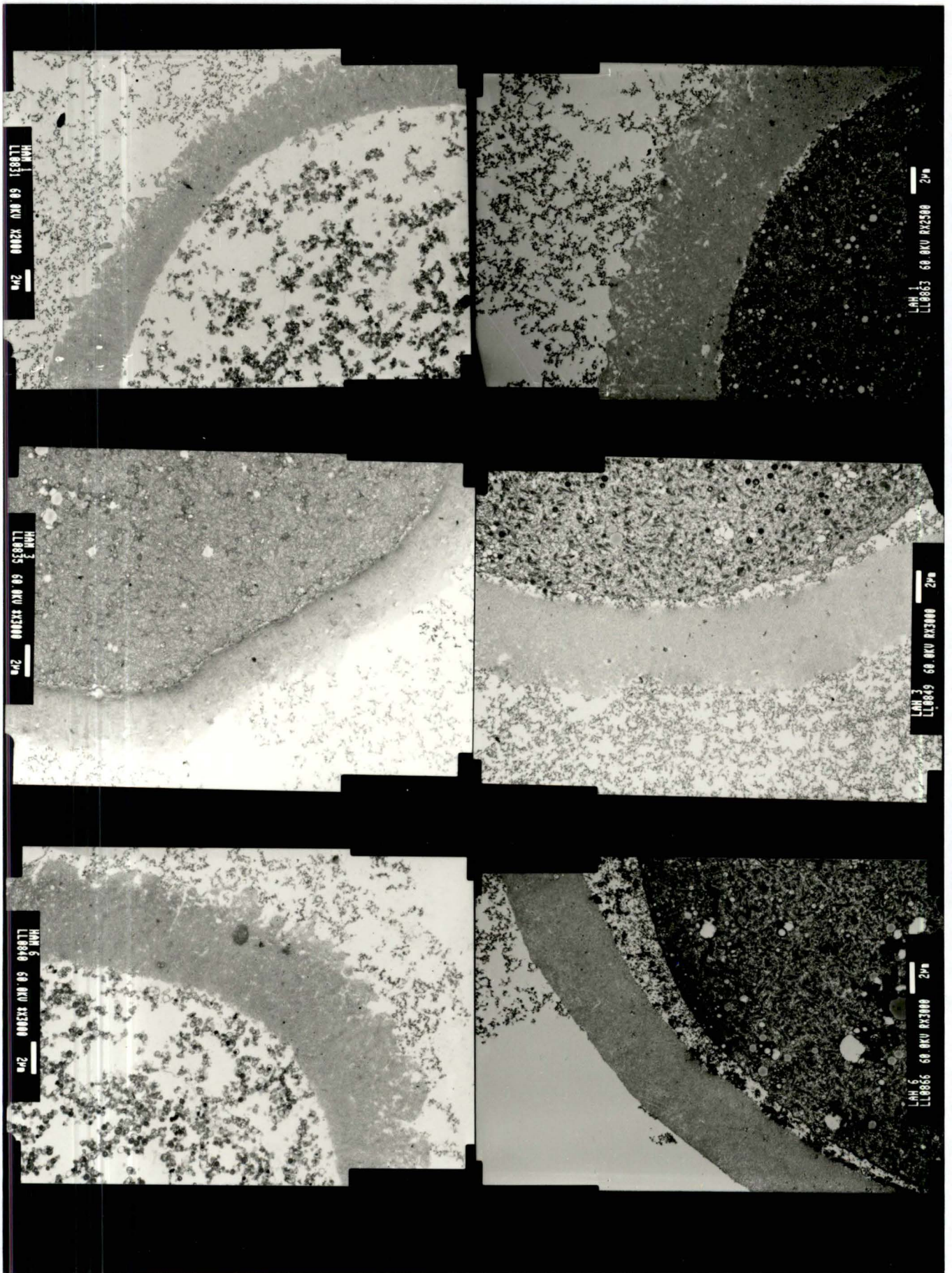


Photo 6a: Zone pellucide d'ovocyte (grossissement 3000 X).

3. IMPACT DES MILIEUX SUR LES GAMÈTES FEMELLES

3.1. APPROCHE HISTOLOGIQUE

Rappelons que deux souris femelles adultes subissent un traitement de superovulation. Les ovocytes sont récupérés et placés dans les deux milieux. Après 1, 3 et 6 heures, des ovocytes sont prélevés, colorés au rouge de Ruthénium et préparés pour l'observation au microscope électronique à transmission (TEM) en vue de l'étude de l'apparition éventuelle du hardening spontané de la zone pellucide.

Les résultats et conclusions tirés ci-dessous reposent sur l'unique réalisation de cette expérience. Il serait sans doute d'un grand intérêt de répéter celle-ci afin de voir si les résultats obtenus sont semblables.

3.1.1. Résultats

Les zones pellucides observées et photographiées à deux grossissements différents sont reprises dans les photo 6a (3000x) et 6b (6000x).

En aucun cas nous n'observons, par une différence de contraste, l'apparition de deux couches concentriques dans les zones pellucides des ovocytes. En d'autres termes, on n'observe pas de signe du hardening.

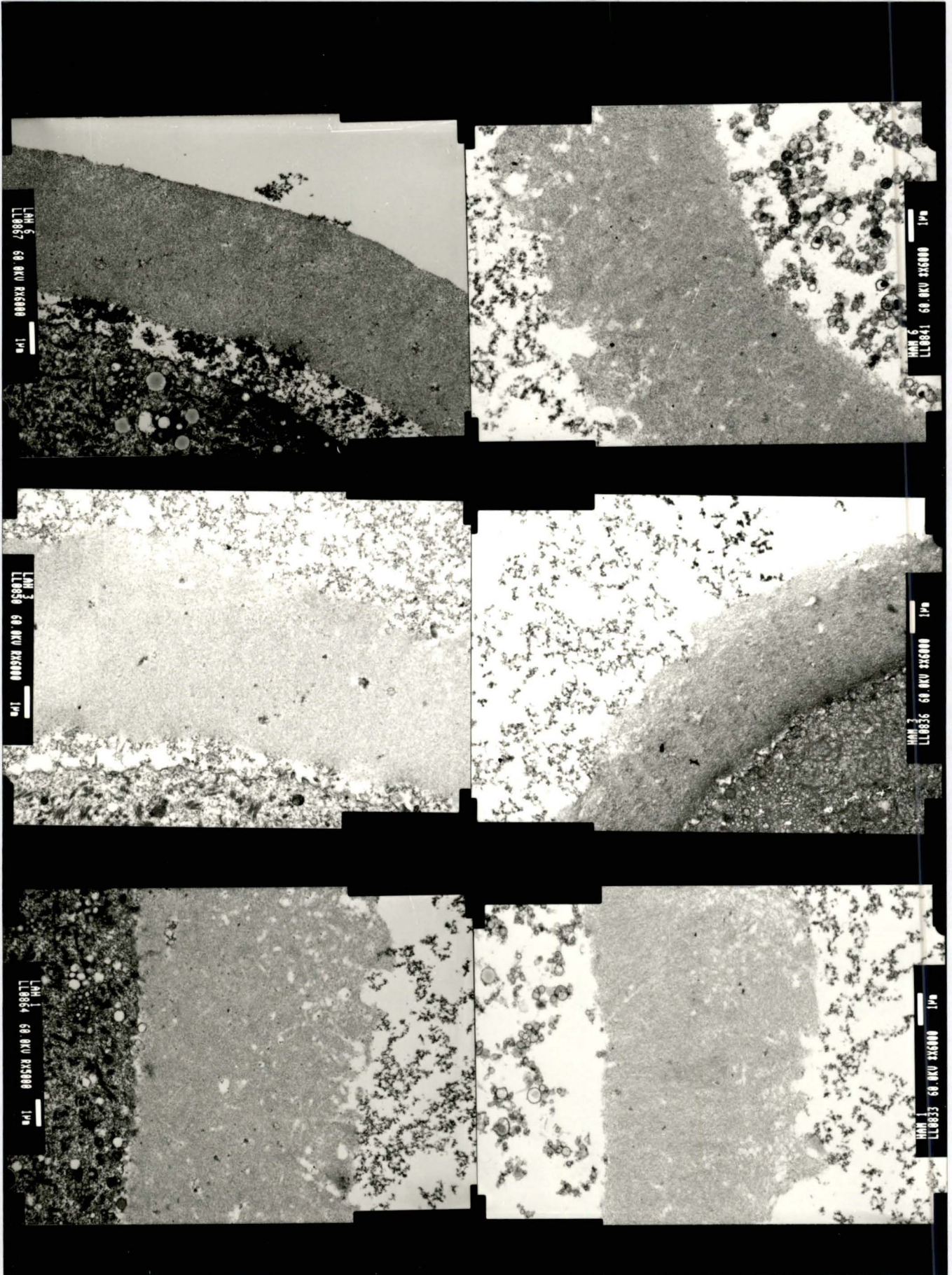
Par contre, on remarque dans l'ensemble, que la structure de la zone pellucide est mieux conservée dans le LAH que dans le HAM. La granulosité de la zone pellucide semble plus homogène dans le LAH (le grain est plus fin et uniformément réparti) et le bord extérieur de la zone pellucide semble moins découpé dans ce même milieu.

De plus, les photos, d'ovules cultivés dans le HAM présentent un cytoplasme ovocytaire rétracté. Cela n'est pas observé dans le cas d'ovocytes placés dans le LAH. Ces observations tendent à montrer que l'utilisation de ce milieu est bénéfique pour une meilleure conservation de la structure morphologique des ovocytes.

3.1.2. Discussion

Le rouge de Ruthénium, colorant employé pour cette expérience, est une molécule considérée comme un polyanion ayant une grande affinité pour les sucres (Luft, 1971). Il se fixe donc sur les glycoprotéines membranaires avec pour résultat une augmentation du contraste des membranes.

Photo 6b: Zone pellucide d'ovocyte (grossissement 6000 X).



Ce colorant permet de mettre en évidence, par une différence de contraste, deux couches concentriques dans des zones pellucides d'ovocytes fécondés. Ces modifications au sein de la zone pellucide sont dues à l'exocytose des granules corticaux, qui induit le processus de hardening. Nous disposons donc d'un bon outil pour observer l'apparition de ce processus (Bonnie *et al.*, 1984; Schroeder *et al.*, 1990).

L'observation des clichés visualisant les zones pellucides des ovocytes soumis à l'expérience ne permet pas de remarquer, par une différence de contraste, deux couches concentriques au sein des zones pellucides. Face à cette observation, il semble que l'on puisse tirer comme conclusion que le processus de hardening spontané, du à l'exocytose prématurée du contenu des granules corticaux, ne s'est pas réalisé au cours de notre expérience. Cependant, la procédure de coloration au rouge de Ruthénium n'est pas aisée, et nous n'avons pas eu l'occasion de traiter des ovocytes fécondés afin de nous assurer de la bonne mise au point de cette technique. Bien que notre résultat soit probablement exact, il ne nous est pas permis de l'affirmer avec certitude.

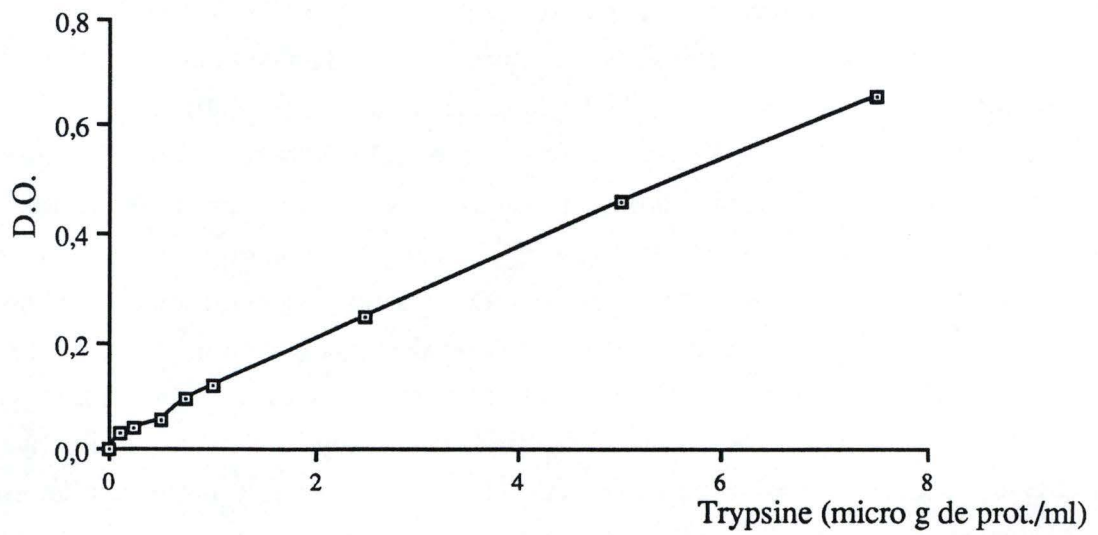
Par contre, des différences morphologiques dues au traitement apparaissent nettement sur les clichés. La structure de la zone pellucide ainsi que celle du cytoplasme ovocytaire sont mieux conservées dans le LAH que dans le HAM. Le fait que le grain semble moins compact et plus fin dans le LAH nous fait penser que l'intégrité de la structure de la zone pellucide doit être mieux conservée dans ce milieu. Cette zone pellucide est formée en grande partie de glycoprotéine jouant un rôle primordial dans la fécondation (Bleil *et al.*, 1981; Schroeder *et al.*, 1990). Il est donc très probable que tout processus entraînant une altération de la zone pellucide altère également l'aptitude de l'ovocyte à être fécondé. Il en est de même du cytoplasme. Il semble que sa rétraction ne soit pas un artéfact apparu lors de la préparation des coupes puisqu'elle ne se produit pas dans les ovocytes cultivés dans le LAH.

En conclusion, nous n'avons pas mis en évidence un quelconque effet des milieux sur le hardening de la zone pellucide. Mais il semble, que le LAH ait un effet favorable sur l'ovocyte en culture, car il permet mieux que le HAM le maintient de l'intégrité morphologique (et fonctionnelle) de l'ovocyte.

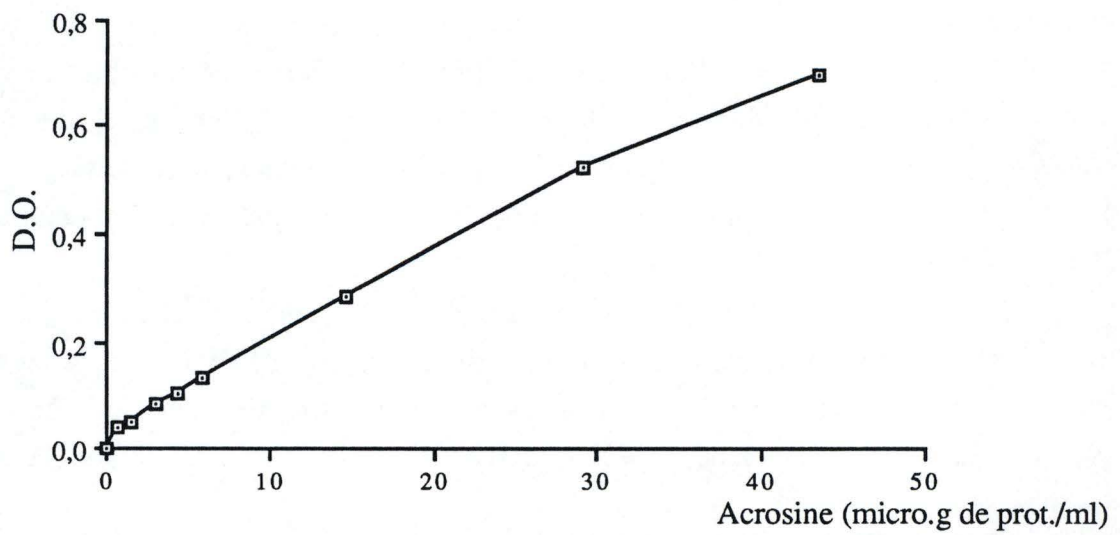
3.2. APPROCHE BIOCHIMIQUE

L'approche biochimique du phénomène de hardening spontané de la zone pellucide est basée sur la recherche dans les deux milieux étudiés d'inhibiteurs de protéases susceptibles de bloquer ou de ralentir l'effet des enzymes libérés prématurément par les granules corticaux .

Pour atteindre cet objectif nous avons dans un premier temps comparé les activités enzymatiques pour les deux protéases retenues, la trypsine et l'acrosine. Par la suite



8a. Activité enzymatique de la trypsine à différentes concentrations



8b. Activité enzymatique de l'acrosine à différentes concentrations

nous avons réalisé des tests d'inhibition en présence des deux milieux. Enfin nous nous sommes intéressés à la nature de ou des inhibiteur(s) présent(s) dans les deux milieux étudiés, par des tests nous permettant de caractériser ces inhibiteurs.

3.2.1. Résultats

3.2.1.1. Activités enzymatiques

L'activité enzymatique de la trypsine est représentée sur la figure 8a. On peut remarquer sur cette dernière que l'équation $V=k[E]$ (où la vitesse de la réaction enzymatique est directement proportionnelle à la concentration en enzyme) est respectée pour différentes concentrations enzymatiques testées dans cette cinétique. Pour une raison de facilité technique, la concentration choisie pour la suite des tests est de 5 μg de protéines par ml.

La courbe d'activité enzymatique de l'acrosine à différentes concentrations présentes une allure comparable (fig.8b). Les remarques concernant le respect de l'équation $V=k[E]$ et le choix de la concentration pour la suite des tests, sont identiques à celles émisent ci-dessus. La concentration retenue pour l'acrosine est de 29 μg de protéines par ml; elle correspond à peu de chose près à l'activité de la trypsine à la concentration choisie.

3.2.1.2. Tests d'inhibition

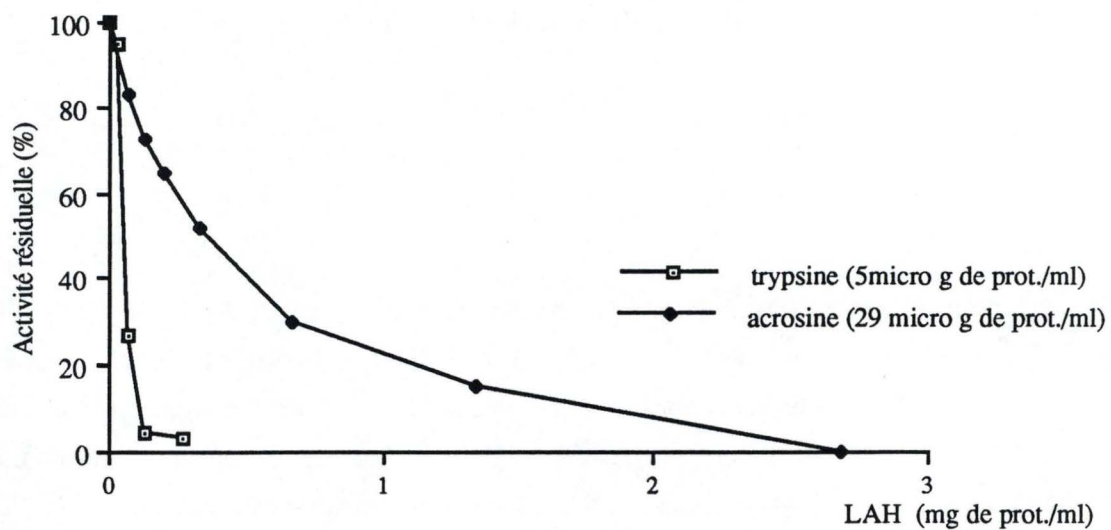
Les résultats des dosages de protéines (Folin), réalisés sur le LAH et le sérum humain, sont les suivants :

- LAH 6,7 mg de protéines par ml.
- Sérum humain total 88,5 mg de protéines par ml.
- Sérum humain 7,5 % 6,6mg de protéines par ml.

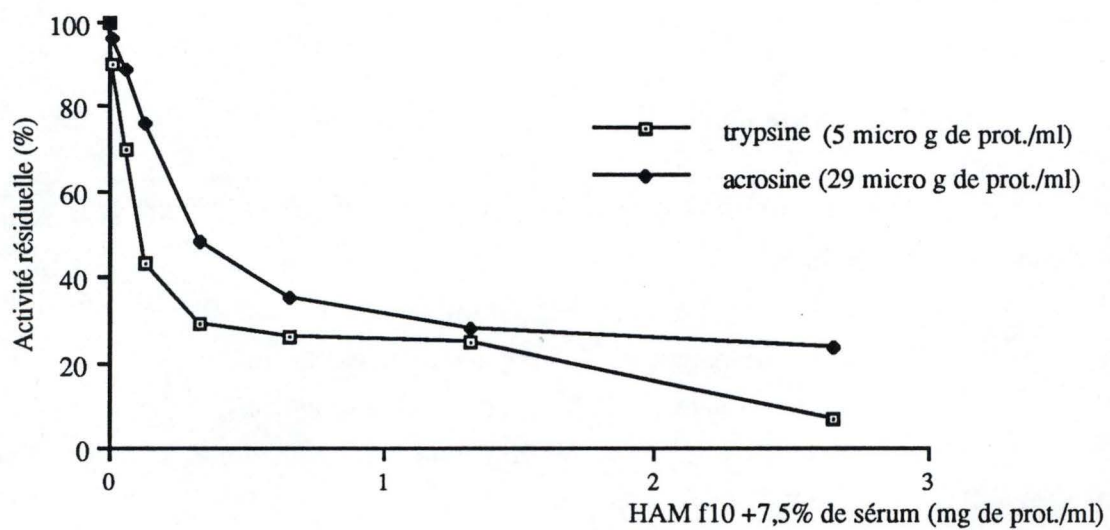
Le milieu HAM F10 + 7,5 % de sérum contient donc une quantité de protéines (6,6 mg/ml) presque identique au LAH.

Les courbes d'inhibition dues au LAH sont représentées sur la figure 9a. On remarque que les deux enzymes sont inhibés par le LAH, mais que la trypsine est complètement inhibée en présence de 5 % de LAH dans test, tandis que 40 % de LAH sont nécessaire pour induire une telle inhibition sur l'acrosine.

Les courbes d'inhibition réalisées par le HAM F10 additionné de 7,5% de sérum humain sont représentées sur la figure 9b. Nous observons également une inhibition des deux enzymes. Ces inhibitions sont moins prononcées que celles mesurées dans le LAH et la différence de sensibilité des deux enzymes est beaucoup moindre.



9a. Evolution de l'inhibition de l'activité enzymatique en présence de LAH



9b. Evolution de l'inhibition de l'activité enzymatique en présence du HAM F10

3.2.2. Discussion

En fécondation *in vitro*, le phénomène de hardening spontané de la zone pellucide est directement corrélé avec une diminution du taux de fécondation des ovocytes.

Le processus de hardening de la zone pellucide qui est essentiel pour un développement normal de l'embryon après la fécondation (il empêche la polyspermie) peut s'il se produit prématurément, empêcher toute fertilisation de l'ovocyte par le spermatozoïde (De Felici *et al.*, 1982; Downs *et al.*, 1986; Gianfortoni et Gulyas, 1985).

Le processus de hardening est du à la libération du contenu des granules corticaux (petits organites, situés juste sous la membrane plasmique de l'ovocyte) lorsque le spermatozoïde vient fusionner avec la membrane de l'ovocyte. Ce contenu, composé de protéases et de glycoprotéases, est déversé dans l'espace périvitellin et à pour rôle de modifier les glycoprotéines de la zone pellucide (Bleil *et al.*, 1981; Schroeder *et al.*, 1990; Wassarman, 1990).

Nous n'avons pu trouver dans la littérature la nature des protéases contenues dans les granules corticaux; nous avons alors choisi arbitrairement une protéase type : la trypsine. Nous avons aussi recherché l'effet des deux milieux sur l'acrosine, une sérine protéase trypsine like, qui joue différents rôles dans la fécondation.

Les résultats de nos tests sont concluants puisque les deux milieux étudiés (HAM et LAH) inhibent les activités des deux enzymes testées.

En ce qui concerne la trypsine, nous remarquons que l'inhibition est plus marquée dans le LAH que dans le HAM. Ceci est un élément favorable pour le LAH, puisqu'il tend à faire penser que ce milieu contient de puissants inhibiteurs de protéases, pouvant réduire l'apparition du hardening spontané dans la zone pellucide et donc laisser cette dernière dans un état propice à la fécondation.

La discussion est plus délicate en ce qui concerne l'acrosine. En effet, cet enzyme dont le rôle dans la fécondation est très documenté est complètement inhibé dans le LAH. Or, ce milieu donne un taux de fécondation plus élevé que dans le HAM, où cet enzyme possède toujours une activité résiduelle, même aux concentrations les plus élevées (fig.9a et 9b). Dès lors, une question fondamentale peut être posée : quel est le rôle de l'acrosine dans la fécondation ?

L'acrosine est une sérine protéase trypsine like. Cet enzyme contenu dans l'acrosome qui recouvre la tête des spermatozoïdes. Cet enzyme apparaît très tôt dans l'évolution puisqu'on le retrouve notamment dans les spermatozoïdes d'oursins. Il doit donc avoir un rôle fondamental sans quoi la nature ne l'aurait pas conservée pour la transmettre aux embranchements plus évolués.

Tabl. 2: Test d'inhibition avec LAH chauffé à 100°C pendant 10 minutes.

Sans inhibiteur	Acrosine	100 % *
	Trypsine	100 % *
Test avec 400 µl de LAH (2,68 mg de prot./ml)	Acrosine	2,3 % *
	Trypsine	0 % *
Test avec 400 µl de LAH chauffé à 100°C pendant 10 minutes	Acrosine	100 % *
	Trypsine	100 % *

* Pourcentage d'activité résiduelle des enzymes lorsque ceux-ci sont mis en contact avec les milieux

En fait, dans notre test d'inhibition, nous avons montré que l'activité protéasique de l'acrosine est inhibée, c'est-à-dire que l'enzyme n'est plus capable d'hydrolyser le substrat en présence de l'un des deux milieux. Ce résultat ne devrait pas mener à une conclusion trop hâtive quant à l'absence de rôle de l'acrosine dans la fécondation. En effet, l'acrosine est une protéine très complexe qui assure différentes fonctions (Klemm *et al.*, 1991; Meizel, 1984; Takano *et al.*, 1993; Tummon *et al.*, 1991; Welker *et al.*, 1988). Elle est notamment impliquée dans l'induction de la fusion des membranes acrosomiales externe et plasmique du spermatozoïde, dans la dispersion du contenu de l'acrosome durant la réaction acrosomiale, dans la digestion de la matrice liant les cellules de la corona radiata et peut-être localement de certains constituants de la zone pellucide, dans la liaison spécifique du spermatozoïde avec la glycoprotéine ZP₂ de la zone pellucide et dans la fusion spermatozoïde-ovocyte après franchissement de la zone pellucide.

Les résultats obtenus avec nos tests d'inhibition semblent donc aller à l'encontre du rôle lytique cité ci-dessus, en tous cas celui de digestion de la zone pellucide.

Mais, l'inhibition de l'activité protéasique pourrait présenter un intérêt fonctionnel. En effet, au cours de la fécondation l'acrosine se fixe sur une glycoprotéine de la zone pellucide appelée ZP₂. Cette fixation permet d'assurer le maintien de la liaison entre les gamètes (Crozet, 1989; Takano *et al.*, 1993). Si l'acrosine, grâce à son activité protéasique, détruit cette glycoprotéine, la liaison assurant le maintien entre les gamètes sera aussi détruite. On peut penser que si l'activité protéasique de l'acrosine est réduite, l'entretien de la liaison est favorisé et il pourrait en résulter un taux de fécondation plus élevé, ce que nous avons effectivement observé dans le liquide amniotique.

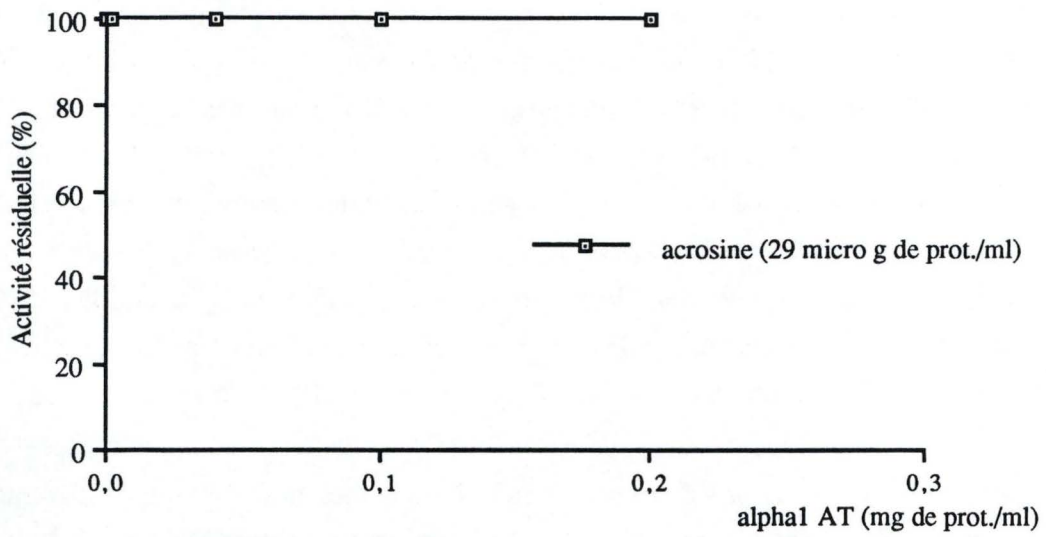
3.2.3. Caractérisation du ou des inhibiteur(s)

Pour rappel, après avoir effectué nos tests d'inhibition nous nous sommes intéressés à la nature du ou des inhibiteur(s) potentiels contenu à la fois dans le sérum humain et le LAH et responsable de la baisse d'activité de l'acrosine.

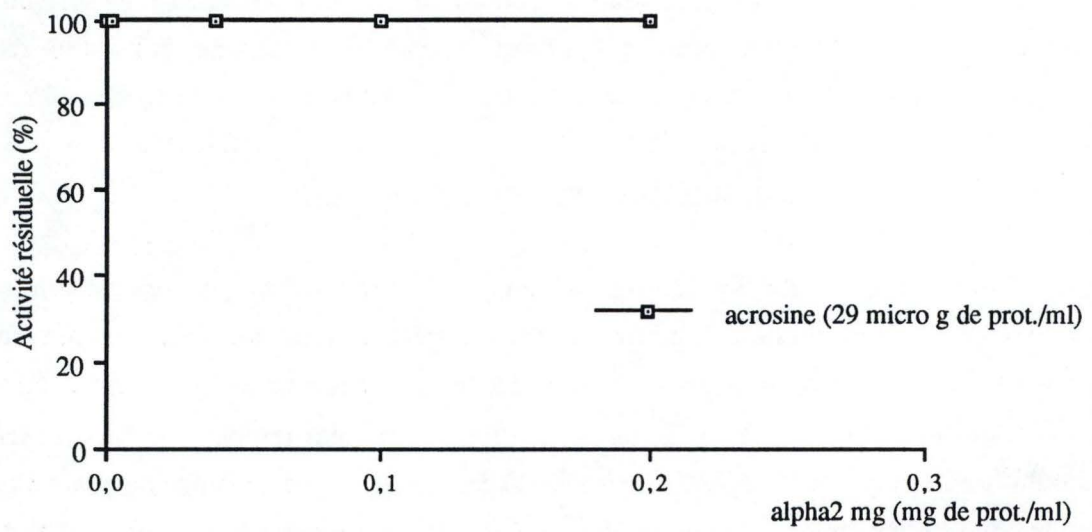
Pour aborder cette étude, nous avons dans un premier temps, effectué des tests d'inhibition avec du LAH ébouillanté à 100°C pendant 10 minutes puis dans un second temps, nous avons, grâce à une approche bibliographique recherché quels pouvaient être les composants du LAH et du sérum humain capable d'agir sur l'acrosine et la trypsine. Deux inhibiteurs ont été retenus : l' α_1 antitrypsine et l' α_2 macroglobuline.

Le LAH dénaturé à 100°C pendant 10 minutes n'exerce plus d'inhibition sur l'activité des enzymes, que ce soit la trypsine ou l'acrosine (tableau 2).

Ces résultats, confirme que le ou les inhibiteur(s) présent(s) dans le LAH sont de nature protéique.



10a. Evolution de l'inhibition de l'acrosine en présence d'alpha1 anti-trypsine.



10b. Evolution de l'inhibition de l'acrosine en présence d'alpha2 macroglobuline.

Par contre, nous n'observons aucune inhibition de l'acrosine par les deux inhibiteurs testés (fig. 10a et b). Le pourcentage d'activité résiduelle est toujours de 100%, quelles que soit la concentration des molécules inhibitrices.

L'inhibition de la trypsine est totale en présence d' α_1 antitrypsine, comme en présence d' α_2 macroglobuline (fig. 11a et b).

3.2.4. Discussion

La nature protéique des inhibiteurs contenus dans le LAH ayant été confirmée, nous avons entrepris de tester deux protéines antiprotéasiques dont la présence dans le LAH est reconnue.

L' α_1 antitrypsine est une glycoprotéine qui inhibe la plupart des sérine-protéases, α_2 macroglobuline, quant à elle, inhibe un bon nombre d'endoprotéase (Hiram et Mendenhall, 1970). Les résultats obtenus nous montrent que ces inhibiteurs n'ont pas d'effet sur l'activité de l'acrosine mais que la trypsine est totalement inhibée.

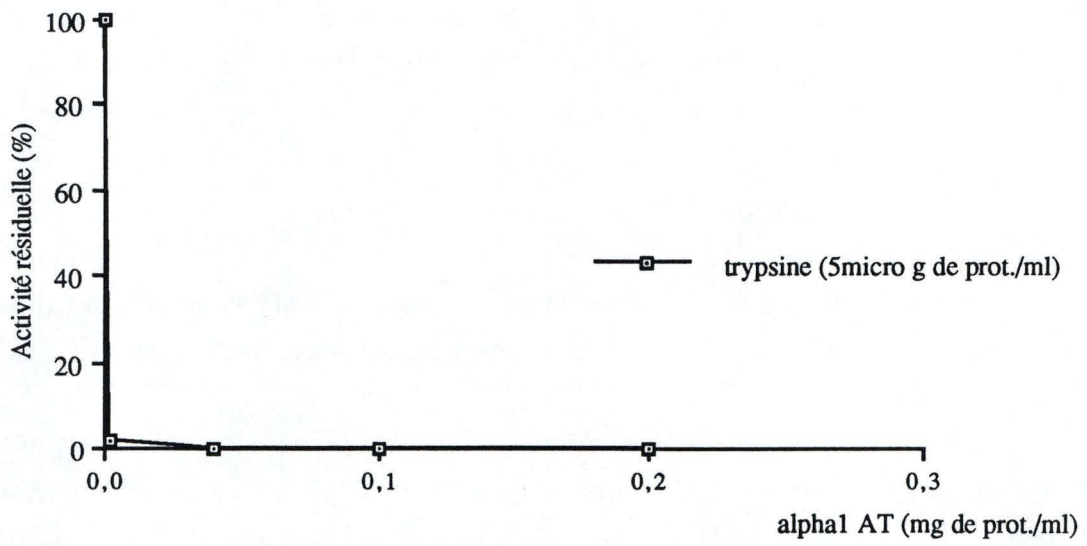
La présence d'inhibiteurs, tels que ceux qui ont été employés dans nos tests, peut expliquer l'inactivation de la trypsine dans le LAH mais aussi dans le HAM F10 complétement avec 7,5% de sérum humain, ces deux inhibiteurs étant aussi présents dans le sérum humain.

En ce qui concerne l'acrosine, la situation est plus complexe, puisqu'aucune inhibition n'est visualisée. Cette observation coïncide avec la remarque faite précédemment qui concernait la présence d'inhibiteurs puissants pouvant agir sur l'activité protéasique de la trypsine, mais laissant celle de l'acrosine indemne.

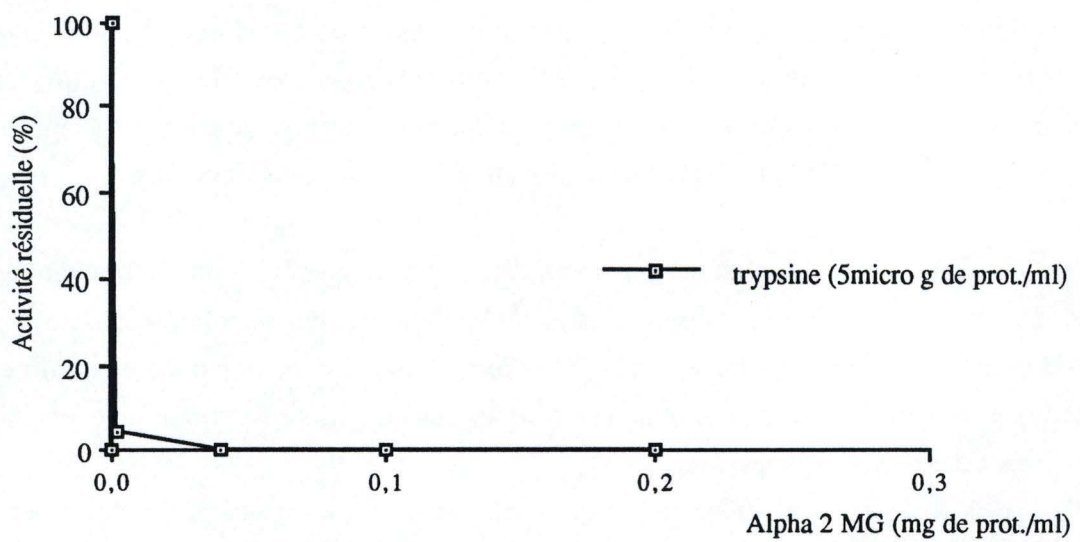
Le LAH contient donc certainement d'autres protéines inhibitrices pouvant agir sur l'acrosine. Schroeder et ses collaborateurs (1990) font remarquer la présence dans le LAH d'une glycoprotéine fœtale, la fétuine. Cette dernière contenue dans de nombreux fluides extracellulaires, pendant la vie fœtale, est considérée comme une protéine inhibitrice des sérine-protéases.

Ces auteurs font aussi remarquer que la fétuine est capable d'inhiber la transformation ZP2 en ZP2f et donc de réduire l'apparition de hardening spontané de la zone pellucide des ovocytes, en agissant sur les protéases libérées par les granules corticaux.

La fétuine pourrait être la ou une des protéines capables d'inhiber l'activité lytique de l'acrosine, permettant une meilleure réalisation de la liaison entre la ZP2 et l'acrosine pour maintenir l'attachement des gamètes durant la fécondation (Schroeder *et al.*, 1990; Wassarman, 1990). Nous n'avons malheureusement pas pu effectuer de tests avec cette substance.



11a. Evolution de l'inhibition de la trypsine en présence d'alpha 1 anti-trypsine



11b. Evolution de l'inhibition de la trypsine en présence l'alpha 2 macroglobuline.

**IV. DISCUSSIONS GÉNÉRALES
ET
CONCLUSIONS**

1. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Au cours de ces 5 dernières années, à l'I.M.P.L., 900 cycles de fécondation *in vitro* ont été réalisés de façon comparative, d'une part dans du HAM F10 complétement de 7,5% de sérum humain, milieu tout à fait conventionnel et considéré comme référence, et d'autre part dans du LAH, milieu d'essence naturel, prélevé entre la 16^{ème} et la 18^{ème} semaine de grossesse, centrifugé, filtré et décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes.

Le résultat de ces essais comparatifs indique un taux de fécondation significativement, plus élevé dans le LAH que dans le HAM, particulièrement lorsque le sperme utilisé est de moindre qualité.

Dès lors, nous aboutissons à la conclusion suivante : il existe une dépendance entre le taux de fécondation obtenu et le milieu dans lequel se sont déroulées les fécondations. Nous avons donc recherché l'impact de ces milieux sur des paramètres susceptibles d'influencer la fécondation.

La comparaison entre le HAM et le LAH montre que ce dernier, maintient moins bien la motilité des spermatozoïdes; cet effet ne devrait cependant pas influencer les résultats de la F.I.V. Par contre, le LAH induit un grand nombre de R.A. ce phénomène, aboutissement naturel de la capacitation est indispensable pour la fécondation, mais considéré en général comme défavorable et même comme une perte de capacité fécondante s'il se passe avant le contact des spermatozoïdes avec l'ovule.

Dans le cas particulier de la F.I.V., l'ovocyte est préalablement dépouillé artificiellement de sa corona radiata et le rôle des enzymes contenus dans l'acrosome n'est peut-être plus aussi important. C'est ce qui pourrait expliquer que l'activité antiprotéasique du LAH n'entraîne pas d'inhibition de la fécondation; bien au contraire, certains éléments laissent entrevoir un rôle favorable de cette activité antiprotéasique. L'acrosine n'aurait ainsi plus la possibilité de lyser les glycoprotéines au niveau de la zone pellucide mais pourrait s'y fixer de façon plus durable. La fixation de l'acrosine liée à la membrane interne de l'acrosome, pourrait, après la R.A., favoriser ainsi grandement la fusion des gamètes.

Le LAH pourrait aussi avoir un effet bénéfique sur le gamète femelle. Une hypothèse était l'action protectrice des inhibiteurs de protéases sur le durcissement (hardening) spontané de la zone pellucide. Nous n'avons pas pu mettre en évidence ce hardening sur les ovocytes, qu'ils aient été cultivés dans le HAM ou le LAH. Par contre, le LAH s'avère supérieure par sa capacité de maintenir l'intégrité morphologique (zone pellucide et cytoplasme) de l'ovocyte.

L'ensemble de ces observations, augmentation des R.A., inhibition des protéases et notamment de l'acrosine et maintien de l'intégrité des ovocytes forme très

probablement une première réponse à cette recherche sur les effets favorables du LAH dans le processus de fécondation.

2. PERSPECTIVES.

D'après les résultats obtenus, il serait intéressant dans un premier temps de se pencher d'une part sur la diminution de la motilité des spermatozoïdes en fonction de l'âge gestationnel du LAH et surtout sur le phénomène d'induction de la réaction acrosomiale par ce même milieu. Dans cette optique, divers dosages de substances importantes pour le métabolisme des spermatozoïdes et inductrices de la R.A. doivent être réalisés.

Dans un second temps, il serait intéressant d'approfondir l'approche biochimique. En effet nos tests ont été réalisés avec une même activité enzymatique, mais ceci ne signifie pas que nos 2 enzymes étaient à même concentration. Dès lors, il serait utile de réaliser une purification plus fine de l'acrosine afin d'entreprendre nos tests d'inhibition à même concentration en protéine.

De plus, il serait très intéressant de réaliser nos tests d'inhibition et de caractérisation des inhibiteurs, non plus en utilisant du LAH ou du sérum humain, mais en plaçant dans nos eppendorfs le fluide extracellulaire où se déroule la fécondation *in vivo*. Si les résultats de ces opérations sont identiques à ceux obtenus pour le LAH, nous pourrions postuler que *in vivo* l'acrosine s'est adaptée aux inhibiteurs de protéases, afin de conserver son rôle protéasique pour pénétrer la zone pellucide des ovocytes.

Ce rôle de l'acrosine est le principale point d'interrogation soulevé dans ce travail car il perturbe les affirmations généralement admises selon lesquelles c'est son rôle de protéase qui est primordiale dans le processus de la fécondation.

Il nous faudrait, dans les limites de l'éthique biologique, poursuivre les interrogations sur des ovocytes non dépourvu de leur corona radiata et sur le rôle de l'acrosine dans la fixation de spermatozoïdes à la zone pellucide et dans la fusion des gamètes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALBERTS B., DENNIS B., JULIAN L., MARTIN R., KEITH R. and JAMES D.** (1989). *Biologie moléculaire de la cellule. Editions Médecine-Sciences Flammarion., Paris.*
- ALMIRON I. and CHEMES H.** (1988). FSH modulates mitotic activity of germ and Sertoli cells in immature rats. *Intern. J. of Androlo.*, 11, 235-246.
- BARTLETT J.M.S., WEINBAUER G.F. and NIESCHLAG E.** (1989). Differential effect of FSH and testosterone on the maintenance of spermatogenesis in the adult hypophysectomized rat. *J. of Endoc.*, 121, 49-58.
- BLANC M.C.** (1987). Etude de retro-contrôle testiculaire de la sécrétion des hormones gonadotropes chez le mouton (*Ovis aries*): composantes protéiques et stéroïdiennes. *Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie CURIE, Paris VI.*
- BLEAU G., LALUMIERE G., CHAPDELAIN A. and ROBERTS KD.** (1975). Red cell surface structure stabilization by cholesterol sulfate as evidenced by scanning electron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta.*, 375, 220-223.
- BLEIL J.D., BEALL C.F. and WASSARMAN P.M.** (1981). Mammalian sperm-egg interaction : fertilization of mouse eggs triggers modification of the zona pellucida glycoprotein, ZP₂. *Dev. Biol.*, 86, 189-197.
- BONNIE S.D. and D.J. WOLGEMUTH** (1984). Structure and function of the mammalian zona pellucida, a unique extracellular matrix. *Mod. Cell Biol.*, 3, 77-111.
- BOUCHARD P. and COSSON M.P.** (1981). Bases moléculaires du mouvement des spermatozoïdes. *Annales d'Endocrinologie*, 42, 396-406.
- BOUSETTE C.** (1990). Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de licencié en Sciences Biologiques: Contribution à la mise au point d'un dilueur pour la conservation du sperme de bélier. FUNDP, Namur.
- BRYAN J.H.D. and AKRUK S.R.** (1977). A naphthol yellow S and erythrosine B staining procedure for use in studies of the acrosome reaction of rabbit spermatozoa. *Stain Tech.*, 52, 47-51.

- CROZET N.** (1989). La fécondation *in vivo* et *in vitro*. Dans : La reproduction chez les mammifères et l'homme de C. THIBAUT et M.C. LEVASSEUR *Edition INRA, Paris*.
- CUMMINGS J.M., EDIRISINGHE W.R., ODAWARA Y., WALES R.G. and YOVICH J.L.** (1989). Ultrastructural observations on gamete interaction using micromanipulated mouse oocytes. *Gam. Res.*, 24, 461-469.
- DE FELICI M. and SIRACUSA G.** (1982). Spontaneous hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during *in vitro* culture. *Gam. Res.*, 6, 107-113.
- DE LAMIRANDE E. and GAGNON C.** (1993). A positive role for the superoxyde anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Intern. J. of Androlo.*, 16, 21-25.
- DEBRY J.M.** (1989). Human amniotic fluid use and IVF; recent development. 5th annual ESHRE meeting Malmö; Sweden.
- DOWNS S.M., SCHROEDER A.C. and EPPIG J.J.** (1986). Serum maintains the fertilizability of mouse oocytes matured *in vitro* by preventing the hardening of the zona pellucida. *Gam. Res.*, 15, 115-122.
- DRAZANCIC Sc. D. and KUVACIC I.** (1974). Amniotic fluid glucose concentration. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 22, 40-48.
- DUNBAR B.S., BUDKIEWICZ A.B. and BUNDMAN D.S.** (1985). Proteolysis of specific porcine zona pellucida glycoproteins by boar acrosin. *Biol. of Reprod.* 32, 619-630.
- EDIRISINGHE W.R., WALES R.G., CHAPMAN H.M. and YOVICH J.L.** (1991) Assisted fertilization of mouse oocytes and preliminary results for human oocytes using zona drilling. *J. IVF and ET*, 8, 48-55.
- FISHEL S., JACKSON P., ANTINORI S., JOHNSON J., GROSSI S. and VERSACI C.** (1990). Subzonal insemination for the alleviation of infertility. *Fertil. and Steril.*, 54, 829-835.

- FOCK-NUZEL R., LOTTSPREICH F., HENSCEN A. and MULLER-ESTERL W.** (1984). Boar acrosin is a two-chain molecule. Isolation and primary structure of the light chain; homology with the pro-part of other serine proteinases. *FEBS*, 141, 441-446.
- FULKA J., MOTLIK J., and LEFEVRE B.** (1989). Les cellules sexuelles. *La Recherche*, 213, p 1021-1030.
- GIANAROLI L., SERACCHIOLI R., FERRARETTI AP., TROUNSON A., FLAMIGNI C. and BOVICELLI L.** (1986). The successful use of human amniotic fluid for mouse embryo culture and human in vitro fertilization, embryo culture and transfer. *Fertil. and Steril.*, 46, 907-913.
- GIANAROLI L., TROUNSON A., KING C., CHIAPPAZZO L., FERRARETTI A. and BAFARO G.** (1989). Human amniotic fluid for fertilization and culture of human embryos : results of clinical trials in human *in vitro* fertilization (IVF) programs. *J. of IVF. and ET.*, 6, 213-217.
- GIANFORTONI J.G. and GULYAS B.J.** (1985). The effects of short-term incubation (aging) of mouse oocytes on *in vitro* fertilization, zona solubility, and embryonic development. *Gam. Res.*, 11, 59-68.
- GORDON J.W., GARRISI G.J., TALANSKY B.E. GRUNFELD L. and NAVOT D.** (1986). Clinical evaluation of three approaches to micromanipulation assisted fertilisation. *Fertil. and steril.*, 54, p 671-677.
- GORDON J.W., TALANSKY B.E., GRINFELD L., GARRISI G.J., RICHARDS C., and LAUFER N.** (1988). Fertilization of human oocytes by sperm from infertile males after zona pellucida drilling. *Fertil. and Steril.*, 50, p 68-73.
- GUERIN J.F.** (1991). Comment améliorer la viabilité embryonnaire en culture ? *Contracept. Fertil. Sex.*, 19, p 153-158.
- GUSTINE Ph. D. and ZIMMERMAN D.** (1972). Amniotic fluid proteins: Evidence for the presence of fetal plasma glycoproteins in mouse amniotic fluid. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 15, 553-560.

- HENRIOUL F.** (1993). Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de licencié en Sciences Biologiques: Mise au point d'un milieu de dilution et d'un protocole de cryopréservation de la semence de bélier. FUNDP, Namur.
- HIRAM W. and MENDENHALL M.D.** (1970). Serum protein concentrations in pregnancy : concentrations in cord serum and amniotic fluid. *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 15, 581-585.
- JEAN M., BARRIERE P., SAGOT P., L'HERMITE A. and LOPES P.** (1992). Utility of zona pellucida drilling in cases of severe semen atleration in man. *Fertil. and Steril.*, 57, p 591-596.
- KINLOCH R.A., BETINA R.S. and WASSARMAN P.M.** (1990). Genomic organisation and polypeptide primary structure of zona pellucida glycoprotein hzp3, the hamster sperm receptor. *Develop Biol*, 142, 414-421.
- KLEMM U., MULLER-ESTERL W. and ENGEL W.** (1991). Acrosin, the peculiar sperm specific serine protease. *Hum . Gene.*, 87, 635-641.
- LANGLAIS J. and ROBERTS K.D.** (1985). A molecular membrane model of sperm capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gam .Res.*, 12, 183-224.
- LANGLAIS J., ZOLLINGER M. and ROBERTS K.D.** (1981). Localization of cholesteryl sulfate in human spermatozoa in support of a hypothesis for the mechanism of capacitation. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 7266-7270.
- LEGAULT Y., BLEAU G., CHAPDELAIN A. and ROBERTS K.D.** (1980). Stéroid sulfatase activity of the hamster reproductive tract during the oestrus cycle. *Biol. Reprod.*, 23, 720-725.
- LESSIRE B.** (1991). Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de licencié en Sciences Biologiques: Mise au point d'un milieu pour la dilution et la conservation du sperme de bélier. FUNDP, Namur.
- LUCRECIA C., DENNISON-LAGOS L., BANKS S.M., FUGGER E.F. and SHERINS R.J.** (1993). Chemical composition and protein source in the capacitation medium significantly affect the ability of human spermatozoa to undergo follicular fluid induced acrosome reaction. *Hum. Reprod.*, 8, 575-580.

- LUFT J.H. (1971). Ruthenium red and violet : chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. *Anat. Rec.* 171, 347-368.
- MEIZEL S. (1984). The importance of hydrolytic enzymes to an exocytotic event, the mammalian sperm acrosome reaction. *Biol. Rev.*, 59, 125-157.
- MLADENOVIC I, HAJDUKOVIC L., GENBACEV O., CUPERLOVIC M., and MOVSESIJAN M. (1993). Lectin binding as biological test *in vitro* for the prediction of functional activity of human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 8, 258-265.
- MONGET P. (1993). Le système IGF dans l'ovaire de brebis. *Thèse de doctorat de l'Université Paris VI*.
- MOOS J., TESARIK J., LECA G. and PEKNICOVA H. (1991). Mechanism of maturation and nature of carbohydrate chains of boar sperm acrosin. *FEBS*, 1:2, 27-30.
- NAGAE T., YANAGIMACHI R., PRAKASH NS. and YANAGIMACHI H. (1986). Acrosome reaction in human spermatozoa. *Fertil. and Steril.*, 45, 701-707.
- NG S.C., BONGSO A., RATNAM S.S., SATANANTHAN H., CHAN C.L.K., WONG PC. and HAGGLUND L. (1988). Pregnancy after transfer of sperm under zona. *Lancet* (oct. 1988) : 790-796
- NUSBAUM J. and ZETTNER A. (1973). The content of calcium, magnesium, copper, iron, sodium, and potassium in amniotic fluid from eleven to nineteen week's gestation. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 13, 219-226.
- PALMERO G., JORIS H., DEVROEY P. and VAN STEIRTEGHEM A.C. (1992). Pregnancies obtained after assisted fertilization by intracytoplasmic injection in couples with severe andrological infertility. *Focus on Reprod.*, 2, 13-24.
- PERREAULT S.D., BARBEE R.R. and SLOTT V.L. (1988). Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Develop. Biol.*, 125, 181-186.

- PLACHOT M. (1988). La maturation ovocytaire. *Physiologie*, 33-43.
- PLACHOT M., MANDELBAUM J. and JUNCA A-M. (1984). Acrosome reaction of human sperm used for *in vitro* fertilization. *Fertil. and Steril.*, 42, 418-423.
- QUEENAN M.D., ENRIQUE C., GADOW M.D., BACHNER P. and KUBARYCH R.N. (1978). Amniotic fluid proteins in normal pregnancies. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 45, 406-414.
- SCHROEDER A.C., SCHULTZ R.M., KOPF G.S., TAYLOR F.R., BECKER R.B., and EPPIG J.J. (1990). Fetuin inhibits zona pellucida hardening and conversion of ZP2 to ZP2f during spontaneous mouse oocyte maturation *in vitro* in the absence of serum. *Biol. of Reprod.*, 43, 891-897.
- SIMON A., YOUNIS J., LEWIN A., BARTOOV B., SCHENKER J.G. and LAUFER N. (1991). The correlation between sperm cell morphology and fertilization after zona pellucida slitting in subfertile males. *Fertil. and Steril.*, 56, 325-331.
- STROHMER H. and FEICHTINGER W. (1992). Successful clinical application of laser for microinsemination in an *in vitro* fertilization program. *Fertil. and Steril.*, 56, 212-214.
- TADIR Y., WRIGHT W.F., VAFA O., LIAW L.H., ASCH R. and BERNS M.W. (1991). Micromanipulation of gametes using laser microbeam. *Hum. Reprod.*, 6, 1011-1016.
- TAKANO H., YANAGIMACHI R. and URCH U.A. (1993). Evidence that acrosin activity is important for the development of fusibility of mammalian spermatozoa with the oolemma : inhibitor studies using the golden hamster. *Zygote*, 1, 79-91.
- TALBOT P. and CHACON R.S. (1981). A triple-stain : technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J. of Exp. Zoo.*, 251, 201-208.

- TESARIK J., DRAHORAD J. and PEKNICOVA J.** (1988). Subcellular immunochemical localization of acrosin in human spermatozoa during the acrosome reaction and zona pellucida penetration. *Fertil. and Steril.*, 50, 133-141.
- TESARIK J., MENDOZA C. and CARRERAS A.** (1993). Fast acrosome reaction measure : a highly sensitive method for evaluating stimulus-induced acrosome reaction. *Fertil. and Steril.*, 59, 424-430.
- THIBAUT C., SZOLLOSI D. and GERARD M.** (1987). Mammalian oocyte maturation. *Reprod. Nutr. Develop.*, 27, 865-896.
- TÖPFER-PETERSEN E., FRIESS A.E. and SCHILL W.B.** (1988). The acrosome reaction in boar spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 3, 319-326.
- TUCKER M., BISHOP F., COHEN J., WICKER S.R. and WRIGHT G.** (1991). Routine application of partial zona dissection for male factor infertility. *Hum. Reprod.*, 6, 676-681.
- TUNNON J.S., YUZPE A.A., DANIEL S.A.J. and DEUTSCH A.** (1991). Total acrosin activity correlates with fertility potential after fertilization *in vitro*.. *Fertil. and Steril.*, 56, 933-938.
- VAN DER ZWALMEN P., BERTIN G. and SCHOYSMAN R.** (1991). Possibilité de traitement des infertilités masculines par ouverture de la zone pellucide dans un programme de procréation médicalement assistée. *Contracept. Fertil. Sex.*, 19, 619-621.
- WASSARMAN P.M.** (1990). Profil of a mammalian sperm receptor. *Develop.*, 108, 1-17.
- WASSARMAN P.M.** (1990). Regulation of mammalian fertilization by zona pellucida glycoproteins. *J. Reprod. Fert.*, 42, 79-87.
- WASSARMAN P.M.** (1992). Mouse gamete adhesion molecules. *Biol. of Reprod.*, 46, 186-191.

WELKER B., BERNSTEIN G.S., DIEDRICH K., NAKAMURA R.M. and KREBS D. (1988). Acrosomal proteinase activity of human spermatozoa and relation of results to semen quality. *Hum. Reprod.*, **3**, 75-80.

ANNEXES

Milieu de Ham F 10

Ham's Medium F 10

Références

Exp. Cell. Res; 29, 515, 1963.

Acides aminés	mg/l
Aspartique	13,30
Glutamique	14,70
Alanine	8,91
Arginine . HCl	211,00
Paragine . H ₂ O	15,00
Cystéine . HCl	31,50
Glutamine	146,20
Glycocolle	7,51
Histidine HCl	21,00
Isoleucine	2,60
Leucine	13,10
Lysine HCl	29,30
Méthionine	4,48
Phénylalanine	4,96
Proline	11,50
Sérine	10,50
Tréonine	3,57
Tryptophane	0,60
Throsine	1,81
Valine	3,50

Sels et autres composants	mg/l
KCl	285
KH ₂ PO ₄	83
NaCl	7.400
NaHCO ₃	1.200
Na ₂ HPO ₄ . 7 H ₂ O	290
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	44
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,004
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	152
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0,834
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,051
Acide lipoiique (a. thioctique)	0,200
Glucose	1.100
Hypoxanthine	4
Pyruvate Na	110
Rouge de Phénol	12
Thymidine	0,727

Catalogue

Milieu de HAM F 10
 HAM 2010 : flacons stériles de 100 ou 500 ml, 1X
 HAM 0010 : milieu sec, sachets pour 5 l ou (20 x 5 l)

Vitamines	mg/l
Acide folique	1,320
Biotine	0,024
Chlorure	0,698
Inositol	0,541
Nicotinamide	0,615
Ca-pantothénate	0,715
Riboflavine . HCl	0,206
Thiamine	0,376
Cobalamine	1,012
Cobalamine B ₁₂	1,360

Tableau 1: Composition du HAM.

Milieu sec ne contient pas NaHCO₃, ce dernier doit être ajouté au moment de l'emploi. Utiliser solution stérile à 7 p. 100, Code BIC 3000, flacons 100 ml. Ajouter 17 ml par litre de milieu final. Milieu stérile 1X concentré ne contient pas L-glutamine. Pour notre glutamine 200 mM concentrée, stérile, Code GLU 3100, flacons de 20 ou 100 ml. Ajouter 5,0 ml par litre de milieu final.

Composition du LAH

Alpha-fetoprotéine Amniotique:

Evolution en fonction des semaines de grossesse: AFP produite par la foetus, libérée dans le LAH pour atteindre un maximum entre la 12^o-14^o semaine de grossesse pour diminuer progressivement après cette date.

- Sem 10: 9693 ngr/ml
- Sem 16: 10 826 ngr/ml
- Sem 18: 7553 ngr/ml
- Sem 37: 145 ngr/ml

Glucose:

Important dans le métabolisme énergétique du foetus.

Sa concentration diminue progressivement au cours de la grossesse:

- Sem 7-12: 65,25 mgr/%
- Sem 17-20: 28,01 mgr/%
- Sem 37-38: 18,95 mgr/%
- Sem 41: 0,23 mgr/%

Electrolytes du LAH:

Sem	Osmolarité (mOsm/kg)	Na ⁺ mEq/l	K ⁺ mEq/l	Cl ⁻ mEq/l	Urée mg/100ml
10	271	137	4,1	102	18
14	268	136	4,0	103	15
16	279,3	135	3,7	105,3	20,5
20	267,7	135,7	3,9	108	31,7
35	257	138	4,2	101,5	29,5
44	230	127	3,6	94	54

Contenu en protéines du LAH:

Le contenu en protéine est de 205 mg/ 100 ml se répartissant comme suit:

- albumine : 60 %
- céruloplasmine : 1,5 %
- transférine : 11,6 %
- Iga : 0,1 %
- IgG : 11 %

Présence parfois d' α 2 haptoglobine et α 2 macroglobine.

Tableau 2: Composition sommaire du LAH.

Les hormones du LAH

Soit *hCG* (Human Chorionic Gonadotropin)

La concentration en hCG dans plasma foetal < LAH < sérum maternel.

Forte augmentation de concentration en hCG dans le LAH à partir de la 9^{ème} semaine pour atteindre un pic à la 13^{ème} semaine.

Diminution progressive pour atteindre un niveau constant qui se maintiendra jusqu'en fin de grossesse (0,12 à 1,2 UI/ml).

Soit *hCS* (Human Chorionic Somatomammotropine)

La concentration d'hCS dans le LAH augmente progressivement :

- Sem 11-13: 0,41 µg/ml

- Sem 32-35: 68 µg/ml ?

- Sem 36-40: 0,44 µg/ml

Dans le sérum maternel, cette augmentation est plus rapide.

Soit la *PRL* (Prolactine)

En début de grossesse, la concentration de PRL est élevée: 10 000 ng/ml. Cette concentration est 100 fois supérieure à celle obtenue dans le sérum maternel: 2 à 50 ng/ml.

Les raisons du taux élevé en début de grossesse sont inconnues.

Soit le *glucagon*

Les concentrations en glucagon chez les primates à terme varient de 41 à 307 ng/ml.

La source est inconnue.

Soit *Human Growth Factor*

Sa concentration dans le LAH varie peu tout au long de la grossesse. Elle se situe autour d'une valeur de 2,5 ng/ml en début de grossesse et de 2,1 ng/ml en fin de grossesse dans le plasma maternel.

Par contre, dans le LAH, la concentration de HGH augmente pour atteindre une valeur de 10 ng/ml à 20-30^{ème} semaine.

A terme, la concentration en HGH est de 30 ng/ml.

Soit *C16 Stéroïde Hydroxylé*

Les divers concentrations sont:

- 16- α -OH-DHEA: 798 ng/ml

- DHEA: 8 ng/ml

- 16-Kétoandrosténedione: présent à de fortes concentrations

- 16-OH-DHEAS: représente une faible fraction
- 16-OH-Progestérone: 130 ng/ml
- Progestérone: 52 ng/ml

Soit les *oestrogènes*

* Oestrone et oestradiol: petites variations durant les 12 dernières semaines: de 2,5 à 4,4 et de 1,2 à 3,1 ng/ml.

* Oestriol: augmente jusqu'en fin de gestation, durant les 30 premières semaines: 86 à 145 ng/ml. En fin de grossesse: 559 à 881 ng/ml.

* Oestrone ou E₄ : sa concentration augmente durant la grossesse pour atteindre: 83,8 ng/ml.

* Cortisol: augmente durant la grossesse pour atteindre un plateau à la 33 ou 35ème semaine. Un pic de production: à la 40ème semaine. A terme: 13 à 240 ng/ml.

* P4: sa concentration diminue au fur et à mesure de la grossesse dans le LAH. Les concentrations varient de 40 à 167 ng/ml.

A 14 sem: 55 ng/ml

A la fin: 26 ng/ml

* Prénénolone: concentrations moyennes varient d'un auteur à l'autre: 145 à 400 ng/ml dans le LAH.

* Prostaglandines: Le LAH contient surtout PGE₂ et PGF_{2α}. PGF_{2α} augmente jusqu'en fin de gestation (1,2 à 39,5 ng/ml).

PGE₂ en début de gestation: 1,7 à 17,0 ng/ml. En fin de gestation: pas de moyenne signalées.

Tableau 3

Ham f10													LA												
Sp	Tps	Imm			Mob			Mot			RA			Imm			Mob			Mot			RA		
		R1	R2	Moy	R1	R2	Moy	R1	R2	Moy	R1	R2	Moy	R1	R2	Moy	R1	R2	Moy	R1	R2	Moy	R1	R2	Moy
Sp1	0	5	5	10	5	5	10	40	40	80	16	16	32	5	5	10	5	5	10	40	40	80	16	16	32
	3	10	10	20	3	3	6	37	37	74	20	20	40	13	15	25	7	5	12	32	30	62	34	34	68
	9	14	18	32	7	6	13	30	26	56	26	28	54	19	18	37	8	8	16	23	24	47	38	36	74
	18	19	17	36	9	10	19	22	23	45	34	32	66	21	22	43	8	9	17	22	19	41	44	42	86
	24	22	18	40	10	9	19	18	24	42	38	36	74	22	24	46	9	8	17	19	18	37	48	44	92
Sp2	0	4	4	8	4	4	8	42	42	84	15	16	31	4	4	8	4	4	8	42	42	84	15	16	31
	3	12	17	29	3	3	6	35	31	66	22	26	48	14	16	30	6	7	13	30	28	58	38	36	74
	9	16	15	31	2	5	7	32	30	62	30	28	58	19	15	34	5	12	17	26	23	49	40	38	78
	18	19	19	38	7	11	18	24	20	44	34	38	72	22	24	46	11	12	23	17	14	31	46	42	88
	24	19	23	42	8	8	16	23	19	42	36	38	74	26	23	49	6	10	16	18	17	35	46	44	90
Sp3	0	5	5	10	3	3	6	42	42	84	14	14	28	5	5	10	3	3	6	42	42	84	14	14	28
	3	12	11	23	6	5	11	32	34	66	24	26	50	11	15	26	8	9	17	31	26	57	38	34	72
	9	13	12	25	6	9	15	31	29	60	30	30	60	17	18	35	11	9	20	22	23	45	38	40	78
	18	14	17	31	12	10	22	23	24	47	38	40	78	21	19	40	10	14	24	19	17	36	46	44	90
	24	18	20	38	12	8	20	20	22	42	40	42	82	20	24	44	14	10	24	18	16	34	46	46	92
Sp4	0	5	5	10	5	5	10	40	40	80	14	16	30	5	5	10	5	5	10	40	40	80	14	16	30
	3	10	11	21	6	7	13	34	32	66	28	30	58	15	13	28	9	6	15	27	31	58	38	36	74
	9	14	9	23	9	10	19	27	31	58	32	36	68	15	15	30	10	10	20	25	25	50	40	42	82
	18	14	14	28	13	11	24	23	25	48	40	42	82	16	21	37	14	12	26	20	17	37	48	44	92
	24	21	23	44	9	8	17	20	19	39	42	42	84	25	25	50	9	10	19	16	15	31	46	44	90

ACROSIN : ITS ROLE IN THE FERTILIZATION

J.L. BISTER, V. LANNOY, B. PERRAD, J.M. DEBRY* and R. PAQUAY

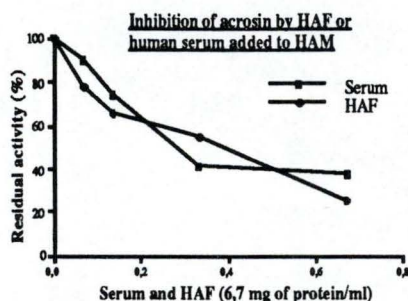
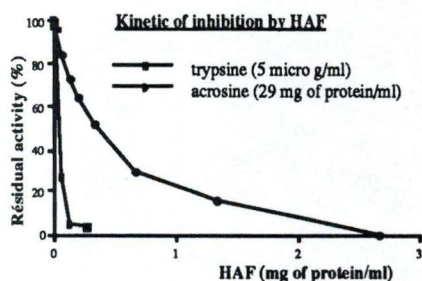
The *in vitro* fertilization (IVF) gives better results when conducted in human amniotic fluid (HAF) than in classical medium (HAM F10 + 7.5 human Serum) [J.M. DEBRY, unpublished data].

The inhibition of a premature spontaneous hardening of the zona pellucida, induced by proteases released by the oocyte cortical granules, could be one of the favourable effects of the HAF, and one of the role of the serum added to the other media.

To test this hypothesis, we looked for an antiprotease activity of the HAF and of the human serum added HAM F10 medium.

The method used to test this antiprotease activity is the *in vitro* colorimetric assay of BAPNA catabolism (N α -Benzoyl - Arginine - P-Nitroamillide) by trypsin or acrosin in the presence of increasing quantity of HAF or HAM + human serum (0-40%).

The results show a total inhibition of the acrosin trypsin like activity at 40% HAF, corresponding to 2.7 mg protein/ml. A parallelism is obtained with the same quantities of protein from HAF or human serum.



These data and the well-known presence of fetuin, inhibitor of the serine-proteases clash with the role commonly attributed to the acrosine : enzymatic dispersion of the corona radiata cells and penetration of the spermatozoa through the zona pellucida. But one must not hastily conclude that acrosine does not have any role in fecundation. The membrane-linked fraction of acrosin plays actively in the gametes fusion, due to its fixation to the ZP2 glycoprotein of the zona pellucida. This complex bicatenar molecule may have also other enzymatic effects and could be implicated in the initiation of the zygote metabolism.

Present address : Laboratoire de Physiologie Animale, FUNDP, 61 rue de Bruxelles, B-5000 Namur, Belgium

* Present address : Institut de Morphologie Pathologique, Allée des Templiers 41, B-6280 Lovreval, Belgium.