

CHAPITRE : I les premières cellules de développement

I- Biologie cellulaire et moléculaire de la spermatogenèse

I-1- Déroulement de la spermatogenèse

La spermatogenèse est le processus de différenciation cellulaire qui aboutit à la transformation des cellules germinales en spermatozoïdes. Elle se déroule dans la paroi des tubes séminifères du testicule. Elle comporte deux phases :

- La Méiose (la division) : des spermatogonies aux spermatides
- La spermiogenèse (différenciation cytoplasmique) : des spermatides aux spermatozoïdes

I-1.1 Fonctions et structure du testicule humain :

Les testicules sont des organes pairs situés à l'intérieur du scrotum, qui possèdent deux fonctions:

- une fonction exocrine, ou gamétogenèse, caractérisée par la production des spermatozoïdes;
- une fonction endocrine, avec synthèse des hormones stéroïdes sexuelles mâles, les androgènes.

Chez l'homme adulte, chaque testicule est une masse ovoïde qui mesure environ 5 cm de long, 3 cm de large et 2,5 cm d'épaisseur, entourée d'une enveloppe conjonctive, l'albuginée. Au pôle supérieur du testicule, il existe un épaississement conjonctif appelé le corps de Highmore. Celui-ci est relié à l'albuginée par des cloisons radiaires, les septa testis, qui délimitent 200 à 300 lobules testiculaires

I-1.2 Evolution des cellules de la lignée germinale

Trois types de cellules germinales sont impliquées dans la spermatogenèse : les spermatogonies, les spermatocytes et les spermatides

a) Les spermatogonies

Il s'agit de cellules diploïdes se divisant par mitoses, disposées en périphérie des tubes séminifères. Ce sont des cellules arrondies, d'un diamètre de 10 à 15 μm , avec un cytoplasme clair et un noyau ovoïde. Il en existe trois types :

- spermatogonies Ad, à chromatine dense, d'aspect sombre;
- spermatogonies Ap, à chromatine poussiéreuse, claire;
- spermatogonies B, à chromatine mottée et irrégulière.

b) Les spermatocytes

Il s'agit de cellules disposées à distance de la membrane tubulaire. Issus de la dernière division des spermatogonies B, les spermatocytes primaires sont de grandes cellules au noyau arrondi contenant plusieurs nucléoles. Ils traversent une courte interphase (stade pré-leptotène), pendant laquelle s'effectue une réplication d'ADN (les spermatocytes primaires sont des cellules à $2n$ chromosomes dupliqués ou $4c$ molécules d'ADN). Ces cellules entrent ensuite dans un processus de division qui n'affecte que les cellules de la lignée germinale, appelé la méiose. Sa finalité est d'assurer le brassage de l'information génétique et la diminution de moitié du contenu en chromosomes de la cellule. Elle consiste en deux divisions successives (méioses I et II), consécutives à une seule phase de réplication d'ADN. Chacune des deux divisions peut être décomposée, comme la mitose, en 4 étapes distinctes : prophase, métaphase, anaphase, télophase.

La première division méiotique aboutit à la séparation des chromosomes homologues et à la formation de spermatocytes secondaires, dans lesquels chaque chromosome est formé de deux chromatides. Les spermatocytes secondaires contiennent donc n chromosomes dupliqués

Après une interphase très courte où les chromosomes ne se décondensent que partiellement, les spermatocytes secondaires entrent en deuxième division de méiose, sans réplication d'ADN préalable. La deuxième division est similaire à une mitose somatique normale, à ceci près qu'elle ne porte que sur 23 chromosomes au lieu de 46.

La deuxième division méiotique aboutit à la ségrégation des chromatides sœurs dans les deux cellules filles, les spermatides, qui sont des cellules haploïdes contenant n chromosomes.

c) Les spermatides

La différenciation post-méiotique des spermatides en spermatozoïdes est appelée la spermiogenèse. Chez l'homme, elle dure environ 23 jours.

Les spermatides, localisées près du centre du tube séminifère, sont de petites cellules de 6 à 7 μm de diamètre divisées en trois classes :

- les spermatides rondes, qui possèdent un noyau rond avec une chromatine pâle et homogène;
- les spermatides en élongation, dont le noyau s'allonge et dont la chromatine devient plus sombre;
- les spermatides en condensation, dont le noyau est très allongé, avec une partie caudale globulaire et une partie antérieure saillante, et dont la chromatine est sombre et condensée.

La maturation consiste en :

- une réorganisation nucléaire, avec élongation et compaction importante du noyau. Cette étape cruciale modifie globalement la structure du génome. Elle sera détaillée plus loin;
- une élimination de la majeure partie du cytoplasme via les corps résiduels;
- la mise en place de l'acrosome à partir de l'appareil de Golgi;
- l'assemblage des structures du flagelle.

La spermiogenèse aboutit à la libération des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères. Ceux-ci subiront une dernière maturation dans l'épididyme, puis dans les voies génitales féminines, de manière à acquérir leur pouvoir fécondant.

I-1.3 Cinétique de la spermatogenèse

La production des spermatozoïdes est continue à partir de la puberté grâce au renouvellement des spermatogonies souches Ad et Ap par mitoses. Chez l'homme, les spermatogonies Ap un peu plus différenciées donneraient naissance aux cellules souches de renouvellement ou spermatogonies B, lesquelles entameraient leur différenciation.

La spermatogenèse humaine dure 74 jours. Le cycle spermatogénétique est défini comme la succession chronologique des différents stades de différenciation d'une génération de cellules germinales (depuis la spermatogonie jusqu'au spermatozoïde). Chacune des étapes du cycle spermatogénétique a une durée constante. En réalité, à un niveau donné du tube séminifère, les spermatogonies B entrent dans un cycle de spermatogenèse de manière discontinue. Chez l'homme, le départ d'une nouvelle lignée est déclenché tous les 16 jours : ceci constitue le

cycle de l'épithélium séminal et explique l'association préférentielle de certaines cellules entre elles à un stade donné. Ainsi, on distingue 6 associations cellulaires possibles (ou stades) au cours de la spermatogenèse humaine.

Les spermatogonies de même génération sont reliées par des ponts cytoplasmiques qui persistent entre les cellules germinales de même génération jusqu'à la fin de la spermiogenèse. Ces groupes de cellules effectuent donc leur spermatogenèse de manière synchrone. Chez l'homme, la paroi d'un tube séminifère représente trois ou quatre groupes de cellules de génération différente : une section de tubes correspond donc à plusieurs territoires d'évolution asynchrone.

I-1.4 Contrôle neuro-endocrinien de la fonction testiculaire

D'une manière générale, les deux fonctions testiculaires, endocrine (production d'androgènes) et exocrine (spermatogenèse), sont sous le contrôle d'hormones synthétisées à l'étage hypothalamique, hypophysaire et testiculaire

En réponse à la sécrétion pulsatile de GnRH (Gonadotropin releasing hormone) par l'hypothalamus, l'antehypophyse sécrète les gonadotrophines hypophysaires, FSH (Follicle stimulating hormone) et LH (Luteinizing hormone).

La LH est l'hormone qui contrôle la fonction endocrine du testicule en agissant sur ses récepteurs, situés à la surface des cellules de Leydig. Elle stimule la production de testostérone par ces cellules.

La FSH et la testostérone sont les deux hormones clés dans le contrôle de la spermatogenèse. Elles agissent via les cellules de Sertoli, qui possèdent les récepteurs de la FSH à leur surface et ceux de la testostérone dans leur noyau. La FSH contrôle la prolifération des cellules de Sertoli pendant la période néonatale et prépubertaire. Elle régule la sécrétion de nombreux facteurs synthétisés par les cellules de Sertoli qui jouent un rôle important dans la spermatogenèse.

La testostérone, produite par les cellules de Leydig sous l'action de la LH, est indispensable à l'initiation et au déroulement de la spermatogenèse, qu'elle stimule et qu'elle maintient par une action paracrine. Ses récepteurs sont situés sur les cellules de Leydig, les cellules de Sertoli et les cellules myoïdes péri-tubulaires, dont elle régule les fonctions. Elle exerce

également un rétro-contrôle négatif sur les sécrétions des gonadotrophines (en particulier la LH), et de la GnRH.

Enfin, les cellules de Sertoli synthétisent l'inhibine, qui exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de la FSH.

I-2- Le contrôle de la méiose dans la lignée germinale male

1. Les gènes impliqués dans le déroulement de la méiose

1-1- Gène C-mos (proto-oncogène c-mos = p39^{mos}).

Dans le testicule de la souris, c-mos est principalement exprimé sous la forme d'un transcrit de 1,7 kb, spécifique du testicule dans les spermatides jeunes. Au contraire les anticorps reconnaissant la protéine

MOS de 43 kD montrent que celle-ci est abondante dans les spermatocytes pachytènes et peu ou pas présente dans les cellules post-méiotiques. Ces résultats indiquent donc une régulation, non seulement au niveau transcriptionnel mais aussi traductionnel de MOS. MOS est également exprimé par les cellules de Leydig et de Sertoli. Au contraire de ce qui est connu du rôle de

MOS dans l'ovocyte, il n'existe pas de données sur le rôle de MOS lors de la spermatogenèse, bien que son abondance dans les pachytènes suggère un rôle dans le processus de la méiose. Cependant des résultats très récents font état que l'expression de v-mos sous le contrôle du promoteur PGK2 dans des souris transgéniques, entraîne un arrêt de la spermatogenèse en métaphase I. Par contre, la surexpression de c-mos ne cause pas de stérilité.

1-2- Gènes des cyclines

a) Cycline B (= p 45)

Chez les mammifères, les cyclines B1 et B2 sont exprimées lors de la transition G2/M. Ces deux cyclines sont également exprimées dans le testicule et sont spécifiques des cellules germinales. Par hybridation in situ, il apparaît que l'ARN messager de la cycline B1 est surtout présent dans les spermatides rondes, ce qui semble surprenant puisque ces cellules ont terminé leur méiose.

Toutefois les quantités de protéine cycline B1 et son activité kinasique sont maximales dans les spermatocytes pachytènes. Ceci suggère pour la cycline B1 comme pour MOS, une régulation post-transcriptionnelle importante, et que les

ARN messagers présents dans les spermatides rondes pourraient ne pas être traduits.

Pour ce qui est des transcrits codant la cycline B2, leur niveau apparaît maximum dans les pachytènes âgés, c'est-à-dire juste avant la première division de méiose.

b) Cycline A

Il apparaît y avoir au moins deux gènes de cycline A. Le gène CYC A1 est très fortement exprimé dans le testicule adulte et seulement dans les cellules en méiose ou juste avant.

Au contraire, le gène CYC A2 n'est détecté que dans les cellules en mitose (spermatogonies) et les spermatocytes préleptotènes, c'est-à-dire au moment de la synthèse d'ADN de la méiose. Ainsi, le gène de la CYC A1 apparaît plutôt impliqué dans le contrôle de la phase M et celui de la CYC A2 plutôt dans le contrôle de la phase S.

c) Cycline D

Les gènes codant pour les cyclines D1, D2 et D3 sont exprimés dans le testicule, de même que dans l'ovaire, mais leurs profils d'expression sont très différents dans ces deux glandes.

La cycline D1 est fortement exprimée dans le testicule au début de la vie post-natale et chez les animaux adultes dépourvus de cellules germinales. Les études en hybridation in situ confirment ces résultats en ne détectant une expression de l'ARN messager correspondant que dans les cellules de Sertoli.

Le gène codant la cycline D2, quant à lui, apparaît exprimé de manière faible dans tous les types cellulaires du testicule.

La cycline D3, comme les autres membres de cette famille, est particulièrement active pendant la phase G1. Dans le testicule, l'expression du gène CYC D3 apparaît maximale dans les spermatides rondes.

1-3- Les CDK (Kinases dépendant des cyclines)

Les mécanismes régulateurs de l'activité des CDK sont essentiellement des mécanismes post-traductionnels puisqu'ils caractérisent des réactions de phosphorylation et déphosphorylation, ainsi que leur association avec des cyclines spécifiques

Les gènes codant pour CDKI, CDK2, CDK3, CDK4 et CDK5 sont exprimés dans le testicule. L'expression de ces gènes apparaît dépendante du type cellulaire et du stade de développement. Ainsi CDKI et CDK2 sont fortement exprimées dans les spermatocytes pachytènes et diplotènes, mais les gènes codant pour les CDK 1 à 5 sont également exprimés dans les cellules de Sertoli adultes alors que celles-ci ne se multiplient. Donc, cette expression ne semble pas strictement reliée une activité de prolifération.

1-4- Les cdc25 (Protéines phosphatases)

Chez les mammifères trois homologues du gène *cdc25* ont été identifiés : *cdc25A*, *cdc25B* et *cdc25C*.

Les ARNm de *cdc25A* apparaissent au début de la phase G1 et sont à leur niveau maximum en milieu et en fin de phase G1. La protéine correspondante est active lors de la transition G1-S et pourrait également être importante en fin de phase M.

Les ARNm de *cdc25C* sont en quantité importante en phase G2 et la protéine active à la transition G2-M. Dans le testicule de la souris adulte, l'expression de *cdc25C* apparaît restreinte aux cellules germinales et en particulier aux spermatocytes pachytènes et diplotènes, ce qui apparaît tout à fait compatible avec un rôle lors de la transition G2-M. Ces transcrits persistent cependant dans les spermatides rondes et allongées.

Les *cdc25B*, au contraire, apparaît fortement exprimé dans les cellules somatiques dont la plupart, dans le testicule adulte, ne sont pas en phase de prolifération.

2. Les hormones et les facteurs locaux potentiellement impliqués dans la régulation de la méiose chez le male

Un système de culture de segments de tube séminifère a pu montrer que la FSH, l'interleukine-1 α et le MIP-1 α (macrophage inflammatory protein) stimulent l'incorporation de thymidine tritiée par les spermatocytes en stade préleptotène. Inversement, l'interleukine-6 apparaît exercer, dans ce système, une action inhibitrice sur la synthèse d'ADN méiotique.

Il a enfin été postulé que les cellules de Sertoli sont la source d'une substance inhibant l'entrée en méiose des cellules germinales (MIS).

II- Biologie cellulaire et moléculaire de l'ovogenèse

II-1- Déroulement de l'ovogenèse

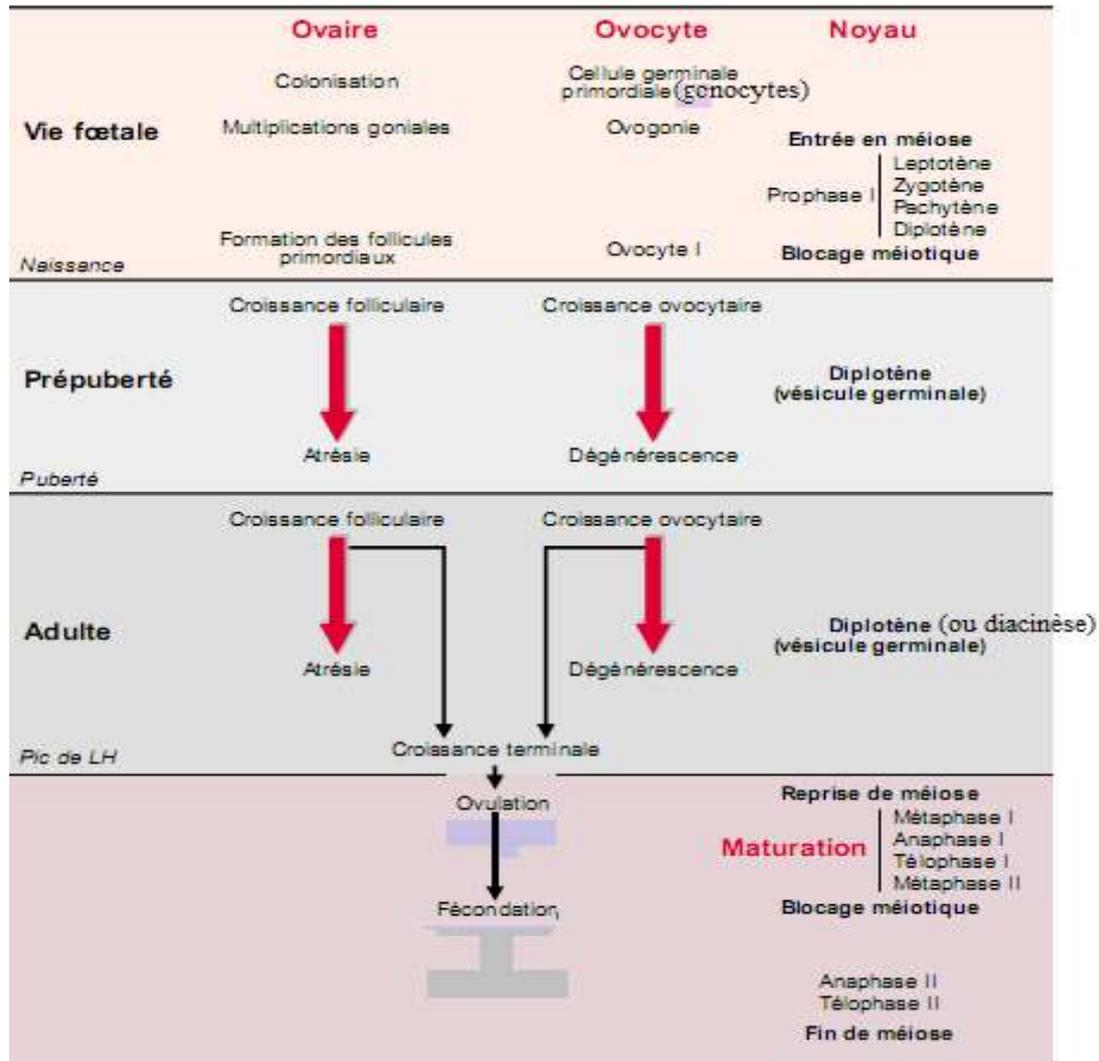


Figure : Principales étapes de la vie de l'ovocyte, depuis la cellule germinale primordiale (gonocytes) jusqu'à la fécondation. Les phases méiotiques et les arrêts/reprises du cycle cellulaire sont représentés. Avant et après la puberté, la plupart des ovocytes sont voués à la dégénérescence lors de l'atrésie folliculaire. La maturation n'a lieu qu'à la suite du pic ovulatoire de LH (ovulation), c'est-à-dire après la puberté, lors de chaque cycle ovarien et même alors ne concerne qu'un très faible pourcentage des ovocytes. La terminaison de la méiose nécessite l'activation de l'ovocyte lors de la fécondation. Dès avant la naissance (dans la plupart des espèces) et jusqu'aux 24 dernières heures précédant une hypothétique ovulation, l'ovocyte reste donc au stade diplotène (ou diacinèse) de la fin de la prophase méiotique.

II-2- Le contrôle de la méiose dans la lignée germinale femelle

L'entrée en méiose de l'ovocyte se réalise durant la vie fœtale et s'accompagne d'une synthèse d'ADN analogue à la phase S d'une mitose. La plupart des ovocytes ont ensuite deux phases d'arrêt pendant la méiose : les caractéristiques varient selon l'espèce. Généralement la méiose se déroule jusqu'au stade diplotène de la première prophase et reste bloquée au stade diacinèse l'intérieur de l'ovaire. Cette étape correspond à la phase G2 du cycle cellulaire. Elle est caractérisée par des chromosomes diffus, entourés par une membrane nucléaire que l'on appelle la **vésicule germinale**. La reprise de la méiose, qui s'opère à la puberté, correspond à la transition G2/M et fait intervenir la dissolution de la membrane nucléaire (rupture de la vésicule germinale, **GVBD** pour germinal vesicle breakdown) déclenché au cours de l'ovulation, la formation du fuseau de division et la ségrégation des chromosomes. L'ovocyte termine alors la première division de méiose en expulsant son premier globule polaire. Il poursuit ensuite sa maturation et s'arrête une seconde fois en métaphase de seconde division. La transition entre les deux métaphases de méiose n'est pas interrompue par une interphase. L'achèvement de la deuxième division de méiose est déclenché par la pénétration du spermatozoïde lors de la fécondation.

Ainsi, la première pause dans le processus de méiose est rompue par un signal hormonal qui arrive alors que l'ovocyte est encore dans l'ovaire (ovulation), alors que la deuxième pause est rompue lors de la fécondation.

II-2-1. Première pause au cours de la méiose

L'arrêt en G2/M s'effectue lorsque l'ovocyte contient de grandes quantités de p34cdc2 (CDK1) inactif, sous sa forme phosphorylée sur la tyrosine 15. Au contraire l'activité MPF/H1 kinase = p34cdc2 - cycline B = CDKI - cycline B, apparaît lors de la phase de rupture de la vésicule germinale, atteint un haut niveau lors de la métaphase I et disparaît de manière transitoire au moment de l'expulsion du premier globule polaire. Cette activité réapparaît à la métaphase II et reste élevée jusqu'à la fécondation. La nécessité d'une synthèse protéique à cette étape est fonction de l'espèce étudiée. Ainsi chez la palourde ou l'étoile de mer, l'application de l'hormone 1-méthyl adénine entraîne la rupture de la vésicule germinale en 15 minutes. Dans l'ovocyte de grenouille, au contraire, bien que de grandes quantités de cycline B1 et B2 soient présentes, associées

à la forme phosphorylée inactive de p34cdc2, la rupture de la vésicule séminale n'a lieu que plusieurs heures après l'addition de l'hormone déclenchante qui est la progestérone. Or ce n'est pas une synthèse de cycline qui est requise. La protéine nécessaire pourrait être MOS (proto-oncogène c-mos = p39^{mos}).

La reprise de la méiose de l'ovocyte de mammifère également nécessite la déphosphorylation de la tyrosine 15 de p34cdc2. En effet, les expériences utilisant le vanadate, qui est un inhibiteur des tyrosine phosphatases, bloque la reprise de la méiose dans l'ovocyte de rat et de souris. MOS ne semble pas nécessaire chez la souris pour la reprise de la méiose. Pour ce qui est de l'ovocyte d'~toile de mer ou de palourde, il semblerait que le processus d'activation de cdc25 ne soit pas fonctionnel, ce qui empêcherait la déphosphorylation de p34cdc2 sur la tyrosine 15 bloquant ainsi l'activité MPF.

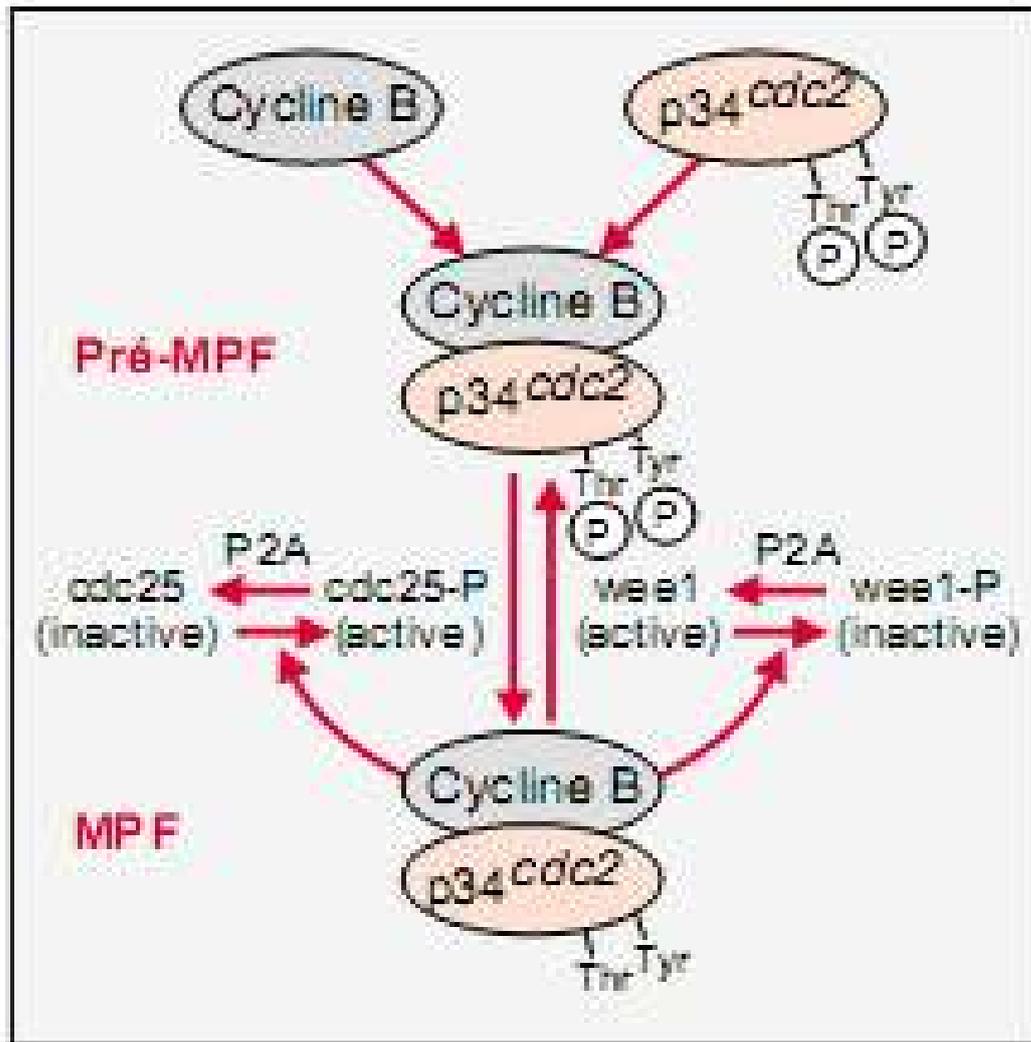


Figure : Mécanismes d’activation du MPF. L’assemblage des deux sous-unités (p34^{cdc2} et cycline B) mène à la formation du pré-MPF. Celui-ci est activé par déphosphorylation, sous la dépendance du produit du gène *cdc25* alors que la phosphorylation est contrôlée par le produit du gène *wee1*. Une fois activé, le MPF peut auto-amplifier son activité en agissant sur les niveaux de phosphorylation de *wee1* et *cdc25*. En inhibant la phosphatase2A (P2A), le MPF augmente l’activation de *cdc25* et l’inactivation de *wee1*, favorisant ainsi sa propre activation.

II-2-2. Arrêts au cours de la métaphase II

L’ovocyte des mammifères, s’arrête une seconde fois à la métaphase de la seconde division. A ce moment pourtant, l’activité MPF est élevée et la dégradation des cyclines est inhibée.

Ce second arrêt est dû à l'activité CSF (pour "cytostatic factor"). Or la protéine MOS a le même effet que le CSF car elle est capable d'arrêter la mitose à la métaphase, alors qu'il y a une activité p34^{cdc2} importante. Actuellement, il semble raisonnable de penser que CSF est en partie ou en totalité MOS et que le second arrêt en métaphase est dû à la transcription de *mos* quand l'ovocyte mature. Cependant MOS est aussi nécessaire à la maturation de l'ovocyte de grenouille. En effet il est exprimé à ce stade du développement de l'ovocyte, et cette première pause en prophase I ne peut être rompue en présence d'oligonucléotides antisens pour *mos*. Ceci suggère donc que dans cette espèce (contrairement à la souris), MOS est nécessaire à la transition G2/M. MOS agit probablement en activant la MAP kinase. La MAP kinase elle-même a une activité CSF.

Les membres de la famille des MAPkinases (pour "mitogen activated proteins") sont des sérine/thréonine kinases qui sont activées par phosphorylation sur des résidus tyrosine et thréonine. La MAPkinase est activée au cours de la maturation de l'ovocyte et qu'elle régule la méiose.

L'activation de la MAP kinase précède l'activation de p34cdc2 lors de la première méiose. Le blocage de l'activité MAP kinase bloque également la rupture de la vésicule germinale. Chez la souris, contrairement l'étoile de mer, l'activité MAP kinase reste élevée pendant toute la période de maturation de l'ovocyte et durant l'arrêt en métaphase II. Cette activité chute après la fécondation et pendant la première mitose lors de la formation du pronucléus.

MOS stimule l'activité MAP kinase dans l'ovocyte de grenouille mais n'active pas p34cdc2. Le couple MOS/MAP kinase pourrait avoir deux effets : produire les caractéristiques du deuxième cycle de méiose, c'est-à-dire celui de la phase S est exprimée, et être la cause du blocage en métaphase II.

II-2-3. Les facteurs de signalisation cellulaire impliqués dans ces régulations

a) Première pause de méiose

Chez l'étoile de mer, la 1-méthyl adenine induit la maturation, probablement via une chute de la teneur de l'ovocyte en AMPc.

Pour ce qui est de l'ovocyte de mammifère, la maturation méiotique se réalise spontanément lorsque l'ovocyte est extrait du follicule (disparition de blocage exercé par les

OMI (oocyte meiotic inhibitor) secrétés par les cellules folliculaires) ; il n'est pas besoin d'un stimulus hormonal pour réinitier la méiose et atteindre la métaphase II. Par contre, la maturation spontanée, qui se produit *in vitro*, est stoppée si on ajoute au milieu de culture un analogue de l'AMPc ou un inhibiteur des phosphodiésterases. Il semble donc que l'AMPc soit impliqué dans le blocage de l'ovocyte en prophase I. D'ailleurs, on observe une chute significative de la teneur de l'ovocyte en AMPc juste avant la rupture de la vésicule germinale. De plus, l'augmentation des concentrations extracellulaires de Ca^{++} diminue l'efficacité de l'AMPc à maintenir l'ovocyte bloqué

Il apparait donc y avoir un effet antagoniste entre le Ca^{++} et l'AMPc à ce niveau.

b) Arrêt en métaphase II (2ème pause)

Chez les mammifères, dont l'ovocyte est bloqué en métaphase II, c'est la fécondation qui déclenche une augmentation du Ca^{++} qui est le signal de reprise de la méiose. Ce mécanisme est le mieux compris chez la grenouille. L'hypothèse est la suivante : le Ca^{++} active la calmoduline, qui elle-même active la calmoduline kinase II, qui active à son tour la destruction de la cycline et la dégradation de MOS. En effet les inhibiteurs de la calmoduline et de la Cam kinase II empêchent l'effet du Ca^{++} . Inversement, la micro-injection d'une forme constitutionnellement active de la Cam kinase II lève l'arrêt de la méiose en absence de toute augmentation de $[Ca^{++}]$. On doit cependant remarquer qu'il n'a pas été établi de relation directe entre la Cam kinase II et la destruction de la cycline. D'autre part, la quantité de cycline diminue avant la protéine MOS et donc la levée d'inhibition n'est pas symétrique du mécanisme qui établit cet arrêt dans la méiose.