



HAL
open science

Caractérisation du protéome du spermatozoïde humain

Fanny Jumeau

► **To cite this version:**

Fanny Jumeau. Caractérisation du protéome du spermatozoïde humain. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2013. Français. NNT : 2013LIL2S045 . tel-01144470

HAL Id: tel-01144470

<https://theses.hal.science/tel-01144470>

Submitted on 21 Apr 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITÉ LILLE - NORD DE FRANCE
UNIVERSITÉ DROIT ET SANTÉ DE LILLE 2**

École Doctorale Biologie-Santé (ED446)

THÈSE

**Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE 2
Spécialité : Biologie du Développement et de la Reproduction**

Présentée par

Fanny JUMEAU

**CARACTERISATION DU PROTEOME DU SPERMATOZOÏDE
HUMAIN**

Soutenue publiquement le 16 Septembre 2013 devant le Jury composé de :

Mme le Pr. Anne DUITTOZ	Rapporteur
Mme le Pr. Sylviane HENNEBICQ-REIG	Rapporteur
M. le Dr. Charles PINEAU	Examineur
Mme le Pr. Nathalie RIVES	Examineur
Mme le Dr. Valérie MITCHELL	Co-directrice de Thèse
M. le Dr. Nicolas SERGEANT	Co-directeur de Thèse

A mes parents,

Remerciements

Aux membres du jury,

Mme le Professeur Sylviane Hennebicq-Reig, je tiens à vous exprimer ma gratitude pour la lecture minutieuse de mon manuscrit et pour vos précieux commentaires.

Mme le Professeur Anne Duittoz, je vous remercie pour le temps que vous avez accordé à l'étude de ce manuscrit et pour vos remarques constructives. Je vous remercie sincèrement pour votre gentillesse depuis mon entrée en master.

Mme le Professeur Nathalie Rives, je vous suis reconnaissante de me faire l'honneur de faire partie de ce jury et pour vos précieux conseils lors de mon dernier comité de thèse. Je suis consciente de l'opportunité que vous m'offrez et j'espère me montrer à la hauteur de votre confiance.

Mr le Docteur Charles Pineau, c'est un honneur de vous compter parmi ce jury. Je vous adresse mes sincères remerciements ainsi qu'à votre équipe pour votre accueil à Rennes. Je vous remercie pour tous les conseils et le soutien que vous m'avez apporté.

J'ai également une pensée pour le Professeur René Habert, présent lors de mes comités de thèse et dont les conseils éclairés nous ont beaucoup aidé.

A Valérie et Nicolas, mes directeurs de thèse,

Je remercie très sincèrement Mme le Docteur Valérie Mitchell de m'avoir encadré et accordé sa confiance pour réaliser ce travail. Votre écoute et votre gentillesse ont été pour moi un vrai réconfort. Merci de m'avoir transmis votre passion et vos connaissances inépuisables sur le testicule et le spermatozoïde.

Je remercie également chaleureusement Mr le Docteur Nicolas Sergeant, co-encadrant de cette thèse, de m'avoir toujours poussée plus loin, pour m'avoir appris à réfléchir comme une scientifique, pour ta rigueur et ton dynamisme. Merci pour ton investissement dans ce projet et pour tout ce que tu m'as appris.

A l'équipe « Alzheimer et Tauopathies »,

Je remercie Mr le Docteur Luc Buée de m'avoir accueilli dans son équipe et donner l'opportunité de présenter mon travail lors des réunions d'équipe.

Je remercie l'ensemble de l'équipe « Alzheimer & Tauopathies », chercheurs, ITA et étudiants d'avoir accueillie avec humour mes spermatozoïdes dans un monde de neurones. Je remercie les « chefs » pour vos conseils lors des réunions d'équipe. Je remercie également les ITA qui m'ont formé aux différentes techniques. Je remercie plus particulièrement le groupe DM : Nicolas, Marie-Laure, Bernard, Suzanna, Claire-Marie, Francisco, Céline, Hélène, Sabiha, Vincent. Merci pour vos encouragements et vos conseils. Un grand merci à la « 2D Team » de m'avoir soutenue quand je n'y croyais plus. Hélène, Sabiha et Francisco, merci à vous ! Une pensée pour les anciens, Olfa, Katia, Sophie et Antoine.

Au laboratoire de Spermiologie,

Je remercie chaleureusement Amélie, Claudine, Hélène, Marie-Claire et Wendy du service de Spermiologie pour m'avoir toujours soutenue dans la bonne humeur. Je remercie de tout cœur Marie-Claire pour m'avoir fait confiance pour les TP. Votre bienveillance et gentillesse ont été un vrai soutien lors de nos nombreuses conversations. Merci pour vos commentaires lors de la relecture de ce manuscrit qui m'ont beaucoup aidé.

Au CHRU de Lille, l'école doctorale Biologie-Santé et l'université de Lille 2,

Je remercie toutes les personnes qui ont contribué à l'attribution de ma bourse de thèse.

A mes professeurs du master « Repro »,

Un grand merci à Mme Duittoz, Mr Vaudin et Mme Pillon, pour m'avoir encouragée durant ces 2 ans. Je garderai un excellent souvenir de tous les bons moments que nous avons passé avec vous.

A Caroline et Julien,

Caroline, merci pour ton soutien et tous tes bons conseils. Je te souhaite beaucoup de belles choses pour la suite, tu es j'en suis sûre, une grande chercheuse. Julien, merci pour ta bonne humeur ! Je te souhaite bon courage pour ta thèse.

A notre « aquarium »,

Audrey et Fatima, je suis très heureuse d'avoir partagé avec vous ces moments de rigolade!

A mes drôles de thésardes,

Céline, ma compatriote des réunions du vendredi matin, tu es pour moi une amie généreuse et entière avec un caractère bien trempé, un sacré petit bout de femme ! L'épiphanie est un jour particulier qui me fait toujours penser à toi et je me souviendrais de ne jamais te faire confiance en ce qui concerne les doses... Marie, sensible et tellement adorable, grâce à toi je parle une nouvelle langue... « je bouine et je pigne parce que potentiellement c'est naze espèce de mauvaise ! ». J'ai également découvert qu'il était possible de se nourrir presque exclusivement de nutella sans se transformer en écureuil... Merci à vous deux d'avoir toujours été là, merci pour tous ces moments, merci pour les soirées « bière, pizza, l'amour est dans le pré », merci, merci, merci ! Je vous souhaite le meilleur pour l'avenir. Hey les filles !!! J'ai plus de réseau et là c'est le drame... mais bon y'a comme une étincelle dans le ciel de ce soir !!! Je ne peux pas ne pas citer notre thésarde expatriée, Marie-Lise... que dire... un anniversaire presque commun, des goûts musicaux exceptionnels, des tops chefs en herbe... bref de vraies « jumelles ».

A mes amis,

Je suis obligée de commencer par l'unique et exceptionnel Guigui rebaptisé « Mr Patate ». Tu as été présent dans les meilleurs moments comme les plus difficiles, merci pour toutes ces années d'amitié.... Je te souhaite beaucoup de bonheur avec cette « bonne vieille Ju ». Juliette, extravertie et entière alors sans tentabluff je te dirais : ne change pas et kiffe ta petite race de chien ! Je te confie mon GuiGui mais n'oublie jamais que « l'homme est un loup pour l'homme et surtout pour la femme »... Simon, je suis toujours aussi fan de ta poésie très particulière. Merci d'être toujours là pour « ta grande ». Amélie, notre aventure à commencer avec Sour'Ilis. Merci pour ton soutien sans faille pendant ces trois ans. Tu es une fille extraordinaire. Je te souhaite tout le bonheur que tu mérites enfin ! Margaux et Alex, que de souvenirs avec vous « à l'baraque ». Maintenant vous construisez votre « bergerie » et j'espère que beaucoup d'autres bons moments nous y attendent. Félicitations pour le « mini-Alex » qui arrive ! Seb, merci pour tous ces moments magiques ! Sans toi, je ne trouve jamais Margot, « Give me everything tonight », les World Apart, les barbies, les chapelles, le carnaval, le coup du permis à l'aéroport, Dikkenek,... Sophie et Jo, je ne peux pas ne pas vous citer ! Je vous souhaite le

meilleur et j'espère que d'autres aventures tchèques nous attendent. Clémence, notre Carrie Bradshaw, merci pour ton amitié et tous ces bons moments sur les bancs de l'ILIS. Coline, ma génialissime Coco, merci pour ton amitié depuis notre rencontre dans ce qui restera « notre couvent » ... Je te souhaite tout le bonheur du monde avec ton Yohann et le bout de chou qui arrive ! Jenna dit « la binomette » et Manue dit « la petite sainte bourreau des coeurs », mes compères du M2 Repro, merci à vous les filles d'être toujours présentes. Une petite dédicace à Marie B, « monkette », bonne chance pour la suite. Une pensée également à Ingrid, Bouts, Anette, Armelle, et Domitille.

A Damien,

Mon Mr Big, tu as été à mes côtés pendant ces trois ans, tu as toujours su me motiver, me donner confiance en moi, calmer mes angoisses et m'encourager, merci pour ta patience et ton soutien.

A ma famille,

Une pensée pour mes grands-parents... J'espère que de là haut vous êtes fiers de moi...

Merci également à la famille Gorski, Chantal et Jacky, les cousins et les petits-cousins !

Ma sœur, Amélie, merci à toi pour ta joie de vivre et pour être une petite sœur aussi exceptionnelle. Londres a révélé ta personnalité and « you are so beautiful » ! J'espère que tu penseras à ta vieille sœur pour des aventures rock'n'rollesques !

Mon frère, Nicolas, baroudeur dans l'âme, j'espère que tu me feras découvrir beaucoup d'autres belles villes. Merci pour ton humour et ton goût douteux pour les cadeaux qui nous ont valu beaucoup de fous rires à la maison.

Enfin, mes parents, je vous serais toujours reconnaissante, sans vous rien n'aurait été possible, merci d'avoir cru parfois plus que moi en mes rêves. Je vous dédie ce travail.

« L'obstination est le chemin de la réussite »

Charlie Chaplin

RESUME

CARACTERISATION DU PROTEOME DU SPERMATOZOÏDE HUMAIN

La spermatogenèse est un processus complexe qui se déroule dans le tube séminifère du testicule. Au cours de ce processus, la cellule germinale entre en méiose puis réalise de profondes transformations cytologiques comme la compaction de la chromatine, la formation de l'acrosome et du flagelle. Les organites cytoplasmiques comme l'appareil de Golgi et le reticulum endoplasmique sont éliminés. Le spermatozoïde est alors une cellule organisée qui ne réalise pas ou peu de synthèse protéique. De plus, à la sortie du testicule, le spermatozoïde n'est pas mobile et incapable de féconder l'ovocyte. C'est par des interactions avec son environnement, l'épididyme et les voies génitales féminines, qu'il acquiert pleinement ces fonctions. Ces interactions se traduisent par des modifications du protéome comme le clivage des protéines ou des modifications post-traductionnelles. Ainsi, l'approche protéomique représente une méthode pertinente pour appréhender la physiologie spermatique. Dans cette étude, le protéome du spermatozoïde humain a été réalisé selon deux approches. L'électrophorèse bidimensionnelle est particulièrement adaptée pour l'étude des modifications post-traductionnelles tandis que le shotgun constitue une technologie puissante en terme de sensibilité et d'identification des protéines. Les analyses bioinformatiques ont permis d'identifier les familles de protéines surexprimées de façon significative au sein du protéome spermatique. Parmi celles-ci, les protéines d'association aux microtubules et de la voie du protéasome ont été sélectionnées. Le profil d'expression de la DCDC2C (famille des protéines à domaines doublecortine) et la culline 3 (E3-ubiquitine-ligase) ont été caractérisés dans le testicule et le spermatozoïde humain. De plus amples investigations sont nécessaires afin de préciser son rôle dans la physiologie spermatique.

Outre la compréhension de processus physiologiques, les outils protéomiques permettent l'identification de nouveaux marqueurs de qualité du spermatozoïde. La caractérisation de la qualité spermatique repose actuellement sur un examen descriptif, le spermogramme-spermocytogramme, qui ne permet pas toujours d'expliquer l'infertilité du couple. Ainsi, l'amélioration des outils diagnostics et de la prise en charge de la fertilité sont les enjeux de la Procréation Médicalement Assistée. Dans ce contexte, nous avons observé le protéome de 161 échantillons de spermes normaux (OMS 2010). L'analyse de ce protéome a permis de définir un index de qualité protéique significativement associé à la mobilité progressive du spermatozoïde. Un kit permettant d'établir la qualité protéique spermatique est en cours de développement.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF THE HUMAN SPERM PROTEOME

Spermatogenesis is a complex process located in seminiferous tubules of the testis. Germ cell underwent meiosis during the process following many cytological modifications such as chromatin compaction, biogenesis of both acrosome and flagellum. Subcellular components like the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum were eliminated. Spermatozoa is then a highly organized cell which realized no or little *de novo* protein synthesis. Spermatozoa is furthermore unable to move and fertilize an oocyte outside of the testis, as it fully becomes functional by interacting with its environment, the epididymis and the female genital tracts. These interactions are translated by modifications of the proteome as proteins cleavage or post-translational modifications. The proteomic approach represents then a relevant method to understand sperm physiology. This study has been conducted using two different approaches. 2D-electrophoresis is especially adapted to post-translational studies while the shotgun approach is a powerful and sensible tool for protein identification. Bioinformatic analyses helped identifying protein families overexpressed in a meaningful way inside the sperm proteome. Microtubules-associated proteins and proteins implied in proteasomal pathways were selected. The expression profiles of DCDC2C (doublecortin containing domain family) and cullin 3 have been characterized in the testis and in the human spermatozoa. Further investigations are necessary in order to define its role in the sperm physiology.

Besides the understanding of physiological processes, proteomic tools allow the identification of new markers of sperm quality. The characterization of sperm quality currently relies on a descriptive test that is not yet capable of explaining the infertility of a couple. Improving the diagnostic tool and management of fertility are the main objectives of reproductive studies. We have therefore observed the

proteome of 161 normal sperm samples (WHO 2010). The proteome analysis defined a sperm protein quality index significantly related to the progressive motility of the sperm. A kit that could help establishing the sperm protein quality index routinely is currently in process.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	13
TABLE DES FIGURES	17
TABLEAUX	18
ABBREVIATIONS	19
PRESENTATION DU MANUSCRIT	20
INTRODUCTION	21
CHAPITRE 1 : LE SPERMATOZOÏDE HUMAIN	22
A. LA SPERMATOGENESE.....	22
I. LE TESTICULE	22
II. DE LA CELLULE SOUCHE AU SPERMATOZOÏDE	23
1. Architecture de l'épithélium séminifère	23
2. Les différentes phases de la spermatogenèse	26
2.1 La phase proliférative	26
2.2 La phase méiotique	26
2.3 La phase de différenciation : la spermiogenèse.....	28
3. La spermiation	29
B. LE SPERMATOZOÏDE.....	30
I. Structure générale du spermatozoïde	30
II. LA TETE DU SPERMATOZOÏDE.....	32
1. L'acrosome.....	32
2. Le noyau.....	33
2.1 La compaction de la chromatine.....	33
2.2 Le noyau : une réserve d'ARN.....	34
III. LE FLAGELLE	35
1. L'hélice mitochondriale.....	35
2. L'axonème	37
3. Les fibres denses	39
4. La gaine fibreuse	39
C. LA MATURATION DU SPERMATOZOÏDE	40
I. L'EPIDIDYME	40
1. Description de l'épididyme.....	40
2. Le fluide épидидymaire.....	41

2.1	L'homéostasie ionique	41
2.2	Les protéines du fluide épидидymaire	43
II.	LES MODIFICATIONS BIOCHIMIQUES LIEES A LA MATURATION EPIDIDYMAIRE.....	43
1.	La composition lipidique de la membrane plasmique.....	43
2.	Les facteurs décapacitants et de liaison à la zone pellucide	44
3.	Les modifications post-traductionnelles	44
4.	L'acquisition de la mobilité.....	45
III.	LA CAPACITATION	46
	CHAPITRE 2 : L'EXPLORATION DE LA FERTILITE MASCULINE	48
I.	L'EJACULAT : UN LIQUIDE BIOLOGIQUE COMPLEXE	48
1.	Les glandes annexes	49
1.1	Les vésicules séminales	49
1.2	La prostate	50
1.3	Les glandes de Littré et de Cowper	50
2.	La liquéfaction du sperme.....	50
II.	L'ANALYSE DU SPERME	51
1.	Le spermogramme	51
2.	Le spermocytogramme.....	53
III.	LA SELECTION DES SPERMATOZOÏDES	56
IV.	LES CRITERES DE QUALITE DU SPERMATOZOÏDE	60
1.	Les critères de L'OMS.....	60
2.	La prise en compte du spermogramme – spermocytogramme dans la prise en charge du couple en Procréation Médicalement Assistée	60
3.	La prise en compte de la qualité des spermatozoïdes sélectionnés dans la prise en charge du couple en Procréation Médicalement Assistée.....	61
	CHAPITRE 3 : LE SPERMATOZOÏDE ET LA PROTEOMIQUE	62
I.	L'APPROCHE PROTEOMIQUE.....	62
1.	Le protéome	62
2.	L'intérêt d'une approche protéomique dans l'étude du spermatozoïde	63
3.	Les stratégies protéomiques.....	63
II.	LA PROTEOMIQUE DE L'EJACULAT	65
2.	L'étude du plasma séminal	65
2.	Le protéome du spermatozoïde.....	68
3.	La recherche de biomarqueurs dans le spermatozoïde humain	70
	OBJECTIFS.....	73

RESULTATS.....	76
ETUDE 1.....	78
LE PROTEOME DU SPERMATOZOIDE HUMAIN REVELE LA DCDC2C, UNE NOUVELLE PROTEINE ASSOCIEE AUX MICROTUBULES	78
ETUDE 2.....	113
LE PROTEOME DU SPERMATOZOIDE HUMAIN REVELE LA CULLINE 3, UNE E3- UBIQUITINE-LIGASE	113
ETUDE 3.....	118
L'INDEX DE QUALITE DU SPERMATOZOIDE (SPQI), UN NOUVEAU MARQUEUR DE QUALITE DU SPERME	118
DISCUSSION.....	153
I. LA PROTEOMIQUE : UN OUTIL POUR COMPRENDRE LA PHYSIOLOGIE SPERMATIQUE	154
1. Le protéome spermatique.....	154
1.1 Stratégies et jeux de données.....	154
1.2 L'analyse <i>Gene Ontology</i>	156
1.3 L'analyse AMEN	156
2. La famille des protéines de liaison aux microtubules.....	157
2.1 La famille des protéines à domaine doublecortine	158
2.2 L'expression de la DCDC2C dans le spermatozoïde et le testicule humain.....	160
2.3 La protéine DCDC2C dans le spermatozoïde et le testicule humain, quel rôle ?	161
2.4 D'autres protéines de la famille des protéines à domaine doublecortine ?.....	161
3. Les protéines impliquées dans la voie du protéasome.....	163
3.1 La voie du protéasome.....	163
3.2 Les phénotypes d'infertilité associés aux ubiquitine-ligases	164
3.3 L'expression de la culline 3 dans le spermatozoïde et le testicule humain	164
3.4 La culline 3 dans le spermatozoïde et le testicule humain, quel rôle ?.....	164
II. LA PROTEOMIQUE : UN OUTIL POUR DEFINIR DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS DE QUALITE DU SPERMATOZOIDE HUMAIN.....	165
1. Le profil protéique des spermatozoïdes humains	165
2. AKAP4 – Hexokinase 1, de nouveaux marqueurs de qualité du spermatozoïde ?	166
2.1 La famille des protéines AKAPs	167
2.2 L'hexokinase 1	168
2.3 Le profil d'expression de l'AKAP4 et de l'hexokinase 1 dans le spermatozoïde humain	169

3. L'index de qualité protéique (SPQI).....	169
4. Vers un test diagnostic ?	170
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	172
BIBLIOGRAPHIE.....	175
ANNEXES	193
CURRICULUM VITAE	194
PUBLICATIONS	197
COMMUNICATIONS ORALES.....	237
COMMUNICATIONS AFFICHEES.....	240

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1 : ORGANISATION DU TESTICULE HUMAIN.....	23
FIGURE 2 : ARCHITECTURE DE L'EPITHELIUM SEMINIFERE.....	25
FIGURE 3 : SCHEMA DE LA MEIOSE.....	27
FIGURE 4 : LA SPERMIOGENESE.....	29
FIGURE 5 : SCHEMA GENERAL DE LA STRUCTURE DU SPERMATOZOÏDE HUMAIN.....	30
FIGURE 6 : OBSERVATION EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DU SPERMATOZOÏDE HUMAIN.....	31
FIGURE 7 : OBSERVATION EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DE LA TETE DU SPERMATOZOÏDE HUMAIN.....	32
FIGURE 8 : OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DES DIFFERENTES PARTIES DU FLAGELLE.....	36
FIGURE 9 : OBSERVATION EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DE L'HELICE MITOCHONDRIALE.....	37
FIGURE 10 : OBSERVATION EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DE L'AXONEME.....	38
FIGURE 11 : SCHEMATISATION DU GLISSEMENT MICROTUBULAIRE PERMETTANT LE MOUVEMENT DU SPERMATOZOÏDE.....	38
FIGURE 12 : COUPE TRANSVERSALE DU FLAGELLE AU NIVEAU DE LA PIECE PRINCIPALE.....	39
FIGURE 13 : L'EPIDIDYME HUMAIN.....	42
FIGURE 14 : L'APPAREIL GENITAL MASCULIN.....	49
FIGURE 15 : UN AGGLUTINAT DE SPERMATOZOÏDES.....	51
FIGURE 16 : EVALUATION DE LA VITALITE SPERMATIQUE PAR LE TEST A L'EOSINE-NIGROSINE.....	52
FIGURE 17 : L'EVALUATION DE LA NUMERATION SPERMATIQUE SUR CELLULE DE COMPTAGE.....	52
FIGURE 18 : SPERMOGRAMME NORMAL.....	53
FIGURE 19 : SPERMOCYTOGRAMME NORMAL SELON LA CLASSIFICATION DE DAVID MODIFIEE.....	56
FIGURE 20 : STRATEGIE EN PROTEOMIQUE DESCRIPTIVE.....	65
FIGURE 21 : LES BIOMARQUEURS PROTEIQUES DE QUALITE DU SPERMATOZOÏDE.....	71
FIGURE 22 : LA FAMILLE DES PROTEINES A DOMAINE DOUBLECORTINE (STRUCTURE).....	158
FIGURE 23 : CARACTERISATION DU PROFIL D'EXPRESSION DE LA DCX DANS LE SPERMATOZOÏDE ET LE TESTICULE HUMAIN.....	162

TABLEAUX

TABLEAU 1 : COMPOSITION DU PLASMA SEMINAL	48
TABLEAU 2 : LES DIFFERENTES ANOMALIES DU SPERMATOZOÏDE SELON LA CLASSIFICATION DE DAVID MODIFIEE.	55
TABLEAU 3 : METHODES DE SELECTION DES SPERMATOZOÏDES.....	59
TABLEAU 4 : LIMITES BASSES DE REFERENCES OMS 2010.....	60
TABLEAU 5 : LES DIFFERENTES ETUDES PROTEOMIQUES DU PLASMA SEMINAL.....	67
TABLEAU 6 : LES DIFFERENTES ETUDES PROTEOMIQUES DU SPERMATOZOÏDE.....	69
TABLEAU 7 LES DIFFERENTES ETUDES PROTEOMIQUES DES COMPARTIMENTS DU SPERMATOZOÏDE.....	70
TABLEAU 8 : LA FAMILLE DES PROTEINES A DOMAINES DOUBLECORTINES (EXPRESSION ET PATHOLOGIES ASSOCIEES).....	159
TABLEAU 9 : LES PROTEINES DE LA FAMILLE AKAPS.....	167

ABBREVIATIONS

- 1DE : électrophorèse monodimensionnelle
- 2DE : électrophorèse bidimensionnelle
- 2DE-DIGE : électrophorèse bidimensionnelle associée à un marquage différentiel (differential in gel electrophoresis)
- ADN : acide désoxyribonucléique
- ARN : acide ribonucléique
- AKAP : A-kinase anchor protein
- AMPc : adénosine monophosphate cyclique
- ATP : adénosine triphosphate
- DCDC2A : doublecortin containing domain 2A
- DCDC2B : doublecortin containing domain 2B
- DCDC2C : doublecortin containing domain 2C
- DCLK : doublecortin « like » kinase
- DCX : doublecortine
- FIV : fécondation *in vitro*
- GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
- GTP : guanosine triphosphate
- HK1 : hexokinase 1
- HSP : heat shock protein
- ICSI : intra-cytoplasmic sperm injection
- IUI : insémination intra-utérine
- LC-MS-MS : liquid chromatography – mass spectrometry
- MALDI-TOF : source d'ionisation par désorption laser assistée par une matrice – analyseur temps de vol
- OMS : organisation mondiale de la santé
- pI : point isoélectrique
- PKA : protéine kinase A
- PMA : procréation médicalement assistée
- PSA : antigène prostatique spécifique

PRESENTATION DU MANUSCRIT

L'objectif général de ce travail de thèse était la caractérisation du protéome spermatique humain afin de mieux appréhender la physiologie spermatique et de définir de nouveaux marqueurs de qualité du spermatozoïde.

La première partie de ce manuscrit, l'introduction, reprend les notions fondamentales utiles à la compréhension de mon travail.

Les objectifs puis les résultats seront présentés sous forme de manuscrit en préparation pour publication.

La discussion générale reprendra les différents points abordés au cours de ce travail de thèse.

Le manuscrit se terminera par une conclusion et les perspectives à ce projet.

Enfin, les annexes contiennent les contributions scientifiques réalisées.

Introduction

CHAPITRE 1 : LE SPERMATOZOÏDE HUMAIN

La spermatogenèse est un processus finement régulé aboutissant à la production du gamète mâle : le spermatozoïde. Toutefois, à la sortie du testicule, le spermatozoïde n'est pas mobile et est incapable de féconder un ovocyte. Ces fonctions sont acquises au cours de sa maturation dans l'épididyme et les voies génitales féminines. Dans la 1^{ère} partie de ce chapitre, nous ferons une revue générale de la spermatogenèse. Nous détaillerons, dans une 2^{ème} partie, la structure du spermatozoïde. Enfin, dans une 3^{ème} partie, les modifications fonctionnelles et biochimiques liées à la maturation du spermatozoïde seront exposées.

A. LA SPERMATOGENESE

I. LE TESTICULE

Le testicule est une glande amphicrine dont la composante exocrine a pour but la production du gamète mâle et la partie endocrine, la synthèse des hormones masculines. Le testicule présente une forme ovale et mesure 4 à 5 cm de hauteur pour un diamètre de 3 cm (Figure 1). Il est maintenu dans le scrotum par le muscle crémaster. Cette position extracorporelle permet de maintenir une température de 34°C optimale pour la spermatogenèse. Le complexe pampiniforme, dérivé de l'artère testiculaire, chemine dans le cordon spermatique et assure la thermorégulation. La capsule conjonctive, l'albuginée, recouvrant le testicule s'invagine et définit 200 à 300 lobules par testicule. Chaque lobule comprend 3 à 4 tubes séminifères d'une longueur de 50 cm et un diamètre de 150 µm. Ces tubes contournés possèdent une extrémité borgne et se jettent dans le *rete testis*, puis dans les cônes efférents (10 à 12 par testicule) avant de rejoindre l'épididyme. L'épithélium des tubes séminifères est le siège de la spermatogenèse avec les cellules de la lignée germinale et la cellule de Sertoli. Chaque tube est entouré d'une paroi, la *tunica propria*, composée de cellules myoépithéliales. Sous l'effet de l'ocytocine

et de la vasopressine, les cellules myoépithéliales assurent l'expulsion des spermatozoïdes vers l'épididyme. Outre les capillaires sanguins et le tissu conjonctif lâche, le tissu interstitiel, situé entre les tubes séminifères, contient les cellules de Leydig, sécrétrices de la testostérone.

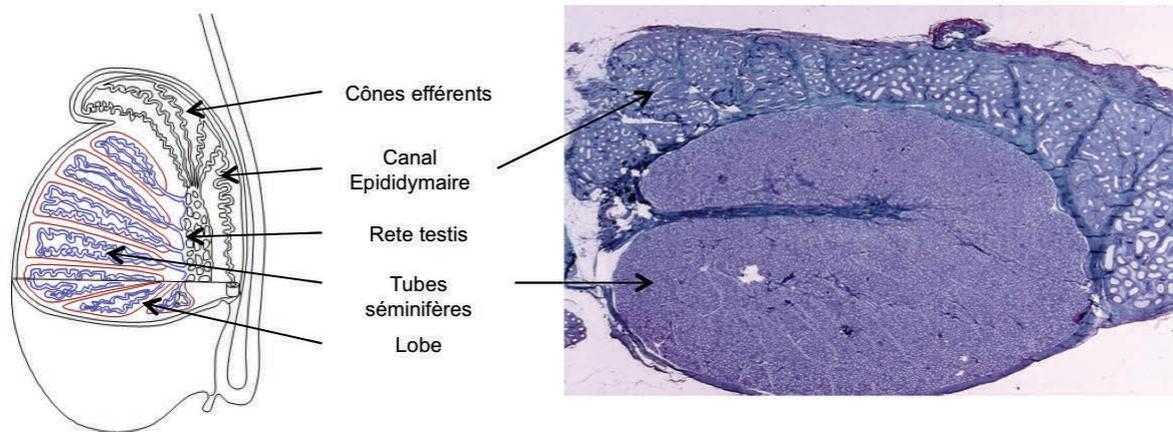


Figure 1 : Organisation du testicule humain.

Le testicule est organisé en lobes contenant les tubes séminifères, siège de la spermatogenèse. Il s'agit de tubes contournés qui se jettent dans le *rete testis*, les cônes efférents puis le canal épididymaire.

(schéma du testicule : Alain Gallien, intellingo.fr ; Coupe de testicule humain : avec l'autorisation du Laboratoire d'Histologie – Faculté de médecine – Lille)

II. DE LA CELLULE SOUCHE AU SPERMATOZOÏDE

La spermatogenèse se déroule dans l'épithélium du tube séminifère et a pour but la production des gamètes mâles à partir des cellules souches, les spermatogonies.

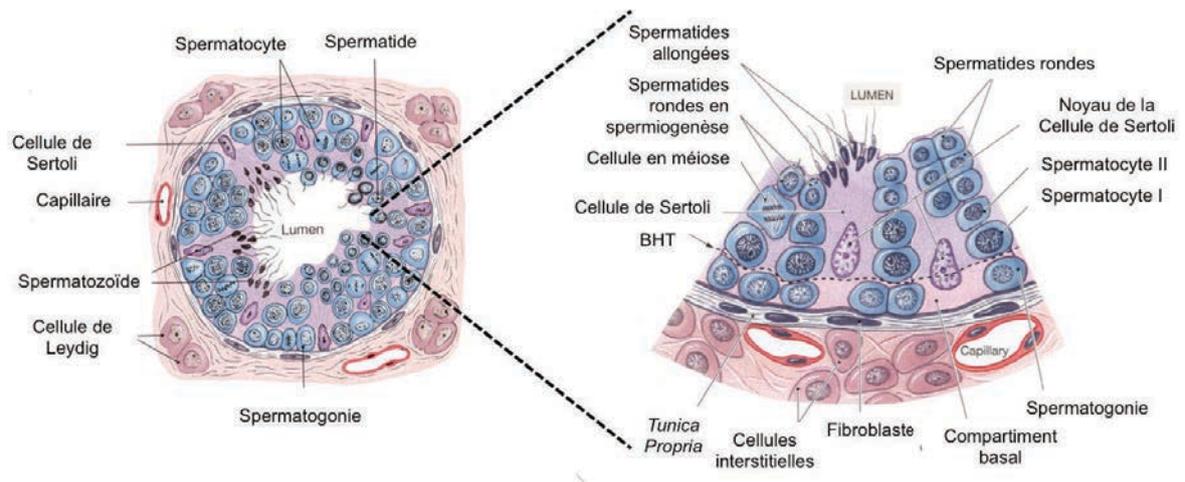
1. Architecture de l'épithélium séminifère

La lignée germinale regroupe plusieurs types de cellules correspondant à différents stades de la spermatogenèse (Figure 2). La différenciation se déroule depuis la basale du tube séminifère où se situent les formes immatures des cellules de la lignée germinale, jusqu'à la lumière du tube, contenant les formes les plus matures. Les spermatogonies se

situent en périphérie du tube séminifère contre *la tunica propria*. Elles sont de forme ovoïde et mesurent environ 10µm. On distingue les spermatogonies A de type « sombre » (Ad) et de type « poussiéreuse » (Ap); et les spermatogonies B de type « croûteuse ». Entre le stade spermatogonie et spermatocyte I, la barrière hémato-testiculaire se met en place et marque le compartiment basal et adluminal. Cette barrière permet de créer un environnement où les cellules germinales méiotiques seront isolées des agents exogènes pouvant induire des anomalies de méiose. Le spermatocyte I est la cellule la plus volumineuse de la lignée germinale avec une chromatine filamenteuse (15 µm). Le spermatocyte II a une durée de vie de quelques heures. Histologiquement, le spermatocyte II apparaît deux fois plus petit que le spermatocyte I et présente une chromatine finement granuleuse. La spermatide ronde est une cellule sphérique de petite taille (8-10 µm). Cette cellule subit des transformations cytologiques majeures durant la spermiogenèse. Son noyau est rond et devient peu à peu condensé, ce qui la rend facilement différenciable du spermatocyte II. Progressivement, la spermatide ronde se modifie pour devenir la spermatide allongée, cellule précurseur du spermatozoïde.

Entre les cellules de la lignée germinale, la cellule de Sertoli garantit la structure du tube séminifère (Figure 2). On compte environ 30 à 50 cellules germinales pour une cellule de Sertoli (Mruk et Cheng 2004). Cette cellule fut décrite pour la 1^{ère} fois par Enrico Sertoli en 1865 comme une cellule « ramifiée ». Elle présente une grande taille et occupe toute la hauteur de l'épithélium du tube séminifère. Son noyau triangulaire possède un nucléole et son cytoplasme s'insinue entre les cellules germinales ce qui le rend difficilement observable en microscopie classique. La cellule de Sertoli est en contact avec toutes les cellules de la lignée germinale afin d'assurer ses différents rôles : stimuler la spermatogenèse, échanger des facteurs, nourricier (glucose et lactate), assurer l'étanchéité de la barrière hémato-testiculaire et phagocyter les corps résiduels (Mruk et Cheng 2004; Alves et al. 2013). La cellule de Sertoli joue un rôle fondamental dans le contrôle de la spermatogenèse. En effet, à l'encontre des cellules germinales, elle possède des récepteurs aux androgènes. Elle stimule et module la spermatogenèse par l'intermédiaire de différents facteurs (Griswold 1995).

A



B

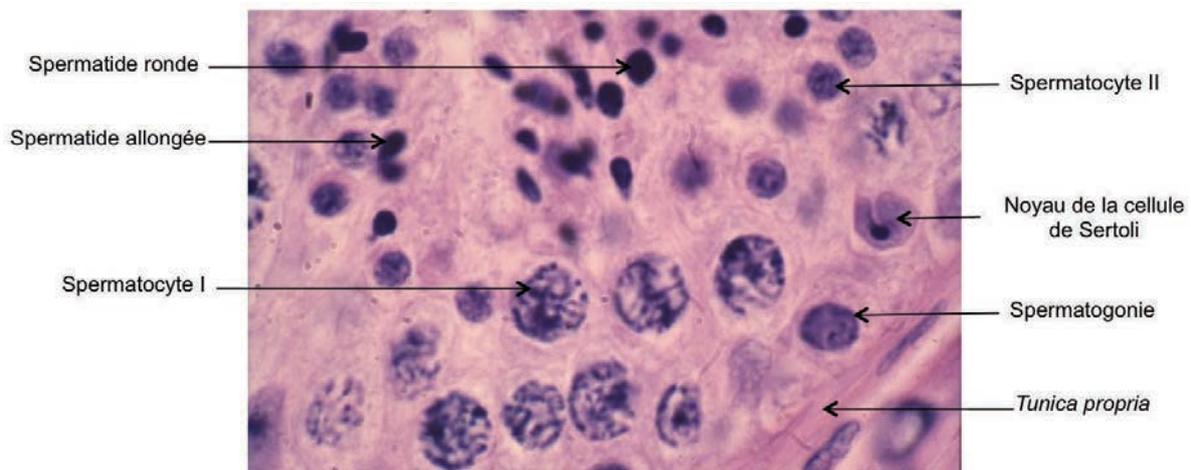


Figure 2 : Architecture de l'épithélium séminifère.

(A) Le tube séminifère est entouré d'un tissu conjonctif contenant des fibroblastes, des cellules interstitielles, des cellules de Leydig et des capillaires sanguins.

(vue générale du tube séminifère lookfordiagnosis.com ; l'épithélium du tube séminifère os1.amc.nl)

(A-B) Dans le tube séminifère, les spermatogonies se localisent dans le compartiment basal et sont en contact avec la *tunica propria*. Les spermatocytes I sont les cellules les plus volumineuses. L'entrée en méiose marque le compartiment adluminal délimité par la barrière hémato-testiculaire (BHT). Les spermatocytes II sont deux fois plus petits en comparaison avec les spermatocytes I. La spermatozoïde ronde puis allongée présente un noyau condensé. Le noyau de la cellule de Sertoli possède un nucléole.

(B : Avec l'autorisation du Laboratoire d'Histologie – Faculté de médecine – Lille)

2. Les différentes phases de la spermatogenèse

La spermatogenèse démarre à la puberté sous l'effet des hormones gonadotropes (GnRH-LH-FSH) et des androgènes (testostérone). Elle dure 74 jours chez l'homme adulte et se divise en 3 phases : proliférative, méiotique et de différenciation.

2.1 La phase proliférative

Sous l'effet des hormones gonadotropes, la spermatogonie de type Ad se multiplie par division hémiplastique pour donner une spermatogonie de type Ad, assurant le renouvellement du stock, et une spermatogonie de type Ap. Cette dernière se divise de façon hétéroplastique pour donner deux spermatogonies de type B. Celles-ci deviennent des spermatocytes I compétents pour entrer en méiose. Cette phase proliférative dure 16 jours. Les ponts cytoplasmiques existant entre la cellule mère et la cellule fille persistent tout le long de la spermatogenèse. Les cellules germinales évoluent alors en lignées synchrones et issues du même clone.

2.2 La phase méiotique

La méiose est un processus propre à la gamétogenèse (Figure 3). L'appariement des chromosomes homologues marque le début de la méiose (prophase) et est caractéristique du stade leptotène. Le stade zygotène voit se mettre en place le complexe synaptonémal. Les échanges de portions chromosomiques ou *crossing-over* sont associés au stade pachytène. Au stade diplotène, le complexe synaptonémal se dissocie. Le stade diacinèse marque la fin de la prophase I de méiose. Les chromosomes se placent sur le fuseau méiotique. Cette prophase dure 22 jours sur les 24 jours que dure la 1^{ère} phase de méiose chez l'homme et est caractéristique du spermatocyte I (diploïde). La métaphase I voit la plaque équatoriale se mettre en place. Pendant l'anaphase, les chromosomes migrent le long du fuseau. Les deux lots de chromosomes entourés de leurs enveloppes nucléaires sont constitués pendant l'anaphase I. La 1^{ère} division de méiose dite « équationnelle » conduit à la production de deux cellules filles, les spermatocytes II. Le spermatocyte II est une cellule haploïde dont la durée de vie n'est que de quelques

heures. Ces derniers possèdent 23 chromosomes dupliqués et abordent rapidement la 2^{ème} division de méiose dite « réductionnelle » qui aboutit à la production de 2 spermatides rondes (haploïde).

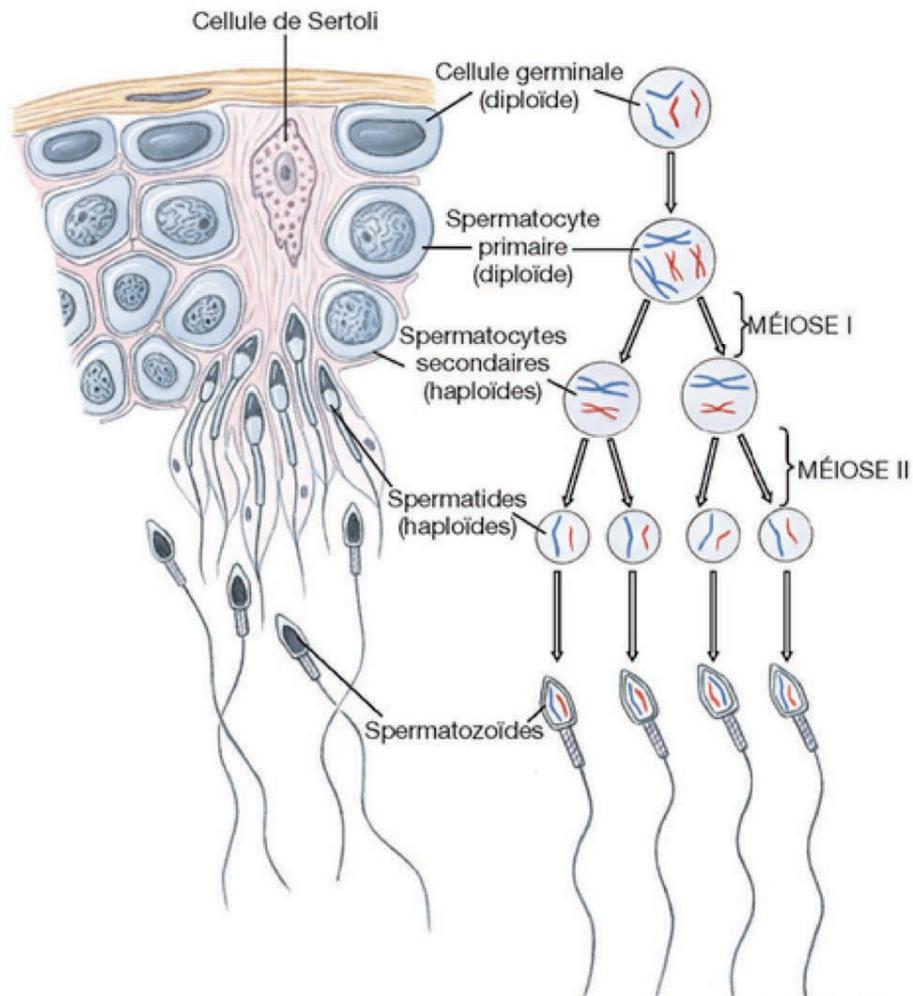


Figure 3 : Schéma de la méiose.

De Boeck Université 2007

2.3 La phase de différenciation : la spermiogenèse

Suite à la deuxième division méiotique, le spermatocyte II devient une spermatide ronde et entame progressivement sa différenciation pour devenir une spermatide allongée. Cette phase de différenciation cellulaire, appelée spermiogenèse, dure 23 jours et induit des changements cytologiques profonds (Figure 4). Elle comporte plusieurs phases :

- *L'hypercompaction de la chromatine* : la chromatine se condense progressivement et le noyau apparaît compact. Les histones sont partiellement remplacées par des protéines de transition puis par des nucléoprotéines, les protamines. Ces dernières présentent de nombreux ponts disulfures permettant une condensation importante de la chromatine. Les protamines existent sous deux isoformes : P1 et P2 dont le ratio est constant. Un déséquilibre de ce ratio entraîne un défaut de condensation de la chromatine associé à un taux de fécondation plus faible (De Mateo et al. 2009; 2010).

- *La formation de l'acrosome* : l'acrosome est formé par la fusion des vésicules golgiennes. Il contient des enzymes qui seront libérées lors de la fécondation. Parmi elles, les enzymes hydrolytiques digéreront les différentes enveloppes de l'ovocyte lors de la fécondation (hyaluronidase, proacrosine). Elles seront activées lors de la capacitation puis la réaction acrosomique (Moreno et Alvarado 2006; Valbuena et al. 2008; Berruti et Paiardi 2011).

- *La formation du flagelle* : le flagelle est élaboré à partir du centriole distal à la partie postérieure de la tête. Le réseau microtubulaire est composé de 9 doublets de microtubules et d'un doublet central. Ces microtubules sont associés à des bras de dynéine dont l'activité module le mouvement spermatique. Des les pièces intermédiaire et principale, les fibres denses recouvrent l'axonème. Dans la pièce principale, la gaine fibreuse entourent les microtubules et régule la mobilité spermatique (Lie et al. 2010; Konno et al. 2012; Sperry et al. 2012).

- *La formation de la manchette mitochondriale* : dans la pièce intermédiaire, les mitochondries s'organisent en hélice autour du réseau microtubulaire.

- *L'élimination du reste cytoplasmique* : les organites cellulaires à l'exception des mitochondries sont éliminés dans une vésicule appelée « corps résiduel » qui sera phagocytée par la cellule de Sertoli.

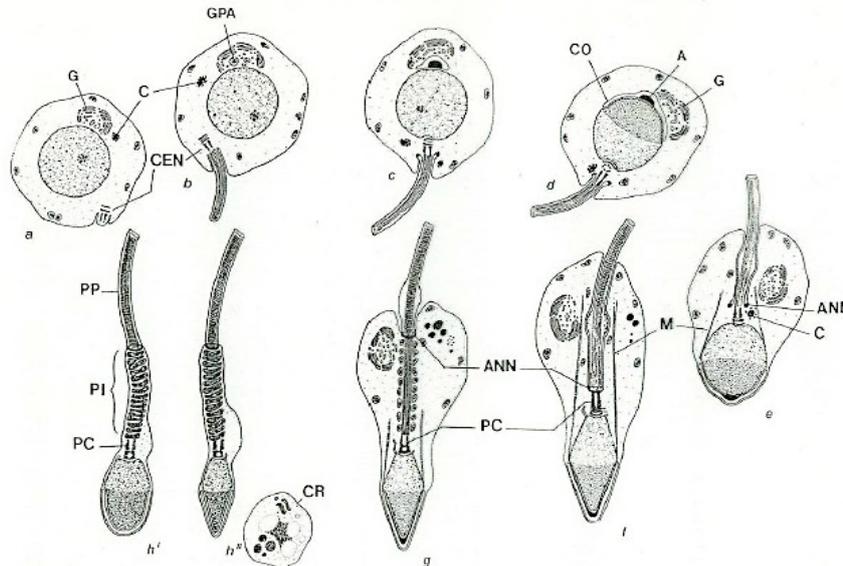


Figure 4 : La spermiogenèse.

G : appareil de Golgi, C : corps chromatoïdes, CEN : centriole, GPA : granule post-acrosomique, CO : coiffe, A : acrosome, ANN : anneau, PC : pièce connectrice, PI : pièce intermédiaire, PP : pièce principale, CR : corps résiduel.

D'après Mauvais-Jarvis, médecine de la reproduction masculine, édition Flammarion médecine/sciences.

3. La spermiation

La spermiation est le processus par lequel la spermatide allongée quitte l'épithélium séminifère. Le corps résiduel est phagocyté par la cellule de Sertoli et les jonctions cellule de Sertoli - spermatides allongées sont peu à peu éliminées. Le cytoplasme de la cellule de Sertoli se rétracte libérant alors le spermatozoïde immature dans le fluide testiculaire. Ce processus est sous le contrôle de l'hormone folliculostimulante (FSH) et de la testostérone (Saito et al. 2000; Beardsley 2002; O'Donnell et al. 2011).

B. LE SPERMATOZOÏDE

I. Structure générale du spermatozoïde

Le spermatozoïde humain est une cellule hautement spécialisée. Le spermatozoïde se compose d'une tête et d'un flagelle (Figures 5 et 6). La tête se divise en deux parties : l'acrosome, vésicule fondamentale à la fécondation et le noyau dont la chromatine est hypercompactée. Le flagelle, moteur de la mobilité, comporte 3 parties : les pièces intermédiaire, principale et terminale. La pièce connectrice fait le lien entre la tête et l'axonème, présent sur toute la longueur du flagelle. Dans les pièces intermédiaire et principale, les fibres denses entourent l'axonème. La pièce intermédiaire comprend l'hélice mitochondriale. Dans la pièce principale, l'axonème est recouvert d'une gaine fibreuse. Le cytosquelette se désorganise progressivement dans la pièce terminale.

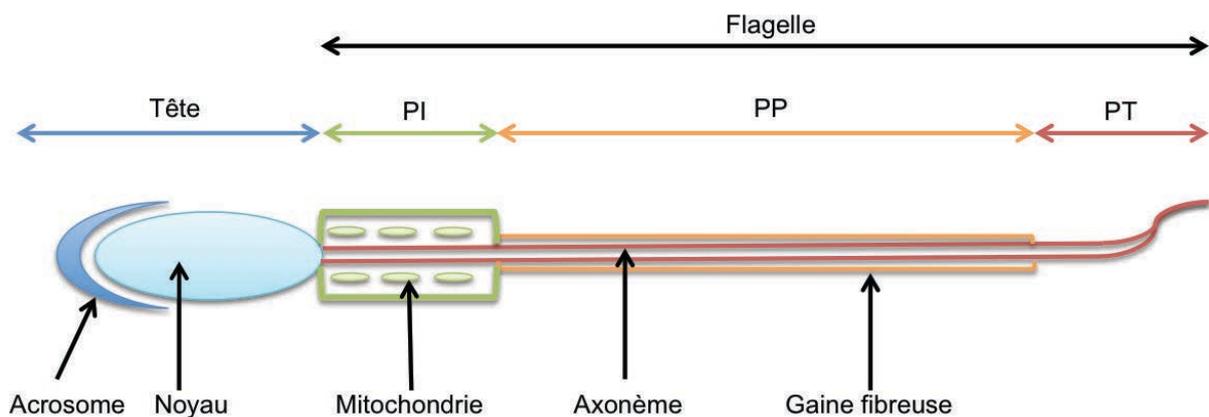


Figure 5 : Schéma général de la structure du spermatozoïde humain.

La tête se compose de l'acrosome et du noyau. Le flagelle se divise en 3 parties : les pièces intermédiaire (PI), principale (PP) et terminale (PT).

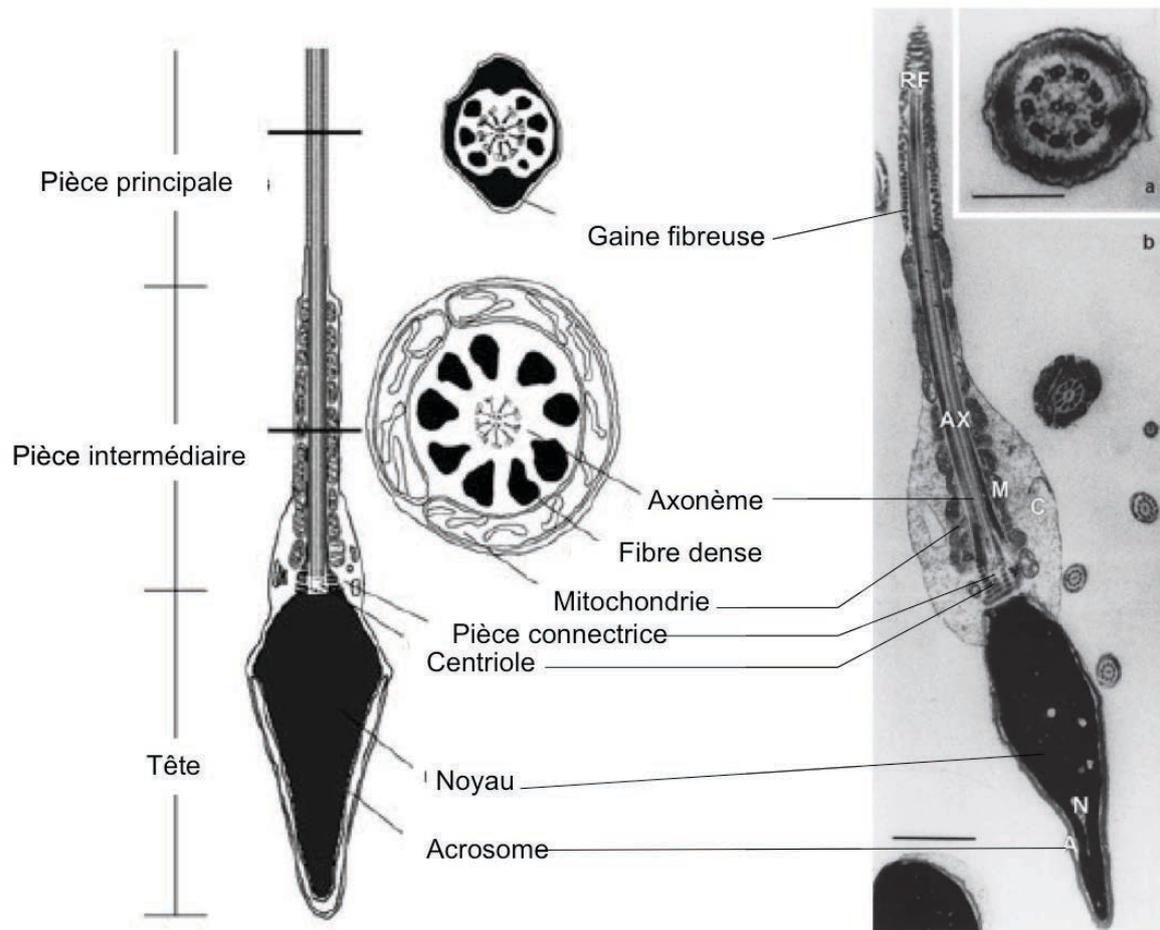


Figure 6 : Observation en microscopie électronique du spermatozoïde humain.

A : acrosome ; N : noyau ; C : cytoplasme ; M : mitochondrie ; Ax : Axonème ; RF : gaine fibreuse

D'après (Nieschlag et al. 2010; Inaba 2011)

II. LA TÊTE DU SPERMATOZOÏDE

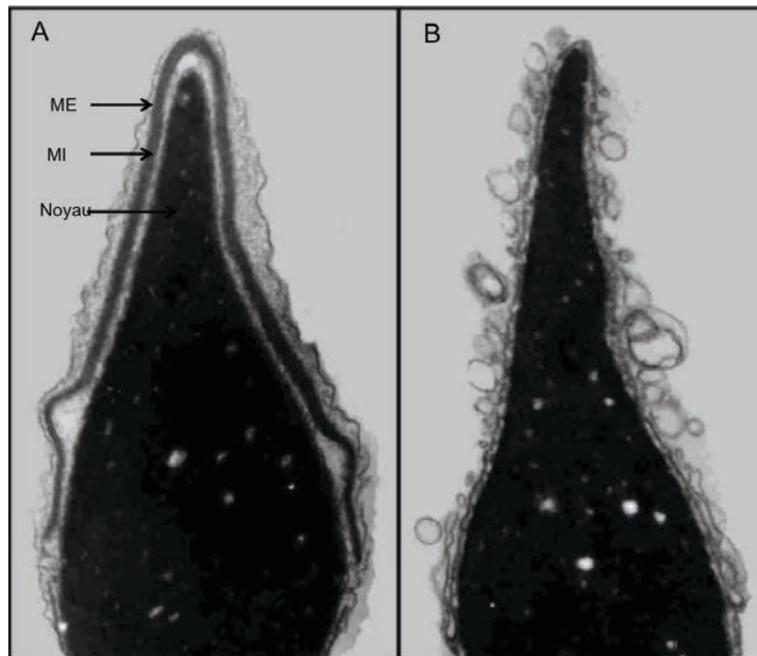


Figure 7 : Observation en microscopie électronique de la tête du spermatozoïde humain.

(A) le spermatozoïde n'a pas réalisé sa réaction acrosomique. On distingue la membrane externe (ME) et interne (MI) de l'acrosome. La chromatine est hyper condensée.

(B) le spermatozoïde réalise sa réaction acrosomique. La ME est vacuolisée, le contenu hydrolytique libéré et la MI exposée à la zone pellucide de l'ovocyte.

D'après (Blas et al. 2005).

1. L'acrosome

L'acrosome est une vésicule d'origine golgienne composée d'enzymes hydrolytiques. La coloration à l'acridine orange témoigne du pH acide intra-acrosomal (Abou-Haila et Tulsiani 2000; Moreno et Alvarado 2006). Après la remontée des voies génitales féminines, le spermatozoïde traverse les cellules du cumulus qui entourent l'ovocyte. Il se lie à la zone pellucide via la glycoprotéine ZP3. Ce phénomène appelé « réaction acrosomique » induit la rupture de la membrane externe de l'acrosome. Cette rupture est médiée par les SNAREs (soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment

protein receptor) (Blas et al. 2005). Le contenu enzymatique hydrolytique de l'acrosome est libéré et digère la zone pellucide de l'ovocyte. La membrane interne ainsi exposée comporte les récepteurs, ligands et enzymes qui permettent la fusion des gamètes mâle et femelle. Parmi les enzymes acrosomales, la proacrosine et la hyaluronidase restent aujourd'hui les mieux caractérisées. La proacrosine est la forme inactive de l'acrosine obtenue après de multiples clivages (Zahn et al. 2002). L'acrosine est une « trypsin-like » endoprotéase dont l'activité est la protéolyse de la zone pellucide de l'ovocyte (Klemm et al. 1991; Oh-Oka et al. 2001; Ferrer et al. 2012). Les hyaluronidases sont une famille d'enzymes impliquées dans la rupture des ponts d'acide hyaluronique existant au niveau du cumulus et de la zone pellucide de l'ovocyte (Kim et al. 2008; Martin-DeLeon 2011).

2. Le noyau

2.1 La compaction de la chromatine

Au cours de la spermiogenèse, le génome haploïde du spermatozoïde est empaqueté dans le nucléosome (5-15%) et le complexe de nucléoprotamines (85-95%). Le nucléosome est un complexe constitué d'histones présent dans toutes les cellules somatiques. Une isoforme H2B (Histone 2B) spécifique au testicule a toutefois été décrite dans le spermatozoïde (Zalensky 2002). A la fin de la méiose, une vague d'acétylation entraîne le recrutement de protéines de transition, l'incorporation des variants testiculaires des histones, une modification des marques épigénétiques et enfin les protamines (Oliva et Castillo 2011). Le complexe de nucléoprotamines a été observé uniquement dans le spermatozoïde. Il se compose de deux protamines P1 et P2. La forme P2 est spécifique des spermatozoïdes humain, murin et équin. Ces petites protéines (environ 17 kDa) aux pH basiques ($pI > 11$) neutralisent les charges négatives de l'ADN ce qui permet une hypercompaction de la chromatine. Le ratio P1/P2 est constant. Le déséquilibre du ratio entraîne une anomalie de la condensation de la chromatine, un défaut morphologique de la tête du spermatozoïde et un arrêt du développement embryonnaire. La compaction de la chromatine induit une répression presque complète de la transcription dans le spermatozoïde. Cette compaction a pour

objectif de protéger le génome paternel en le rendant inaccessible aux nucléases (Wykes et al. 2003; Rousseaux et al. 2004; Oliva 2006; De Mateo et al. 2009; Johnson et al. 2010; Oliva et Castillo 2011).

2.2 Le noyau : une réserve d'ARN

Il est maintenant établi que le spermatozoïde contient un pool d'ARNm qui ne sont pas ou peu traduits, et de petits ARN non codants comme les miARN et les PIWI (Thomson et Lin 2009; Hamatani 2012; Romero et al. 2012; Sandler et al. 2013). En effet, des expériences d'incorporation d'uridine radiomarquée n'ont pas démontré d'activité transcriptionnelle dans le spermatozoïde éjaculé (Grunewald et al. 2005). De plus, le spermatozoïde est dépourvu des sous-unités 28S et 18S fondamentales pour la mise en place du ribosome (Cappallo-Obermann et al. 2011). Ces données suggèrent qu'il n'existe pas d'activité traductionnelles dans le spermatozoïde. Toutefois, ces affirmations sont peu à peu remises en cause et les avancées de la protéomique ont permis de mettre en évidence la présence de protéines ribosomales (De Mateo et al. 2011). Ces données récentes supposent la possibilité d'une activité traductionnelle probablement restreinte dans le spermatozoïde. Enfin, comme dans les cellules somatiques, la transcription n'est pas à exclure dans les mitochondries (Gur et Breitbart 2008).

Cependant, d'autres hypothèses considèrent plutôt le spermatozoïde comme une réserve d'ARN délivrée à l'ovocyte au moment de la fécondation pour les premières heures de vie du zygote (Barroso et al. 2009; Galeraud-Denis et al. 2010; Kumar et al. 2013). Des équipes proposent aujourd'hui le séquençage de ce pool d'ARN qui constituerait un nouveau marqueur de qualité du spermatozoïde (Hamatani 2011; Li et Zhou 2012). Néanmoins, les études préliminaires n'ont pas permis d'établir de résultats reproductibles compte tenu de l'hétérogénéité du sperme.

III. LE FLAGELLE

Le flagelle représente le moteur du spermatozoïde (Figure 8). Au centre, l'axonème est présent sur toute la longueur du flagelle. Les fibres denses entourent l'axonème dans les pièces intermédiaire et principale. Les mitochondries sont disposées en hélice autour des fibres denses dans la pièce intermédiaire. La gaine fibreuse recouvre les fibres denses dans la pièce principale. Dans la pièce terminale, l'axonème se désorganise progressivement.

1. L'hélice mitochondriale

Les mitochondries sont disposées en hélice (10 à 15 tours de spires) autour de l'axonème dans la pièce intermédiaire (Figure 9). Cet organe module plusieurs voies métaboliques :

- *la production énergétique* : le glucose pénètre la mitochondrie et gagne deux voies métaboliques génératrices d'ATP, le cycle de l'acide citrique et la phosphorylation oxydative (Piomboni et al. 2012).

- *la voie calcique* : le Ca^{2+} est un modulateur de l'hyperactivation du mouvement flagellaire, de la capacitation et la réaction acrosomique. La mitochondrie est une réserve calcique (Costello et al. 2009).

- *les espèces réactives de l'oxygène* : le stress induit la production d'espèces réactives de l'oxygène conduisant à la peroxydation des lipides membranaires. Ce phénomène réduit la fluidité membranaire et la mobilité spermatique. Le stress oxydant est également inducteur de dommages à l'ADN. Toutefois, le stress oxydant favorise l'induction de la voie AMPc (adénosine monophosphate cyclique) et la phosphorylation des protéines cibles. Ainsi, il existe une balance entre les effets bénéfiques et néfastes du stress oxydant. Cette balance déséquilibrée conduit à une perte de la qualité spermatique (Cocuzza et al. 2007; De Lamirande et O'Flaherty 2008; Aitken 2011).

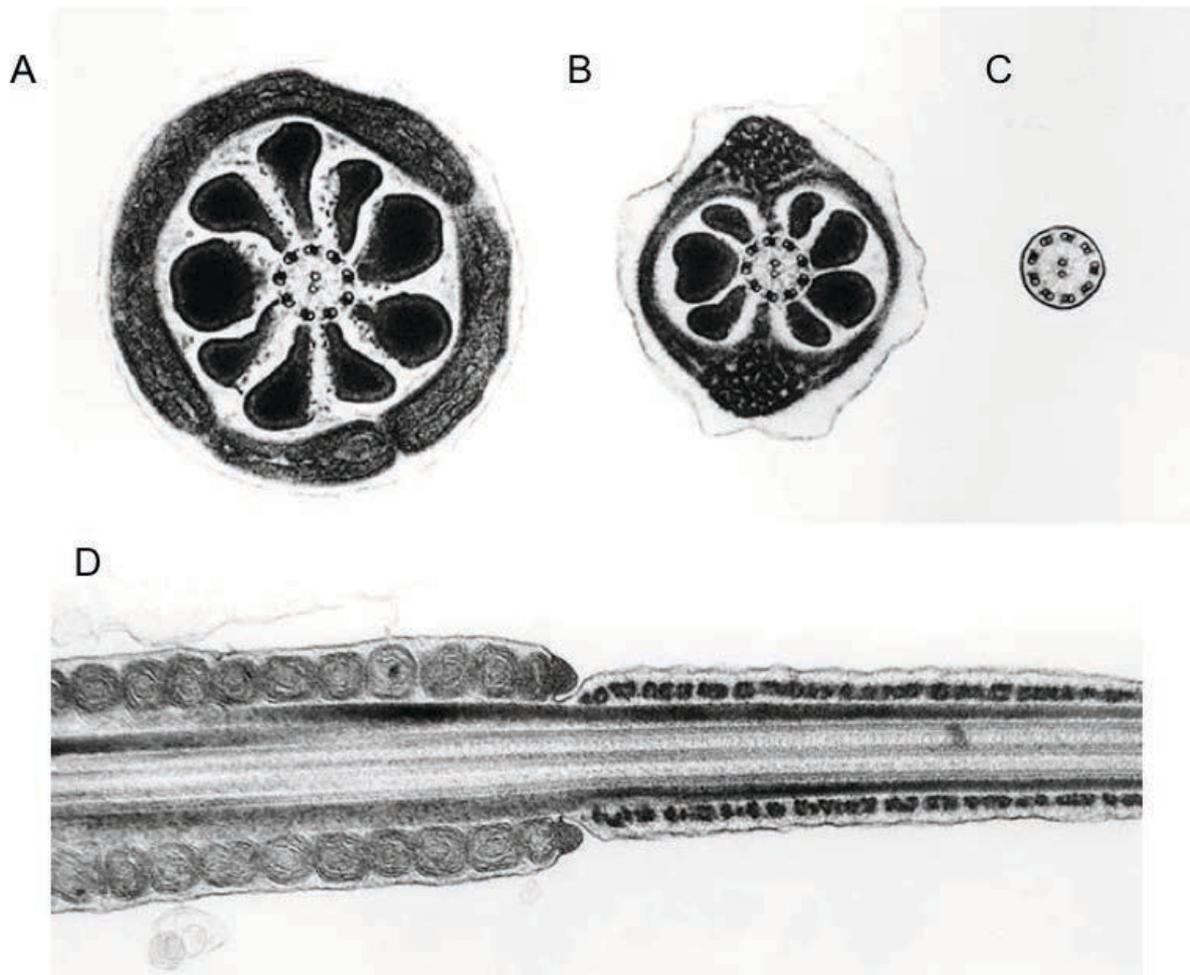


Figure 8 : Observations en microscopie électronique des différentes parties du flagelle.

A-C ; Coupes transversales au niveau de:

(A) la pièce intermédiaire. L'axonème est composé de 9 doublets de microtubules périphériques et un doublet central. Les fibres denses (9) entourent l'axonème. Les mitochondries sont disposées en hélice en périphérie.

(B) la pièce principale. Les fibres denses (7) entourent l'axonème. La gaine fibreuse recouvre les microtubules et les fibres denses.

(C) la pièce terminale. Seul l'axonème persiste.

(D) Coupe longitudinale au niveau de la pièce intermédiaire et la pièce principale. L'axonème est au centre. Les fibres denses apparaissent épaissies et noires de part et d'autre de l'axonème. Dans la pièce intermédiaire, les mitochondries sont alignées autour de l'axonème et des fibres denses. Dans la pièce principale, la gaine fibreuse apparaît discontinue autour de l'axonème et des fibres denses.

D'après Don W. Fawcett, visualphotos.com

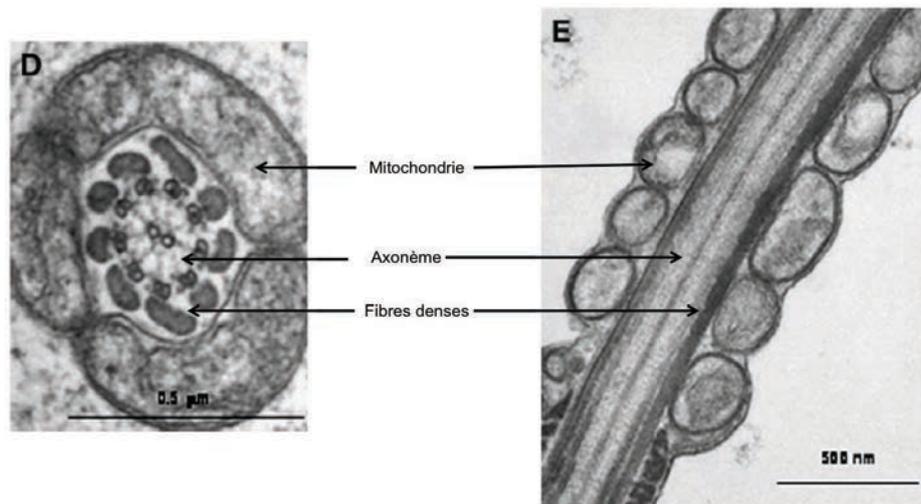


Figure 9 : Observation en microscopie électronique de l'hélice mitochondriale.

Coupe transversale (D) et longitudinale (E).

D'après (Pelliccione et al. 2011).

2. L'axonème

L'axonème présente une conformation 9+2 c'est-à-dire qu'il est composé de 9 doublets périphériques de microtubules et d'un doublet central (Figure 10). Le doublet de microtubules est constitué d'un tubule A (13 protofilaments disposés parallèlement) et d'un tubule B incomplet (10-11 protofilaments) qui lui est accolé. Les protofilaments sont composés d'hétérodimères de α et β -tubuline. Des bras interne et externe de dynéine sont inclus périodiquement au tubule A en fonction de la séquence peptidique (Raff et al. 2008). La phosphorylation de ces bras active leur activité ATPasique (Turner 2006). Les bras de dynéine ne sont pas tous activés en même temps permettant la courbure du flagelle (Figure 11). Les bras de dynéine glisse alors le long des microtubules ce qui induit le mouvement périodique et oscillatoire. La déphosphorylation des bras de dynéine par une voie dépendante de la calmoduline renverse le système. Enfin, les doublets de microtubules sont reliés entre eux par des ponts élastiques de nexine (Konno et al. 2012).

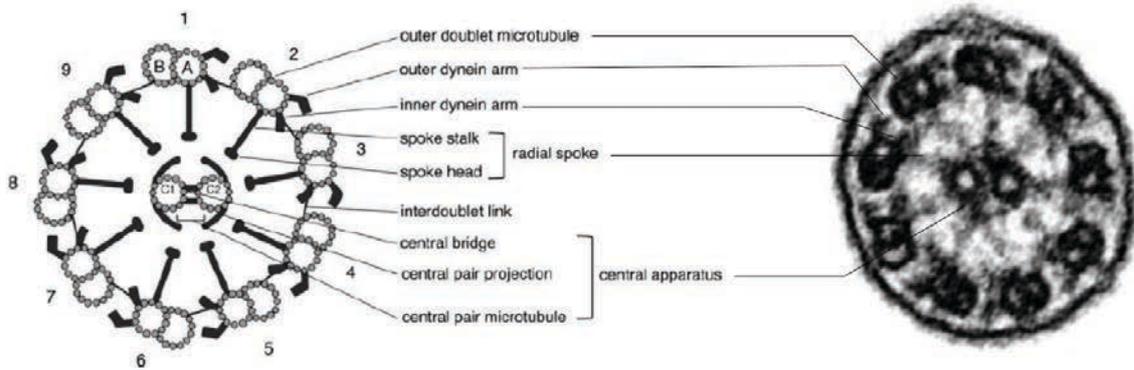


Figure 10 : Observation en microscopie électronique de l'axonème.

L'axonème se compose de 9 doublets de microtubules périphériques et d'un doublet central. Les doublets sont reliés par des ponts de nexine. Les bras de dynéine externe et interne sont attachés aux microtubules A de chaque doublet.

D'après (Inaba 2011; Konno et al. 2012).

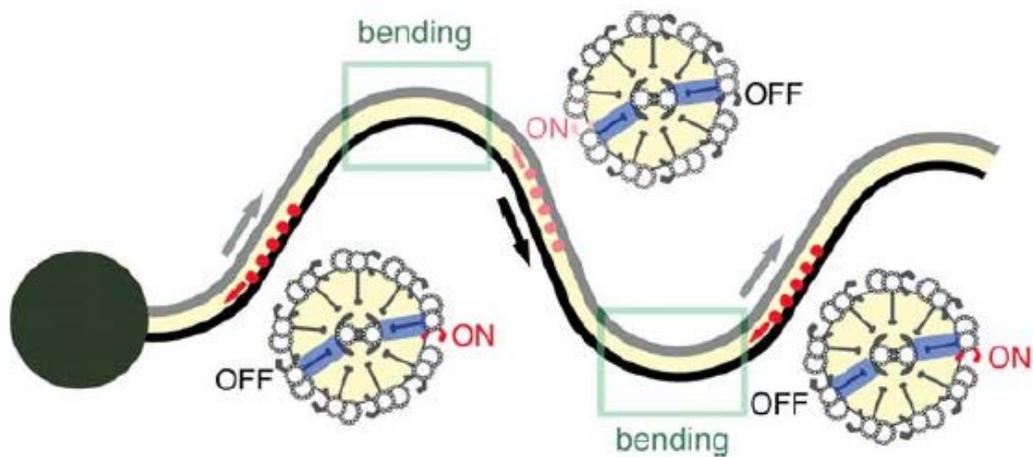


Figure 11 : Schématisation du glissement microtubulaire permettant le mouvement du spermatozoïde.

Les bras de dynéine induisent périodiquement le mouvement des microtubules.

On : le bras de dynéine est activé

Off : le bras de dynéine n'est pas activé

Bending : courbure

D'après (Inaba 2011)

3. Les fibres denses

Les fibres denses (ODF, outer dense fiber) assurent la connexion entre l'axonème et la pièce connectrice du centriole. Ces fibres recouvrent ensuite l'axonème sur toute sa longueur dans les pièces intermédiaire et principale. On dénombre 9 fibres denses dans la pièce intermédiaire et 7 dans la pièce principale (Figure 12). Ces fibres constituent une structure élastique qui protège l'axonème lors de son transit dans les voies génitales masculines et féminines (Shao et al. 1998; Petersen et al. 1999; Yang et al. 2011). Ce rôle protecteur vis à vis du stress place les fibres denses comme la 10^{ème} famille de protéines liées au stress (Fontaine et al. 2003). Quatre types de fibres denses différentes sont recensées et ne sont pas encore totalement caractérisées aujourd'hui.

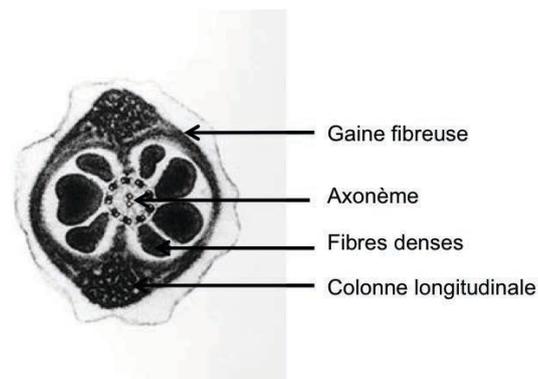


Figure 12 : Coupe transversale du flagelle au niveau de la pièce principale.

D'après Don W. Fawcett, visualphotos.com

4. La gaine fibreuse

La gaine fibreuse entoure les fibres denses et l'axonème. Elle est reliée à l'axonème par deux colonnes longitudinales ventrale et dorsale attachées aux doublets de microtubules 3 et 8 (Figure 12). La stabilisation de la liaison est assurée par les ponts disulfures entre les résidus cystéines. La gaine fibreuse est composée de nombreuses protéines impliquées dans diverses voies de signalisation. Parmi celles-ci, la voie AMPc joue un rôle majeur dans la réponse cellulaire et en particulier la mobilité spermatique. Son activation entraîne la phosphorylation de protéines cibles par la PKA (protéine kinase

A). Les protéines AKAPs (A-kinase anchor protein) représentent plus de 50% des protéines de la gaine fibreuse et sont des protéines d'ancrage qui se lient aux sous-unités RII α et β de la PKA via deux domaines de liaison (Brown 2002; Eddy et al. 2003). La phosphorylation de leurs résidus tyrosines régule le glissement de la gaine fibreuse et de l'axonème et ainsi la mobilité spermatique (Carrera et al. 1996; Turner et al. 1999). La ropporine est une protéine de liaison à la rhophiline spécifique du spermatozoïde exprimée à la surface interne de la gaine fibreuse. La liaison de la rhophiline à la Rho GTPase entraîne l'activité kinase/phosphatase de cette dernière. La ropporine possède un domaine de liaison à la PKA de séquence homologue à celui présent dans les protéines AKAPs. Cette donnée suggère que la ropporine pourrait également se lier à la PKA et ainsi l'activer (Fujita et al. 2000). Les enzymes glycolytiques hexokinase-1 et la GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) présentent une isoforme spécifique du testicule et sont exprimées au niveau de la gaine fibreuse. La glycolyse permet la production d'ATP indépendamment de la voie oxydative mitochondriale requise pour le mouvement flagellaire (Turner 2006). Ainsi, ces deux enzymes jouent un rôle prédominant dans la mobilité spermatique (Eddy et al. 2003; Nakamura et al. 2008b).

C. LA MATURATION DU SPERMATOZOÏDE

A la sortie du testicule, le spermatozoïde n'est pas mobile et est incapable de féconder un ovocyte. Il acquiert ses fonctions durant sa maturation dans l'épididyme et pendant la capacitation dans les voies génitales féminines.

I. L'EPIDIDYME

1. Description de l'épididyme

L'épididyme mesure 7m ce qui explique l'aspect histologique (Figure 13.B et C). C'est un organe orienté avec une tête, un corps et une queue (Figure 13.A). Il contient le canal

épididymaire, très sinueux, dans lequel transitent les spermatozoïdes. Les spermatozoïdes arrivent au niveau de la tête de l'épididyme par les cônes efférents, pénètrent le canal épидидymaire et transitent jusqu'à la queue pendant 12 jours. Les spermatozoïdes seront stockés quiescents jusqu'à l'éjaculation. Il est entouré de cellules musculaires lisses et comprends un épithélium pseudostratifié prismatique à cellules de remplacement et stéréocils. Ces derniers ont un rôle de réabsorption du fluide et par leur mouvement, contribue à la migration du spermatozoïde. La régulation du péristaltisme et des sécrétions de l'épididyme est sous le contrôle des androgènes et de facteurs nerveux sympathiques et parasympathiques. Par exemple, l'endothéline régulée par l'ocytocine agit comme un puissant vasoconstricteur au niveau des cellules musculaires lisses pour faciliter le transport des spermatozoïdes (Filippi et al. 2005). Au pôle apical, les cellules épithéliales sont reliées par des desmosomes afin de préserver un environnement clos pour le transit des spermatozoïdes.

2. Le fluide épидидymaire

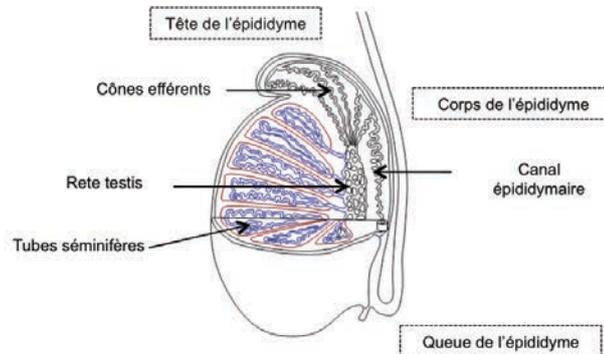
Afin de maintenir un environnement propice aux spermatozoïdes, le fluide épидидymaire est modifié entre la tête et la queue.

2.1 L'homéostasie ionique

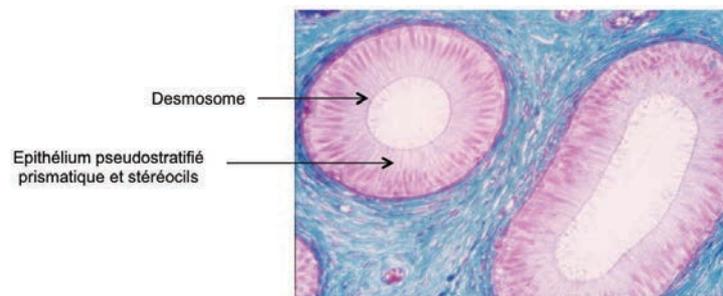
Dans la partie proximale de l'épididyme, l'eau est réabsorbée afin de concentrer les spermatozoïdes (Liu et al. 2012). Le transport de l'eau est régulé par les canaux CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), canaux chlorés exprimés à la surface des cellules épидидymaires et activés par la voie AMPc. Chez l'homme, la mutation du gène CFTR conduit à des pathologies épидидymaires sévères et l'absence congénitale bilatérale des canaux déférents (Wong 1998; Stuhrmann et Dörk 2000; Liu et al. 2012). Le transport de l'eau est également assuré par les aquaporines dont la répartition diffère le long de l'épididyme (Huang et al. 2006). L'homéostasie calcique est maintenue notamment par le complexe CatSper (cation channel sperm associated) en accord avec les canaux à protons Hv1 (Lishko et al. 2012). Dans la partie distale, de nombreux ions H⁺ sont libérés par une pompe à protons ATPase dépendante afin de

maintenir un pH acide nécessaire à l'état quiescent du spermatozoïde (Da Silva et al. 2007).

A



B



C

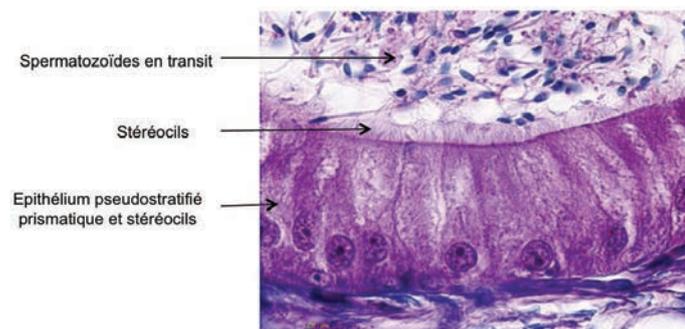


Figure 13 : L'épididyme humain.

(A) L'épididyme est un organe composé d'une tête, d'un corps et d'une queue. Il contient le canal épидидymaire. (D'après Alain Gallien, intellingo.fr)

(B) Coupe transversale du canal épидидymaire. Il est composé d'un épithélium pseudostratifié prismatique à cellule de remplacement et stéréocils. Les desmosomes situés au pôle apical assurent l'étanchéité du transit épидидymaire. (Avec l'autorisation du Laboratoire d'Histologie – Faculté de médecine – Lille)

(C) Coupe longitudinale du canal épидидymaire. (Département d'Histologie de l'UPMC - St Antoine – Paris)

2.2 Les protéines du fluide épидидymaire

Le fluide épидидymaire est riche en protéines. Parmi les plus importantes, ont été détectées l'albumine, la clusterine, la lactoferrine, la calmoduline, la NPC2 (Niemann-Pick disease type C2), l' α -anti-trypsine, et la prostaglandine D2 synthétase (Dacheux et al. 2006; 2012). L'albumine contribue à la survie et la mobilité des spermatozoïdes (Elzanaty et al. 2007; Kumar et al. 2012). L'albumine joue également un rôle dans la perméabilité membranaire du spermatozoïde par son action sur le cholestérol. Le transport du cholestérol est ensuite modulé par la NPC2 (Legare et al. 2006). La clusterine et la lactoferrine possèdent une action anti-microbienne (O'Rand et al. 2011). Dans le sperme, elles forment un complexe associé aux séménogélines séminales qui module l'activité de la PSA (antigène prostatique spécifique). La calmoduline intervient dans l'homéostasie calcique (Khattari et al. 2012). L' α -anti-trypsine quant à elle joue un rôle dans la médiation des processus inflammatoires (Leßig et al. 2009). Enfin, la prostaglandine D2 synthétase intervient dans la modulation de l'apoptose via la cyclooxygénase-2 (Cheuk et al. 2002).

II. LES MODIFICATIONS BIOCHIMIQUES LIEES A LA MATURATION EPIDIDYMAIRE

1. La composition lipidique de la membrane plasmique

Au cours du transit épидидymaire, le ratio cholestérol/phospholipide qui compose les membranes du spermatozoïde diminue en raison d'une grande perte de cholestérol médiée par les PLC (phospholipase C) et PLA2 (phospholipase A2). Cette modification induit une augmentation de la fluidité membranaire nécessaire à la capacitation, la réaction acrosomique et la fusion des gamètes males et femelles. L'augmentation de la fluidité membranaire permet l'influx de Ca^{2+} et l'activation des signaux de transduction préparant la capacitation (Visconti et al. 1999; Saez et al. 2010).

2. Les facteurs décapacitants et de liaison à la zone pellucide

Les facteurs décapacitants sont des molécules qui se fixent sur la membrane plasmique du spermatozoïde afin de la stabiliser et d'éviter une capacitation précoce. Parmi ces facteurs, les protéines de la famille CRISP bloquent les canaux ioniques et ainsi la capacitation. Ces glycoprotéines sont retirées de la membrane plasmique du spermatozoïde lors de son passage dans les voies génitales féminines (Roberts et al. 2007).

Durant le transit épидидymaire, de nombreux facteurs favorisant l'interaction des gamètes sont sécrétés. Parmi ces facteurs, les protéines de la famille SOB (sperm oocyte binding protein) ont été identifiées comme modulatrices de l'interaction gamétique. Des études concernant SOB 1 ont en effet montré que l'inactivation de la protéine conduit à un échec de fécondation (Lefevre et al. 1999). La protéine HE2 (human epididymis specific protein 2) a été localisée au niveau de l'acrosome et la région équatoriale suggérant qu'elle pourrait jouer un rôle lors de la fusion des gamètes (Kirchhoff 1998).

3. Les modifications post-traductionnelles

Le spermatozoïde est une cellule quiescente du point de vue de la transcription. Il n'y a donc pas de synthèse protéique *de novo* dans le spermatozoïde post-testiculaire. L'activation des protéines et enzymes, permettant au spermatozoïde de devenir mobile et fécondant, est régulée par des modifications de type clivages ou post-traductionnelles (Baker et al. 2005). Dans l'acrosome, la proacrosine est clivée en β -acrosine, forme active de l'enzyme impliquée dans la digestion des enveloppes ovocytaires (Zahn et al. 2002). Dans le noyau, les thiols des résidus cystéines des protamines sont oxydés ce qui créent des ponts disulfures et terminent la maturation de la chromatine (Hernández-Ochoa et al. 2006). Dans le flagelle, les protéines AKAPs sont la cible de plusieurs modifications post-traductionnelles permettant de médier le mouvement spermatiques. La phosphorylation cytoplasmique de protéines chaperonnes telles que HSP60 (heat shock protein 60) et erp99 associée à l'augmentation de la fluidité membranaire permet

à ces deux protéines de se retrouver à la surface de la tête du spermatozoïde afin de moduler l'interaction ovocyte – spermatozoïde (Asquith 2004).

4. L'acquisition de la mobilité

L'acquisition de la mobilité spermatique est marquée par plusieurs évènements :

- *L'activation de la mitochondrie dans la queue de l'épididyme* : celle-ci a été mise en évidence par l'analyse des espèces réactives de l'oxygène émises par la mitochondrie (De Lamirande et O'Flaherty 2008; Piomboni et al. 2012).

- *La production d'énergie* : la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie et la voie glycolytique dans la gaine fibreuse produisent l'ATP (Miki et al. 2004). La carnitine par son rôle dans le cycle des acides gras contribue au métabolisme énergétique du spermatozoïde (Chiu Ming et et al. 2004).

- *L'homéostasie ionique* : les ions bicarbonates régulent le pH intracellulaire, stimulent l'activité calcique et activent la voie AMPc (Gadella et Harrison 2000; Liu et al. 2012). L'efflux des ions K⁺ permet aux spermatozoïdes de bouger en condition hypotonique (Santi et al. 2013).

- *L'activation de la voie AMPc* induit la mobilité spermatique par l'activation de kinases (Wuttke et al. 2001).

- *L'oxydation des thiols des résidus cystéine des fibres denses* permet la rigidification des fibres denses (Sloboda 2009).

- *Le clivage et la phosphorylation des pro-protéines AKAPs* activent le réseau microtubulaire (Turner et al. 1999; Ficarro et al. 2002; Luconi et al. 2004; Moretti et al. 2007). Les protéines AKAPs sont également les cibles de la S-nitrosylation induite par la voie de l'acide nitrique médiatrice de la capacitation et du mouvement spermatique (Lefièvre et al. 2007).

- *L'activité ATPasique des bras de dynéine* permet le mouvement flagellaire (Konno et al. 2012).

- *Les modifications post-traductionnelles des protéines de l'axonème* : la β -tubuline est phosphorylée alors que l' α -tubuline est acétylée (Sloboda et al. 2009). Certains résidus des α et β -tubuline portent des motifs glutamylés qui jouent un rôle dans le maintien de la structure de l'axonème (Konno et al. 2012).

III. LA CAPACITATION

La capacitation est la dernière étape de maturation du spermatozoïde, se déroulant dans les voies génitales féminines, requise pour la fécondation. La capacitation prépare le spermatozoïde à la réaction acrosomique et se caractérise par l'hyperactivation du mouvement flagellaire. Le mouvement hyperactivé du flagelle se définit par une augmentation de la courbure et de la symétrie du battement. Il est déterminant pour une migration facilitée dans les voies génitales féminines et la pénétration du cumulus et de la zone pellucide de l'ovocyte. Différents modulateurs sont impliqués dans la capacitation :

- *La fluidité membranaire* : les rafts lipidiques membranaires se définissent par une région riche en cholestérol et sphingolipides formant alors une plateforme de signalisation. La perte de cholestérol induit la migration des rafts à la partie antérieure de la tête. Ce phénomène permet d'augmenter la liaison du spermatozoïde à la zone pellucide de l'ovocyte (Gadella et al. 2008; Nixon et Aitken 2009). Durant la capacitation, l'assymétrie des phospholipides et l'exposition des phosphatidylsérines facilitent l'adhésion cellulaire (Flesch et Gadella 2000; Gadella et Harrison 2000). La capacitation s'accompagne d'une activation des signaux de transduction au travers de la membrane menant à l'activité PKA et la phosphorylation des résidus tyrosines des protéines. (Visconti et al. 1999)

- *Les ions bicarbonates et la voie AMPc* : de nombreuses études ont montré que la capacitation est un phénomène HCO_3^- - dépendant (Wuttke et al. 2001). A l'ovulation, le

pH de la trompe est alcalin et la concentration des ions bicarbonates est à son maximum. L'entrée des ions bicarbonates via le transporteur $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ stimule la fluidité membranaire et l'activité de l'adénylate cyclase. Ce dernier synthétise l'AMPc qui active la PKA. Cette kinase phosphoryle les protéines cibles telles que les AKAPs dans le flagelle et mène à l'hyperactivation du mouvement (Turner et al. 1999; Luconi et al. 2004). La phosphorylation conduit également à un remodelage des protéines de la tête ce qui permet la reconnaissance ovocyte (ZP3) - spermatozoïde (Asquith et al. 2004).

- *Le calcium* : il module l'activité de kinases et ainsi la phosphorylation des protéines cibles (Baldi et al. 1996). L'entrée de Ca^{2+} intracellulaire est régulée par une Ca^{2+} -ATPase dépendante de la calmoduline et augmente durant la capacitation. Toutefois, l'entrée de calcium ne suffit pas et la mobilisation des réserves calciques acrosomale et mitochondriale est requise pour l'hyperactivation du flagelle (Costello et al. 2009).

CHAPITRE 2 : L'EXPLORATION DE LA FERTILITE MASCULINE

Aujourd'hui, 15% des couples sont en échec dans leur projet parental. Lors, du bilan de fertilité du couple, le spermogramme - spermocytogramme est l'examen de 1^{ère} intention pour évaluer la qualité du sperme. Ce dernier est un liquide biologique complexe et hétérogène. Au cours de ce chapitre, nous définirons la composition du sperme et comment en évaluer sa qualité.

I. L'EJACULAT : UN LIQUIDE BIOLOGIQUE COMPLEXE

Le sperme est un liquide biologique complexe composé d'une phase liquide, le plasma séminal et d'une phase cellulaire, les spermatozoïdes et les cellules rondes. Le plasma séminal est la résultante des sécrétions testiculaires, épидидymaires et des glandes annexes : la prostate, les vésicules séminales et les glandes de Littré et de Cowper (Tableau 1- Figure 14). Les spermatozoïdes sont stockés dans la queue de l'épididyme et seront introduits dans le plasma séminal pour composer le sperme. A l'éjaculation, le sperme est émis en 3 fractions. La 1^{ère} fraction contient les sécrétions prostatiques et des glandes de Cowper. La 2^{ème} fraction comporte les sécrétions épидидymaires, testiculaires et les spermatozoïdes. La 3^{ème} fraction inclus les sécrétions des vésicules séminales.

Origine des sécrétions	pH	Rôle	Volume du plasma séminal (%)
Vésicules séminales	Basique	Apport énergétique aux spermatozoïdes Coagulation du sperme	68%
Prostate	Acide	Liquéfaction du sperme	15%
Glandes de Littré et de Cowper		Lubrification des parois de l'urètre	4,5%
Epididyme		Facteurs décapacitants et nutritifs	12%
Testicule		Transport des spermatozoïdes	0,5%

Tableau 1 : Composition du plasma séminal.

1. Les glandes annexes

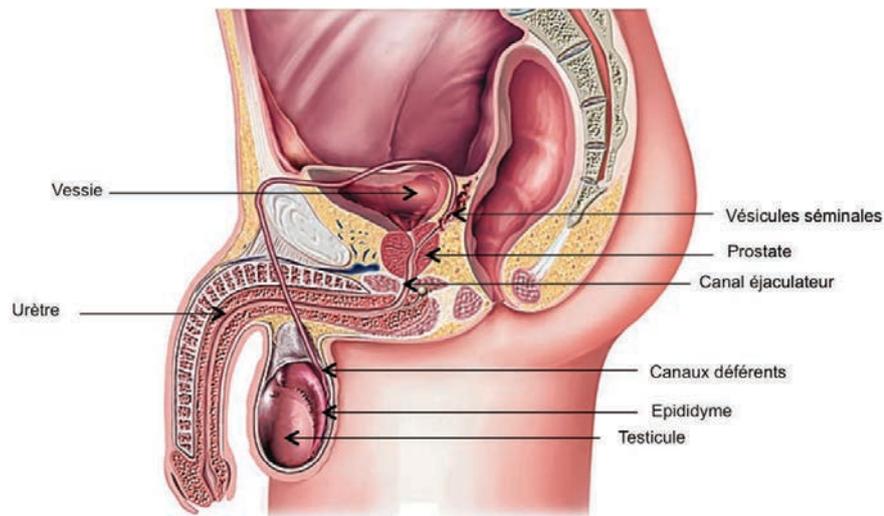


Figure 14 : L'appareil génital masculin.

D'après Encyclopédie Larousse médicale en ligne.

1.1 Les vésicules séminales

Les vésicules séminales sont des glandes paires contournées mesurant 4 à 5 cm de longueur qui aboutissent dans les canaux éjaculateurs (Figure 14). La muqueuse comprend un épithélium cubique simple un fin tissu conjonctif. Elle est entourée d'une couche musculaire lisse. Cette musculature assure l'expulsion des sécrétions issues de l'épithélium. L'épithélium présente une importante activité avec de nombreuses vacuoles de sécrétions. Celles-ci, sous la dépendance des androgènes, représentent environ 68% du volume du plasma séminal, possèdent un pH alcalin et sont riches en fructose, en prostaglandines et en séménogélines. Le pH alcalin est garanti par les ions bicarbonates. Le fructose est une source énergétique pour le spermatozoïde. Les prostaglandines (PGE1 et 2) contribuent à la fécondation en favorisant le mouvement péristaltique de l'épithélium des trompes de Fallope. Les séménogélines induisent la coagulation du sperme et seront protéolysées par la PSA pendant la liquéfaction, libérant les spermatozoïdes.

1.2 La prostate

La prostate est une glande unique organisée en 3 lobes. Elle mesure 3 cm de longueur et est située sous la vessie, entourant l'urètre prostatique et est traversée par les canaux éjaculateurs (Figure 14). La prostate comprend une cinquantaine de glandes tubulo-alvéolaires logées dans un tissu conjonctif riche en fibres musculaires et élastiques. L'épithélium est bistratifié cubique et son aspect varie selon l'activité sécrétoire. La prostate secrète essentiellement du zinc et des phosphatases acides, des enzymes nécessaires à la liquéfaction du sperme (par exemple la PSA) ce qui confère à la composante prostatique un pH acide. Ses sécrétions représentent 15% du volume du plasma séminal et sont régulées par les androgènes.

1.3 Les glandes de Littré et de Cowper

Les glandes de Littré ou urétrales sont retrouvées dans la muqueuse de l'urètre pénien. Les glandes de Cowper ou bulbo-urétrales sont situées sous la prostate dans la partie interne du pénis. Elles secrètent un mucus émis juste avant l'éjaculation dont le rôle est de lubrifier les parois de l'urètre. Elles représentent moins de 4,5% du volume du plasma séminal.

2. La liquéfaction du sperme

A l'éjaculation, le sperme coagule naturellement sous l'effet des séménogélines issues des vésicules séminales. Puis sous l'effet des protéases d'origine prostatique, le sperme se liquéfie peu à peu libérant alors les spermatozoïdes qui peuvent remonter les voies génitales féminines. Parmi ces enzymes prostatiques, les rôles de la PSA et de la « collagenase-like » peptidase ont clairement été identifiés comme de puissantes enzymes impliquées dans la liquéfaction (Koren et Lukac 1979; Lilja et Laurell 1984; Lee et al. 1989). *In vitro*, la liquéfaction du sperme se réalise en 30 à 45 min à 37°C.

II. L'ANALYSE DU SPERME

Le spermogramme - spermocytogramme est l'examen de 1^{ère} intention pour évaluer la qualité du sperme dont l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) a défini les limites basses de références (WHO 2010).

1. Le spermogramme

Le spermogramme est l'étude du sperme frais éjaculé. Après un délai d'abstinence sexuelle de 3 à 5 jours, le recueil est réalisé au laboratoire dans un réceptacle stérile. Après liquéfaction, divers paramètres sont caractérisés (WHO 2010) :

- *le volume*, témoin du bon fonctionnement des glandes annexes.

- *le pH*, reflet de l'équilibre des sécrétions des glandes et voies génitales. Leur association confère un pH neutre au sperme.

- *La viscosité*, résultante des sécrétions prostatiques et des vésicules séminales. Le déséquilibre d'une des deux composantes induit une augmentation ou une diminution de la viscosité.

- *Les agglutinats*, témoins le plus souvent de la présence d'anticorps anti-spermatozoïdes dans l'éjaculat (Figure 15).

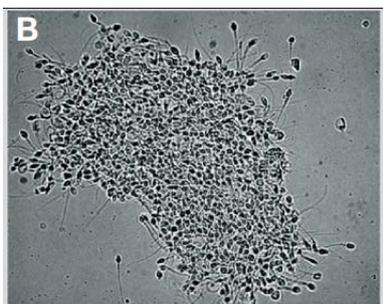


Figure 15 : Un agglutinat de spermatozoïdes.

D'après cahier de formation du biologiste – Bioforma 2009.

- *La vitalité*, renseigne sur le nombre de spermatozoïdes vivants et morts par une coloration vitale (éosine - nigrosine). Le spermatozoïde vivant n'intègre pas le colorant

puisque sa membrane plasmique est intacte et *a contrario*, le spermatozoïde mort se colore en rose (Figure 16).

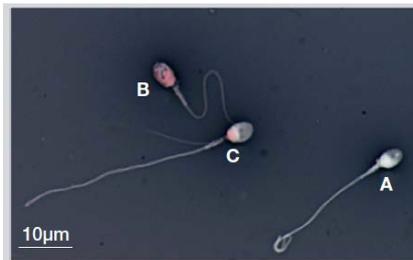


Figure 16 : Evaluation de la vitalité spermatique par le test à l'éosine-nigrosine.

(A) spermatozoïde vivant

(B -C) spermatozoïdes morts.

D'après cahier de formation du biologiste – Bioforma 2009.

- *La numération des spermatozoïdes et des cellules rondes.* Ces dernières peuvent être des cellules épithéliales issues du tractus génital ; des cellules inflammatoires, les polynucléaires ; des cellules germinales. Un test complémentaire permet d'identifier les polynucléaires. Une concentration en polynucléaires supérieure à 10^6 /mL indique, le plus souvent, un épisode génital infectieux ou inflammatoire. La numération se réalise sur cellule de comptage (Figure 17).

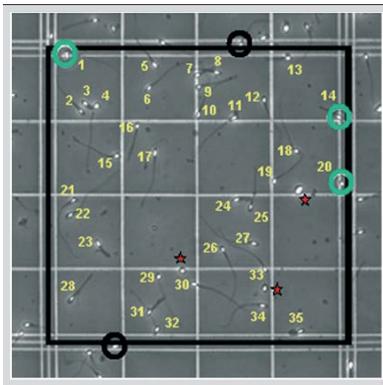


Figure 17 : L'évaluation de la numération spermatique sur cellule de comptage.

D'après cahier de formation du biologiste – Bioforma 2009.

- *La mobilité* est un paramètre essentiel pour l'évaluation de la fécondance du spermatozoïde. La mobilité du spermatozoïde présente différents profils. Appréciée au microscope optique, elle est exprimée en pourcentage de spermatozoïdes mobiles (Grizard et Jimenez 1997). Une évaluation qualitative est réalisée en différenciant les spermatozoïdes se déplaçant activement suivant une trajectoire linéaire ou aléatoire (mobilité progressive PR), ne progressant que très faiblement (non progressif NP) et les spermatozoïdes immobiles (IM) (WHO 2010). Des systèmes d'analyses assistés par ordinateur (système CASA) garantissent une mesure automatique et objective. Ces systèmes CASA permettent de détecter des anomalies de mobilité imperceptibles en microscopie optique. Toutefois, peu de laboratoires sont aujourd'hui équipés. Les spermatozoïdes présentent un caractère hétérogène et différents profils de mobilité sont observés.

L'examen du sperme est le reflet du fonctionnement du tractus génital mâle dans son ensemble à un instant donné (Figure 18). Plusieurs spermogrammes sont nécessaires afin d'évaluer plusieurs cycle de la spermatogenèse et statuer sur la qualité du sperme.

SPERMOGRAMME du 18/01/2012			
Délai d'abstinence	3	jours	
Volume:	3,30	mL (N>1,5ml)	Viscosité: Normale
pH:	7,8	(N >= 7,2)	
Numération			
Spermatozoïdes :	180,0000	millions / ml	soit pour l'éjaculat 594,0000 millions
		(N>=15 millions / ml)	(N>=39 millions / éjaculat)
Cellules :	0,40	millions / ml	(N<1 million/ml)
Polynucléaires :	<5%	millions / ml	(N<1 million/ml)
Mobilité			
	%	à 1 heure	à 4 heures
progressifs (a)		35 %	0 %
peu progressifs (b)		25 %	5 %
non progressifs (c)		5 %	45 %
immobiles (d)		35 %	50 %
(N : a+b >= 32% a+b+c >= 40%)			
Vitalité :	76%	de formes vivantes (N>=58%)	
Agglutinats:	absents	Agrégats:	absents

Figure 18 : Spermogramme normal.

(a+b) : Mobilité progressive

(c) : Mobilité non progressive

(d) : Immobile

Avec l'autorisation du laboratoire de Spermiologie – CHRU LILLE

2. Le spermocytogramme

La morphologie du spermatozoïde est considérée comme l'un des facteurs clés de réussite de la fécondation. Un spermatozoïde morphologiquement normal se définit par (WHO 2010):

- *une tête* ovale avec un grand axe (5 µm) et un petit axe (3 µm). Le rapport grand axe/petit axe peut fluctuer entre 1,33 et 2.

- *la région acrosomique* représente 40 à 70% de la surface de la tête, elle a un contour régulier et une texture homogène.

- *la pièce intermédiaire* est dans le prolongement de la tête et présente une longueur de 4 μm et un diamètre de 0,6 à 0,8 μm .

- *la pièce principale* mesure 45 μm de longueur et un diamètre de 0,4 μm .

La morphologie spermatique est appréciée sur frottis après coloration. Plusieurs colorations peuvent être utilisées : les colorations de Shorr, de Papanicolaou modifiée et des kits comme DiffQuick (Henkel et al. 2008). Les colorations de Shorr et de Papanicolaou modifiée sont basées sur le même principe et sont donc de qualités comparables. Les colorations à partir de kit ne sont en revanche pas recommandées en raison du bruit de fond occasionné. La lecture de la morphologie spermatique est alors plus difficile et le nombre de formes anormales se trouve augmentées.

Le spermocytogramme consiste à rechercher les atypies morphologiques des spermatozoïdes en microscopie optique. Ainsi, plusieurs classifications ont été établies (Pour revue (Menkveld et al. 2011)). Historiquement, MacLeod et Gold en 1951 définissent plusieurs catégories d'anomalies de la tête. Les spermatozoïdes n'appartenant pas à ces catégories sont classés comme normaux. Eliasson complète la classification précédente par la description de la pièce intermédiaire. En France, la classification de David définie en 1972 et modifiée en 1988 puis 2000 est largement utilisée (Auger et al. 2000). Celle-ci répertorie les diverses anomalies morphologiques du spermatozoïde qui se divisent en plusieurs catégories (Tableau 2) : les anomalies de la tête, de la pièce intermédiaire et du flagelle. Le spermocytogramme permet de définir le nombre de spermatozoïdes typiques (morphologie normale) et le nombre de spermatozoïdes atypiques. Cet examen met en évidence les atypies monomorphes et polymorphes. L'observation est réalisée sur 100 spermatozoïdes et les associations d'atypies pour chaque spermatozoïde sont référencées. Un index d'anomalies multiples (nombre total d'anomalies / nombre de spermatozoïdes anormaux) peut être calculé révélant le nombre moyen d'anomalies par spermatozoïde. L'originalité de la méthode David modifiée est de recenser l'intégralité des anomalies du spermatozoïde ne considérant pas une anomalie plutôt qu'une autre (Figure 19). Ces méthodes de lecture du spermocytogramme basées sur la description des anomalies spermatiques s'opposent à celle établie par Kruger. Il propose une description du spermatozoïde

normal présent au niveau du col de l'utérus après le test post-coïtal. Les critères de description du spermatozoïde sont dits critères stricts de « Tygerberg ». Cette classification bien que moins précise concernant la description des différentes anomalies propres à chaque spermatozoïde est préconisée par l'OMS (WHO 2010).

Anomalies	Caractérisée par	Se définit par	Exemple
Anomalies de la tête	Amincie	Le petit axe de la tête est plus petit	
	Allongée	Le grand axe de la tête est plus long	
	Microcéphale	Les deux axes de la tête sont plus petits	
	Macrocéphale	Les deux axes de la tête sont plus grands	
	Multiples	Plusieurs têtes	
	Acrosome anormal ou absent		
	Base anormale ou absente		
Anomalies de la pièce intermédiaire	Grêle	Hélice mitochondriale incomplète	
	Angulée	Le flagelle n'est pas dans l'axe de la tête	
	Restes cytoplasmiques	Le corps résiduel n'a pas été complètement éliminé	
Anomalies de la pièce principale	Absent		
	Court	Le flagelle est plus court	
	Enroulé	Le flagelle est enroulé sur lui-même ou autour de la tête	
	De calibre irrégulier	Le flagelle présente des parties plus fines	
	Multiples	Plusieurs flagelles	

Tableau 2 : Les différentes anomalies du spermatozoïde selon la classification de David modifiée.

D'après (Auger 2010)

SPERMOCYTOGRAMME

Sur 100 spermatozoïdes Typiques : **63%** Atypiques : **37%**
 IAM : **1,27** (*Classification de David modifiée*)

Tête	Pièce intermédiaire	Flagelle
Allongée 0	Reste cytoplasmique 1/1	Absent 1/1
Amincie 0	Grèle 1/1	Ecourté 0
Microcéphale 0	Angulation 4/1	Calibre irrég. 0
Macrocéphale 0		Enroulé 3
Têtes multiples 1/1		Multiple 3/1
Base anormale 8/6		
Acrosome malformé 25/7		

Figure 19 : Spermocytogramme normal selon la classification de David modifiée.

Pour chaque anomalie, le 1^{er} chiffre représente le nombre total de spermatozoïde présentant l'anomalie et le 2^{ème} chiffre, le nombre de spermatozoïdes comportant une anomalie associée.

Avec l'autorisation du Laboratoire de Spermiologie – CHU LILLE.

III. LA SELECTION DES SPERMATOZOÏDES

In vivo, les spermatozoïdes potentiellement fertiles effectuent une sélection naturelle leur permettant de se séparer du plasma séminal, des cellules rondes et des spermatozoïdes immobiles par migration active dans le tractus génital féminin. La sélection des spermatozoïdes peut être réalisée *in vitro* par différentes méthodes. Cette sélection permet d'enrichir la préparation en spermatozoïdes mobiles et normaux et d'optimiser ainsi les chances de fécondation. Un test de sélection des spermatozoïdes peut compléter le spermogramme afin d'estimer la qualité de la préparation enrichie en spermatozoïdes mobiles et normaux. Ainsi, la méthode de sélection des spermatozoïdes doit répondre à plusieurs critères (Revue dans (Henkel et Schill 2003)):

- Récupérer le plus grand nombre de spermatozoïdes mobiles et normaux,
- Sans causer de dommages aux spermatozoïdes,
- Eliminer les spermatozoïdes anormaux, morts et les cellules rondes,
- Eliminer le plasma séminal, les toxiques, les substances bioactives comme les espèces réactives de l'oxygène.

Différentes méthodes de sélection ont été développées (Revue dans (Henkel et Schill 2003)) et sont résumées dans le tableau 3:

- *la migration ascendante* : le principe de cette méthode repose sur la capacité des spermatozoïdes les plus mobiles de traverser, depuis le fond du tube vers la partie supérieure, un milieu capacitant. Ce milieu comporte de l'albumine, protéine de captation du cholestérol ; du pyruvate, substrat énergétique ; et du glucose. Cette méthode de sélection présente les avantages d'être facile à réaliser et permet l'obtention d'une fraction pure enrichie en spermatozoïdes mobiles. Toutefois, les spermatozoïdes présentant un défaut de condensation de la chromatine ne sont pas éliminés. Le rendement obtenu est également moindre qu'avec la méthode de sélection par gradient de densité. Ainsi, cette approche est réservée aux spermés normaux avec une forte mobilité progressive.

- *la migration par sédimentation* : cette méthode combine la migration ascendante à la sédimentation sur la phase obtenue. Cette technique présente l'avantage d'obtenir une fraction de spermatozoïdes mobiles enrichie et une faible production d'espèces réactives de l'oxygène. Toutefois, le faible rendement ne permet pas l'utilisation de cette approche pour les cas d'oligoasthénozoospermies.

- *la filtration sur colonne* : le principe de cette méthode implique la capacité des spermatozoïdes à migrer au travers d'une colonne de filtration contenant des fibres de laine. Le succès de cette méthode est directement lié au type de colonne utilisée. Le rendement en terme de spermatozoïdes mobiles et l'élimination des cellules rondes sont les avantages majeurs de cette méthode. Cette méthode permet d'obtenir une fraction enrichie en spermatozoïdes normaux de meilleur qualité que par la sélection par gradient de densité (Van den Bergh et al. 1997). Toutefois, cette approche ne permet pas d'éliminer complètement les cellules rondes et selon le type de colonne utilisée, les spermatozoïdes peuvent être endommagés.

- *la colonne Sephadex* : les spermatozoïdes sont filtrés sur une colonne dont la porosité permet le passage des spermatozoïdes normaux. Comparée à la sélection par gradient de densité, la fraction obtenue présente un meilleur rendement en terme de

spermatozoïdes morphologiquement normaux. Comparée à la sélection par migration ascendante, cette méthode produit une fraction enrichie en spermatozoïdes morphologiquement normaux et semble corrélée à un meilleur taux de réussite en insémination intra-utérine (Zavos et Centola 1992). Enfin ces colonnes de filtration semblent garantir un meilleur rendement en terme de spermatozoïdes mobiles après cryoconservation (Drobnis et al. 1991).

- *la migration transmembranaire* : le principe de cette méthode repose sur la capacité des spermatozoïdes mobiles à traverser une membrane nucléoporee. Les cellules rondes et les spermatozoïdes immobiles ne peuvent pas traverser la membrane en raison de sa porosité. Par cette approche, peu d'espèces réactives de l'oxygène sont produites. Toutefois, le faible rendement obtenu fait que cette méthode n'est pas ou peu utilisée en laboratoire.

- *le gradient de densité* : le principe de cette méthode repose sur la capacité des spermatozoïdes les plus mobiles et normaux à migrer au travers d'un gradient de macromolécules. Ce milieu contient des particules de silice recouverte de silane et dont l'osmolarité est ajustée avec des polysucrozes. Il présente l'avantage d'être peu toxique. Après centrifugation, le gradient présente plusieurs phases. Les phases supérieures contiennent le plasma séminal, les cellules rondes et les spermatozoïdes morts ou anormaux. Les spermatozoïdes les plus normaux morphologiquement sont dans le culot. Cette méthode flexible permet, par l'utilisation de plusieurs couches (1,2,3,4,5,6) de gradient de concentration variable, l'obtention d'une sélection plus ou moins stringente des spermatozoïdes. Par ailleurs, cette approche permet d'obtenir une fraction purifiée et enrichie en spermatozoïdes mobiles et morphologiquement normaux. Ainsi, elle présente un meilleur rendement en particulier pour les spermes altérés. De plus, les spermatozoïdes sélectionnés par gradient de densité à partir de spermes altérés présentent une bonne maturité de la chromatine (De Mateo et al. 2010). De la même façon, cette approche semble plus efficace pour sélectionner les spermatozoïdes présentant des dommages à l'ADN de type cassure simple brin en comparaison avec la méthode de sélection par migration ascendante (Enciso et al. 2011). Toutefois, le coût est plus élevé que pour la méthode de sélection par migration ascendante.

Les différentes méthodes présentent des avantages et des inconvénients (Tableau 3). Le choix de l'approche utilisée doit tenir compte des caractéristiques du sperme afin d'obtenir une sélection optimale.

Méthodes	Avantages	Inconvénients
Migration ascendante : Migration des spermatozoïdes mobiles dans un milieu capacitant	Fraction enrichie en spermatozoïdes mobiles Facile et peu onéreuse	Faible Rendement Espèces réactives de l'oxygène Nombreux spermatozoïdes avec un défaut de condensation de la chromatine
Migration par sédimentation : Migration ascendante puis sédimentation	Fraction enrichie en spermatozoïdes mobiles Peu d'ERO	Faible rendement
Migration sur colonne de filtration Filtration sur colonne contenant des fibres de laine	Facile Fraction enrichie en spermatozoïdes mobiles Bon rendement Peu d'ERO	Onéreuse Pureté de la préparation (cellules rondes et débris cellulaires présents) Dommages aux spermatozoïdes
Colonne Sephadex Filtration sur colonnes contenant des billes de porosité variable	Fraction enrichie en spermatozoïdes normaux	Faible rendement
Migration transmembranaire : Migration des spermatozoïdes au travers d'une membrane	Peu d'ERO	Faible rendement
Gradient de densité : Migration des spermatozoïdes au travers d'un gradient de macromolécules	Fraction enrichie en spermatozoïdes normaux Bon rendement Peu d'ERO Elimination des cellules rondes	Méthode plus longue (temps) et onéreuse

Tableau 3 : Méthodes de sélection des spermatozoïdes.

ERO : espèces réactives de l'oxygène

IV. LES CRITERES DE QUALITE DU SPERMATOZOÏDE

1. Les critères de L'OMS

Le sperme possède un caractère hétérogène intra et interindividuel lié par exemple à la profession, l'hygiène de vie ou le lieu de résidence (Bonde et Storgaard 2002; Lewis 2007). Ainsi, de nombreuses anomalies spermatiques sont observées dans un sperme qualifié de normal. L'OMS a alors défini les valeurs basses de référence, résumées dans le tableau 4, pour qualifier un sperme normal (WHO 2010).

Paramètres spermatiques	Limites basses de références OMS 2010
Volume	1,5 mL
Numération des spermatozoïdes	15 Millions/mL 39 Millions/éjaculat
Numération des cellules rondes	1 Million/mL
Numération des polynucléaires	1 Million/mL
Mobilité	(PR) $\geq 32\%$; (PR+NP) $\geq 40\%$
Vitalité	58%
Morphologie	4% (Classification de Kruger)

Tableau 4 : Limites basses de références OMS 2010.

D'après (WHO 2010)

2. La prise en compte du spermogramme - spermocytogramme dans la prise en charge du couple en Procréation Médicalement Assistée

La PMA (Procréation Médicalement Assistée) est un ensemble de techniques permettant d'aider le couple à concevoir un enfant. L'insémination intra-utérine (IIU) est la technique la moins invasive. Le principe de cette méthode est l'introduction au fond de l'utérus du sperme préparé c'est-à-dire dont les spermatozoïdes ont été sélectionnés associée à une synchronisation du cycle. Il s'agit de la technique de 1^{ère} intention pour les couples dont l'infertilité est idiopathique, immunologique ou lors de troubles de l'éjaculation. La fécondation *in vitro* (FIV) consiste à mettre en contact *in vitro* les complexes cumulo-ovocytaires ponctionnés après stimulation hormonale et les

spermatozoïdes préparés. Elle est privilégiée lorsque l'infertilité a une origine féminine. L'injection intra-cytoplasmique du spermatozoïde (ICSI) est particulièrement adaptée aux couples dont le sperme est altéré, réalisée avec l'utilisation de spermatozoïdes épидидymaires ou testiculaires ou dans le cadre de l'azoospermie. L'ovocyte est alors fécondé directement avec un spermatozoïde choisi en fonction de sa morphologie.

Le spermogramme - spermocytogramme est un examen descriptif qualitatif et quantitatif à un instant donné qui aide les cliniciens à la prise en charge du couple en PMA. Les paramètres essentiels pris en compte pour choisir la technique de PMA sont la numération, la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes (Lewis 2007). La concentration et la mobilité spermatique apparaissent comme les facteurs les plus discriminants pour prédire les chances de réussite de la fécondation (Nallella et al. 2006). *A contrario*, la morphologie est hétérogène entre les groupes fertiles et infertiles et ne semble pas être un facteur déterminant. La morphologie du spermatozoïde est, sans conteste, le paramètre le plus controversé (Pour revue (Coetzee et al. 1998; Kruger et Coetzee 1999)). L'étude statistique de 1461 couples fertiles et infertiles de Guzick et al. montre que la morphologie est le paramètre le plus discriminant (Guzick et al. 2001). A l'inverse, Chia et al. préconisent la prudence en ce qui concerne la morphologie spermatique considérant les critères de l'OMS trop stringents (Chia et al. 1998).

3. La prise en compte de la qualité des spermatozoïdes sélectionnés dans la prise en charge du couple en Procréation Médicalement Assistée

Le choix de la technique de PMA repose, pour la composante masculine, sur l'analyse du spermogramme – spermocytogramme et la qualité de la préparation obtenue après sélection des spermatozoïdes. La numération et la mobilité des spermatozoïdes orienteront le couple soit vers l'IIU ($> 1. 10^6$ spermatozoïdes progressifs) soit vers la FIV ($0,5. 10^6$ spermatozoïdes progressifs) ou l'ICSI ($< 0,5. 10^6$ spermatozoïdes progressifs). La tératozoospermie sévère ($< 4\%$ de formes normales) engagera le couple vers l'ICSI (Guérif 2010).

CHAPITRE 3 : LE SPERMATOZOÏDE ET LA PROTEOMIQUE

L'électrophorèse bidimensionnelle mise au point par O'Farrell dans les années 1970 marque le début de l'étude du profil d'expression des protéines. Il faudra attendre cependant les années 1990 pour que la méthode devienne plus reproductible et se développe. La protéomique ou « science des protéines » est définie pour la 1^{ère} fois par l'américain Marc Wilkins en 1994 et permet à l'américain John Fenn, au japonais Koichi Tanaka et au suisse Kurt Wuerthrich d'obtenir le prix Nobel de Chimie en 2002 pour leurs travaux sur la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire. Le développement des méthodes électrophorétiques et de spectrométries de masse dans les années 1990 et 2000 marque l'avènement de la protéomique. Le terme protéome provient de la contraction de « protéine » et « génome ». La protéomique permet de caractériser la composition protéique d'un organisme vivant à l'état basal en réponse à une situation biologique ou pharmacologique. La caractérisation complète des protéines inclut les mutations, les isoformes, les modifications post-traductionnelles ou encore les interactions avec d'autres molécules. Ces études nécessitent une méthodologie adaptée à chaque question biologique. Dans ce chapitre, nous présenterons l'approche protéomique et nous ferons une revue des études portant sur le sperme.

I. L'APPROCHE PROTEOMIQUE

1. Le protéome

Depuis l'ère du séquençage, il est maintenant établi que le génome code pour environ 20 000 gènes. Toutefois, les mutations et l'épissage alternatif contribuent à la diversité du transcriptome. La production d'isoforme spécifique, les clivages protéiques et les modifications post-traductionnelles conduisent à une importante diversité protéique au sein d'une cellule et font la richesse du protéome. Ces différents étages de l'expression cellulaire révèlent une forte complexité des systèmes biologiques impliquant de

puissants mécanismes de régulations qui, s'ils sont perturbés, mènent à la pathologie (Brewis et Gadella 2010).

Bien que chaque cellule possède le même génome, l'expression des transcrits et des protéines est spécifique à chaque type cellulaire en réponse à la situation biologique. Le génome est en effet un système statique qui ne permet pas de comprendre complètement un système biologique. A l'inverse, le transcriptome est un système dynamique qui représente l'expression génique en réponse aux stimuli. Le protéome est également un système dynamique, reflet direct de la réponse cellulaire fonctionnelle de l'interaction d'un système biologique et de son environnement à un moment donné (Calvel et Pineau 2010).

2. L'intérêt d'une approche protéomique dans l'étude du spermatozoïde

Le spermatozoïde présente une chromatine hypercompactée, ce qui le rend peu actif voire inactif sur le plan de la transcription. La cellule spermatique est également dépourvue des organites cellulaires impliqués dans la transcription et la traduction. La réponse cellulaire à l'environnement ne se situe donc pas au niveau génomique ou transcriptomique mais bien au niveau protéomique (Calvel et Pineau 2010). Ainsi, l'approche protéomique est particulièrement adaptée à l'étude du spermatozoïde.

3. Les stratégies protéomiques

Le développement simultané des méthodes de séparation, d'identification et de bioinformatique permet aujourd'hui de caractériser le protéome d'un système biologique en réponse à une situation physiologique ou pathologique à un instant donné. La diversité des outils protéomiques implique que la méthodologie utilisée soit adaptée à la question biologique.

La protéomique descriptive permet d'établir le catalogue protéique d'un tissu ou d'une cellule dont la démarche est illustrée en figure 20. L'isolement et la purification du plasma séminal ou du spermatozoïde sont requis. Des techniques de préfractionnement

du spermatozoïde, cellule compartimentalisée, permettent d'augmenter le pouvoir résolutif en terme d'identification (Brewis et Gadella 2010). Les protéines extraites sont ensuite séparées afin de répondre aux besoins de l'étude. L'électrophorèse bidimensionnelle (2DE) est une technique de séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique (pI) et de leur masse moléculaire. Ces caractéristiques propres à chaque protéine sont définies par la composition de la séquence polypeptidique en acides aminés. Cette méthode de séparation est particulièrement adaptée à l'étude des modifications post-traductionnelles qui modifient les propriétés biochimiques des protéines (pI et masse moléculaire). Dans l'étude du spermatozoïde, cette approche prend tout son sens, bien que peu résolutive, en comparaison avec des avancées technologiques (Oliva et al. 2008; 2009; 2010; Plessis et al. 2011). L'électrophorèse monodimensionnelle (1DE) permet une séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire. Les protéines séparées sont ensuite isolées et digérées en peptides. La spectrométrie de masse permet d'identifier les peptides puis la protéine à partir des bases de données. De la même façon, le choix du spectromètre de masse doit être adapté à la méthode de séparation des protéines. Ainsi, un spectromètre de masse puissant, hautement résolutif, permettant de caractériser les mélanges peptidiques complexes, devra être associé à l'électrophorèse monodimensionnelle. Actuellement, cette approche est la plus pertinente pour caractériser un protéome à grande échelle (Oliva et al. 2008; 2009; 2010; Plessis et al. 2011).

La protéomique différentielle renseigne sur les différences d'expressions quantitatives ou relatives des protéines d'une cellule ou d'un tissu dans deux conditions différentes, par exemple sain versus pathologique. Cette approche repose sur le marquage différentiel des deux échantillons issus de deux conditions. Les méthodes de séparation et d'identification des protéines sont ensuite les mêmes que pour la protéomique descriptive. Par exemple, la 2DE-DIGE (differential gel electrophoresis) comporte une étape de marquage des échantillons au moyen de cyanines différentes (Aitken et Baker 2008). L'analyse du marquage différentiel est observée par l'apparition sur le gel d'électrophorèse bidimensionnelle de spots de couleurs différentes. La superposition des images correspondantes à la longueur d'onde de chaque cyanine permet de révéler les protéines différentiellement exprimées. Ces méthodes sont particulièrement adaptées pour comprendre l'origine de certaines formes d'infertilité.

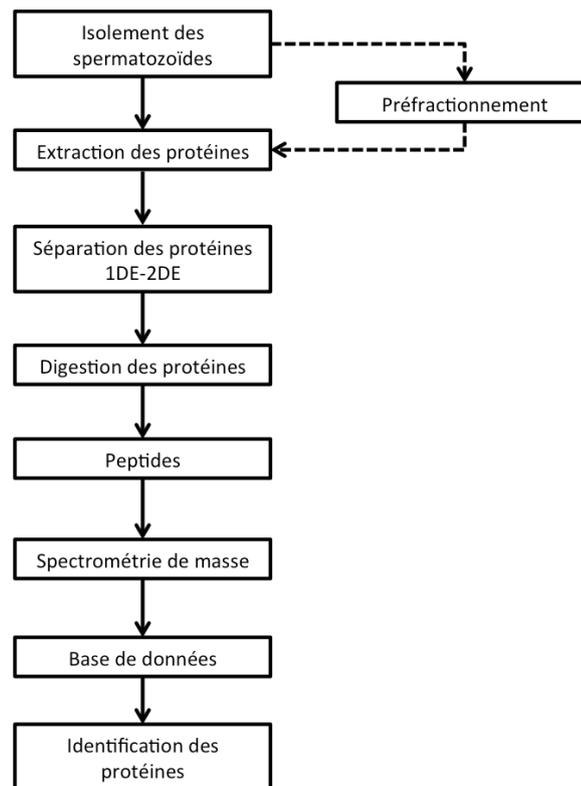


Figure 20 : Stratégie en protéomique descriptive.

1DE : électrophorèse monodimensionnelle ; 2DE : électrophorèse bidimensionnelle

II. LA PROTEOMIQUE DE L'EJACULAT

Le sperme est un liquide biologique complexe composé d'une phase liquide, le plasma séminal et une phase cellulaire, les spermatozoïdes et les cellules rondes. Sa complexité réside dans la provenance multiple des différentes fractions qui le compose. Biochimiquement, les protéines exprimées dans le spermatozoïde et le plasma séminal possèdent des propriétés variables. Ces différents paramètres confèrent une complexité particulière à l'étude de l'éjaculat.

2. L'étude du plasma séminal

La compréhension de l'étude de la fertilité masculine passe par l'examen du plasma séminal, composante essentielle à la survie et au transport des spermatozoïdes. Comme développé dans le chapitre 2, le plasma séminal est composé des sécrétions

épididymaires et des glandes annexes. Quelques études portent sur le plasma séminal en raison de son rôle physiologique et de l'abondance des protéines qui le compose (Tableau 5). Le plasma séminal peut être obtenu facilement et représente une voie d'étude intéressante pour la compréhension de la fertilité masculine et l'identification de marqueurs de qualité du sperme (Tomar et al. 2012).

Le premier protéome du plasma séminal dans sa globalité a été publié en 2004 par Fung et al. Il contient 139 protéines et a été obtenu par une combinaison d'approche (Fung et al. 2004). Les avancées technologiques en protéomique ont permis à Pilch et al. de compléter largement ce protéome avec 923 protéines dont les fonctions majoritaires sont la liaison, l'activité catalytique et la transduction du signal (Pilch et Mann 2006). Milardi et al. ont étudié la composition du plasma séminal de jeunes pères afin d'identifier des marqueurs de fertilité. Parmi les plus de 1000 protéines identifiées, seulement 83 ont été retrouvées dans le plasma séminal de tous les sujets révélant l'extrême variabilité de ce fluide biologique (Milardi et al. 2012). Récemment, l'équipe de Rolland et al. a réalisé une étude combinatoire génomique et protéomique avec pour objectif l'identification de marqueurs spécifiques de chaque organe du tractus génital masculin (Rolland et al. 2012). Dans cette étude, l'expression de la TKTL1 (transketolase « like » protéine 1), la LDHC (L-lactate déshydrogénase C) et la PGK2 (phosphoglycérate kinase 2) est associée aux donneurs fertiles.

Les travaux d'Utleg et al. ont permis la production du 1^{er} protéome des prostasomes, petites vésicules de sécrétions entourées d'une membrane lipidique émises par la prostate (Utleg et al. 2003; Brouwers et al. 2013). Le protéome des prostasomes revèlent 139 protéines identifiées et se répartissant en plusieurs catégories : enzymes (33,8%), protéines de transport ou de structure (19,4%), protéines de transduction du signal (17,3%), protéines GTP (14,4), protéines chaperonnes (5,8%) et 9,4% des protéines ne sont pas caractérisées (Utleg et al. 2003). Depuis, l'équipe de Drake et al., a complété le protéome des sécrétions prostatiques par la production d'un catalogue de 916 protéines (Drake et al. 2010). L'équipe de Brouwers et al. identifie et précise la composition lipidique de la membrane de deux populations de prostasomes (Brouwers et al. 2013). Kumar et al. se sont intéressés aux protéines de liaison à l'héparine impliquées dans la capacitation et la réaction acrosomique (Kumar et al. 2009).

L'étude protéomique du plasma séminal est sans conteste d'un intérêt pertinent dans la compréhension du dialogue spermatozoïde – plasma séminal. Les marqueurs identifiés devraient permettre de renseigner facilement sur la qualité du sperme et en améliorer l'analyse.

Références	Etude protéomique du plasma séminal	Résultats
(Utleug et al. 2003)	Protéome des prostasomes (LC MS-MS)	139 protéines identifiées
(Fung et al. 2004)	Protéome du plasma séminal de l'homme normozoosperme (2DE-MALDI TOF ; 1DE-LC MS-MS)	100 protéines identifiées
(Pilch and Mann 2006)	Protéome du plasma séminal de l'homme normozoosperme (1DE-LC MS-MS)	923 protéines identifiées
(Kumar et al. 2009)	Protéines de liaison à l'héparine (2DE-MALDI TOF)	40 protéines identifiées
(Drake et al. 2010)	Protéome des sécrétions prostatiques	916 protéines identifiées
(Milardi et al. 2012)	Protéome du plasma séminal de jeunes pères (nano HPLC-MS-MS)	1000 protéines dont 83 communes à tous les sujets étudiés
(Rolland et al. 2012)	Marqueurs du tractus génital (nano LC-MS-MS)	TKTL1, LDHC et PGK2 associés aux donneurs fertiles
(Brouwers et al. 2013)	Protéome de la composition lipidique du prostasome (HILIC-APCI-QTRAP)	Différence de composition en sphingomyélines et hexosylceramides

Tableau 5 : Les différentes études protéomiques du plasma séminal.

LC MS-MS : liquid chromatography – mass spectrometry ; 2DE : électrophorèse bidimensionnelle ; MALDI TOF : source d'ionisation par désorption laser assistée par une matrice – analyseur temps de vol ; 1DE : électrophorèse monodimensionnelle ; HPLC : high performance liquid chromatography ; HILIC : hydrophylic interaction chromatography ; APCI-QTRAP : source à ionisation chimique à pression atmosphérique – analyseur quadripolaire et trappe linéaire

2. Le protéome du spermatozoïde

Les innovations technologiques en protéomique sont en plein essor et permettent aujourd'hui d'aborder l'étude du spermatozoïde humain (Oliva et al. 2010). Toutefois, la principale difficulté à l'étude du protéome du spermatozoïde est la pollution protéique du plasma séminal et des cellules rondes.

Afin de comprendre la physiologie spermatique, le challenge était de caractériser le protéome global du spermatozoïde. Les études portant sur le protéome spermatique sont référencées dans le tableau 6. Martinez-Heredia et al. proposent en 2006 pour la première fois, une carte réalisée en 2DE-MALDI-TOF de 98 protéines du spermatozoïde complétée depuis par des analyses de compartiments cellulaires (Martínez-Heredia et al. 2006). Les spots étaient focalisés de façon homogène entre les pI 5 et 8 et les protéines majoritaires apparaissaient plutôt dans les hauts poids moléculaires (PM>50 kDa). L'analyse *Gene Ontology* des protéines identifiées a permis de caractériser les fonctions de ces protéines : production d'énergie (23%), transcription et synthèse protéine (23%), cycle cellulaire - apoptose et stress oxydant (10%), transduction du signal (8%), cytosquelette et mouvement du flagelle (10%), reconnaissance cellulaire (7%), métabolisme (6%), et fonctions inconnues (11%). Les avancées technologiques ont ensuite permis à Baker et al. d'isoler 1056 produits de gènes par la LC MS-MS (Baker et al. 2007). Toutefois, c'est l'équipe chinoise de Wang et al. qui a obtenu le protéome le plus complet avec 4675 protéines identifiées (Wang et al. 2013). Les auteurs se sont intéressés aux protéines cible de drogue avec pour objectif le développement d'un contraceptif masculin. Ainsi, l'admission d'inhibiteur à l'ALDH2 (aldéhyde déshydrogénase 2), la FAAH (fatty acide amide hydrolase), la RAF1 et la DHODH (dihydroorotate déshydrogénase) a permis de mettre en lumière leurs rôles dans la mobilité spermatique.

Références	Protéome	Résultats
(Martínez-Heredia et al. 2006)	Protéome du spermatozoïde (2DE – MALDI TOF)	98 protéines identifiées
(Baker et al. 2007)	Protéome du spermatozoïde (1DE -LC MS-MS)	1056 produits de gènes identifiés
(Wang et al. 2013)	Protéome du spermatozoïde (chromatographie-LC MS-MS)	4675 protéines identifiées

Tableau 6 : Les différentes études protéomiques du spermatozoïde.

2DE : électrophorèse bidimensionnelle; MALDI TOF : source d'ionisation par désorption laser assistée par une matrice – analyseur temps de vol; 1DE : électrophorèse monodimensionnelle ; LC MS-MS : liquid chromatography – mass spectrometry

Afin d'enrichir les connaissances sur le protéome spermatique, les équipes ont réalisé des fractionnements cellulaires (Tableau 7). Les premières études protéomiques sur le spermatozoïde ont porté sur la membrane plasmique du spermatozoïde en raison de son rôle fondamental dans la fécondation (Brewis et Gadella 2010; Yurttas et al. 2010). Xu et al. proposent en 1994 la première carte réalisée en 2DE, qui a permis la résolution de 117 protéines (Xu et al. 1994). Une autre approche basée sur le radiomarquage des protéines membranaires a permis à Naaby-Hansen et al. d'établir une seconde carte de 98 protéines (Naaby-Hansen et al. 1997). Toutefois, les limites technologiques de l'époque n'ont pas permis d'identifier ces protéines ainsi focalisées. Depuis, les études sur la membrane du spermatozoïde ont pour objectif l'identification de protéines impliquées dans l'interaction ovocyte-spermatozoïde pour la contraception masculine (Domagala et Kurpisz 2004). L'équipe espagnole d'Oliva et al. s'est intéressée à la condensation de la chromatine et aux protéines nucléaires (Oliva 2006; De Mateo et al. 2009; 2011; Oliva et Castillo 2011; Oliva et Ballescà 2011). Pour cela, les noyaux ont été isolés et 403 protéines nucléaires identifiées, en particulier, des histones et des facteurs de transcription probablement impliqués dans les marques épigénétiques et le développement de l'embryon (De Mateo et al. 2011). Plus récemment, l'équipe de Baker et al. a réalisé un fractionnement tête-flagelle et caractérisé les protéines présentes dans chaque fraction (Baker et al. 2013). Par cette méthode, 704 protéines de la tête et 901 protéines flagellaires ont été identifiées. Parmi les protéines, l'expression de nouvelles tyrosines kinases a été démontrée. Ces données renforcent l'importance de la phosphorylation de la physiologie spermatique. L'équipe d'Amaral et al. s'est intéressée au flagelle et identifie 1049 protéines (Amaral et al. 2013). Elle démontre la présence de

la voie de la β -oxydation des acides gras dans la mitochondrie probablement impliquée dans la mobilité du spermatozoïde.

Références	Protéome	Résultats
(Xu et al. 1994)	Carte de la membrane plasmique (2DE)	117 protéines non identifiées
(Naaby-Hansen et al. 1997)	Carte de la membrane plasmique par radiomarquage (2DE)	98 protéines non identifiées
(Wang et al. 2013)	Protéome du spermatozoïde (chromatographie-LC MS-MS)	4675 protéines identifiées
(de Mateo et al. 2011)	Protéome du noyau du spermatozoïde (1DE/2DE-LC MS-MS)	403 protéines identifiées
(Amaral et al. 2013)	Protéome du flagelle (1DE-LC MS-MS)	1049 protéines identifiées
(Baker et al. 2013)	Protéome de la tête et du flagelle (1DE-LC MS-MS)	704 protéines de la tête et 901 protéines flagellaires identifiées

Tableau 7 Les différentes études protéomiques des compartiments du spermatozoïde.

2DE: électrophorèse bidimensionnelle ; LC MS-MS: liquid chromatography - mass spectrometry; 1DE: électrophorèse monodimensionnelle

3. La recherche de biomarqueurs dans le spermatozoïde humain

Chez l'homme normozoospermique, des protéines particulières ont fait l'objet d'études plus précises en raison de leurs rôles connus dans la fécondation et ont été proposées comme marqueurs de qualité du spermatozoïde (Figure 21). C'est le cas par exemple, des protamines dont le ratio P1/P2 semble être corrélé à un meilleur taux de fécondation (Aoki et al. 2006; De Mateo et al. 2009). L'activité du complexe proacrosine-acrosine a également été proposée comme marqueur de qualité du spermatozoïde (Chaudhury et al. 2005). L'activité mesurée semble réduite chez les hommes normozoospermes infertiles. Au niveau de l'axonème, l'expression de l'enzyme CYP24A1 apparaît significativement plus élevée chez les hommes normozoospermes fertiles (Blomberg Jensen et al. 2012). Les protéines mitochondriales ont également fait l'objet d'études. C'est le cas de la prohibitine dont l'ubiquitination semble être plus importante dans les spermatozoïdes anormaux (Thompson et al. 2003). Ces données suggèrent un

mécanisme de reconnaissance des spermatozoïdes anormaux afin qu'ils soient éliminés. De la même façon, les protéines impliquées dans la voie apoptotique apparaissent surexprimées chez les hommes normozoospermes infertiles dont le test TUNEL est positif (Zorn et al. 2012). Par ailleurs la PTPN14 (protein tyrosine phosphatase non receptor 14) est associée à la mobilité spermatique (Chao et al. 2011). L'expression de la protéine PTPN14 chez les hommes normozoospermiques infertiles semble proche de celle des hommes asthénozoospermes, comparée aux contrôles fertiles.

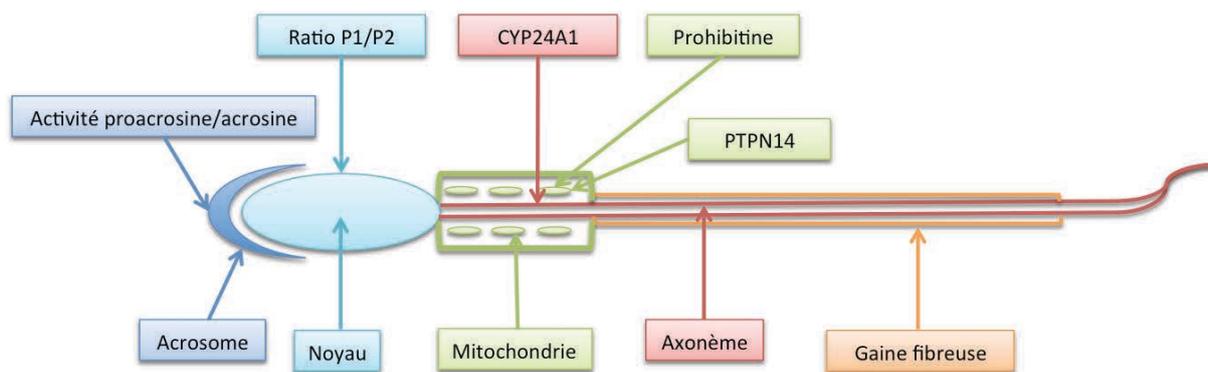


Figure 21 : Les biomarqueurs protéiques de qualité du spermatozoïde.

Dans le contexte de la Procréation Médicalement Assistée, la compréhension de l'infertilité chez les hommes normozoospermes a conduit l'équipe de Pixton et al. à comparer sans *a priori* les protéomes d'hommes fertiles à ceux d'hommes en échec en FIV (Pixton et al. 2004). Parmi les 20 protéines sous exprimées, la ODF2 et la secretory actin-binding protein ont été identifiées. Ces protéines impliquées dans la mobilité spermatique pourraient être à l'origine de l'infertilité. Avec le même objectif, Xu et al. ont réalisé une étude protéomique comparative (Xu et al. 2012). Le protéome d'hommes normozoospermes fertiles et infertiles a été analysé par 2DE-MALDI-TOF. Ce travail démontre la sur ou sous expression de 24 protéines. Parmi les protéines surexprimées, l'annexine V dont le rôle dans l'apoptose est connu et les séménogélines ont été identifiées. Ces résultats suggèrent l'emprisonnement des spermatozoïdes dans le coagulum et une activation de la voie apoptotique. Parmi les protéines sous-exprimées, les protéines flagellaires impliquées dans la mobilité ont été identifiées. Il s'agit de l' α -

tubuline, les ODF et l'AKAP4. Ces données suggèrent un défaut de mobilité bien que le sperme soit normal.

La recherche et l'identification de biomarqueurs de qualité du spermatozoïde apparaissent comme les enjeux fondamentaux dans le contexte de la fertilité masculine. Ces marqueurs permettront d'affiner l'analyse du sperme, et plus largement, d'améliorer la prise du couple en Procréation Médicalement Assistée.

Objectifs

Le spermatozoïde est une cellule hautement spécialisée qui présente une composition biochimique compartimentalisée en raison de son organisation structurale. A la sortie du testicule, le spermatozoïde n'est pas mobile et incapable de féconder un ovocyte. C'est par des interactions avec son environnement qu'il acquiert ses fonctions. Ces interactions se traduisent par des modifications biochimiques telles que des clivages, des modifications post-traductionnelles et une relocalisation des protéines. **Ainsi, la protéomique est une méthode de choix pour étudier la physiologie spermatique et définir de nouveaux marqueurs de qualité du spermatozoïde.**

1) Les avancées technologiques dans le domaine de la protéomique permettent aujourd'hui d'étudier le protéome du spermatozoïde et de ses compartiments cellulaires de façon hautement résolutive. Au cours de ce travail, nous avons utilisé une double approche pour caractériser le protéome du spermatozoïde humain : l'électrophorèse bidimensionnelle associée à la spectrométrie de masse MALDI-TOF (Approche 2D) et l'électrophorèse monodimensionnelle associée à la spectrométrie de masse en tandem sur un LTQ-Orbitrap (Approche Shotgun). La 1^{ère} approche permet de caractériser un protéome global et une analyse fine des protéines. La seconde approche est hautement résolutive en ce qui concerne l'identification des protéines. L'analyse bioinformatique des protéines identifiées a permis l'identification et la caractérisation du profil d'expression d'une protéine d'association aux microtubules jamais décrite dans le testicule et le spermatozoïde humain. Ce travail correspond à l'étude 1.

2) Les données obtenues par l'analyse bioinformatique du protéome du spermatozoïde nous ont conduit à nous intéresser aux protéines impliquées dans la voie du protéasome. Ce travail a permis la caractérisation du profil d'expression d'une E3-ubiquitine-ligase pour la 1^{ère} fois dans le testicule et le spermatozoïde humain. Ce travail correspond à l'étude 2.

3) Outre la compréhension de processus physiologiques, les outils protéomiques permettent l'identification de nouveaux marqueurs de qualité du spermatozoïde. La caractérisation de la qualité spermatique repose actuellement sur un examen descriptif, le spermogramme - spermocytogramme, qui ne permet pas toujours d'expliquer

l'infertilité du couple. Ainsi, l'amélioration des outils diagnostics et de la prise en charge de la fertilité sont les enjeux actuels de la Procréation Médicalement Assistée.

Avec l'étude du profil protéique spermatique de 161 patients normozoospermes, nous avons observé des différences qui ont mené à l'établissement d'un index de qualité protéique et à l'identification de deux protéines. Ces protéines représentent des candidates particulièrement intéressantes comme marqueurs de qualité du spermatozoïde. Cette étude 3 fait l'objet d'une déclaration d'invention auprès de Inserm Transfert.

Résultats

Les résultats obtenus au cours de mon travail de thèse ont donné lieu à :

- Une déclaration d'invention intitulée : « **Composition et méthode d'un test diagnostique du risque d'infertilité chez l'homme, Human Sperm Proteome Quality Index (SPQI): a new marker to be considered with sperm parameters** », Inserm Transfert (page 116).

- une publication en attente de soumission (étude 3) : « **Human Sperm Proteome Quality Index (SPQI): a new marker to be considered with sperm parameters** ».

F. Jumeau, J. Sigala, F. Fernandez-Gomez, C. Carpentier, H. Obriot, S. Eddarkaoui, S. Duban-Deweere, J. Hachani, CM. Dhaenens, ML. Caillet-Boudin, MC. Peers, JM. Rigot, L. Buée, N. Sergeant & V. Mitchell.

- une publication en préparation (étude 1) : « **Human Sperm Proteome reveals DCDC2C as a new microtubule associated protein of sperm flagellum** ».

F. Jumeau, FJ Fernandez-Gomez, C. Carpentier, S. Chocu, H. Obriot, S. Eddarkaoui, M. Tardivel, J. Hachani, S. Duban-Deweere, CM. Dhaenens, F. Halgand, F. Chalmel, ML. Caillet-Boudin, JM. Rigot, L. Buée, C. Pineau, N. Sergeant & V. Mitchell.

ETUDE 1

LE PROTEOME DU SPERMATOZOÏDE HUMAIN REVELE LA DCDC2C, UNE NOUVELLE PROTEINE ASSOCIEE AUX MICROTUBULES

Les avancées récentes dans le domaine de la protéomique permettent de caractériser le protéome du spermatozoïde afin de mieux en appréhender la physiologie. Toutefois, peu d'études ont aujourd'hui été publiées et le protéome du spermatozoïde reste mal connu. Nous avons étudié le protéome du spermatozoïde humain, pour la 1^{ère} fois, par deux approches et caractérisé l'expression de la protéine DCDC2C, une protéine d'association aux microtubules.

L'électrophorèse bidimensionnelle (2DE) permet de séparer les protéines en fonction de leur pI et de leur poids moléculaire. Bien que peu résolutive comparée aux nouvelles technologies, cette méthode permet une analyse plus fine des protéines majoritaires et de leurs modifications post-traductionnelles. L'approche shotgun, hautement résolutive, est, quant à elle, adaptée pour l'identification des protéines à haut débit. La stratégie expérimentale adoptée dans cette étude est résumée dans la figure 1.

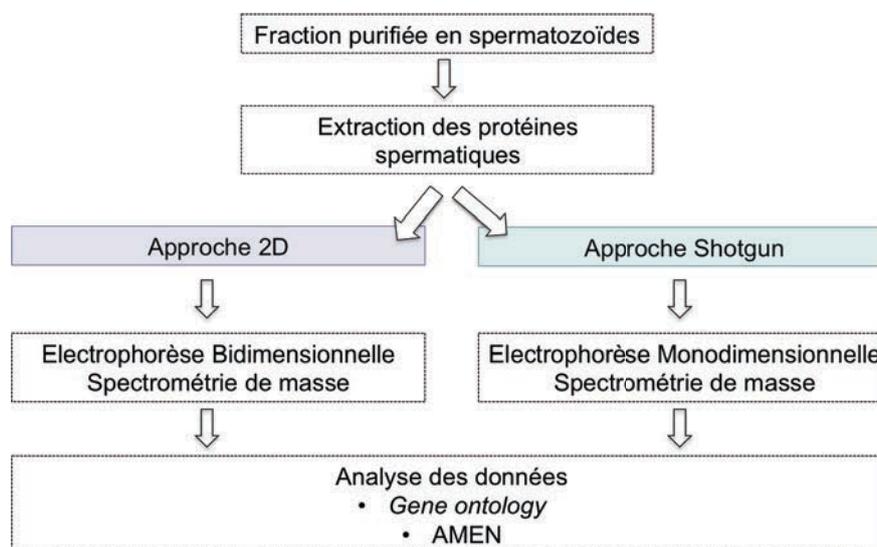


Figure 1 : Stratégie expérimentale de l'étude

Dans cette étude, la 2DE a permis l'identification de 209 protéines complétant ainsi la carte de référence de 98 protéines (Martínez-Heredia et al. 2006). Associé aux résultats du shotgun, 2016 protéines ont été identifiées dans le spermatozoïde humain.

Dans la littérature, 6 publications portent sur le protéome du spermatozoïde humain. Pour la moitié, il s'agit d'études portant sur le protéome global (Martínez-Heredia et al. 2006; Baker et al. 2007; Wang et al. 2013). Pour l'autre moitié, les auteurs se sont concentrés sur le protéome d'un compartiment du spermatozoïde (De Mateo et al. 2011; Amaral et al. 2013; Baker et al. 2013). Au total, l'analyse des jeux de données de la littérature rapporte l'identification de 5129 protéines. Bien que les méthodologies soient comparables, l'analyse de ces différents jeux de données montre que seulement 48 protéines sont communes à toutes les études. Ces résultats révèlent la complexité du protéome du spermatozoïde.

Notre analyse *gene ontology* a permis de répartir les protéines identifiées selon leur localisation cellulaire, les processus biologiques auxquelles elles sont associées et leur fonction moléculaire. Nos résultats sont cohérents avec la structure et la fonction du spermatozoïde. Par exemple, les protéines nucléaires, membranaires et mitochondriales représentent 53% des protéines identifiées. *A contrario*, les protéines golgiennes sont minoritaires (5%). Nos résultats complètent ceux obtenus avec le même type d'analyse par Martínez-Heredia et al. et Baker et al. (2007).

Nous avons réalisé une analyse bioinformatique au moyen du logiciel AMEN, conçu de façon originale par Frédéric Chalmel (IRSET U1085) et développé par la plateforme de protéomique Biogenouest de Rennes. Cet outil permet d'identifier entre autre, les familles de protéines sur ou sous-exprimées significativement dans notre protéome en comparaison avec la répartition théorique de l'annotation du génome. Les protéines impliquées dans les fonctions fondamentales du spermatozoïde comme la mobilité spermatique ou l'interaction spermatozoïde – ovocyte sont surexprimées. De façon intéressante, les microtubules et les protéines impliquées dans la dynamique du réseau microtubulaire apparaissent significativement surexprimés. Les microtubules jouent un rôle fondamental dans la mobilité du spermatozoïde. Dans le testicule, ils participent notamment au déplacement des cellules germinales dans l'épithélium du tube

séminifère au cours de la spermatogenèse. Parmi les protéines impliquées dans la dynamique du réseau microtubulaire, la protéine DCDC2C appartenant à la famille des protéines à domaine doublecortine a été identifiée. Ces protéines sont essentiellement décrites au niveau du cerveau et à notre connaissance, la protéine DCDC2C n'a jamais été décrite dans le testicule et le spermatozoïde humain. L'expression du transcrit et de la protéine a été détectée dans les cellules germinales testiculaires humaines (immunofluorescence, immunoempreinte et RT-PCR). Dans le spermatozoïde, la protéine est localisée dans la partie terminale du flagelle (immunoempreinte et immunofluorescence). La localisation de cette protéine est à la fois surprenante et intéressante. Dans la littérature, la doublecortine (protéine de la famille à domaine doublecortine) a été colocalisée avec la stathmine dans la partie terminale de l'axone de culture primaire de neurones (Jin et al. 2004). La stathmine est une protéine impliquée dans la dépolymérisation des microtubules. La doublecortine et la stathmine agiraient de concert dans la dynamique du réseau microtubulaire. L'expression de la stathmine dans le testicule de rat a été d'ores et déjà été décrit (Guillaume et al. 2001) et la protéine a été identifiée dans notre protéome du spermatozoïde. Ainsi, par analogie, la DCDC2C pourrait jouer un rôle compensatoire à celui de la stathmine.

En conclusion, dans cette étude, nous avons caractérisé le protéome du spermatozoïde humain par deux approches. La protéomique offre désormais d'importants jeux de données révélant de nombreuses protéines jamais décrites dans le spermatozoïde humain. Ainsi, la protéomique représente un outil puissant pour comprendre la physiologie spermatique. Dans ce contexte, nous avons identifié et caractérisé l'expression de la protéine DCDC2C dans le testicule et le spermatozoïde humain. De plus amples études sont nécessaires afin de comprendre le rôle de la DCDC2C dans la spermatogenèse et le spermatozoïde.

Human Sperm Proteome reveals DCDC2C as a new microtubule associated protein of sperm flagellum

Authors :

Fanny Jumeau (1,2,3,4,5), Francisco-Jose Fernandez-Gomez (3,4,5), Céline Carpentier (3,4,5), Sophie Chocu (7), Hélène Obriot (3,4,5), Sabiha Eddarkaoui (3,4,5), Meryem Tardivel (3,4,5), Johann Hachani (6), Sophie Duban-Deweer (6), Claire-Marie Dhaenens (3,4,5), Frédéric Halgand (7), Frédéric Chalmel (7), Marie-Laure Caillet-Boudin (3,4,5), Jean-Marc Rigot (1,8), Luc Buée (3,4,5), Charles Pineau (7), Nicolas Sergeant (3,4,5)* & Valérie Mitchell (1,2,3,4,5)*

1. EA4308 Gametogenesis and Quality of the gamete
2. Institut de Biologie de la Reproduction – Spermiologie – CECOS, CHRU-LILLE, F-59037 Lille, France
3. Inserm UMR 837 – 1 Alzheimer & Tauopathies, Jean-Pierre Aubert Research Center, F-59045 Lille, France
4. University Lille Nord de France, Lille, France
5. University Lille II, IMPRT, IFR114, Lille, France
6. Centre d'Analyse Protéomique de l'Artois CAPA, Lens, France
7. Plateforme Biogenouest Rennes
8. Service d'Andrologie, CHRU Lille, F-59037 Lille, France

*Authors equally contributed to this work

Corresponding author :

Fanny Jumeau, fanny.jumeau@inserm.fr

Key words : human sperm proteome, DCDC2C, microtubules

Abstract

Recent advances in proteomic permit to characterize the human sperm proteome. Currently, few studies were published and the human sperm proteome remains not well known. In this study, we characterized the human sperm proteome by two approaches and identified DCDC2C as a new microtubule associated protein.

Spermatozoa were isolated from normal sperm (WHO 2010). Sperm proteins were extracted, separated by 1D/2D-electrophoresis (1DE/2DE) and identified by mass spectrometry. Dataset were analyzed according to *gene ontology* annotation (GO) and with AMEN software. Interest protein was selected among overexpressed proteins families and not yet described in testis or spermatozoa. DCDC2C, a doublecortin containing domain protein, was sorted from these analyses. Its expression was assessed by RT-PCR, western blotting and immunofluorescence.

2DE revealed 209 proteins, associated to shotgun data (1DE associated to mass spectrometry), 2016 proteins were identified in this study.

Proteins belonged to mitochondria, nucleus and membrane represented 53% of proteins. In the over hand, reproductive processes as sperm motility, meiosis or sperm-egg recognition were overexpressed according to AMEN analysis. Then, GO and AMEN analysis were relevant with sperm structure and function. Among data, microtubule dynamics appeared strongly overexpressed. DCDC2C, a doublecortin containing domain protein, was identified and never described in human testis and spermatozoa. In testis, DCDC2C was detected by western blotting, RT-PCR and immunofluorescence. It localized in germ cell. In spermatozoa, DCDC2C was strongly detected by western blotting and localized in terminal piece of sperm flagellum.

Altogether, our results suggest that proteome analysis of human spermatozoa may be a powerfull tool to further assess and understand sperm physiology. In this study, we characterized human sperm proteome and identified DCDC2C as a new microtubule associated proteins.

Introduction

Spermatogenesis is a complex process located in seminiferous tubules and mediated by hormonal regulation (for review (Alves et al. 2013)). It is divided into three parts: mitotic, meiotic and differentiation phases (for review (Chocu et al. 2012; Alves et al. 2013)). Spermatogonia produce germ cells and after differentiation the spermatozoa is a haploid cell highly specialized. Germ cells undergo many modifications such as chromatin remodeling (for review (Wykes 2003; Björndahl and Kvist 2010; Johnson et al. 2010)) or biogenesis of acrosomal vesicle and flagellum (for review (Moreno and Alvarado 2006; Valbuena et al. 2008; Oko and Sutovsky 2009; Berruti and Paiardi 2011)). During spermatogenesis, the sperm cell loses its cellular organelles such as Golgi apparatus or endoplasmic reticulum (for review (Cooper 2010)). Hence, mature spermatozoa could probably not realize a protein synthesis or is really limited to specific proteins (for review (Baker et al. 2012)). Consequently, the sperm proteome could reveal the complexity of spermatogenesis.

Spermatozoa are the only cells produced by someone with a function located outside the male body. Its function is to deliver the paternal genome to the oocyte according to species selection and fusion with the female gametes to constitute the embryo (for review (Nixon et al. 2007)). To respond to its function, spermatozoa are highly differentiated cells and compartmentalized. Each sperm compartment has a specific function. The head contains an acrosomal vesicle composed of enzymes necessary for sperm penetration through the envelope of the oocyte, the anterior part of the head. The nucleus presents highly compacted chromatin owing to protamines to protect the male genome (Johnson et al. 2010; Oliva and Castillo 2011). The flagellum is a powerful mechanism to move through the female genital tract and is organized in three parts with a common structure, the axoneme composed of nine pairs of microtubules and one in the center (for review (Buffone et al. 2011; Inaba 2011; Sperry 2012)). In the first part, named the middle piece, mitochondria arranged as a helix around the axoneme produce energy necessary for sperm motility (for review (Piomboni et al. 2012)). In the second part, the principal piece, the fibrous sheath composed of outer dense fibers surrounds the cytoskeleton (for review (Eddy et al. 2003)). In the terminal piece, the cytoskeleton disorganizes itself progressively. Then, the sperm proteome is organized in spermatozoa.

In order to become a specialized cell with fertilizing properties, spermatozoa acquire the mobility and capacitation. However, in the testis, spermatozoa could not move and is unable to fertilize an oocyte. By different interaction with its environment, it acquires these functions (Toshimori 2003; Baker et al. 2005; Aitken et al. 2007; Baker et al. 2012; Dacheux et al. 2012). These different interactions are translated by proteome modification. In the epididymis, activation of a cAMP-induced tyrosine phosphorylation cascade was associated with progressive acquisition of sperm motility first, poorly in corpus and finally, fully in cauda (Aitken et al. 2007). Phosphorylation is a post-translational modification occurring during sperm maturation in epididymis. Phosphorylated residues were founded in the entire tail of spermatozoa and are correlated with c-AMP pathways activation. For example, the β -subunit of the mitochondrial F1-ATPase is phosphorylated on there serine residues (Baker et al. 2005) and probably associated with energy production necessary for sperm motility.

In the oviduct, sperm cell realizes its capacitation, a fundamental last step of maturation before the fertilization. Proteins are cleaved or submitted to post-translational modifications (Baker et al. 2005; Aitken et al. 2007; Baker et al. 2012). For example, capacitation step is characterized by a phosphorylation of tyrosine residue from HSP90 (Ecroyd 2003). In this condition, sperm proteome could explain sperm physiology. In this way, many efforts were realized to set up a biochemical approach specially a proteomic method. First study used a 2DE-MS approach in order to focused proteins from whole spermatozoa (Martínez-Heredia et al. 2006). By this way, 98 proteins could be identified. In a 2DE map, 3872 spots were observed and 16 proteins were identified (Li et al. 2007). Proteomics advances permitted to use a more sensible technic 1D-RP LC-ESI-MS and the identification of 1053 gene products (Baker et al. 2007). Since, few studies from each sperm compartments were realized. De Mateo et al. characterized the sperm nucleus with 66 proteins issued from 2DE-MS and 403 from 1DE-MS (De Mateo et al. 2011). More recently, Amaral et al. isolated and characterized 1049 proteins from sperm tail in order to identify new metabolic pathways (Amaral et al. 2012). Baker et al. separated head and flagellum in order to identify proteins present specifically in each parts (Baker et al. 2013). The most extensive proteome published contains 4675 proteins (Wang et al. 2013). New proteins were currently identified revealing the complexity of the human sperm proteome.

Currently, challenge is to identify protein from a proteomic dataset with the goal to characterize sperm physiology or to identify marker of sperm dysfunction. In this study, we produced a dataset of 2016 different proteins obtained by a proteomic approach with 2D-electrophoresis and shotgun methods. We identified DCDC2C, a doublecortin containing domain, as new protein associated to sperm microtubules.

Material & Methods

Sample collection and preparation

Human semen samples were collected from anonymous men who attended the Spermiology laboratory (Lille university center hospital). The semen were obtained between 3 and 5 days of sexual abstinence following masturbation and allowed to liquefy 30 min at 37°C. After liquefaction, the semen parameters (volume, pH, cell counting and motility) were evaluated according to the WHO criteria 2010. Spermatozoa were diluted (1/20) in Ringer medium and counted with an hemocytometer (Malassez cell counting). The progressive motility was evaluated by light microscopy on 5 fields and 100 spermatozoa were observed. The progressive motility (PR) was defined by the number of spermatozoa cells moving actively, either linearly or in a large circle, regardless of speed (WHO 2010). The sperm morphology characterization (spermocytogram) was performed with Schorr's staining. All the semen were normal according to the WHO manual for the examination of human semen (WHO 2010). Men were given informed consent for the use of their semen for research purposes.

Sperm cells were separated from the semen plasma and round cells by a density gradient composed of 50% ferticult (Fertipro, Beernem, Belgium) / 50% PureSperm (Nidacon, Mölndal, Sweden) in a 15 ml sterile Falcon tube (Falcon). After centrifugation (350 x g, 20 min at room temperature), the sperm pellet was washed with 1mL of Tris buffer saline (TBS) (Tris-HCl 0.1mM pH 7.6, 100mM NaCl) by centrifugation (350 x g, 20 min at room temperature).

Testicular sample collection

The testis specimen was collected from a 31 years old man by biopsy for obstructive azoospermia. It was fixed in Bouin's solution and paraffin embedded. It was used for morphological and immunohistochemical examinations. The specimen presented a normal morphology after the histo-pathological diagnosis.

Protein extract

The pellet of spermatozoa or testis tissue was resuspended in 500 µl of lysis buffer containing 2M Thiourea – 8M Urea – 4% CHAPS (GE Healthcare). The lysates were sonicated on ice (40 Hz, 60 pulses) and centrifuged (14,000 x g, 20 min at 4°C). The

supernatants were recovered and the pellets discarded. The protein concentrations were established according to the manufacturer's instructions (Bradford Assay, BioRad, CA USA). Protein lysates were frozen at -80°C until used. SY5Y, a neuroblastoma cell lineage was used as control and processed as spermatozoa.

2D electrophoresis

Protein extract from 5 ejaculates were pooled, 3 different pools were constituted and analyzed. Protein concentration from each pool was established according to the manufacturer's instructions (Bradford Assay, BioRad, CA USA). A volume corresponding to 800 µg of proteins were taken and placed in rehydration with immobiline dry strips 18 cm IPG non linear strip pH 3-11 (GE Healthcare) under oil overnight at room temperature. Strips were focused at 20°C with Ettan IPGPhor 3 (GE Healthcare) at 50V during 2 min (step), 500V during 1h (step), 1000V during 1h (gradient), 6000V during 40 min (gradient), 6000V during 2h (gradient). Intensity was 50 µA/strips. Strips were stored at -20°C before used. Strips were equilibrated with two baths during 15 min at room temperature. Both contained 6M Urea – 2% SDS – 30% Glycerol – 50mM Tris-HCl pH8.6. In the first bath was added 1% DTT and in the second, 4.7% iodoacetamide. Strips were placed on 12% acrylamide gel and recovered by 0.5% agarose gel added of 1% bromophenol blue (Biorad, CA USA). Running buffer was composed by TG 1X buffer (25mM Tris – 192mM Glycine – 1.1% (w/v) SDS – pH 8.3, Biorad, CA USA) in the lower part of electrophoresis cell and 2% SDS were added to this buffer in the higher part. Electrophoresis was running at 2.5W/gel during 15h at 4°C. Gels were fixed (50% ethanol (v/v) – 3% orthophosphoric acid (v/v) – H₂O) overnight, rehydrated (2h – H₂O) and stained (34% methanol (v/v) – 17% ammonium sulfate (p/v) – 2% orthophosphoric acid (v/v) – H₂O) during 24h. The gels were digitized with an Epson perfection V750 Pro scanner (Epson, France) and Adobe Photoshop Element 9 software (Adobe, France).

Peptide isolation and Mass spectrometry MALDI TOF identification

Protein identifications from 2-DE gels were performed using a Proteineer™ workflow from Bruker Daltonics GmbH (Bremen, Germany). Briefly, colloidal Coomassie-blue-stained spots were excised from gels with a spot picker (PROTEINEER spII) and placed in 96-well microtiter plates. In-gel digestion and sample preparation for MALDI analysis

were performed according to the manufacturer's instructions using a digester/spotter robot (PROTEINEER dp) and tryptic digest kits (DP 96 standard kit, Bruker Daltonics). The MALDI target plate (AnchorChip™, Bruker Daltonics) was covered with extracted peptides mixed up with α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid matrix (0.3 mg/ml in acetone:ethanol, 3:6 v/v). The molecular mass measurements were performed in automatic mode using FlexControl™ 3.3 software on an Ultraflex™ II TOF/TOF instrument and in the reflectron mode for MALDI-TOF peptide mass fingerprint (PMF) or "LIFT" mode for MALDI-TOF/TOF peptide fragmentation fingerprint (PFF). External calibration over a 1000-3200 mass range was performed using the [M+H]⁺ monoisotopic ions of bradikinin 1-7, angiotensin I, angiotensin II, substance P, bombesin, and adrenocorticotrophic hormone (clip 1-17 and clip 18-39) from a peptide calibration standard kit (Bruker Daltonics). Briefly, an accelerating voltage of 25 kV, a reflector voltage of 26,3 kV and a pulsed ion extraction of 160 ns were used to obtain the MS spectrum. Each spectrum was produced by accumulating data from 800 laser shots. A maximum of four precursor ions per sample were chosen for LIFT-TOF/TOF MS/MS analysis. Precursor ions were accelerated to 8 kV and selected in a timed ion gate. Metastable ions generated by laser-induced decomposition (LID) were further accelerated by 19 kV in the LIFT cell and their masses measured in reflectron mode. Peak lists were generated from MS and MS/MS spectra using Flexanalysis™ 3.3 software (Bruker Daltonics). Database searches, through Mascot 2.3 (Matrix Science Ltd, London, UK), using combined PMF and PFF datasets were performed in the UniProt 2012_01 database via ProteinScape 2.1 (Bruker Daltonics). A mass tolerance of 75 ppm and 1 missing cleavage site for PMF and MS/MS tolerance of 0.5 Da and 1 missing cleavage site for MS/MS search were allowed. Carbamidomethylation of cysteine and oxidation of methionine residues were also considered. Relevance of protein identities was judged according to the probability based Mowse score calculated with a P-value of 0.05 ($P < 0.05$).

1D electrophoresis

A pool of 5 sperm samples were constituted and analyzed. A total of 40 μ g of sperm protein extract was diluted in LDS 2X (Lithium dodecyl sulfate, Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Protein homogenate was boiled at 100°C during 10 min, quickly spun at 500xg using a bench centrifuge and loaded on 4-12% acrylamide gel

(Criterion 12 wells, Biorad, CA USA). Electrophoresis was performed under a continuous voltage of 200V during 1h. The gel was stained with Coomassie Blue [0.1% Blue G250 (Biorad, CA USA), 50% ethanol (v/v), 10% acetic acid (v/v) and H₂O]. The staining was visualized after washing with a destaining solution containing 7% (v/v) of acetic acid, 10% ethanol in H₂O.

Peptide isolation and Mass spectrometry Orbitrap identification

The MS measurements were done with a nanoflow high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Dionex, LC Packings Ultimate 3000) connected to a hybrid LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) equipped with a nanoelectrospray ion source (New Objective). The HPLC system consists of a solvent degasser nanoflow pump, a thermostated column oven kept at 30°C, and a thermostated autosampler kept at 8 °C to reduce sample evaporation. Mobile A (99.9 % MilliQ water and 0.1% formic acid (v:v)) and B (99.9% acetonitrile and 0.1% formic acid (v:v)) phases for HPLC were delivered by the Ultimate 3000 nanoflow LC system (Dionex, LC Packings). 10 µl of prepared peptide mixture was loaded on a trapping precolumn (5 mm × 300 µm i.d., 300 Å pore size, Pepmap C18, 5 µm) for 3 minutes in 2% buffer B at a flow rate of 25 µl/minute. This step was followed by reverse-phase separations at a flow rate of 0.250 µl/minute using an analytical column (15 cm × 300 µm i.d., 300 Å pore size, Pepmap C18, 5 µm, Dionex, LC Packings). We ran a gradient ranging from 2% to 35% buffer B for the first 60 minutes, 35% to 60% buffer B from minutes 60-85, and 60% to 90% buffer B from minutes 85-105. Finally, the column was washed with 90% buffer B for 16 minutes, and with 2% buffer B for 19 minutes prior to loading of the next sample. The peptides were detected by directly eluting them from the HPLC column into the electrospray ion source of the mass spectrometer. An ESI voltage of 1.5 kV was applied to the HPLC buffer using the liquid junction provided by the nanoelectrospray ion source and the ion transfer tube temperature was set to 200°C.

The MS instrument was operated in its data-dependent mode by automatically switching between full survey scan MS and consecutive MS/MS acquisition. Survey full scan MS spectra (mass range 400–2000) were acquired in the Orbitrap section of the instrument with a resolution of R=60'000 at m/z 400; ion injection times are calculated for each spectrum to allow for accumulation of 10⁶ ions in the Orbitrap. The seven most intense

peptide ions in each survey scan with an intensity above 2000 counts (to avoid triggering fragmentation too early during the peptide elution profile) and a charge state ≥ 2 were sequentially isolated at a target value of 10'000 and fragmented in the linear ion trap by collision induced dissociation (CID). Normalized collision energy was set to 35 % with an activation time of 30 milliseconds. Peaks selected for fragmentation were automatically put on a dynamic exclusion list for 120 seconds with a mass tolerance of +/-10 ppm to avoid selecting the same ion for fragmentation more than once. The following parameters were used: the repeat count was set to 1, the exclusion list size limit was 500, singly charged precursors were rejected, and a maximum injection time was set at 500 ms and 300 ms for full MS and MS/MS scan events, respectively. For an optimal duty cycle the fragment ion spectra were recorded in the LTQ mass spectrometer in parallel with the Orbitrap full scan detection. For Orbitrap measurements, an external calibration was used before each injection series ensuring an overall error mass accuracy below 5 ppm for the detected peptides. MS data were saved in RAW file format (Thermo Fisher Scientific) using XCalibur 2.0.7 with tune 2.4.

Data processing, generation of exclusion lists and identification of peptides and proteins

The data analysis was performed with the Proteome Discoverer 1.2 software supported by Mascot (Matrixscience) database search engines for peptide and protein identification. MS/MS spectra were compared to a custom database that combined the Uniprot *Homo sapiens* theoretical proteome set, the super-set of all translations resulting from Ensembl known or novel gene predictions, and the sequences from our 58 560 novel assembled rat testis transcripts translated into the 6 reading frames. Mass tolerance for MS and MS/MS was set at 10 ppm and 0.5 Dalton, respectively. The enzyme selectivity was set to full trypsin with one miss cleavage allowed. Protein modifications were fixed carbamidomethylation of cysteines, variable oxidation of methionine, variable acetylation of lysine and variable phosphorylation of serine, threonine and tyrosine. Identified peptides were filtered based on Xcorr values and the Mascot score to obtain a false discovery rate of 1 % and a false positive rate of 5 %. We employed Proteome Discoverer to generate lists of peptides identified in the first and second run which are excluded in subsequent LC-MS/MS analyses. Prior to the third analysis, peptide exclusion files from the first two runs are combined. Lists of peptides not filtered out are exported as a text file containing uncharged and accurate mass values (at

four decimals) and a retention time window of approximately one minute. The instrument is configured to work with uncharged masses and to automatically calculate the mass of a peptide based on its exact mass and charge state. A mass tolerance of ± 10 ppm is used to reject previously identified peptides within the specified retention time window. Using lower values can lead to reselection of masses because in the parallel mode of operation on an LTQ Orbitrap XL, the parent ion selection for an ion trap MS/MS is based on an Orbitrap preview scan which is acquired at a lower resolution (RP 15'000) than the final Orbitrap full scan, and therefore the masses are less accurate.

Proteomic analyses with AMEN

Protein accession number for each protein from this and previous studies was converted in EntrezGene IDs using ID mapping module from uniprot (<http://www.uniprot.org/?tab=mapping>). Dataset were loaded in AMEN software (Chalmel and Primig 2008). To established *gene ontology* analyses, terms referencies (<http://www.geneontology.org>) from main cellular components, biological process and molecular function were used to find entries and referenced in Table 1 (Supplementary data S1). Group of proteins over-under expressed were defined with p-value < 0.01.

Immunohistochemistry of semen samples and testicular tissue

After sperm isolation, 100 μ L of homogenate were fixed with 2% paraformaldehyde in TBS 1X and incubated 15min at room temperature. Spermatozoa were isolated by centrifugation (10min, 350 x g) and supernatant was removed. Sperm pellet was suspended in TBS 1X and washed by centrifugation two times (10min, 350 x g). Sperm pellet was suspended in 100 μ L of TBS 1X. Thick drop was dropped-off on Superfrost slide (Menzel-Glazer, Germany) and conserved at 4°C.

Sperm slides and testicular sections were placed in citrate buffer pH6 and heat treatment was processed (4min 800W – 2x5min 400W). Slides were washed twice in TBS 1x (5min). 100 μ L of TBS 1X – BSA 0.2% were deposited on thick drop and slides were incubated 1h at room temperature. 100 μ L of primary antibody (DCDC2C, ab126564, Abcam, 1/200 in TBS 1X ; α - β -tubulin, T6793, Sigma-Aldrich, 1/200 in TBS 1X) covered thick drop and slides were incubated at 4°C overnight. Slides were washed two times 5min in TBS 1x at room temperature. Secondary antibodies (Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) ; Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) ;

Invitrogen (Eugene, Oregon, USA)) were diluted (1/400) in TBS 1× and slides were incubated during 1h at room temperature. Slides were washed twice 5min in TBS 1×. Vectashield Mounting Medium with DAPI (Vector laboratories, (Burlingham USA) ; H-1200) covered slides according to manufacturer's instructions.

The scan of DCDC2C immunostainings was performed with a LSM 710 confocal microscope (Zeiss, Jena, Germany) equipped with a Argon laser, with excitation at 488 for Alexa Fluor 488. A UV laser was used for DAPI with excitation at 405 nm. Acquisitions were performed in sequential mode and analyzed with Zeiss Efficient Navigation confocal software (Zeiss).

Western blotting

After electrophoresis, proteins were transferred to 0.45µm nitrocellulose membrane (Amersham, Life Science GE Healthcare, Piscataway NJ USA) using the NuPage Liquid Transfer System (Life Technologies) and according to the manufacturer's instructions. Membranes were blocked with a solution containing 5% skimmed milk – TNT (Tris-HCl 15 mM pH 8.0 – NaCl 140 mM, 0.05% (w/v) Tween-20). Membranes were incubated with the primary antibodies overnight at 4°C (DCDC2C, ab126564, Abcam, 1/2000 in TNT). Immuno-complexes were revealed after incubation with secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (horse anti-mouse: 1/50000 in TNT, Vector Laboratories, Burlingham USA) and detected using the ECL™ luminescence kit (Amersham, Life Science GE Healthcare, Piscataway NJ USA). The luminescence of immune-complexes was acquired with a LAS3000 imaging system (Fujifilm).

RT-PCR

Total RNA was isolated from cells using a total RNA extraction kit according to manufacturer's instruction (Nucleospin RNAII (Macherey-Nagel). RNA concentration was determined by measuring the absorbance at 260 nm using Nanodrop ND1000 technology (Labtech, France). RT-PCR was performed with 1,5 µg of total RNA using random hexamers (5 µM/l) and the M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, California, USA) according to standard protocols. PCR was carried out in a final volume of 10 µl with 10 pM of each primer (DCDC2C primers, Sense : 5'-AAACCAGTGGTGCATTGTGA-3', Antisense : 5'-CGCCTCCTAGAGGGAAGACT-3'; 18S primers, Sense : 5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3', Antisense : 5'-CGCTCCAAGATCCAACACTAC-3'), 5 µL of

GoTaq® GreenMasterMix (Promega) and 1 µl of cDNA under the following conditions: 3 min at 94°C, 17 to 30 cycles of a 30 sec denaturation step at 94°C, annealing for 1 min at specific temperature (DCDC2C : 60°C, 30 cycles ; 18S : 58°C, 17 cycles), 1 min of extension and 7 min of final extension at 72°C. 18S rRNA was used as an internal control. Reaction products were resolved by electrophoresis using a 3% agarose gel and bands were detected by staining with BET (Invitrogen). No DNA amplification was observed in PCR controls in absence of cDNA. Images were obtained using a Molecular Imager ® Gel Doc™ XR System (Bio-Rad).

Results

2D-electrophoresis (2DE) and Shotgun data analyses

On 2DE-Coomassie blue-stained gel, spots were distributed from pI 3 to 10 and from 10 to 110 kDa (Fig. 1). Distribution was homogeneous with many intense spots in acidic part upper to 50 kDa. 300 spots were excised and 209 different proteins were identified by mass spectrometry (MALDI – TOF).

After shotgun (1DE – LC MS-MS (Orbitrap)) analyses, 1638 proteins were characterized after the first run, 11% and 5% new polypeptides were identified after the second and the third run respectively (Fig 2.A). Finally, 1986 different proteins were identified.

Data from 2DE and shotgun analyses were grouped and proteins founded in both dataset were eliminated. Finally, a dataset with 2016 different proteins were obtained with 30 proteins founded with 2DE and not with the shotgun approach (Fig 2.B). Most of them belongs to sperm cytoskeleton in flagellum such as γ -actin or MYH 6/13/14.

Gene Ontology analysis of human sperm proteome (Fig. 3)

Among, cellular component distribution, membrane (23%), nucleus (18%) and mitochondrion (12%) represented 53% of sperm proteins. Proteins from Golgi apparatus and endoplasmic reticulum were minor, 5% and 4% respectively. Metabolism (40%) is the most important biological process (Fig. 3B). Energy production (14%), sperm motility (8%), signal transduction (13%), cell cycle (10%) and apoptosis (8%) presented a homogeneous distribution. Transcription represented 2% of sperm. Molecular process analysis (Fig. 3C) showed that catalytic activity (46%) was the major molecular process. Energy metabolism (ATP binding and activity 18%, GTP binding and activity 7%) represented 25% of sperm protein. Chromatin binding (1%), DNA binding (7%), RNA binding (7%), structural component of ribosome (2%) and translation initiation activity (1%) represented 18% of sperm protein. Finally, 8% of sperm proteins presented phosphatase/kinase activities.

AMEN Analysis (Figs. 4 and 5)

Among sperm component, proteins belonging to flagellum ($r=5.18$) and acrosomal vesicle ($r=4.5$) were strongly overexpressed (Fig. 4.A). Among biological process,

fertilization process ($r=3.05$) and sperm-egg recognition ($r=5$) were strongly overexpressed as sperm motility ($r=3.4$) and flagellar motility ($r=5$) (Fig. 4.B). Gene expression ($r=0.8$) and signaling ($r=0.87$) were underexpressed. Molecular process associated to energy as ADP ($r=3.25$) or GTP ($r=4$) binding was overexpressed (Fig 4.C). DNA binding ($r=0.5$) and receptor activity ($r=0.29$) were underexpressed.

Among protein belonging to flagellum, microtubule dynamics were overexpressed (minimal $r > 5.85$ for all terms) (Fig. 5). Among proteins implied in microtubules dynamics, DCDC2C, a doublecortin containing domain protein, was identified.

Characterization of DCDC2C expression (Fig. 6)

Expression of DCDC2C was characterized in human testis and spermatozoa. Neuroblastoma cells (SY5Y) were used as negative control. In spermatozoa, immunofluorescence study showed a staining of terminal piece of sperm flagellum (Fig. 6.A.a). In testis, DCDC2C expression was founded in cytoplasm of germ cells at different stages (Fig. 6.A.c). Negative control presented any staining (Fig 6.A.b and 6.A.d). By western blotting, DCDC2C expression was strongly detected in sperm lysates and weakly revealed in testis (Fig. 6.B). By RT-PCR, expression of DCDC2C RNA was visualized in testis (Fig. 6.C). Any bands corresponding to DCDC2C were observed in SY5Y cells by western blotting or RT-PCR.

Discussion

Currently, improve knowledge about sperm physiology permits a better understanding about male fertility. According to sperm organization, proteomics approach appears to be a relevant method. New technologies are now powerful and many proteins unknown in spermatozoa could be identified suggesting sperm proteome complexity. Then, human sperm proteome is partially unknown. In order to characterize whole human sperm proteome, we realized a proteomic study of the human sperm by two technologies. We characterized the expression of DCDC2C, a doublecortin containing domain protein, in the human sperm and testis.

In this study, 2DE reveals 209 characterized proteins. This technology permits a precise analysis of the protein profile expression and especially post-translational modifications. These phenomenons are associated with sperm maturation (Toshimori 2003; Urner and Sakkas 2003; Baker et al. 2005; Aitken et al. 2007; Baker et al. 2012). Abnormal post-translational modifications are correlated with sperm dysfunction. For example, abnormal phosphorylation of GCP2 were observed in asthenozoospermic men (Chan et al. 2009). In spite of new technologies present better sensibility, 2DE remains a relevant tool to study human sperm proteome. Martínez-Heredia produced for the first time a map from human sperm proteins by 2DE and identified 98 proteins (Martínez-Heredia et al. 2006). Our data complete currently 2DE-map reference and could be used to compare normal and abnormal post-translational modifications. Shotgun approach presents a higher sensibility concerning proteins identifications than 2DE and 1986 were characterized. Associated with 2DE data, 2016 sperm proteins were identified in this study.

In literature, three previous studies established whole human sperm proteome (Martínez-Heredia et al. 2006; Baker et al. 2007; Wang et al. 2013) and three publications presents a compartmentalized proteome obtained by sperm splitting (De Mateo et al. 2011; Amaral et al. 2013; Baker et al. 2013). After analyses, proteins contained in several dataset were identified and reported in Fig. 7.A. Each dataset presents proteins never previously described in human spermatozoa. After grouping of dataset, 5129 different proteins were identified. These results revealed the strong

complexity of the human sperm proteome. Sperm splitting allows adapting methodologies to sperm component in order to improve identification. For example, protamine 1 and 2 are major basic ($pI > 11$) nucleus proteins implied in compaction of the sperm chromatin. Nevertheless, lysis buffer used could not extract basic protein as protamine. Then, protamine did not revealed in our study. De Mateo et al. identified these proteins with CTAB treatment and 1D-acid-gel-LC-MS-MS (De Mateo et al. 2011).

Our data presented more than 40% of proteins shared with dataset published with different approaches (Fig. 7.B). 100% of identified proteins by Martinez-Heredia and Baker 2007 were founded in our data. Martinez-Heredia characterized 98 sperm proteins by 2DE-MALDI-TOF. With this same technology, 209 proteins were identified in this study. Currently, Wang presented the most extensive dataset (4675 proteins) and 41% of these proteins were founded in our dataset. Compared to proteome obtained by sperm splitting, 76% of nucleus proteins and 85% of flagellar proteins were founded in our data. Baker 2013 realized a nucleus and a flagellar proteome by sperm splitting and 52% of these proteins were presented in our data.

GO and AMEN analyses were relevant with sperm structure and function. Processes implied in fertilization, sperm-egg recognition and sperm motility were over-expressed. Among biological process, gene expression process was under-expressed while translation was over-expressed. These results were proved by molecular functions analyses. DNA binding was under-expressed while RNA binding and translation factor activity processes were over-expressed. These data suggest a potential role for spermatozoa to deliver to oocyte factors implied in translation and chromatin remodeling according to recent hypothesis about functions of RNA in human sperm (Martins and Krawetz 2005; Hamatani 2012). Signaling process in line with the receptor activity. Energy (ATP-GTP binding and activities) processes was over-expressed in line with the activity of mitochondrion.

Among cellular component, microtubules appear to be strongly overexpressed. Microtubules are fundamental for sperm motility and directly correlated with fertilization success. The axoneme is a structure organized in 9+2 microtubules doublets composed by α and β -tubulin. Microtubule associated proteins stabilize network and

improve the microtubule polymerization or depolymerization. In this study, DCDC2C, a doublecortin containing domain was identified. It belongs to a family of proteins that presents one or two doublecortin containing domains in N-ter part of proteins. Doublecortin containing domain proteins are implied in microtubule stabilization network and are previously described in brain. Doublecortin (DCX) is expressed in fetal brain in axons and dendrites from migrating neurons (Gleeson et al. 1999; Filipovic et al. 2012; Fu et al. 2013). In C-ter part of protein, a serine -proline rich domain suggests interactions with kinases and intracellular signal (Friocourt et al. 2003; Moores et al. 2004). Doublecortin like kinase 1, 2 and 3 (DCLK1,2,3) are expressed in fetal and adult brain. In C-ter part, protein present a serine - proline rich domain and a kinase domain suggesting a regulation of their activities by autophosphorylation (Edelman 2004). RP1 and RP1L are expressed in specialized neurons of retina (Wang et al. 2005). DCDC1 expression was described in testis and in fetal brain. Its role in testis has not been characterized yet (Zeng et al. 2003). DCDC2A expression were founded in brain (Massinen et al. 2011). To best of our knowledges, expressions of DCDC2B and DCDC2C are not characterized. In our study, DCDC2C was identified and appeared in testis in germ cell at all stages suggesting a role for this protein in early and late spermatogenesis. Surprisingly, in spermatozoa, DCDC2C expression was revealed in terminal piece of human sperm flagellum where depolymerization of microtubule happened. The principal and intermediate parts of the flagella were accessible to tubulin antibody (Supplementary data 2). DCDC2C contains any specific domain as the other doublecortin containing domain proteins. These data suggest that DCDC2C might be not implied in kinase activity or signal regulation. Furthermore, Jin et al. showed in primary culture of rats neurons, a colocalization of stathmin and DCX at the end of axons (Jin et al. 2004). Stathmin is a protein implied in the microtubule depolymerization. DCX and stathmin could act together as balance system. Interestingly, stathmin was identified in our proteomic data. Then, we could suppose that stathmin and DCDC2C act in microtubule dynamics in the terminal piece of human sperm. Further investigations are needed to validate this hypothesis.

In this study, we realized a proteomic study in order to characterize human sperm proteome by two technologies. Proteomics offers important dataset containing many proteins never described in human spermatozoa. Thus, this approach represents a

powerful tool to improve knowledges about sperm physiology. In this way, we identified DCDC2C and characterized its expression in human testis and spermatozoa. Further investigations are needed to understand the role of this protein in spermatogenesis and in spermatozoa.

Acknowledgements

This work was supported by Lille County Hospital (CHRU-Lille), Inserm, CNRS, IMPRT, University of Lille, Nord de France, Région Nord/Pas-de-Calais, FEDER. FJ is recipient of a scholarship from Région Nord/Pas- de-Calais and CHRU-Lille.

Authors' contribution section

FJ processed sperm samples. FJ, HO and CC have performed the experiments. SDD, JH, FH and CP have performed mass spectrometry. FJ, FH, SC and FC have performed AMEN analyses. MT performed immunostainings acquisitions. FJFG, SE, CMD, MLCB, VM, NS, CP and JMR have provided valuable intellectual inputs to the experimental design and the manuscript. VM, NS and LB have designed the study. FJ, VM, NS, LB and CP have written the manuscript.

References

- Aitken RJ, Nixon B, Lin M, Koppers AJ, Lee YH, Baker MA. Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Asian J Androl.* 2007 Jul;9(4):554–64.
- Alves MG, Rato L, Carvalho RA, Moreira PI, Socorro S, Oliveira PF. Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 2013 Mar;70(5):777–93.
- Amaral A, Castillo J, Estanyol JM, Ballesca JL, Ramalho-Santos J, Oliva R. Human Sperm Tail Proteome Suggests New Endogenous Metabolic Pathways. *Mol. Cell Proteomics.* 2013 Feb 5;12(2):330–42.
- Amaral A, Castillo J, Estanyol JM, Ballescà JL, Ramalho-Santos J, Oliva R. Human sperm tail proteome suggests new endogenous metabolic pathways. *Mol. Cell Proteomics.* 2012 Nov 15.
- Baker MA, Naumovski N, Hetherington L, Weinberg A, Velkov T, Aitken RJ. Head and flagella subcompartmental proteomic analysis of human spermatozoa. *Proteomics.* 2013 Jan 11;13(1):61–74.
- Baker MA, Nixon B, Naumovski N, Aitken RJ. Proteomic insights into the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. *Syst Biol Reprod Med.* 2012 Aug;58(4):211–7.
- Baker MA, Reeves G, Hetherington L, Müller J, Baur I, Aitken RJ. Identification of gene products present in Triton X-100 soluble and insoluble fractions of human spermatozoa lysates using LC-MS/MS analysis. *Proteomics Clin Appl.* 2007 May;1(5):524–32.

- Baker MA, Witherdin R, Hetherington L, Cunningham-Smith K, Aitken RJ. Identification of post-translational modifications that occur during sperm maturation using difference in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*. 2005 Mar;5(4):1003–12.
- Berruti G, Paiardi C. Acrosome biogenesis: Revisiting old questions to yield new insights. *Spermatogenesis*. 2011 Apr 1;1(2):95–8.
- Björndahl L, Kvist U. Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. *Mol Hum Reprod*. 2010 Jan;16(1):23–9.
- Buffone MG, Ijiri TW, Cao W, Merdiushev T, Aghajanian HK, Gerton GL. Heads or tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility. *Mol Reprod Dev*. 2011 Oct 26;79(1):4–18.
- Chalmel F, Primig M. The Annotation, Mapping, Expression and Network (AMEN) suite of tools for molecular systems biology. *BMC Bioinformatics*. 2008;9(1):86.
- Chan C-C, Shui H-A, Wu C-H, Wang C-Y, Sun G-H, Chen H-M, et al. Motility and Protein Phosphorylation in Healthy and Asthenozoospermic Sperm. *J Proteome Res*. 2009 Nov 6;8(11):5382–6.
- Chocu S, Calvel P, Rolland AD, Pineau C. Spermatogenesis in mammals: proteomic insights. *Syst Biol Reprod Med*. 2012 Aug;58(4):179–90.
- Cooper TG. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian J Androl*. 2010;000(000):000–0.
- Dacheux J-L, Belleanne C, Guyonnet B, Labas V, Teixeira-Gomes A-P, Ecroyd H, et al. The contribution of proteomics to understanding epididymal maturation of mammalian spermatozoa. *Syst Biol Reprod Med*. 2012 Aug;58(4):197–210.
- De Mateo S, Castillo J, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R. Proteomic characterization of the human sperm nucleus. *Proteomics*. 2011 Jun 1;11(13):2714–26.
- Ecroyd H. Tyrosine Phosphorylation of HSP-90 During Mammalian Sperm Capacitation. *Biol Reprod*. 2003 Aug 6;69(6):1801–7.
- Eddy EM, Toshimori K, O'Brien DA. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech*. 2003 May 1;61(1):103–15.
- Edelman AM. Doublecortin Kinase-2, a Novel Doublecortin-related Protein Kinase Associated with Terminal Segments of Axons and Dendrites. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Dec 16;280(9):8531–43.
- Filipovic R, Santhosh Kumar S, Fiondella C, Loturco J. Increasing Doublecortin Expression Promotes Migration of Human Embryonic Stem Cell-Derived Neurons. *Stem Cells*. 2012 Aug 20;30(9):1852–62.
- Friocourt G, Koulakoff A, Chafey P, Boucher D, Fauchereau F, Chelly J, et al. Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes. *Cerebral Cortex*. Oxford

- Univ Press; 2003;13(6):620–6.
- Fu X, Brown KJ, Yap CC, Winckler B, Jaiswal JK, Liu JS. Doublecortin (Dcx) Family Proteins Regulate Filamentous Actin Structure in Developing Neurons. *Journal of Neuroscience*. 2013 Jan 9;33(2):709–21.
- Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*. Elsevier; 1999;23(2):257–71.
- Hamatani T. Human spermatozoal RNAs. *Fertil Steril*. 2012 Feb;97(2):275–81.
- Inaba K. Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components. *Mol Hum Reprod*. 2011 Jul 14;17(8):524–38.
- Jin K, Mao X.O, Cottrell B, Schilling B, Xie L, Row R, Sun Y, Peel A, Childs J, Gendeh G, Gibson B, Greenberg G. Proteomic and immunochemical characterization of a role for stathmin in adult neurogenesis. *The FASEB Journal*. 2004 Feb 1;18(2):287–99.
- Johnson GD, Lalancette C, Linnemann AK, Leduc F, Boissonneault G, Krawetz SA. The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. *Reproduction*. 2010 Dec 14;141(1):21–36.
- Li L-W, Fan L-Q, Zhu W-B, Nie H-C, Sun B-L, Luo K-L, et al. Establishment of a high-resolution 2-D reference map of human spermatozoal proteins from 12 fertile sperm-bank donors. *Asian J Androl*. 2007 May;9(3):321–9.
- Martins RP, Krawetz SA. RNA in human sperm. *Asian J Androl*. 2005 Jun;7(2):115–20.
- Martínez-Heredia J, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R. Proteomic identification of human sperm proteins. *Proteomics*. 2006 Aug;6(15):4356–69.
- Massinen S, Hokkanen M-E, Matsson H, Tammimies K, Tapia-Páez I, Dahlström-Heuser V, et al. Increased Expression of the Dyslexia Candidate Gene DCDC2 Affects Length and Signaling of Primary Cilia in Neurons. Palau F, editor. *PLoS ONE*. 2011 Jun 16;6(6):e20580.
- Moore CA, Perderiset M, Francis F, Chelly J, Houdusse A, Milligan RA. Mechanism of microtubule stabilization by doublecortin. *Molecular cell*. Elsevier; 2004;14(6):833–9.
- Moreno RD, Alvarado CP. The mammalian acrosome as a secretory lysosome: new and old evidence. *Mol Reprod Dev*. 2006;73(11):1430–4.
- Nixon B, Aitken RJ, McLaughlin EA. New insights into the molecular mechanisms of sperm-egg interaction. *Cell. Mol. Life Sci*. 2007 Apr 20;64(14):1805–23.
- Oko R, Sutovsky P. Biogenesis of sperm perinuclear theca and its role in sperm functional competence and fertilization. *J Reprod Immunol*. 2009 Dec;83(1-2):2–7.
- Oliva R, Castillo J. Proteomics and the genetics of sperm chromatin condensation. *Asian J*

- Androl. 2011;13(1):24–30.
- Piomboni P, Focarelli R, Stendardi A, Ferramosca A, Zara V. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *Int J Androl.* 2012 Apr;35(2):109–24.
- Sperry AO. The dynamic cytoskeleton of the developing male germ cell. *Biology of the Cell.* 2012 Mar 14;104(5):297–305.
- Toshimori K. Biology of spermatozoa maturation: An overview with an introduction to this issue. *Microsc Res Tech.* 2003 May 1;61(1):1–6.
- Urner F, Sakkas D. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction.* 2003 Jan;125(1):17–26.
- Valbuena G, Hernández F, Madrid JF, Sáez FJ. Acrosome Biosynthesis in Spermatocytes and Spermatids Revealed by HPA Lectin Cytochemistry. *Anat Rec.* 2008 Sep;291(9):1097–105.
- Wang DY, Chan WM, Tam POS, Baum L, Lam DSC, Chong KKL, Pang F. Gene mutations in retinitis pigmentosa and their clinical implications. *Clinica Chimica Acta.* 2005 Jan;351(1-2):5–16.
- Wang G, Guo Y, Zhou T, Shi X, Yu J, Yang Y, Wu Y, Wang J, Liu M, Chen X, Tu W, Zeng Y, Jiang M, Li S, Zhan P, Zhou Q, Zheng B, Yu C, Zhou Z, Guo X, Sha J. In-depth proteomic analysis of the human sperm reveals complex protein compositions. *Journal of Proteomics.* Elsevier B.V; 2013 Feb 21;79(C):114–22.
- World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010.
- Wykes SM. The Structural Organization of Sperm Chromatin. *Journal of Biological Chemistry.* 2003 Jun 4;278(32):29471–7.
- Zeng L, Gu S, Li Y, Zhao E, Xu J, Ye X, et al. Identification of a novel human doublecortin-domain-containing gene (DCDC1) expressed mainly in testis. *Journal of Human Genetics.* 2003 Jul 1;48(7):393–6.

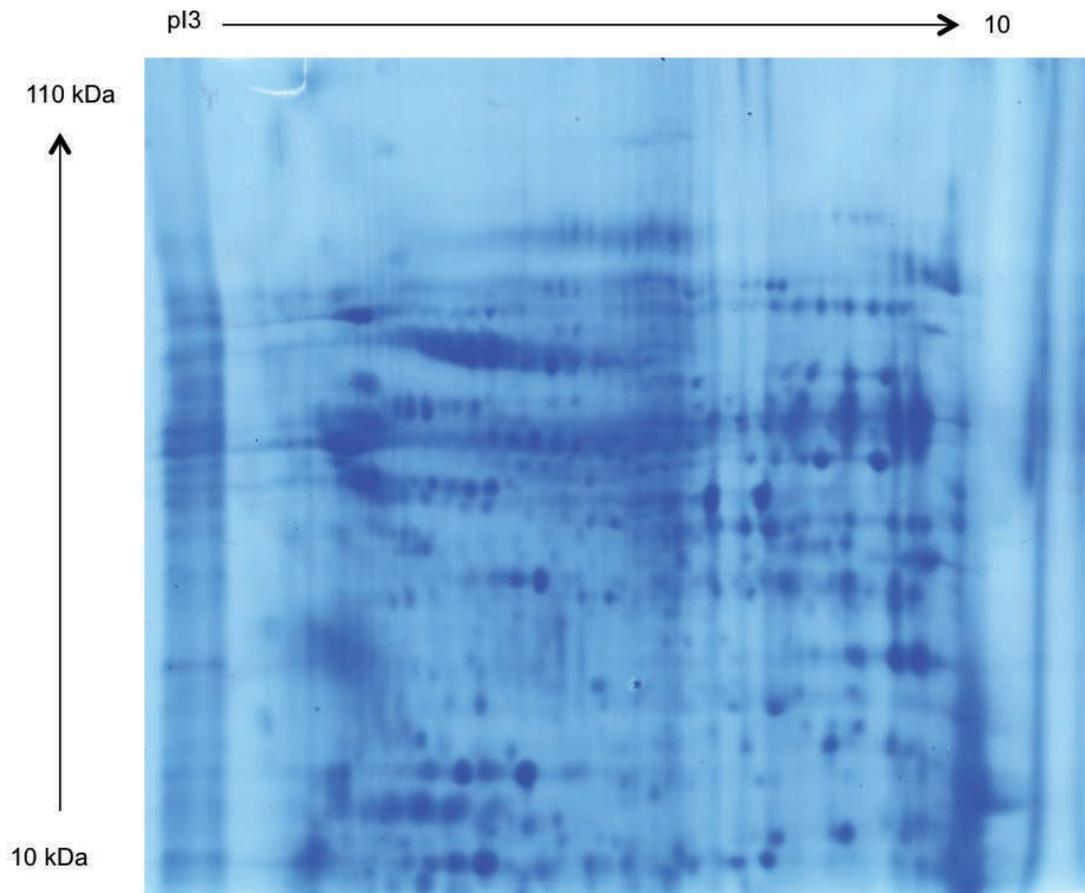
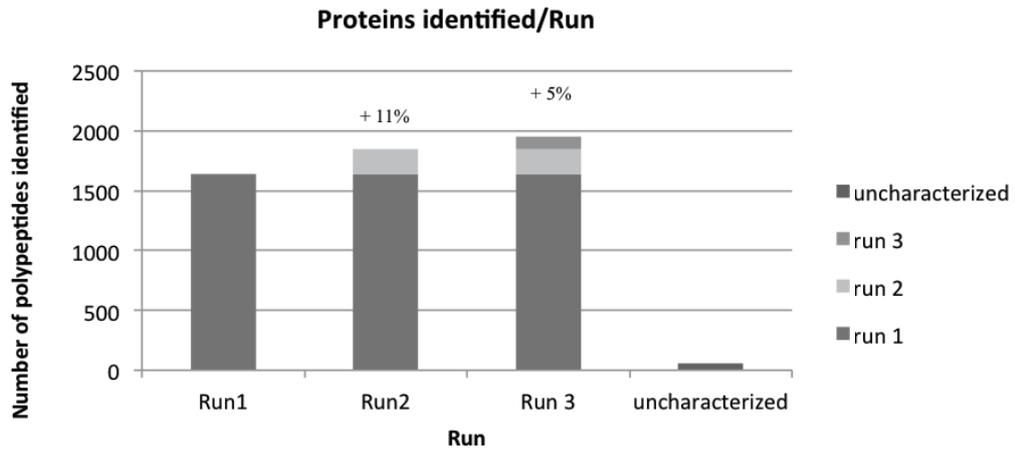


Figure 1 : 2D-electrophoresis Coomassie-blue stained-gel of the human spermatozoa.

Spots were homogeneously distributed. Major proteins belonged to acidic parts upper than 50 kDa.

2.A



2.B

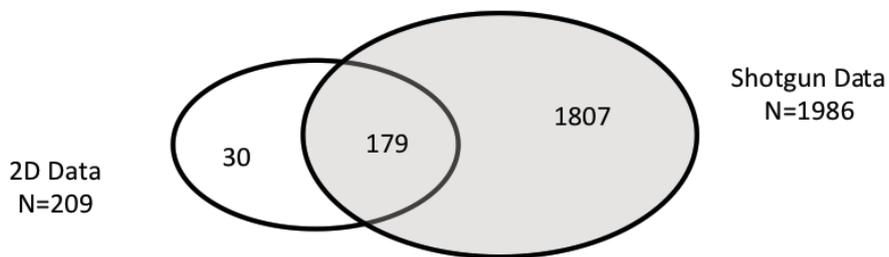
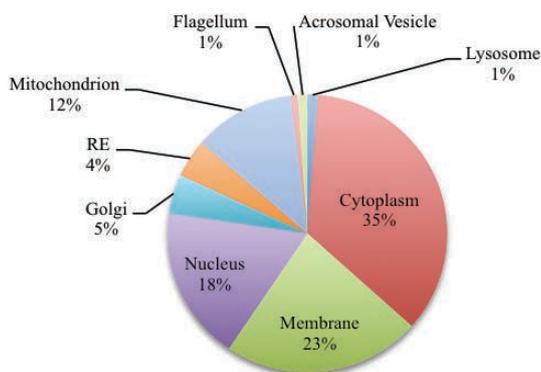


Figure 2 : Shotgun identification and dataset obtained from human sperm proteome.

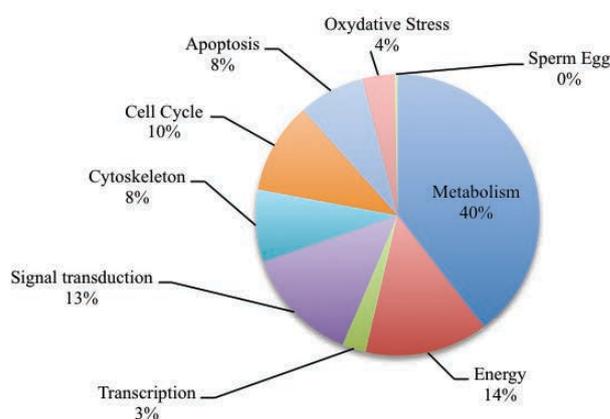
(2.A) Shotgun analysis showed 1638 proteins identified after the first run. 11% and 5% more proteins were characterized after second and third runs respectively.

(2.B) 209 proteins were identified by 2D-electrophoresis and 1986 proteins by shotgun approach. 179 proteins were founded in both dataset.

3.A



3.B



3.C

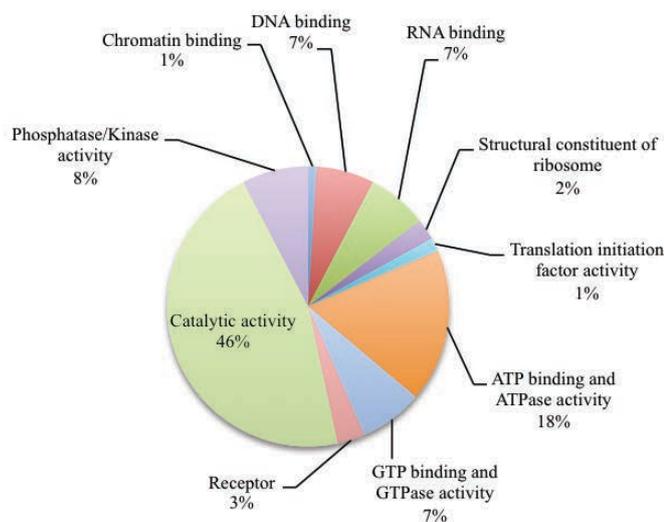
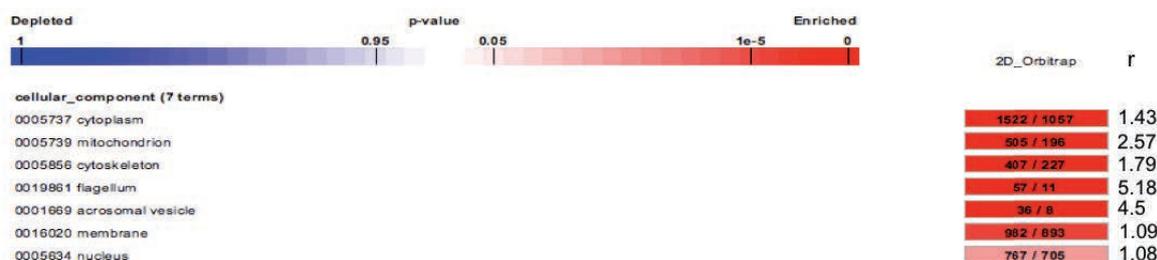
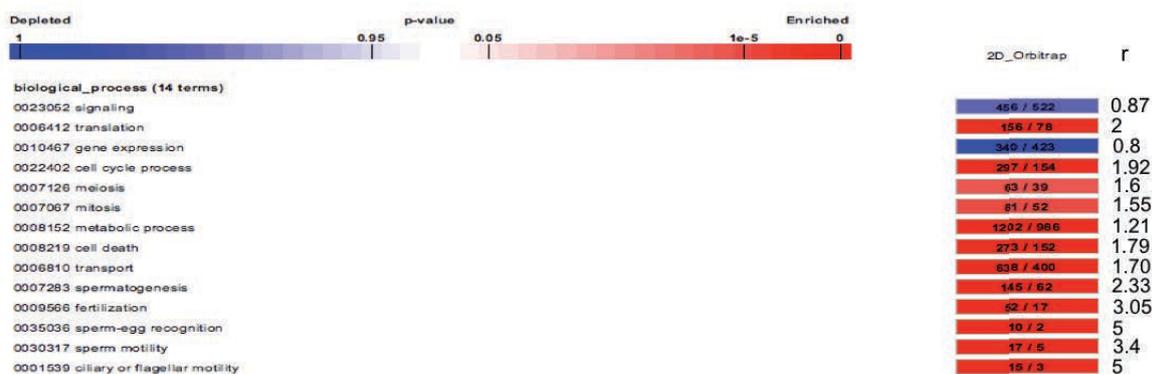


Figure 3 : Gene Ontology analysis of the human sperm proteome according to cellular component (3.A), biological process (3.B) and molecular function (3.C).

4.A



4.B



4.C

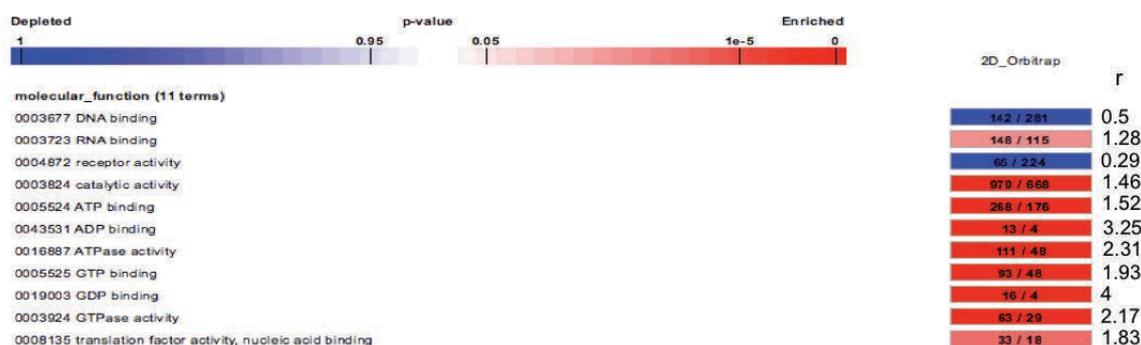


Figure 4 : AMEN analysis of the human sperm proteome according to cellular component (4.A), biological process (3.B) and molecular function (3.C).

For each lane, first number identified number of proteins founded in dataset according to gene ontology terms. Second number indicated number of proteins expected for the gene ontology terms according to genome annotation. r corresponds to the ratio between number of proteins identified and expected. Blue corresponds to underexpression of proteins belonging to gene ontology term. Red indicates over-expression. Scale color reveals the p-value.

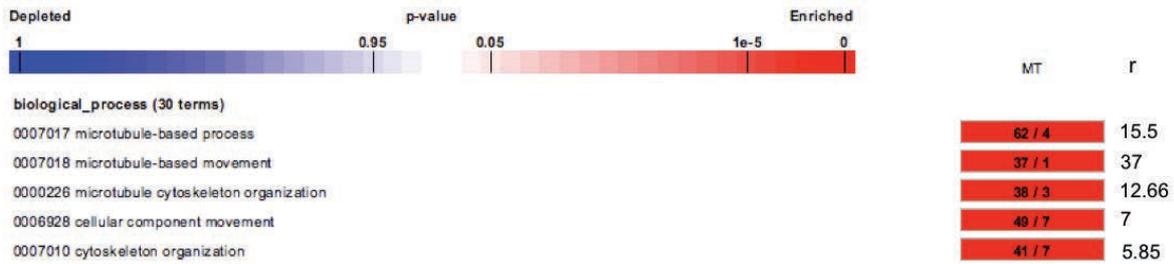
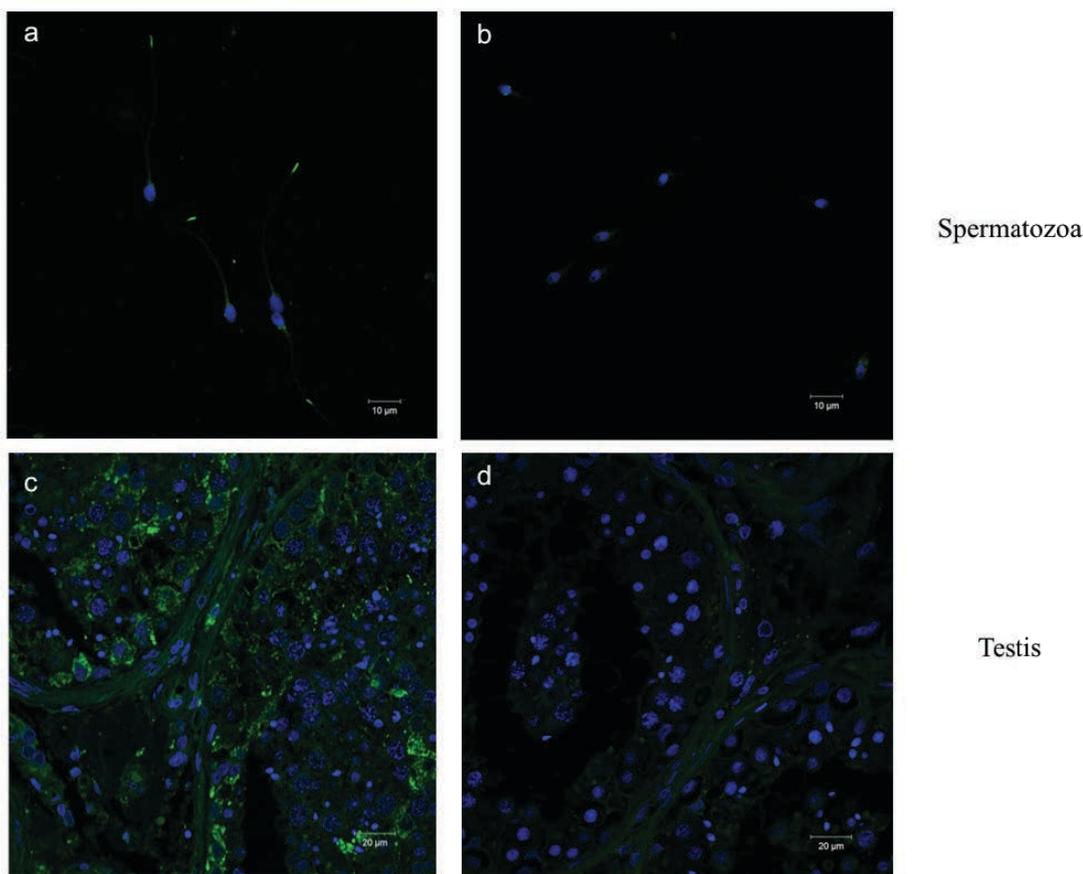


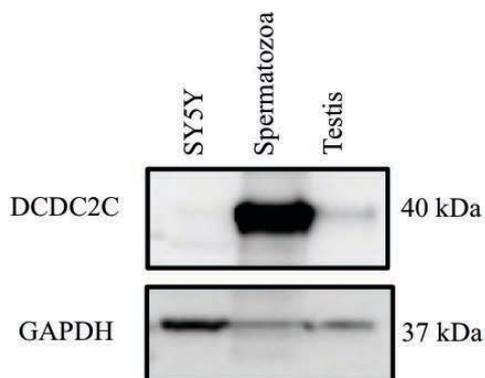
Figure 5 : AMEN analysis of process associated to microtubules dynamics.

For each lane, first number identified number of proteins founded in dataset according to gene ontology terms. Second number indicated number of proteins expected for the gene ontology terms according to genome annotation. r corresponds to the ratio between number of proteins identified and expected. Blue corresponds to underexpression of proteins belonging to gene ontology term. Red indicates over-expression. Scale color reveals the p-value.

6.A



6.B



6.C

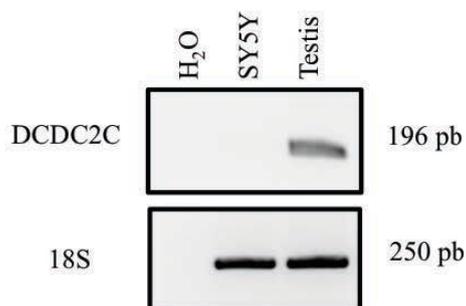


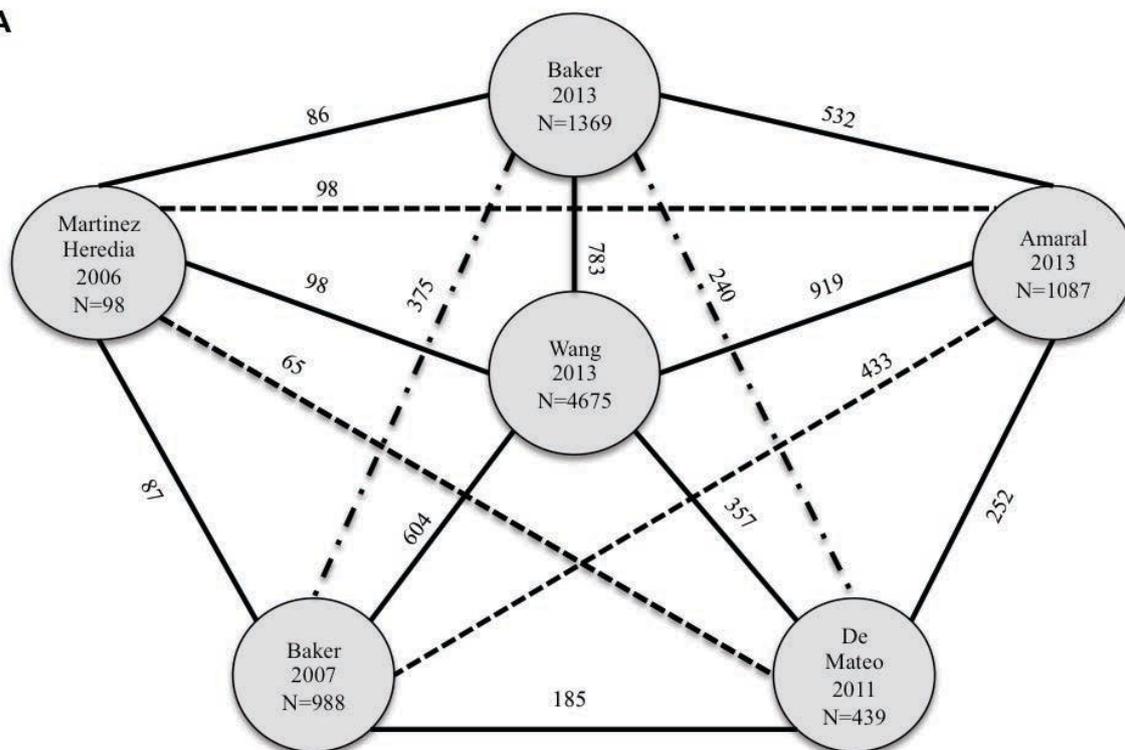
Figure 6 : Characterisation of DCDC2C expression in human spermatozoa and testis.

(6.A) Immunofluorescence reveals DCDC2C expression in human spermatozoa and testis. In spermatozoa (6.A.a), DCDC2C was revealed in the terminal piece of sperm flagellum. In testis (6.A.c), DCDC2C was identified in all germ cell. Negative controls (6.A.b and 6.A.d)

(6.B) Western blotting showed a strong expression in spermatozoa and most weakly in testis. SY5Y was used as negative control.

(6.C) RT-PCR revealed DCDC2C expression in testis. Any signal were detected in SY5Y.

7.A



7.B

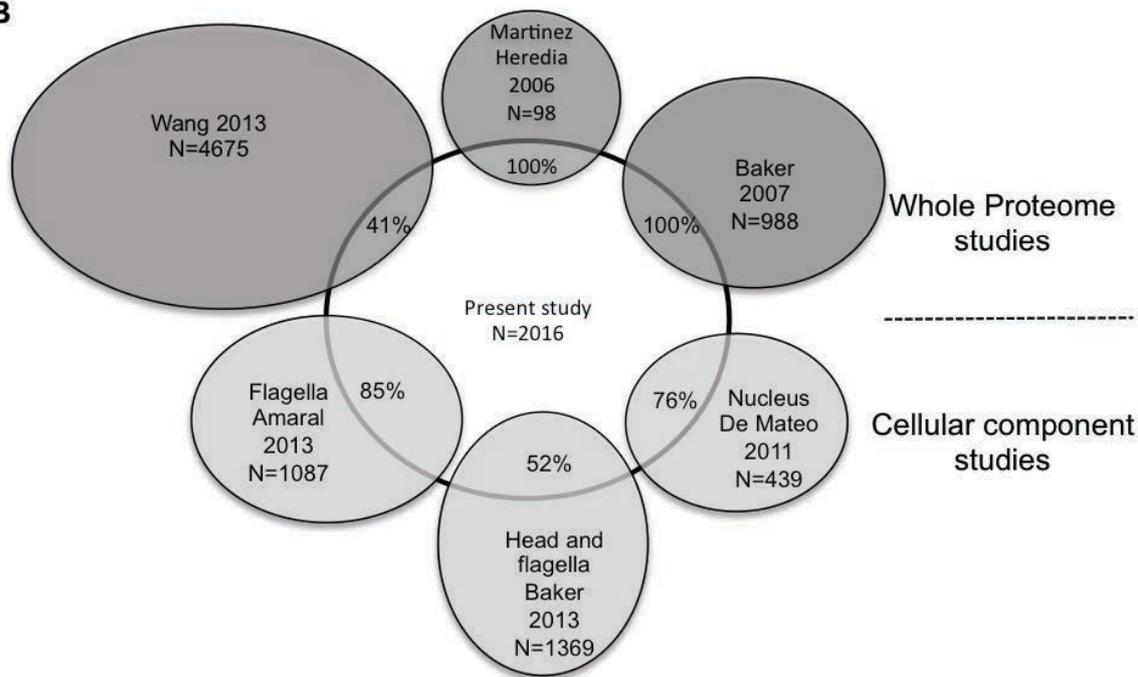


Figure 7 : Human sperm proteome published analysis and comparison to this study.

(7.A) Identification of shared proteins in published dataset.

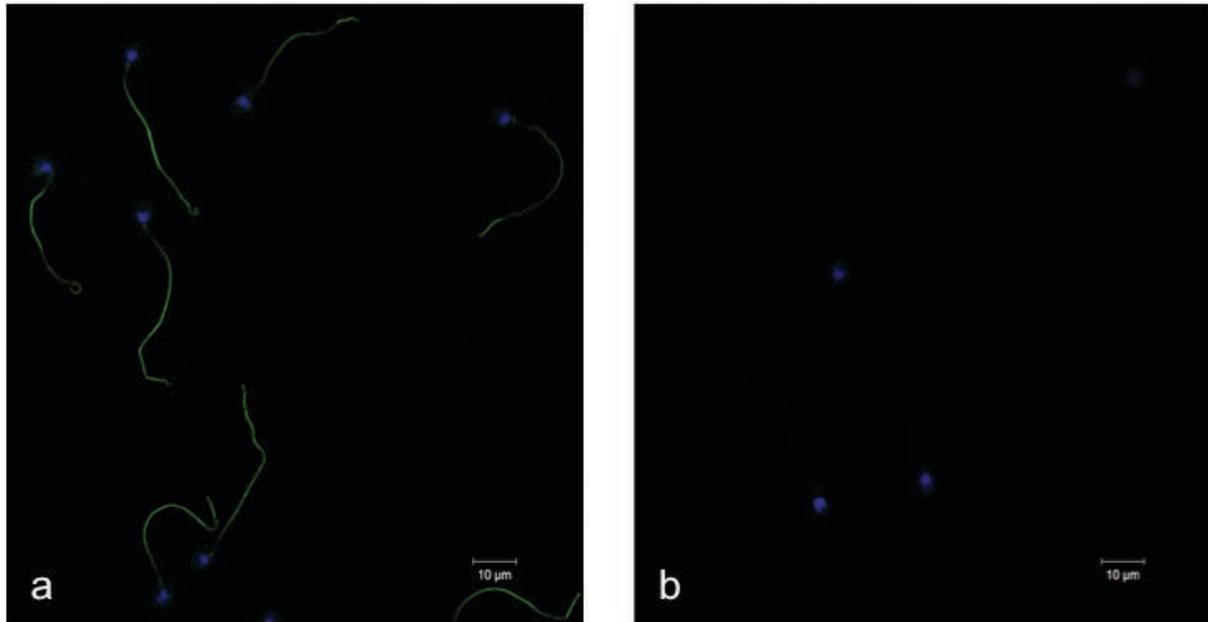
(7B.) Comparison of published dataset to this present study.

GO cellular component	Description
0005764	Lysosome
0005737	Cytoplasm
0016020	Membrane
0005634	Nucleus
0005794	Golgi
0005783	RE
0005739	Mitochondrion
0036126, 0035686, 0035085, 0097014	Flagellum
0001669, 0043159, 0002080	Acrosomal Vesicle

GO Biological process	Description
0008152	Metabolism
0006112, 006096, 0006094, 0055114, 0006099, 0009061, 004533	Energy
0006351	Transcription
0007165	Signal transduction
0007010	Cytoskeleton
0007049	Cell Cycle
0006915	Apoptosis
0006979	Oxydative Stress
0035036	Sperm Egg

GO Molecular function	Description
0003682	Chromatin binding
0003677	DNA binding
0003723	RNA binding
0003735	Structural constituent of ribosome
0008135	Translation initiation factor activity
0005524, 0016887	ATP binding and ATPase activity
0005525, 0003924	GTP binding and GTPase activity
0030545, 0004872	Receptor
0003824	Catalytic activity
0016301, 0016791	Phosphatase/Kinase activity

Supplementary data S1 : Gene Ontology referencies used for AMEN analysis.



Supplementary data 2 : Tubulin (α - β) expression in human spermatozoa revealed by immunofluorescence

- (a) Immunofluorescence showed a signal in the sperm flagellum
- (b) Negative control

ETUDE 2

LE PROTEOME DU SPERMATOZOÏDE HUMAIN REVELE LA CULLINE 3, UNE E3-UBIQUITINE-LIGASE

I. CONTEXTE DE L'ETUDE

L'analyse du protéome du spermatozoïde présentée dans l'étude 1 a dévoilé 35 des 41 protéines constitutives de la voie du protéasome. Ce complexe multiprotéique est composé de deux unités régulatrices 11S et 19S et d'un corps catalytique 26S. Ce complexe est associé à des enzymes E1, 2, 3 ubiquitine-ligase. Le rôle de cette voie est l'élimination des protéines préalablement marquées par un « tag » de type ubiquitine. L'E1-ubiquitine ligase recrute les motifs ubiquitine. Ce motif est transféré à l'E2-ubiquitine-ligase et devient actif. L'E3-ubiquitine-ligase assure la liaison entre le résidu tyrosine de la protéine cible et le motif ubiquitine. La protéine ainsi marquée est reconnue par le protéasome qui la détruit. Le rôle du protéasome a été décrit dans la spermatogenèse, la capacitation et la fécondation (Zimmerman et Sutovsky 2009; Sutovsky 2011). Durant la spermatogenèse, le protéasome intervient dans le remodelage de la chromatine en modulant le remplacement des histones par les protamines (Sutovsky 2003). Une étude chez la drosophile a démontré que les E3-ubiquitine-ligase sont impliquées dans la différenciation des spermatides (Kaplan et al. 2010). Lors de la fécondation, ce complexe apparaît comme un modulateur de la pénétration du spermatozoïde dans la membrane vitelline. Ces données ont été confirmées par l'utilisation d'anticorps dirigés contre la sous-unité 26S qui bloquent la fécondation.

Outre la famille des protéines à domaine doublecortine, l'analyse AMEN du protéome du spermatozoïde humain présentée dans l'étude 1 a révélé une surexpression des ubiquitine-ligases (Figure 1). Parmi celles-ci, la culline 3, une E3-ubiquitine-ligase a été identifiée.

Dans cette étude, nous avons caractérisé le profil d'expression de la culline 3 dans le spermatozoïde et le testicule humain.



Figure 1 : Analyse AMEN des protéines de la voie du protéasome.

Pour chaque terme, la couleur de la case indique la sous ou la sur-expression significative de la famille de protéines. Dans la case, le 1^{er} chiffre correspond au nombre de protéines observées dans notre protéome associées à ce terme. Le second chiffre indique le nombre de protéines théoriques attendues pour ce terme en accord avec l'annotation du génome. Lorsque le nombre observé est supérieur au nombre théorique, la famille de protéines associée à ce terme est sur-exprimée.

II. MATERIELS ET METHODES

Les protocoles de préparation des échantillons, d'extraction des protéines et d'analyses protéomiques (électrophorèse mono et bidimensionnelle, spectrométrie de masse, immunoempreinte et immunofluorescence) sont les mêmes que ceux l'étude 1.

RT-PCR

Les ARN totaux sont extraits sur colonne de silice au moyen du kit Nucleospin RNAII (Macherey-Nagel). La concentration et la pureté des ARN est déterminée par un dosage au nanodrop ND-1000 ($\lambda = 260 \text{ nm}$; rapport absorption 260/280 nm). Les ARN sont convertis en ADNc par une étape de rétrotranscription (RT) à partir de 1,5 μg d'ARN total extrait. L'ARN est dénaturé à 68°C pendant 10 min. La RT se fait à 37°C pendant 1h par la rétrotranscriptase M_MLV (200u/ μL) (Invitrogen)

en présence de dNTP (2,5 mM, invitrogen), d'amorces hexanucléotides (Invitrogen), de séquences aléatoires (5 μ M) et de RNase out (1 μ L, invitrogen, 40u/ μ L) dans un volume final de 20 μ L puis à 70°C pendant 15 minutes. L'amplification est réalisée à partir de 5 μ L d'ADNc dilués au quart dans un volume final de 9 μ L of GoTaq® GreenMasterMix (Promega) avec 10 pmol d'amorces (Culline 3, amorce sens : TCCAGGGCTTATTGGATCTG, amorce anti-sens : GCCCTTTGACTCCCTTTTTC).

La PCR se fait en 3 étapes : 1) une dénaturation pendant 3 minutes à 94°C ; 2) une amplification lors de 30 cycles constitués d'une dénaturation de 30 secondes à 94 °C, une hybridation (60°C) et d'une extension à 72°C pendant une à deux minutes ; et 3) une élongation finale à 72°C pendant 7 minutes. Les ampligènes sont déposés sur gel d'agarose 3% contenant 3% de BET (euromedex) et visualisés sous ultraviolets avec le Molecular Imager ® Gel Doc TM XR System (Bio-Rad).

Immunoempreinte

Les anticorps utilisés sont l'anti-culline 3 (Sigma, SAB4200180, souris, 1/1000-TNT) et la GAPDH (Santa-cruz, sc-25778, lapin, 1/10.000-TNT).

Immunofluorescence

L'anticorps anti-culline 3 (Sigma, SAB4200180, souris) est utilisé au 1/200-TNT.

III. RESULTATS

Les transcrits de la culline 3 ont été détectés dans le testicule dans les mêmes proportions que dans le cerveau adulte humain (Figure 2.A). En immunoempreinte, la protéine a été révélée dans le spermatozoïde, le testicule et le cerveau humain (Figure 2.B). Dans la piste correspondant aux protéines du spermatozoïde, deux bandes sont observées. Ceci suggère la présence de deux isoformes de la protéine issues de l'épissage alternatif. En immunofluorescence, l'anticorps utilisé n'a pas permis de détecter la culline 3 dans le spermatozoïde (Figure 2.C.a). Dans le testicule, la culline 3 a été détectée dans le cytoplasme des spermatocytes I (Figure 2.C.c).

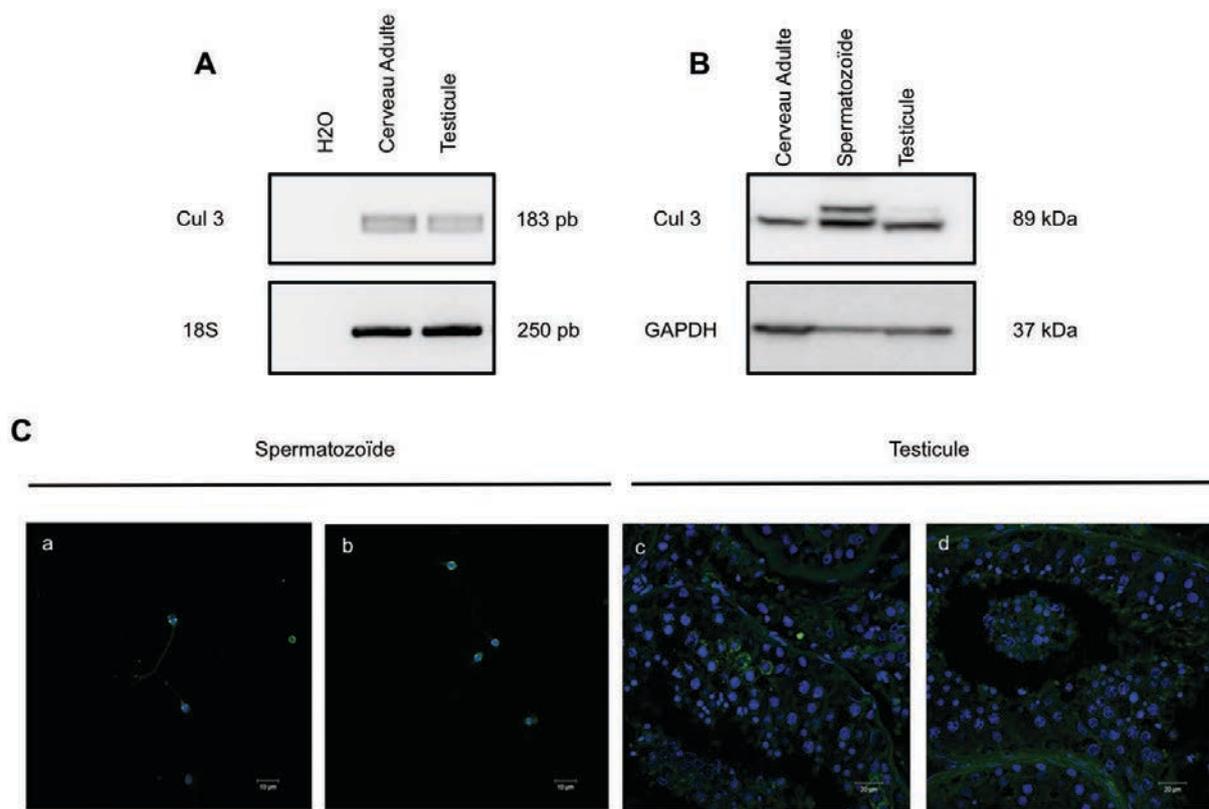


Figure 2 : Caractérisation du profil d'expression de la culline 3 dans le spermatozoïde et le testicule humain.

- (A) Le transcrit de la culline 3 a été détecté dans le testicule humain (RT-PCR).
- (B) La protéine culline 3 a été révélée dans le spermatozoïde et le testicule. Deux bandes ont été observées dans la piste correspondant au spermatozoïde (western-blot)
- (C) La protéine culline 3 n'a pas été détectée dans le spermatozoïde humain (a) et a été observée dans le cytoplasme des cellules des phases précoces de la spermatogenèse (c). (b-d) contrôle négatif.

IV. DISCUSSION

Le protéasome est un complexe impliqué dans la destruction des protéines permettant le recyclage des acides aminés (Glickman et Ciechanover 2002). Ainsi, dans le testicule, la culline 3 pourrait jouer un rôle dans le turn-over des protéines. Chez la souris, l'expression de la culline 3 a été détectée dans les phases tardives de la spermatogenèse (Wang et al. 2006). L'observation de la culline 3 dans le cytoplasme des spermatocytes I supposerait un rôle de la culline 3 dès les phases précoces de la spermatogenèse et en particulier, pendant la méiose. Les études chez la drosophile laisse penser que la culline 3 serait impliquée la différenciation des spermatides (Kaplan et al. 2010). De façon intéressante, les animaux invalidés pour la KLH10, un partenaire de la culline 3, présentent une maturation asynchrone des spermatides (Yan et al. 2004). Ensemble ces données suggèrent un rôle de la culline 3 dans les phases tardives de la spermatogenèse. Ainsi, la chez l'homme la culline 3 pourrait avoir un rôle complexe dans la spermatogenèse puis la spermiogenèse.

Dans le spermatozoïde, il est nécessaire de compléter les observations par une caractérisation de la présence de la protéine. Le profil protéique suggère un épissage alternatif de la culline 3. Le rôle de chaque isoforme est à identifier.

Des investigations complémentaires sont nécessaires afin de préciser le rôle de la culline 3 dans la spermatogenèse et le spermatozoïde.

ETUDE 3

L'INDEX DE QUALITE DU SPERMATOZOÏDE (SPQI), UN NOUVEAU MARQUEUR DE QUALITE DU SPERME

Malgré des paramètres spermatiques normaux, l'origine de l'infertilité masculine reste inconnue dans de nombreux cas en raison des limites de l'analyse spermiologique. Désormais, les avancées protéomiques permettent de nouvelles voies d'étude du spermatozoïde. Dans cette étude, nous étudions le profil protéique du spermatozoïde comme indicateur de sa qualité. Nous définissons pour la 1ère fois un index de qualité protéique du spermatozoïde.

Les échantillons spermatiques étudiés sont qualifiés de normaux selon le manuel d'analyse du sperme (WHO 2010). Les spermatozoïdes ont été sélectionnés par un gradient de densité monocouche. Celui-ci permet de s'affranchir du plasma seminal et des cellules rondes tout en sélectionnant un nombre maximal de spermatozoïdes. Cette méthode présente l'avantage de ne pas induire de biais de sélection des spermatozoïdes pour des analyses représentatives de l'éjaculat.

Le profil protéique révèle dans 49,6% des cas une répartition homogène des protéines de 10 à 120 kDa. Dans 50,4% des cas, les échantillons spermatiques présentent une disparition des protéines de hauts poids moléculaires au profit de celles des bas poids moléculaires suggérant une protéolyse partielle. Ces observations nous ont conduit à définir deux groupes : le groupe A dont la répartition des protéines est homogène et non protéolysée ; le groupe B dont les hauts poids moléculaires ne sont plus ou peu visibles suite à une protéolyse.

L'analyse en spectrométrie de masse a permis d'identifier les protéines de hauts poids moléculaires majoritaires contenues dans la bande à 110 kDa. Il s'agit de l'AKAP4 et de l'Hexokinase 1, deux protéines localisées dans la gaine fibreuse du spermatozoïde et impliquées dans la mobilité spermatique. Les immunoempreintes utilisant des anticorps

dirigés contre les parties N- et C-terminales de ces deux protéines ont révélé une bande unique pour les échantillons du groupe A. Une cascade de bandes de 20 à 50 kDa a été observée pour les échantillons du groupe B quel que soit l'anticorps utilisé. Ces données renforcent l'hypothèse d'une protéolyse partielle.

L'observation du profil protéique a été traduite en index mathématique. Les bandes majoritaires des hauts (80-110 kDa) et bas (15-30kDa) poids moléculaires ont été utilisées pour définir deux fenêtres d'analyse sur le gel. L'intensité des bandes contenues dans ces deux fenêtres a été quantifiée au moyen d'un logiciel (ImageJ). Un ratio a ensuite été calculé (bas poids moléculaires / hauts poids moléculaires) et reflète la qualité du profil protéique (SPQI, Sperm Protein Quality Index). Dans le groupe A, le ratio est équilibré ($1 < \text{SPQI A} < 2$) alors qu'il ne l'est plus dans le groupe B ($1 > \text{SPQI B} > 2$).

Les paramètres spermatiques ont été comparés selon le ratio SPQI. La mobilité progressive apparaît très significativement différente entre les deux groupes en faveur du groupe A. Le profil protéique du spermatozoïde semble donc être un indicateur de la mobilité progressive (SPQI A).

Les résultats préliminaires du suivi des couples en PMA (supplementary data S3) révèle un taux de réussite en fécondation qui varie selon la qualité du proteome global spermatique. Il semble plus élevé pour les hommes dont les spermatozoïdes ne sont pas proteolysés.

Ces résultats suggèrent que le profil protéique du spermatozoïde humain, l'index de qualité protéique SPQI et la modification du profil d'expression d'AKAP4 et de l'hexokinase 1 sont des indicateurs de la mobilité progressive. Le SPQI et l'analyse du profil d'expression d'AKAP4 et de l'hexokinase 1 pourraient être utilisés comme de nouveaux marqueurs de qualité du spermatozoïde et indicateur de success en PMA.

InsermTransfert

Pôle Propriété Industrielle

Dossier suivi par : **Amine NAIMI** Ingénieur Brevets

BIO13168-SERGEANT-AN

Paris, le 12/07/2013

M. Nicolas SERGEANT
INSERM UMR 837-1
Alzheimer & Tauopathies
Centre Jean Pierre Aubert, IMPRT, Univ. Lille Nord de France
1, Place de Verdun
Rue Polonovski
59045 Lille cedex
France

Objet : Attestation de Rédaction et dépôt d'une demande de brevet

*Pour : « **Composition et méthode d'un test diagnostique du risque d'infertilité chez l'homme. Human Sperm Proteome Quality Index (SPQI): a new marker to be considered with sperm parameters** »*

Nos réf. : Dossier N° BIO13168 – SERGEANT / AN

Monsieur,

Suite à nos échanges, nous vous confirmons que, suite à la soumission de la Déclaration d'Invention intitulée «Composition et méthode d'un test diagnostique du risque d'infertilité chez l'homme ; Human Sperm Proteome Quality Index (SPQI): a new marker to be considered with sperm parameters » (Nos réf. BIO 13168 - SERGEANT / AN) issue de l'unité Inserm U837, une décision favorable a été émise par le comité brevets d'Inserm-Transfert pour le dépôt d'une demande de brevet.

Nous confirmons également que la doctorante Fanny JUMEAU est également citée parmi les participants à cette invention.

Nous restons à votre disposition.

Bien cordialement.

Amine NAIMI
Ingénieur brevets

Denise HIRSCH
Directrice PI

**Human Sperm Proteome Quality Index (SPQI): a new marker to be considered
with sperm parameters**

Fanny Jumeau (1,2,3,4,5), Julien Sigala (1,2,3), Francisco-Jose Fernandez-Gomez (3,4,5), Céline Carpentier (3,4,5), Hélène Obriot (3,4,5), Sabiha Eddarkaoui (3,4,5), Sophie Duban-Deweere (4,5,6), Johan Hachani (4,5,6), Claire-Marie Dhaenens (3,4,5), Marie-Laure Caillet-Boudin (3,4,5), Marie-Claire Peers (2,4), Jean-Marc Rigot (7), Luc Buée (3,4,5), Nicolas Sergeant (3,4,5)* & Valérie Mitchell (1,2,3,4,5)*

1. EA4308 Gametogenesis and Quality of the gamete
2. Institut de Biologie de la Reproduction – Spermiologie – CECOS, CHRU LILLE, F-59037 Lille, France.
3. Inserm UMR 837-1, Alzheimer & Tauopathies, Jean-Pierre Aubert Research Center, F-59045 Lille, France
4. University Lille Nord de France, Lille, France
5. University Lille II, IMPRT, IFR114, Lille, France
6. Centre d'Analyse Protéomique de l'Artois CAPA, Lens, France
7. Service d'Andrologie, CHRU-Lille, F-59037 Lille, France

Corresponding authors:

Fanny Jumeau, fanny.jumeau@inserm.fr

* Authors equally contributed to this work

Running title: Spermatozoa Proteome Quality Index

Key words: Male infertility, spermatozoa, proteome, biomarker, AKAP4, Hexokinase I

Abbreviations: ART Assisted Reproductive Technology, ISCI IntraCytoplasmic Sperm Injection, IUI IntraUterine Insemination, IVFc Classical In Vitro Fertilization

Abstract

Despite having normal sperm parameters, male infertility remains unexplained in half of individuals, bringing the limitation of the system use to analyze the semen. Molecular approaches may bring novel insights to the evaluation of the semen quality. To that purpose, we hypothesize that assessment of protein profile quality of the human spermatozoa could contribute to the definition of a spermatozoa quality index.

Semen of 161 individuals was collected in our reproductive biology department. According to the WHO 2010 criteria, semen criteria were all above the threshold and they therefore corresponded to normozoospermia. Spermatozoa were isolated from seminal plasma using a one-step density gradient. Sperm proteins were extracted and analyzed by 1D SDS-PAGE and Coomassie blue staining and markers were assessed by western blotting and immunocytochemistry.

Analysis of markers from different sperm cell compartments showed that sperm proteins extraction was not selective toward cellular compartment and was consistent with the preservation of spermatozoa integrity. 1D SDS-PAGE Coomassie blue stained proteins showed altered expression of proteins characterized by mass spectrometry and shown to correspond to AKAP4 and Hexokinase1. Western blotting of AKAP4 and Hexokinase1 using N- and C-terminal specific antibodies showed a proteolyzed profile in many 50.4% of semen samples. We defined two groups and established a spermatozoa proteome quality index (SPQI) following quantification of Coomassie stained bands corresponding to AKAP4 and Hexokinase 1. This SPQI showed a significant lower sperm motility in SPQI group B. Moreover, our preliminary data regarding the birth success rate after assisted reproduction technology strongly suggest a lower success of conceive for men belonging to the SPQI group B. Altogether, our results suggest that the global proteome analysis of human spermatozoa herein referred to as SPQI in parallel to the analysis of AKAP4 and Hexokinase1 may be a useful biomarker for the prognosis of sperm quality, sperm motility and could be useful to help couples between towards assisted reproduction technologies.

Introduction

Currently, 15% of couples present difficulties to conceive and one in seven men present alteration of sperm quality (Krausz 2011). The semen is constituted of a non-cellular phase, the seminal plasma, a complex fluid composed of prostatic and seminal vesicle secretions and a cellular phase containing spermatozoa and round cells. To evaluate the quality of the semen, a descriptive analysis is often performed. Essential sperm parameters are evaluated including the sperm concentration, the motility and the morphology of spermatozoa. The lower reference limits of these parameters are given according to the WHO criteria (2010). Motility, morphology and sperm count are considered as markers of fertility and used to predict pregnancy success (Aitken 2006). The origin of men infertility remains unknown for 50% of individuals classified as having a normozoospermia (Krausz 2011). Thus, fertilization failure are yet observed and remains ill-defined (Krausz 2011). With this in mind, descriptive analyses of the semen show limits to predict fertility and new tools are certainly needed to understand sperm physiology and define a new approach to identify the origins of men fertilization failure as well as to help couples orientation to current assisted reproduction technologies (ART).

Spermatozoa are highly differentiated cells. During spermatogenesis, they progressively lose their cellular organelles with the cytoplasmic droplet and became motile and able to fertilize during their maturation in the epididymis and in female genital tractus. Hereby, there is no or weak protein synthesis in a mature spermatozoa. However, spermatozoa cell and its environment (epididymis, male and female genital tractus) interact and might consequently modifying the spermatozoa proteome (Plessis et al. 2011). Currently, recent advances in proteomic technology have produced valuable tools for studying sperm proteins. Due to crucial role of the sperm nucleus, the ratio protamine 1 (P1)/protamine 2 (P2) is widely studied and P1/P2 ratio is correlated with fertilization ability (Aoki et al. 2006; Oliva 2006; De Mateo et al. 2007; 2009). De Mateo and collaborators demonstrated a negative correlation between prohibitin expression, a mitochondrial protein implied in sperm motility (Wang et al. 2012), and level of P1/P2 ratio (De Mateo et al. 2007). Acrosomal vesicle is required for spermatozoa penetration of the oocyte zona pellucida and acrosin expression is used as a marker of its integrity

(Zahn et al. 2002; Liu et al. 2008). Chaudhury et al. studied proacrosin/acrosin expression in men with normal sperm parameters but unexplained infertility. Proacrosin/acrosin system seems to be disturbed in men with normal sperm parameters but unexplained infertility and proposed this protein as a marker (Chaudhury et al. 2005). More recently, Blomberg Jensen and collaborators (Blomberg Jensen et al. 2012), proposed for the first time vitamin D metabolizing enzyme CYP24A1 expressed in the annulus of spermatozoa as a novel marker of semen quality. Sperm membrane is a fundamental actor in fertility and its composition can be disturbed by several factors such as oxygen reactive species of thus induce the dysfunction of spermatozoa fertility (Glander et al. 2002; Aitken 2006; Cocuzza et al. 2007; Aitken 2011; Bresler et al. 2011). Yet, many alterations of sperm proteome may contribute to male infertility and those factors remain ill-defined.

Herein, we proposed to evaluate the proteome quality of human spermatozoa and its relationship with the sperm parameters. We hypothesize that assessment of proteome quality profile could be related to semen parameters in order to potentially discriminate between subclasses of normozoospermia. To address this issue, we have studied the semen obtained from a cohort of 161 men with semen parameters within the reference range (WHO 2010). We established a Spermatozoa Proteome Quality Index (SPQI) from the 1D-electrophoresis profile and analyzed in relationship with sperm parameters. Moreover, on a follow-up study, we have analyzed the birth success rate observed among men according to SPQI.

Materials and methods

Semen and semen quality assessment

Human semen samples were collected from anonymous men who attended the Institute of biology of Reproduction (Lille University center hospital). The semen were obtained between 3 and 5 days of sexual abstinence following masturbation and allowed to liquefy 30 min at 37°C. The semen parameters (volume, pH, cell counting and motility) were evaluated according to the WHO criteria 2010. Spermatozoa were diluted (1/20) in Ringer medium and counted with a Malassez cell cytometer. The progressive motility was evaluated by light microscopy on 5 fields and 100 spermatozoa were observed. The progressive motility (PR) is defined by the number of spermatozoa cells moving actively, either linearly or in a large circle, regardless of speed (WHO 2010). The sperm morphology characterization (spermocytogram) was performed after Schorr's staining according to the David's modified classification (Auger et al. 2000). Only sperm above the lower reference limit of semen parameters were included in the present study. Men were given informed consent for the use of their semen for research purposes (PHRC 2009 program).

Isolation of spermatozoa

Sperm cells were separated from the seminal plasma and round cells by a density gradient composed of 50% ferticult (Fertipro, Beernem, Belgium) / 50% PureSperm (Nidacon, Mölndal, Sweden) in a 15 ml sterile Falcon tube (Falcon). After centrifugation (350 × g, 20 min at room temperature), the sperm pellet was washed once with 1mL of Tris buffer saline (TBS) (Tris-HCl 0.1mM pH 7.6, 100mM NaCl) by centrifugation (350 × g, 20 min at room temperature).

Sperm protein extracts

The pellet was resuspended in 500 µl of lysis buffer containing non-buffered 20mM Tris, 2% SDS, 1% Nuclease Mix (Life Science GE Healthcare, Piscataway NJ USA). The lysates were sonicated on ice (40 Hz, 60 pulses) and centrifuged (14,000 × g, 20 min at 4°C). The supernatants were recovered and pellets were discarded. The protein concentrations were established according to the manufacturer's instructions (Bradford Assay, BioRad, CA USA). Protein lysates were frozen at -80°C until used. Proteins from a

cell lineage of human glioblastoma (T98) were extracted following the same procedure as for spermatozoa.

1D-SDS-PAGE of sperm proteins

A total of 15 µg of sperm protein from each samples or T98 cell protein extracts was diluted in LDS 2× (Lithium dodecyl sulfate, Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Protein homogenates were heated at 100°C during 10 min, quickly spun at 500 × g using a bench centrifuge and loaded on 4-12% acrylamide gel (NuPage® Bis-Tris PreCast 12 wells, Life Technologies, Carlsbad California USA). Molecular weight markers (Novex and Magic Marks, Life Technologies) were loaded in the first well. Electrophoresis was performed under a continuous potential of 200V during 1h.

Coomassie blue staining of 1D-SDS PAGE

Polyacrylamide gel was stained with Coomassie Blue [0.1% Blue G250 (Biorad, CA USA), 50% ethanol (v/v), 10% acetic acid (v/v) and H₂O]. Protein staining was visualized after washing with a destaining solution containing 7% (v/v) of acetic acid, 10% ethanol in H₂O. The gel was digitized with an Epson perfection V750 Pro scanner (Epson, France) and acquired using Adobe Photoshop Element 9 Software (Adobe, France). Images were analyzed using ImageJ software version 1.47c (NIH). ImageJ numerical treatment only included noise background reduction without modifying the original digitized image.

NanoLC-MALDI-TOF-MS/MS experiments

Following tryptic digestion of Coomassie blue stained protein bands, nanoseparation was performed on an U3000 nano-HPLC system (Dionex-LC-Packings, Sunnyvale, CA, USA). After a pre-concentration step (C18 cartridge, 300 µm, 1 mm), peptide samples were separated using a Pepmap C18 column (75 µm, 15 cm) by applying an acetonitrile /0.1% TFA gradient from 0% acetonitrile over 3 minutes, 0% to 15% over 7 minutes, 15% to 65% over 42 minutes, 65% to 90% over 5 minutes and, lastly, 6 minutes in 90% of acetonitrile. The flow rate was set to 300 nL/min and 110 fractions were automatically collected every 30 seconds on an AnchorChip™ MALDI target using a Proteineer™ FC fraction collector (Bruker Daltonics, Germany). Two µl of α-cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix (0.3 mg/mL in acetone:ethanol:0.1% TFA-acidified water, 3:6:1 v/v/v) were added during the collection process. The MS and MS/MS mass

measurements were performed off-line using the Ultraflex™ II TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics). The apparatus parameters were set to values given below. Peptide fragmentation was driven by Warp LC™ software (Bruker Daltonics) according to the following parameters: signal-to-noise ratio > 15, more than 3 MS/MS by fraction if the MS signal was available, 0.15 Da of MS tolerance for peak merge and elimination of peaks which appears in more than 35% of the fractions. The protein identification was performed as described below.

Mass spectrometry

The molecular mass measurements were performed in automatic mode using the FlexControl™ 3.0 software on an Ultraflex™ II TOF/TOF instrument and in reflectron mode for MALDI-TOF peptide mass fingerprinting (PMF) or “LIFT” mode for MALDI-TOF/TOF peptide fragmentation fingerprinting (PFF). External calibration over a 1000–3200 mass range was performed using the [M + H]⁺ monoisotopic ions of bradykinin 1–7, angiotensin I, angiotensin II, substance P, bombesin and adrenocorticotrophic hormone (clip 1–17 and clip 18–39) using a peptide calibration standard kit (Bruker Daltonics). Briefly, an accelerating voltage of 25 kV, a reflector voltage of 26.3 kV and a pulsed ion extraction of 160 ns were used to obtain the MS spectrum. Each spectrum was produced by accumulating data from 800 laser shots. A maximum of five precursor ions per sample were chosen for LIFT-TOF/TOF MS/MS analysis. Precursor ions were accelerated to 8 kV and selected in a timed ion gate. Metastable ions generated by laser-induced decomposition were further accelerated by applying 19 kV in the LIFT cell and their masses were measured in reflectron mode. Peak lists were generated from MS and MS/MS spectra using Flexanalysis™ 3.3 software (Bruker Daltonics). Database searches with Mascot 2.3.02 (Matrix Science Ltd, London, UK) using combined PMF and PFF datasets were performed in the UnitProt 2012_06_database via ProteinScape™ 2.1 (Bruker Daltonics). Taxonomy was restricted to Human in raison of the protein source nature. A mass tolerance of 75 ppm and 1 missing cleavage site for PMF and an MS/MS tolerance of 0.5 Da and 1 missing cleavage site for MS/MS searching were allowed. Carbamidomethylation of cysteine and oxidation of methionine residues were considered as fixed and variable modifications, respectively. The relevance of protein identities was judged according to the probability-based MOlecular Weight SEarch (MOWSE) score calculated with a *p* value equal or lower than 0.05 (*p*<0.05).

Western blotting

After 1D-SDS PAGE, proteins were transferred to 0.45µm nitrocellulose membrane (Amersham, Life Science GE Healthcare, Piscataway NJ USA) using the NuPage Liquid Transfer System (Life Technologies) and according to the manufacturer's instructions. Membranes were blocked with a solution containing 5% skimmed milk – TNT (Tris-HCl 15 mM pH 8.0 – NaCl 140 mM, 0.05% (w/v) Tween-20). Membranes were incubated with the primary antibodies overnight at 4°C (Table 1). Immuno-complexes were revealed after incubation with secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (horse anti-mouse: 1/50000 in TNT ; goat anti-rabbit: 1/5000 in TNT, horse anti-goat : 1/20000 in TNT, Vector Laboratories, Burlingham USA) and detected using the ECL™ luminescence kit (Amersham, Life Science GE Healthcare, Piscataway NJ USA). The luminescence of immune-complexes was acquired with a LAS3000 imaging system (Fujifilm).

Immunocytochemistry

After sperm isolation, 100 µL of homogenate were fixed with 2% paraformaldehyde in TBS 1X for 15 min at room temperature. Spermatozoa were isolated by centrifugation (10min, 350 x g) and supernatant was removed. Sperm pellet was suspended in TBS 1X and washed by centrifugation two times (10min, 350 x g). Sperm pellet was suspended in 100 µL of TBS 1X. Thick drop was dropped-off on Superfrost slide (Menzel-Glazer, Germany) and conserved at 4°C.

Slides were placed in acetone bath during 5min and washed twice in TBS 1× (5min). 100µL of TBS 1X –BSA 0.2% were deposited for 1h at room temperature. 100 µL of primary antibody diluted in TBS 1× (Table 1) covered slides at 4°C overnight. Slides were washed two times 5min in TBS 1×. Biotinylated secondary antibodies (1/400 in TBS 1X ; horse anti-mouse, Vector Laboratories, Burlingham USA ; donkey anti-goat, Jackson ImmunoResearch, USA) were diluted in TBS 1× and slides were incubated during 1h at room temperature. Slides were washed twice 5min in TBS 1×. ABC mixture (Vector VECTASTAIN Elite ABC Kit pK 6100, Burlingham USA) covered slides according to manufacturer's instructions. Immunolocalization was revealed by DAB (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate D9015, Sigma Aldrich, France) and reaction was stopped with water. Sperm was stained with hematoxylin Mayer's solution

(Sigma-Aldrich, France) during 1min. Slides were placed in successive bath of ethanol 70/95/100% during 1min/bath and toluene bath (10min). Slides were mounted with the VectaMount™ AQ Mounting Medium (VectaMount Permanent Mounting Medium - H-5000, Vector Laboratories, Burlingham USA). Images from slides were obtained with a Leica DM 2000 LED microscope (Leica, France).

Biostatistics analysis

Quantitative data are presented as mean \pm standard deviation (min-max). Data were analyzed using the SAS software release 9.01 (SAS Institute INC, Cary, NC). Pearson correlation coefficient was calculated to evaluate relationship between sperm parameters and age of men. Anova (variance analysis) and Student t-test (average analysis) were used to analyze the relationship between data from 1D-SDS PAGE and semen parameters. Statistical significance was set at $p < 0.05$ for all tests.

RESULTS

Sperm isolation and analysis of cellular markers (Figs. 1 and 2)

For the present study, 161 human semen samples were freshly collected. Men were aged of 34.7 ± 5.8 years old (22-56) on average. Individuals had no infectious disease or treatment that could interfere with semen parameters. For all samples, the semen volume was over the lower limit of 1.5 mL (WHO 2010). The initial number of spermatozoa counted was of $101 \cdot 10^6 \pm 65.5 \cdot 10^6$ (23.9-380) spermatozoa/mL on average ($385 \cdot 10^6 \pm 295 \cdot 10^6$ (52.7-1900) spermatozoa/ejaculate). The PR motility was of $51.27\% \pm 12.27\%$ (35-70) over the lower reference limit of 32%. Normal spermatozoa morphology was of $33.8\% \pm 12.5\%$ (16-65). After sperm selection, no epithelial or round cells were detected as established by light microscopy assessment (Fig. 1.2).

Molecular markers from sperm cellular component were analysis by western blotting : proacrosin for the acrosome, histone H3 for the nucleus, HSP90 for the cytoplasm, cytochrome C for mitochondria and tubulin- β for the flagellum (Fig. 2). Representative western-blot of those markers are shown on figure 2. Proacrosin was resolved as a single band at 50 kDa (Fig. 2, lane Spz). Proacrosin was not detected in T98 protein lysate (Fig. 2, lane T98). Histone H3 (17 kDa), HSP90 (90kDa), Cytochrome C (15 k Da) and Tubulin- β (50 kDa) were detected both in protein lysate from sperm and T98 cells (Fig. 2). Histone H3 and Tubulin- β were proportionally more abundant in spermatozoa than in T98 glioblastoma-derived cells.

1-SDS PAGE proteome pattern (Fig. 3)

Equal amounts of proteins from 161 individual sperm were loaded. Several major protein profiles were observed in Coomassie blue stained of 1D SDS-PAGE gels at almost 110, 80, 70, 50, 30 15 kDa (Fig. 3, lane SPZ A). 49.6% of sperm samples (80/161) presented many and several well-individualized intense bands comprised between 15 to 160 kDa (Fig. 3.1, lane SPZ A). This group of electrophoretic protein pattern was defined as group A. The remaining 50.4% sperm samples (81/161) were characterized by a lost of high molecular weight bands and an increase of lower molecular weight bands (Fig. 3.1, lane SPZ B). These samples were included in the group B. To further analyze the profiles of human sperm protein expression from group A and B, proteins with apparent

molecular weights were selected such as HSP90 (90 kDa), tubulin- β (50 kDa), GAPDH (37 kDa) and histone H3 (17 kDa) (Fig. 3.2). Strong signals were detected for these proteins in sperm protein lysate from group A as well as in T98 glioblastoma cells (Fig. 3.2, lane SPZ A and T98). Histone H3 staining was comparable in both lanes SPZ A and SPZ B. A decreased signal of HSP90, tubulin- β and GAPDH were observed in sperm protein lysates from group B (Fig. 3.2, lane SPZ B).

Mass spectrometry identification of proteins contained in 110 kDa bands in Coomassie blue stained 1D SDS-PAGE gel (Table 2)

In group B, high molecular weights polypeptides and especially the intensively Coomassie blue stained band at 110 kDa was poorly stained. The 110 kDa Coomassie Blue-stained band was isolated and polypeptides present in this band were analysed by mass spectrometry. Two proteins were identified by Nano-LC MS/MS in the 110 kDa Coomassie-stained band of group A sample. These proteins corresponded to the A-kinase anchor protein 4 (AKAP4) and hexokinase-1 (HK1) (Table 2).

AKAP4 and HK1 profile explored by western blotting (Fig. 4)

AKAP4 and HK1 expression was analyzed by western blotting in sperm samples from groups A and B with antibodies directing against N-ter and C-ter parts of both proteins. A single band at 85 kDa and 110 kDa corresponding to AKAP4 and HK1 respectively was detected in all human sperm samples from group A with antibody directing against N-ter part of both proteins. Two bands at 85 and 95 kDa corresponding to pro-AKAP4 and AKAP4 were observed in sperm samples from group A with a C-ter antibody. In group B, instead of the 110 kDa band, several bands with molecular weights lower than 110 kDa were visualized for both proteins in group B samples whatever antibodies used but were different. No signal corresponding to AKAP4 was detected in T98 cells lysate.

Cellular localization of AKAP4 and HK1 by immunocytochemistry (Fig. 5)

AKAP4 and HK1 cellular localization were analyzed by immunocytochemistry with N-ter and C-ter antibodies. Staining was observed in principal piece of flagellum for both proteins whatever antibodies used. Any differences about staining were observed between group A and B.

Sperm Protein Quality Index (SPQI) (Fig. 6)

After numerical analyses of Coomassie blue stained gels with Image J (Fig. 6.1), bands with the strongest intensities were used to compare the 161 human sperm protein samples. Two windows of molecular weight were defined. Thus, protein bands between 15 to 30 kDa (Low molecular weights LMW) and secondly bands between 80 to 110 kDa (high molecular weights HMW) were selected. These two windows were reproducibly defined using molecular weight markers to calibrate the gels. Each band visualized on gel was defined as a pic by the software (Fig. 6.2). For each window, area under the curve was calculated (Fig. 6.3). To establish a sperm proteome quality index (SPQI), the ratio between the area under curve from HMW and LMW band intensities (Fig. 6.4) was calculated. When the 1D proteome was resolved as numerous intense protein bands over the whole 1D SDS-PAGE lane (Fig. 3.1, lane SPZ A), the ratio was comprised between 1 and 2, named SPQI A and represented 80/161 samples. A second category of proteome profiles with a SPQI B below 1 or above 2 including 81/161 samples was defined.

SPQI and sperm parameters (Table 3)

Any correlation between sperm parameters and the age of men was revealed in whole population. With regards to the SPQI, the sperm parameters were reported. Group A was classified as SPQI A whereas group B had an SPQI B (Table 3). SPQI B group (n= 80, 35.6 years old) was 1.9 years older on average than SPQI A group (n=81, 33.7 years old). The number of spermatozoa per mL of semen (SPQI A = $111.8 \times 10^6 \pm 72$ spz/mL vs SPQI B $90.5 \times 10^6 \pm 56$ spz/mL, $p=0.041$) as well as the PR motility (SPQI A = 53.9 ± 9 % vs SPQI B 48.6 ± 14 %, $p=0.006$) were significantly higher for SPQI A than for SPQI B (Table 3). The PR motility showed the strongest statistical difference between SPQI A and B. Sperm morphology was not different between the two groups.

DISCUSSION

In this study we develop a simple biochemical method enabling to define a sperm proteome quality index, herein named SPQI, based on analysis of the whole 1D sperm proteome profile. Two major sperm proteins AKAP4 and Hexokinase 1 were proteolyzed. Over the analysis of sperm proteomes from 161 ejaculates with normal sperm parameters widely above lower references limits given by WHO (WHO 2010), two categories of proteome profiles were established and a modification of this proteome was identified. SPQI is significantly correlated with lower progressive motility of spermatozoa. To the best of our knowledge, it is the first study to report a modified 1D proteome profile in normozoospermic samples significantly associated with a change in the progressive motility of spermatozoa in men with normozoospermia.

A method was set up to select most sperm cells and extract sperm proteins. Currently, there are two methods to isolate spermatozoa, the swim-up method and the density gradient. The swim-up method selects the most motile spermatozoa. In order to have a lower selection, a single-step density gradient centrifugation method was used to isolate most spermatozoa from seminal plasma and round cells. Moreover, culture medium for spermatozoa used for sperm washing contains protein such as albumin and was replaced by a Tris buffer. In sperm pellet, round cells were not observed and the morphology of spermatozoa was preserved. To evaluate protein extraction and integrity, markers from every sperm cell compartment were explored. Proacrosin belongs to acrosome and is easily cleaved in active form as β -acrosin during acrosomal reaction or consequently to sperm manipulation (Gallo et al. 1991; Zahn et al. 2002). After sperm selection, proacrosin was visualized as well by immunofluorescence (data not shown) and detected by western blotting in sperm lysates. Different proteins (Proacrosin, Histone H3, HSP90, Cytochrome C and tubulin- β) studied were detected in sperm protein lysates. These data suggest that molecular integrity was preserved.

After lysis and protein extraction, whereas the protein quantity loaded for 1D SDS-PAGE was equal for all samples, the 1D SDS-PAGE profile was different. The differences between 1D-SDS PAGE protein profiles could not result from an artifact from the method used to determine the protein concentration. BCA or the Bradford methods for

protein quantification were compared and both gave similar sperm proteome profile. However, that not indicated the integrity of the polypeptides. Moreover, some sperm protein profiles were characterized by the loss of Coomassie blue stained polypeptides of molecular weights over 50 kDa. An increase a proteins quantity loaded did not improve 1D-SDS PAGE profile whatever staining used (supplementary data S1.1 and S1.2). Sperm proteins might be degraded during liquefaction or sperm selection. All samples were freshly prepared after recovering ejaculates with the liquefaction time of 30 minutes. Protease inhibitors did neither improve the protein profile nor increase the number of polypeptides bands (supplementary data S2). Taken together, these observations suggest that is the protein profile observed in group B might result from the partial proteolysis of sperm proteome occurring during sperm storage in epididymis, sperm transit in male genital tract or liquefaction.

Two groups were defined according to the 1D-SDS PAGE profile. The group A included samples with many intense and homogeneous bands visualized between 15 to 110 kDa. Group B represented samples that showed a decrease or a disappearance of high molecular weight proteins, with regards to the sensitivity of Coomassie blue staining. Bands from 110 kDa of 1D-SDS PAGE coomassie blue staining gel was analyzed and characterized by mass spectrometry. AKAP4 and Hexokinase 1 were significantly identified. Our results suggest that the 110 kDa Coomassie-blue stained band contained AKAP4 and HK1 and the disappearance of staining in group B was associated with a modification of expression from both proteins. Both expressions were explored by western blotting. Group A presented a single band for both proteins at almost 100 kDa corresponding to protein expression. Group B showed many bands lower 50 kDa for both protein suggesting a modification of these protein expressions or a proteolysis. Histone H3 expression was not disturbed regardless of profile. AKAP4 and Hexokinase 1 were localized in the fibrous sheath (Eddy et al. 2003; Nakamura et al. 2008). Hexokinase 1 is a predominant glycolytic enzyme presents in spermatozoa (Eddy et al. 2003; Nakamura et al. 2008). Hexokinase 1 uses ATP to phosphorylate glucose to glucose-6-phosphate necessary for sperm motility. AKAP4 is a structural protein that binds cAMP-dependant-kinase (PKA) to initiate and mediate sperm motility (Brown 2002; Moretti et al. 2007). Its protein is encoded by a X-linked genes into a precursor : pro-AKAP4 (97 kDa) that cleaves in AKAP4 (82 kDa) (Turner et al. 1998; Eddy et al.

2003). Men with dysplasia of fibrous sheath presents a gene sperm defect resulting in short or irregular flagella with disorganized axonemes (Baccetti 2005; Baccetti et al. 2005). Immunostaining of sperm samples with AKAP4 antibody showed an incomplete assembled fibrous sheath scaffold (Baccetti et al. 2005). Molecular analysis demonstrated a mutation in gene that encoded AKAP4 (Turner et al. 2001; Baccetti 2005). Recently, *Xu et al.* showed a down-regulation of AKAP4 in infertile normozoospermic men (Xu et al. 2012). According to literature, bands observed in our immunoblotting in Group B did not result from maturation of pro-AKAP4 to AKAP4. Nevertheless, immunochemistry did not reveal differences in localization for both proteins between Groups A and B. Moreover, sperm morphology was not modified. Our results suggest a proteolysis of AKAP4 and hexokinase 1 in group B independently of sperm morphology. Proteolysis is known to be a physiological phenomenon in spermatozoa. Ubiquitin dependent proteolysis is one of the most important pathways implied in spermatogenesis, sperm quality control and fertilization (Sutovsky 2003; 2011). Moreover, proteasome mediated proteolysis is implied in acrosomal reaction and digestion of vitelline membrane (Rawe et al. 2008; Kong et al. 2009; Zimmerman and Sutovsky 2009). After fertilization, some proteins get an ubiquitin-tag as prohibitin, to be eliminated by oocyte (Thompson 2003). Proteasome pathways could be implied in proteolysis of AKAP4 and hexokinase 1.

After analysis with ImageJ software, a quality index was determined and its relationship with sperm parameters was evaluated by biostatistical analysis. Two homogeneous groups were constituted. Half of sperm samples (group A) presents a quality index comprised between 1 to 2 corresponding to an homogeneous sperm protein profile in every molecular weight. The remaining half sperm samples (group B) contained samples characterized by sperm proteome with a disappearance of bands from high molecular weight translated by a quality index lower/over than 1 or 2. Sperm parameters considered as fertility markers are : count of cells, motility and morphology of spermatozoa (Lewis 2007). Nallela et al. considered that count of cells and motility are the most predictive factor to predict fertilization success (Nallela et al. 2006). In our data, progressive motility appears to be strongly significantly different in group A compared with group B. To best of knowledges, it is the first study related to

modification of whole sperm protein profile and significant lower progressive motility in normozoospermia.

To date, among the 161 couples that were followed at the Lille Hospital Fertility department, ART has been offered to 150 (93.1%) of them (Supplementary data S3). Intrauterine insemination (IUI) has been performed in 76 couples, classical *in vitro* fecondation (IVFc) was performed in 60 couples and 14 of them were proposed intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Independently of the ART proposed to patients, frequency of birth success between group A (34%) and group B (22%) was slightly higher for group A. However, differences were more pronounced depending of the ART performed. Thus, among couples with IUI 19 birth were observed. The frequency of success was not significantly differently between categorized in group A (8/35; 23 %) or group B (11/41; 27%). Among couples with IVFc, 42.8% (15/35) of success was observed with men belonging to group A whereas a lower frequency of success (28%, 7/25) for men of the group B. Interestingly, among couples with ICSI, 6 births were obtained 2/3 (66.6%) for men included in the group A and 4/11 (36.3%) for men in the group B. These data suggest that SPQI A indicated a higher fertilization success.

In conclusion, in the present study we suggest that the sperm proteome quality index may represent a *in vitro* assay to evaluate sperm quality. This SPQI relies on the integrity of two major sperm proteins AKAP4 and Hexokinase 1. Their proteolysis may serve as an indicator of progressive motility and more widely of sperm quality. It might be used to understand mechanism of unknown sperm dysfunction. Altogether, our results suggest that the global proteome analysis of human spermatozoa herein referred to as SPQI in parallel to the analysis of AKAP4 and Hexokinase1 may be a useful biomarker for the prognosis of sperm quality, sperm motility and could be useful to help couples between towards assisted reproduction technologies.

Acknowledgements

This work was supported by Lille County Hospital (CHRU-Lille), Inserm, CNRS, IMPRT, University of Lille, Nord de France, Région Nord/Pas-de-Calais, FEDER. FJ is recipient of a scholarship from Région Nord/Pas- de-Calais and CHRU-Lille. The authors wish to thank Denise Escalier for providing proacrosin mAb4D4 antibody. The authors wish to

thank Nassima Ramdame-Sebbane from Biostatistical Department of CHRU Lille for statistical analysis.

Authors' contribution section

FJ, CC, HO, SE have performed the experiments. MCP evaluated sperm morphology. SDD and JH have performed mass spectrometry. JS have collected ART informations. FJFG, CMD, MLCB and JMR have provided valuable intellectual inputs to the experimental design and the manuscript. VM, NS and LB have designed the study. FJ, VM, NS and LB have written the manuscript.

References

- Aitken RJ. Sperm function tests and fertility. *Int J Androl.* 2006 Feb;29(1):69–75.
- Aitken RJ. The Capacitation-Apoptosis Highway: Oxysterols and Mammalian Sperm Function. *Biol Reprod.* 2011 Jun 24;85(1):9–12.
- Aoki VW, Liu L, Jones KP, Hatasaka HH, Gibson M, Peterson CM, Carell DT. Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertil Steril.* 2006 Nov;86(5):1408–15.
- Auger J, Eustache F, David G. Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. *Andrologie.* Springer; 2000;10(4):358–73.
- Baccetti B. Gene deletions in an infertile man with sperm fibrous sheath dysplasia. *Hum Reprod.* 2005 Jun 24;20(10):2790–4.
- Baccetti B, Collodel G, Gambera L, Moretti E, Serafini F, Piomboni P. Fluorescence in situ hybridization and molecular studies in infertile men with dysplasia of the fibrous sheath. *Fertil Steril.* 2005 Jul;84(1):123–9.
- Blomberg Jensen M, Jørgensen A, Nielsen JE, Bjerrum PJ, Skalkam M, Petersen JH, Egeberg DL, Bangsboll S, Andersen AN, Skakkebaek NE, Juul A, Rajpert-De Meyts E, Dissiing S, Leffers H, Jørgensen N. Expression of the vitamin D metabolizing enzyme CYP24A1 at the annulus of human spermatozoa may serve as a novel marker of semen quality. *Int J Androl.* 2012 Mar 9.
- Bresler K, Pyttel S, Paasch U, Schiller J. Parameters affecting the accuracy of the MALDI-TOF MS determination of the phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine (PC/LPC) ratio as potential marker of spermatozoa quality. *Chemistry and Physics of*

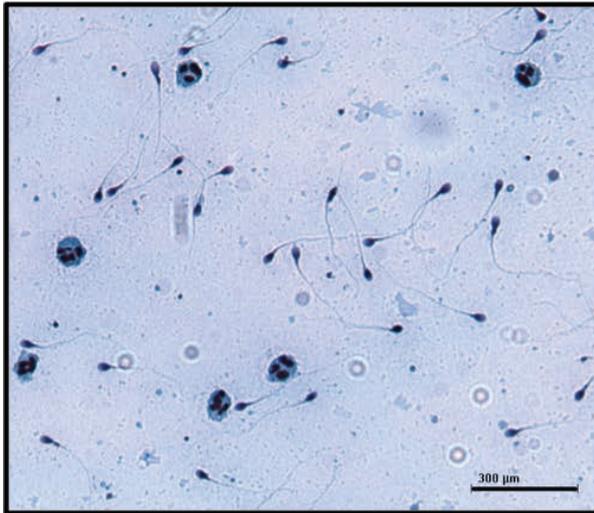
- Lipids. Elsevier Ireland Ltd; 2011 Oct 1;164(7):696–702.
- Brown PR. A-Kinase Anchoring Protein 4 Binding Proteins in the Fibrous Sheath of the Sperm Flagellum. *Biol Reprod.* 2002 Dec 27;68(6):2241–8.
- Chaudhury K, Das T, Chakravarty B, Bhattacharyya AK. Acrosin activity as a potential marker for sperm membrane characteristics in unexplained male infertility. *Fertil Steril.* 2005 Jan;83(1):104–9.
- Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, Agarwal A. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *Int Braz J Urol.* 2007 Sep;33(5):603–21.
- De Mateo S, Gázquez C, Guimerà M, Balasch J, Meistrich ML, Ballescà JL, Oliva R. Protamine 2 precursors (Pre-P2), protamine 1 to protamine 2 ratio (P1/P2), and assisted reproduction outcome. *Fertil Steril.* 2009 Mar;91(3):715–22.
- De Mateo S, Martínez-Heredia J, Estanyol JM, Domínguez-Fandos D, Vidal-Taboada JM, Ballescà JL, Oliva R. Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa. *Proteomics.* 2007 Dec;7(23):4264–77.
- Eddy EM, Toshimori K, O'Brien DA. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech.* 2003 May 1;61(1):103–15.
- Gallo JM, Escalier D, Grellier P, Precigout E, Albert M, David G, Schrével J. Characterization of a monoclonal antibody to human proacrosin and its use in acrosomal status evaluation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 1991 Mar 1;39(3):273–82.
- Glander HJ, Schiller J, Süß R, Paasch U, Grunewald S, Arnhold J. Deterioration of spermatozoal plasma membrane is associated with an increase of sperm lysophosphatidylcholines. *Andrologia.* Wiley Online Library; 2002;34(6):360–6.
- Kong M, Diaz ES, Morales P. Participation of the Human Sperm Proteasome in the Capacitation Process and Its Regulation by Protein Kinase A and Tyrosine Kinase. *Biol Reprod.* 2009 Apr 28;80(5):1026–35.
- Krausz C. Male infertility: Pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.* Elsevier Ltd; 2011 Apr 1;25(2):271–85.
- Lewis SEM. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction.* 2007 Jul 1;134(1):31–40.
- Liu R-Z, Na W-L, Zhang H-G, Lin Z-Y, Xue B-G, Xu Z-G. Assessment of released acrosin activity as a measurement of the sperm acrosome reaction. *Asian J Androl.* 2008 Mar;10(2):236–42.
- Moretti E, Scapigliati G, Pascarelli NA, Baccetti B, Collodel G. Localization of AKAP4 and tubulin proteins in sperm with reduced motility. *Asian J Androl.* 2007 Sep;9(5):641–9.

- Nakamura N, Shibata H, O'Brien DA, Mori C, Eddy EM. Spermatogenic cell-specific type 1 hexokinase is the predominant hexokinase in sperm. *Mol Reprod Dev.* 2008 Apr;75(4):632–40.
- Nallella KP, Sharma RK, Aziz N, Agarwal A. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertil Steril.* 2006 Mar;85(3):629–34.
- Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update.* 2006 Mar 24;12(4):417–35.
- Plessis du SS, Kashou AH, Benjamin DJ, Yadav SP, Agarwal A. Proteomics: a subcellular look at spermatozoa. *Reproductive Biology and Endocrinology.* BioMed Central Ltd; 2011 Mar 22;9(1):36.
- Rawe VY, Diaz ES, Abdelmassih R, Wojcik C, Morales P, Sutovsky P, Chemes H. The role of sperm proteasomes during sperm aster formation and early zygote development: implications for fertilization failure in humans. *Hum Reprod.* 2008 Mar 1;23(3):573–80.
- Sutovsky P. Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: Killing three birds with one stone. *Microsc Res Tech.* 2003 May 1;61(1):88–102.
- Sutovsky P. Sperm proteasome and fertilization. *Reproduction.* 2011 Jul 13;142(1):1–14.
- Thompson WE. Ubiquitination of Prohibitin in Mammalian Sperm Mitochondria: Possible Roles in the Regulation of Mitochondrial Inheritance and Sperm Quality Control. *Biol Reprod.* 2003 Feb 19;69(1):254–60.
- Turner RM, Johnson LR, Haig-Ladewig L, Gerton GL, Moss SB. An X-linked gene encodes a major human sperm fibrous sheath protein, hAKAP82. Genomic organization, protein kinase A-RII binding, and distribution of the precursor in the sperm tail. *J Biol Chem.* 1998 Nov 27;273(48):32135–41.
- Turner RM, Musse MP, Mandal A, Klotz K, Jayes FC, Herr JC, et al. Molecular genetic analysis of two human sperm fibrous sheath proteins, AKAP4 and AKAP3, in men with dysplasia of the fibrous sheath. *J Androl.* 2001 Mar;22(2):302–15.
- Wang M-J, Ou J-X, Chen G-W, Wu J-P, Shi H-J, O W-S, Martin-Deleon P, Chen H. Does Prohibitin Expression Regulate Sperm Mitochondrial Membrane Potential, Sperm Motility, and Male Fertility? *Antioxidants & Redox Signaling.* 2012 Aug;17(3):513–9.
- World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010.
- Xu W, Hu H, Wang Z, Chen X, Yang F, Zhu Z, Fang P, Dai J, Wang L, Shi H, Li Z, Qiao Z. Proteomic characteristics of spermatozoa in normozoospermic patients with infertility. *Journal of Proteomics.* Elsevier B.V; 2012 Sep 18;75(17):5426–36.
- Zahn A, Furlong LI, Biancotti JC, Ghiringhelli PD, Marijn-Briggiler CI, Vazquez-Levin MH. Evaluation of the proacrosin/acrosin system and its mechanism of activation in

human sperm extracts. J Reprod Immunol. 2002 Mar;54(1-2):43-63.

Zimmerman S, Sutovsky P. The sperm proteasome during sperm capacitation and fertilization. J Reprod Immunol. 2009 Dec;83(1-2):19-25.

1.1



1.2

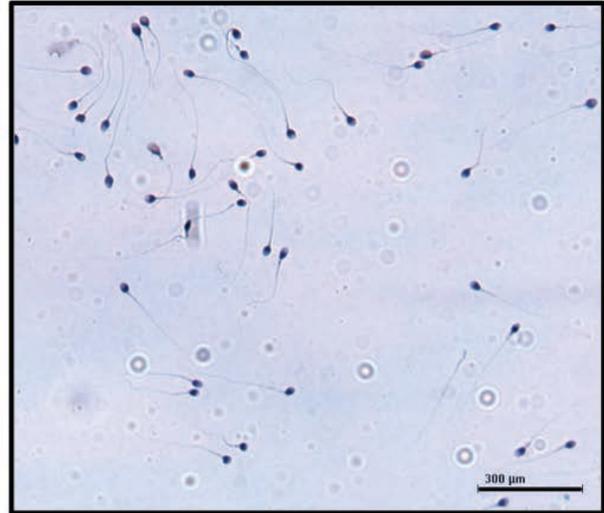


Figure 1 : Observation by light microscopy (x200) of sperm before (1.1) and after (1.2) density gradient selection and Schorr's staining.

After selection, any round cells were observed.

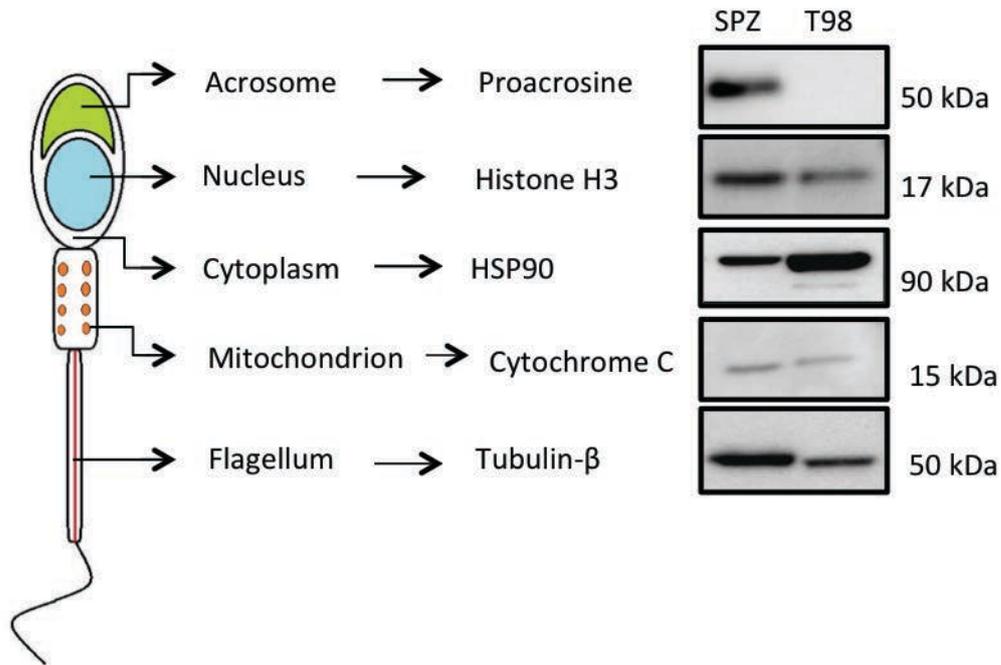
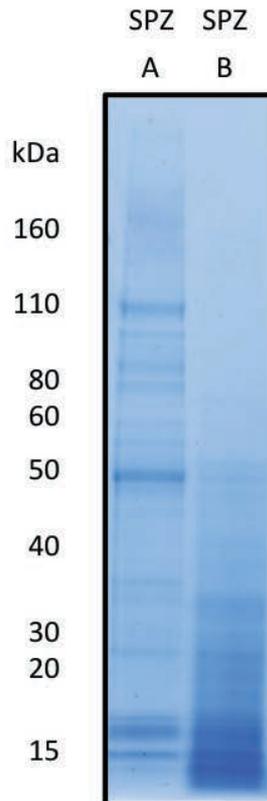


Figure 2 : Assessment of presence of protein markers from sperm cell components by western blotting.

Proacrosine (acrosome) ; histone H3 (nucleus) ; HSP90 (cytoplasm) ; cytochrome C (mitochondrion) ; tubulin-β (flagellum) were detected by western blotting in sperm lysates (lane SPZ). T98 - glioblastoma cell lineage lysates were used as control of histone H3, HSP90, cytochrom C and tubulin-β (lane T98).

3.1



3.2

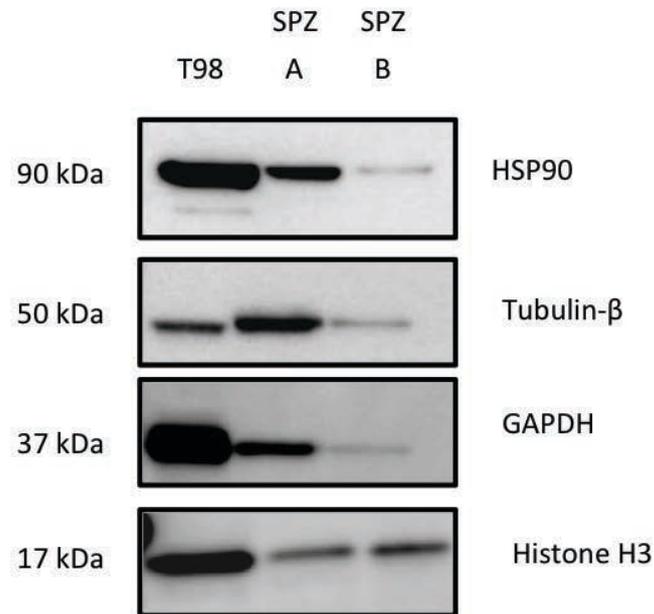


Figure 3 : Coomassie blue staining profiles of whole 1D-SDS PAGE human sperm proteome (3.1) and protein markers from several molecular weight revealed by western blotting (3.2).

Molecular weight marker used were : HSP90 (90 kDa), Tubulin- β (50 kDa), GAPDH (37 kDa), Histone H3 (17 kDa).

Lanes SPZ A showed an homogeneous distribution of bands among molecular weight (3.1) and a strong staining of different markers of molecular weight (3.2). This profile is representative of 49.6% of sperm samples.

Lanes SPZ B presented a loss of high molecular weight proteins and an increase of lower molecular weight (3.1). Western blotting revealed an weak expression of HSP90, tubulin- β and GAPDH. This profile was representative of 50.4% of sperm samples.

Lane T98 (3.2) was used as control for protein expression.

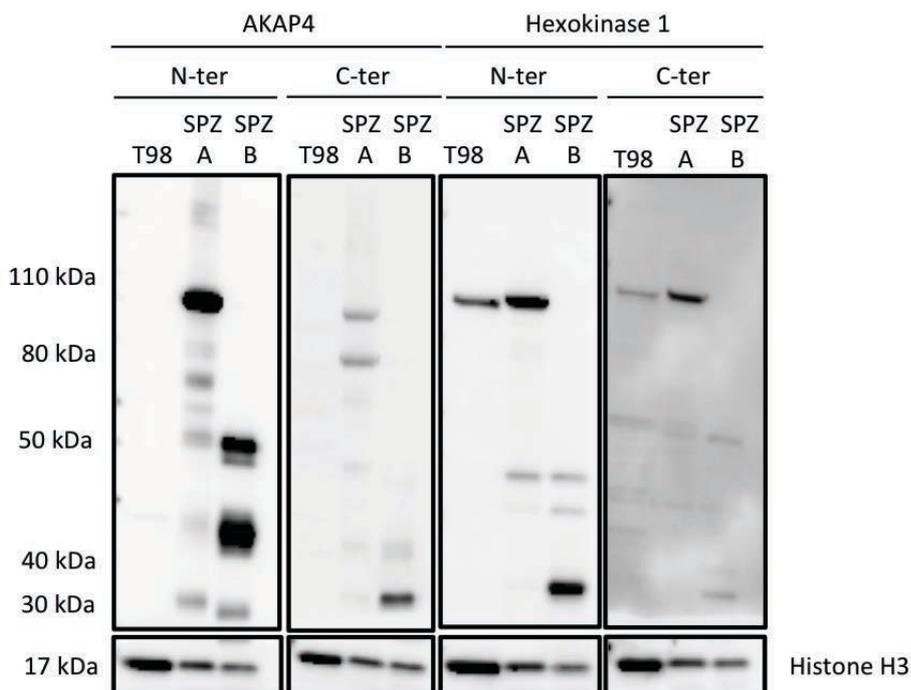


Figure 4 : AKAP4 and Hexokinase 1 expression revealed by immunoblotting.

Representative western blotting from 30 samples from each groups was shown.

One band were revealed for AKAP4 N-ter and Hexokinase 1 N-ter/C-ter antibodies in group A (lane SPZ A). Two bands at almost 95 and 85 kDa were observed with AKAP4 C-ter antibody corresponding to pro-AKAP4 and AKAP4.

In group B (lane SPZ B), several bands comprised between 25 and 50 kDa with different intensities were detected for both proteins whatever antibodies used.

Lane T98 was used as control for protein expression.

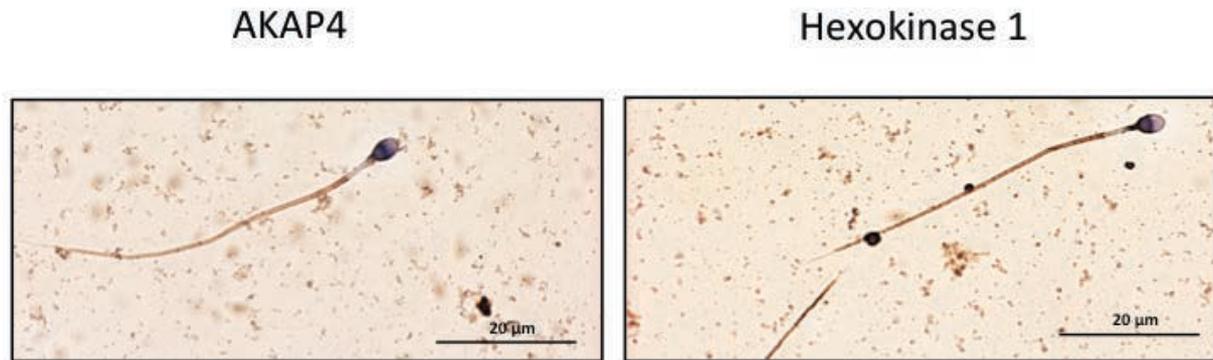


Figure 5: AKAP4 and Hexokinase 1 expression revealed by immunocytochemistry on semen samples.

The staining was revealed in the principal piece of sperm flagellum for both proteins (x630).

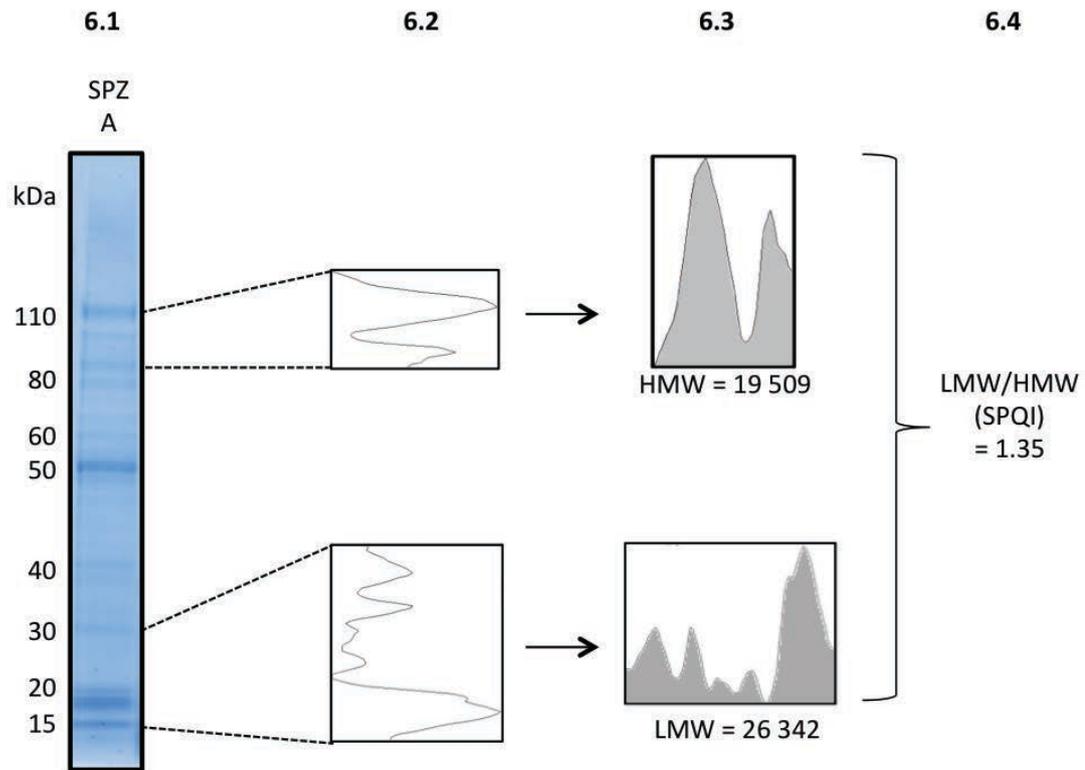


Figure 6 : Method to calculate SPQI from a representative sperm samples belonged to group A.

The sperm protein profile was digitalized and background was eliminated with ImageJ software (6.1). Windows from 15 to 30 kDa (low molecular weight LMW) and 80 to 110 kDa (high molecular weight HMW) were selected (6.2). Area under curve (grey) was calculated (6.3). Ratio LMW/HMW (SPQI) was calculated (6.4).

Table 1:

Proteins, manufacturers, species and dilutions of the primary antibodies used in western-blotting and immunocytochemistry. TNT = Tris – NaCl – Tween. TBS = Tris Buffer Saline

Antibody	Manufacturer	Epitope	Species	Dilution Immunoblotting	Dilution Immunocytochemistry
Proacrosin	mAb 4D4 (Gallo et al., 1991)	C-ter	Mouse	1/1000 – TNT	-
Histone H3	05 - 928 (Millipore, Bellerica, USA)	C-ter of total H3 independant of post-translational modifications	Rabbit	1/2000 – TNT	-
HSP 90	Sc 13119 – A1510 (Santa Cruz, California, USA)	Amino acids 610-723	Mouse	1/500 – TNT	-
Cytochrome C	89515 (BD Pharmingen, San José, USA)	–	Mouse	1/500 – TNT	-
GAPDH	Sc25778 FL335 (Santa Cruz, California, USA)	Amino acids 1-335	Rabbit	1/10000 – TNT	-
Tubulin β	MAB 3408 - LV 1475931 (Millipore, Bellerica, USA)	–	Mouse	1/10000 – TNT	-
AKAP4 N-ter	Ab 56551 (Abcam, UK)	Amino acids 1-101	Mouse	1/10000 – TNT	1/500 – TBS 1X
AKAP4 C-ter	Sc- 66308 (Santa Cruz, California, USA)	C-ter	Goat	1/5000 – TNT	1/400 – TBS 1X
Hexokinase 1 N-ter	Ab 55144 (Abcam, UK)	Amino acids 101-201	Mouse	1/5000 – TNT	1/200 – TBS 1X
Hexokinase 1 C-ter	Sc-6518 (Santa Cruz, California, USA)	C-ter	Goat	1/1000 – TNT	1/100 – TBS 1X

Table 2: Identification of proteins contained in 110 kDa bands following in gel trypsin digestion of the polypeptides and mass spectrometry identification.

MW = Theoretical molecular weight; pI = isoelectric point; Score = identification score; #Pept. = number of peptide sequenced; SC = overlap with the protein sequence (%)

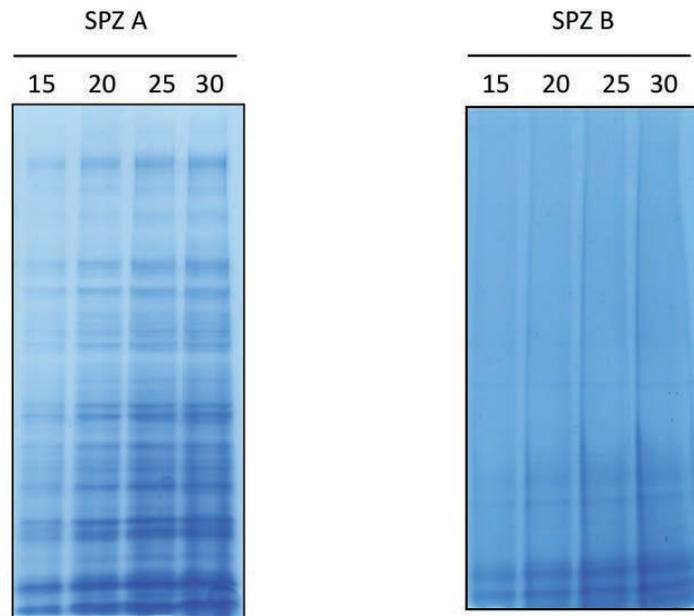
Accession	MW [kDa]	pI	Score	#Pept.	SC [%]	Protein
AKAP4_HUMAN	94.4	6.6	377.5	5	8.7	A-kinase anchor protein 4 OS=Homo sapiens GN=AKAP4
HXK1_HUMAN	102.4	6.4	118.6	2	3.2	Hexokinase-1 OS=Homo sapiens GN=HK1

Table 3: Sperm parameters related to the 1-D sperm proteome index.

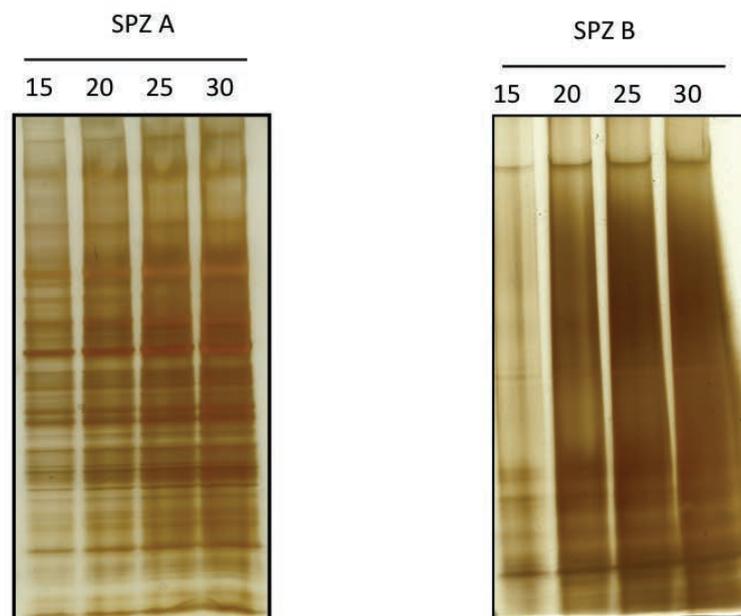
SPQI = Sperm Protein Quality Index; SD = Standard Deviation; NS = No Significant

Sperm parameters	SQPI A (n=80) Mean ± SD (min-max)	SQPI B (n=81) Mean ± SD (min-max)	P (t-test)
Age (years)	33.7 ± 5.1 (22-46)	35.6 ± 6.3 (23-56)	0.043
Volume (mL)	3.7 ± 2.2 (1.5-5.9)	4.2 ± 1.1 (1.9-5.7)	NS
Sperm count (10⁶/mL)	111.8 ± 72.4 (23.9-380)	90.5 ± 56.3 (15.5-300)	0.041
Progressive motility (%)	53.9 ± 9.4 (40-70)	48.6 ± 14.1 (35-70)	0.006
Normal sperm morphology (%)	33.6 ± 11.8 (17-65)	33.9 ± 13.1 (16-58)	NS

S. 1.1

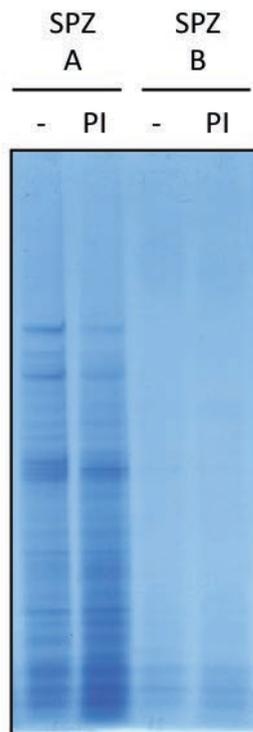


S. 1.2



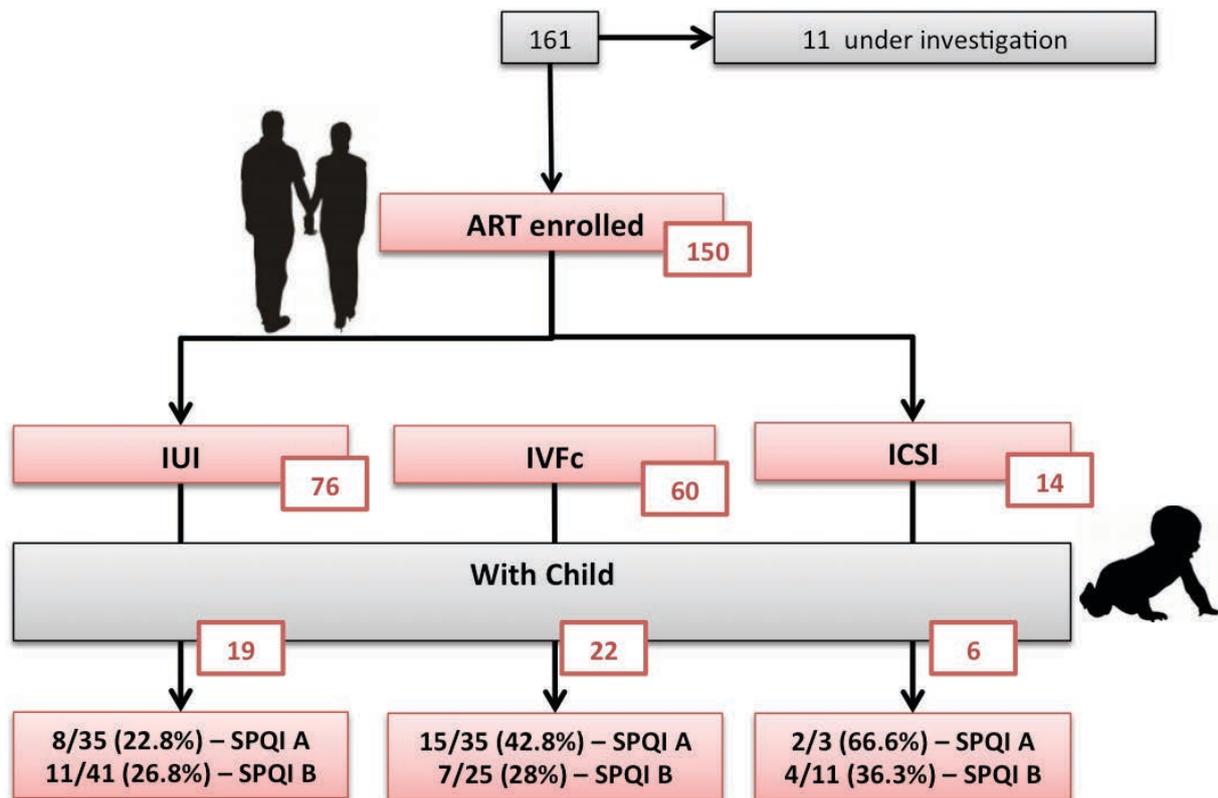
Supplementary data S.1 : Coomassie blue and silver staining profiles of whole 1D-SDS PAGE sperm protein with an increased quantity of proteins (15, 20, 25, 30 µg).

Coomassie blue staining gels (S1.1) or silver staining (S.1.2) are representative of the 1D-SDS PAGE sperm protein profiles of samples from group A (SPZ A) and group B (SPZ B). An increased quantity of proteins were loaded but did not improve numbers of bands visualized in group B.



Supplementary data S2 : Coomassie blue staining profiles of whole 1D-SDS PAGE sperm protein profile with or without protease mix inhibitor.

Mix inhibitor were added (PI) or not (-) after liquefaction before sperm processing in samples from group A (SPZ A) and group B (SPZ B). Addition of protease inhibitor mix did not improve number of bands observed in group B.



Supplementary data S3 : Fertility treatment of 150 couples according to ART child born.

IUI : intra-uterine insemination

IVFc : classical *in vitro* fertilization

ICSI : intracytoplasmic sperm injection

Discussion

La compréhension de la physiologie spermatique et la recherche de nouveaux marqueurs de qualité du spermatozoïde humain représentent les nouveaux challenges de la Spermiologie. Dans ce contexte, la protéomique apparaît comme une méthode pertinente et les avancées technologiques font de cette approche un outil particulièrement puissant.

I. LA PROTEOMIQUE : UN OUTIL POUR COMPRENDRE LA PHYSIOLOGIE SPERMATIQUE

1. Le protéome spermatique

La caractérisation du protéome spermatique représente une source de données encore peu exploitées pour la compréhension de la physiologie du spermatozoïde. Les avancées technologiques permettent aujourd'hui d'identifier plusieurs milliers de protéines dont le rôle n'est pas toujours connu dans le spermatozoïde. Dans notre étude, deux approches ont été utilisées : l'électrophorèse bidimensionnelle et le shotgun. Les jeux de données obtenus ont ensuite été analysés selon l'annotation des protéines *gene ontology* et via le logiciel AMEN.

1.1 Stratégies et jeux de données

L'électrophorèse bidimensionnelle a conduit à l'identification de 209 protéines. Jusqu'à ce jour et par cette approche, la carte protéique de référence contenait 98 protéines identifiées (Martínez-Heredia et al. 2006). Notre carte protéique du spermatozoïde humain est la plus complète en terme de protéines caractérisées par cette méthode. L'électrophorèse bidimensionnelle permet une analyse fine des protéines et en particulier, l'étude des modifications post-traductionnelles. Ces modifications sont des éléments clés de la physiologie spermatique notamment dans la maturation du spermatozoïde. Les anomalies de modifications post-traductionnelles sont directement associées aux anomalies spermatiques. Par exemple, le défaut de phosphorylation de la GCP2 a été mis en évidence chez les patients asthénozoospermes (Chan et al. 2009).

Ainsi, notre carte protéique pourra être utilisée comme une référence du protéome du spermatozoïde humain éjaculé.

Alors que l'électrophorèse bidimensionnelle révèle les protéines majoritaires, l'approche shotgun, de par le haut pouvoir résolutif du spectromètre de masse, permet d'identifier plusieurs milliers de protéines. Par cette méthode, 1986 protéines ont été caractérisées. En association avec les résultats de l'électrophorèse bidimensionnelle, 2016 protéines spermatiques ont été identifiées dans cette étude.

Quelques études portant sur le protéome spermatique ont été publiées et décrites en introduction (pages 64-68). Ces publications émanent pour 5/6 d'entre elles du laboratoire d'Oliva en Espagne et de celui de Baker en Australie. Il s'agit d'étude sur le protéome global du spermatozoïde (Martínez-Heredia et al. 2006; Baker et al. 2007; Wang et al. 2013) ou sur le protéome d'un compartiment du spermatozoïde (De Mateo et al. 2011; Amaral et al. 2013; Baker et al. 2013).

L'intérêt du fractionnement des compartiments cellulaires du spermatozoïde est d'adapter la méthodologie (tampon d'extraction, méthodes de séparation etc..) au compartiment étudié afin d'augmenter le pouvoir résolutif en terme d'identification protéique. Ainsi, De Mateo et al. établissent le protéome du noyau spermatique (de Mateo et al. 2011). Les auteurs soulignent la difficulté d'isoler les protamines. Ces protéines nucléaires jouent un rôle fondamental dans la compaction de la chromatine dans le noyau spermatique. La composition en acides aminés confère à ces protéines un pI isoélectrique basique ($pI > 11$). L'extraction des protéines avec un tampon spécifiquement adapté aux pI basiques est nécessaire. Ceci explique que ces protéines n'aient pas été identifiées ni dans notre étude ni dans celles de Martinez-Heredia et al. et Baker et al.

Nous avons choisi une approche globale afin de caractériser le protéome du spermatozoïde dans son intégralité ne privilégiant aucun compartiment cellulaire.

1.2 L'analyse Gene Ontology

L'analyse *Gene Ontology* permet d'interroger les bases de données et d'associer aux protéines identifiées leur localisation cellulaire, leurs fonctions biologiques et moléculaires. Dans cette étude, la localisation cellulaire des protéines, les protéines nucléaires, membranaires et mitochondriales représentent 53% des protéines. Les protéines de l'appareil de Golgi, du réticulum endoplasmique et du lysosome apparaissent minoritaires. Cette observation est cohérente avec la structure du spermatozoïde. Lors de l'analyse des fonctions biologiques des protéines, un rôle métabolique a été démontré pour 40% d'entre elles. Les protéines se répartissent ensuite de façon équivalente dans la production énergétique, la transduction du signal, la mobilité spermatique, le cycle cellulaire et l'apoptose. La fonction catalytique est majoritairement représentée parmi les fonctions métaboliques. Ces données sont en accord avec les fonctions du spermatozoïde.

L'intégralité des identifications protéiques obtenues par Martinez-Heredia et al. ainsi que Baker et al. a été retrouvée dans notre étude. Nos résultats d'analyse *Gene Ontology* sont en accord et complètent ceux rapportés par ces deux études. Un protéome très complet a été récemment produit avec l'identification de 4675 protéines par une approche shotgun (Wang et al. 2013). Cette équipe s'est intéressée aux protéines prédites comme cibles de drogues telles que le propofol ou le disulfiram avec pour objectif le développement d'inhibiteur de la mobilité spermatique. Cette démarche s'inscrit dans le contexte de la recherche de contraceptif masculin.

1.3 L'analyse AMEN

Le logiciel AMEN permet d'interroger entre autre, les bases de données et d'associer chaque protéine identifiée à leur localisation cellulaire, leurs fonctions biologiques et moléculaires. Il permet en outre de calculer statistiquement la sur ou sous-expression d'une famille de protéine observée dans notre protéome par rapport à l'expression théorique définie dans l'ensemble des bases de données accessibles (Chalmel et Primig 2008). Ce logiciel est développé de façon originale par la plateforme Biogenouest de Rennes.

Parmi les fonctions biologiques, les fonctions fondamentales du spermatozoïde à savoir la mobilité, la production d'énergie, la méiose, la fécondation et la spermatogenèse sont surexprimées. Les protéines impliquées dans la régulation de l'expression des gènes sont sous-exprimées. Cette observation est confirmée par l'analyse des fonctions moléculaires où la liaison à l'ADN est sous-exprimée. En effet, le spermatozoïde présenterait une chromatine peu active du point de vue de la transcription. Toutefois, nous observons une surexpression des protéines de liaisons à l'ARN et de régulation des facteurs de transcription. Ces données renforcent les hypothèses concernant le rôle de protéines spermatiques dans la régulation de la transcription et dans le remodelage des marques épigénétiques de l'embryon (Hamatani 2012). Enfin, nous notons une sous-expression de l'activité des récepteurs membranaires directement liée à la sous-expression du terme transduction du signal. Un point à améliorer serait l'extraction des protéines membranaires du spermatozoïde. Notre protéome pourrait être complété par l'utilisation de détergent spécifique à l'extraction de protéines membranaires.

Désormais, les outils protéomiques permettent l'obtention d'importants jeux de données et le challenge pour les scientifiques est l'analyse de ceux-ci afin de mieux comprendre la physiologie spermatique. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à deux familles : les protéines de liaisons aux microtubules et les protéines de la voie du protéasome.

2. La famille des protéines de liaison aux microtubules

L'axonème se compose de doublets de microtubules constitués d'hétérodimères d' α et β -tubuline. Les microtubules se polymérisent et se dépolymérisent constituant un système dynamique. Durant la spermatogenèse, les microtubules participent aux déplacements des cellules germinales dans l'épithélium du tube séminifère (Tang et al. 2013). La stabilité du réseau microtubulaire est assurée par des protéines d'association aux microtubules. La famille des protéines à domaine doublecortine sont des protéines d'association aux microtubules décrites essentiellement au niveau cérébral (Dijkmans et al. 2010). Nous avons rapporté pour la 1^{ère} fois la présence de protéines de la famille des protéines à domaine doublecortine dans le spermatozoïde et le testicule humain.

2.1 La famille des protéines à domaine doublecortine

La famille des protéines à domaine doublecortine intervient dans la dynamique et la modulation du réseau microtubulaire, la formation du fuseau mitotique et le transport liés aux microtubules (Figure 22). La doublecortine se compose de deux domaines doublecortines dans sa partie N-terminale. Les domaines doublecortines sont communs à toutes les protéines de cette famille. La spécificité de chacune des protéines de cette famille réside dans sa partie C-terminale (Dijkmans et al. 2010). Les protéines de cette famille sont codées par plusieurs gènes situés sur différents chromosomes et présentent une faible homologie de séquence hormis les domaines doublecortines suggérant une duplication ancestrale du gène. Toutefois, ces protéines présentent des caractéristiques et des rôles communs présentés dans le Tableau 8.

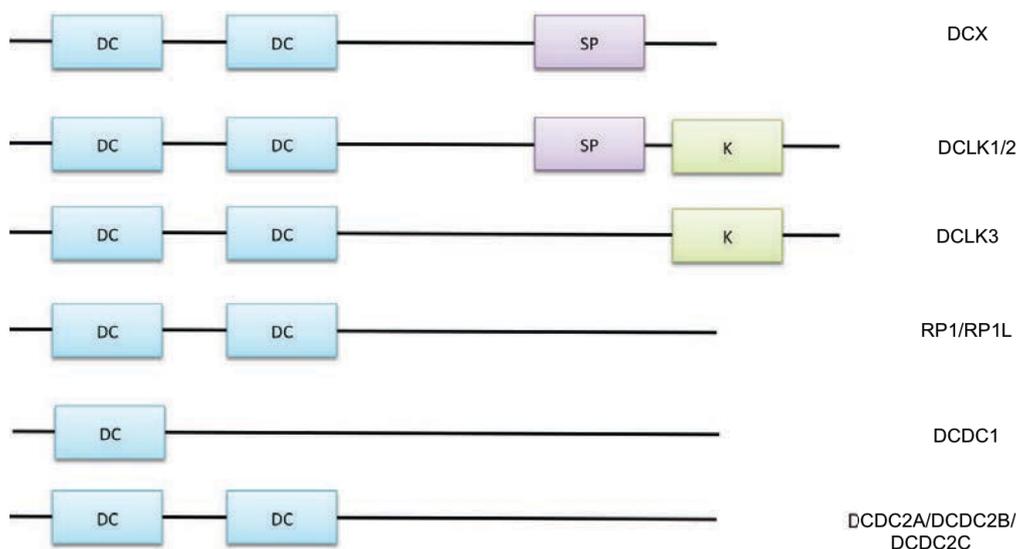


Figure 22 : La famille des protéines à domaine doublecortine (structure).

DC : domaine doublecortine ; SP : domaine riche en sérine proline ; K : domaine kinase.

D'après (Dijkmans et al. 2010)

Gène	Chromosome	Domaines	Expression	Pathologies associées
DCX	X	2 DC 1 SP	Cerveau embryonnaire	Lissencéphalie Retard mental Surdité ?
DCLK1	13	2DC + 1SP + 1K	Cerveau embryonnaire et adulte (DCLK1/DCLK2) Œil (DCLK2)	
DCLK2	4	2DC + 1SP + 1K		
DCLK3	3	1DC + 1K		
RP1	8	2DC	Œil	Rétinite pigmentaire
RP1L1	8			
DCDC1	11	1DC	Cerveau et testicule (DCDC1) Cerveau (DCDC2A)	Dyslexie (DCDC2A) Prostate (DCDC2A)
DCDC2A	6	2DC		
DCDC2B	1	2DC		
DCDC2C	2	2DC		

Tableau 8 : La famille des protéines à domaines doublecortines (expression et pathologies associées).

DC : domaine doublecortine ; SP : domaine riche en sérine proline ; K : domaine kinase.

La doublecortine (DCX) est exprimée dans le cortex du cerveau embryonnaire et intervient dans la migration des neurones au cours de la neurogenèse (Gleeson et al. 1999; Filipovic et al. 2012; Fu et al. 2013). Les domaines doublecortines permettent à la protéine de se placer au centre de 2 hétérodimères de l' α et β -tubuline et assurent la stabilité tout le long du réseau microtubulaire (Horesh et al. 1999; Moores et al. 2004). Dans la partie C-terminale de la protéine, le domaine riche en sérine-proline n'est pas requis pour la liaison aux microtubules mais suggère de possibles interactions avec des protéines kinases et d'associations aux clathrines (Moores et al. 2004). Le rôle de ce domaine a été décrit au niveau de la partie terminale des axones et des dendrites (Friocourt et al. 2003). La doublecortine intervient dans le transport des protéines via son interaction avec le complexe AP1/AP2. Les mutations liées au gène DCX situé sur le chromosome X sont associées à des neuropathies comme la lissencéphalie et un retard mental. L'homologue du gène DCX chez la drosophile a été étudié et serait un gène candidat impliqué dans la surdité (Bechstedt et al. 2010). Les doublecortines-like-kinases (DCLK) 1, 2 et 3 sont caractérisées par un domaine kinase dans leurs parties C-terminales. Les DCLK1 et 2 possèdent également un domaine riche en sérine-proline tout comme la DCX. Le domaine kinase s'apparente à une calmoduline-dépendante-

protéine-kinase bien que son activité catalytique ne soit pas régulée par la calmoduline (Edelman 2004). La DCLK2 a notamment été décrite dans la partie terminale des axones et des dendrites (Edelman 2004). Toutefois, son rôle exact à ce niveau n'a pas été identifié. Dans cette étude, les auteurs suggèrent la possibilité pour DCLK2 de s'autophosphoryler via son domaine kinase et ainsi autoréguler son activité. Les protéines RP1 et RP1L1 ne présente pas de domaine particulier dans leurs parties C-terminales. L'expression de ces protéines a été décrite dans les neurones spécialisés de la rétine : les photorécepteurs et les bâtonnets. Les mutations des gènes RP1 et RP1L1 sont associées à la rétinite pigmentaire (Wang et al. 2005). Enfin les protéines à domaine doublecortine DCDC1, DCDC2A, DCDC2B et DCDC2C présentent un ou deux domaines doublecortines et aucune spécialisation dans leurs parties C-terminales. L'expression du transcrit DCDC1 a été décrite dans le testicule et le cerveau embryonnaire (Zeng et al. 2003). La présence de la protéine n'a pas été confirmée et son rôle n'a pas été identifié. Des études dans des cultures primaires de neurones chez le rat ont permis d'identifier DCDC2A comme modulateur des voies de signalisation Sonic hedgehog/Wint (Massinen et al. 2011). Le déséquilibre de ces voies de signalisation dûe à une perte de fonction de DCDC2A serait impliqué dans la dyslexie. Enfin, l'expression anormale de la protéine DCDC2A a été décrite dans le cancer de la prostate (Longoni et al. 2012). A notre connaissance, l'expression des protéines DCDC2B et DCDC2C n'est pas caractérisée.

2.2 L'expression de la DCDC2C dans le spermatozoïde et le testicule humain.

La protéine DCDC2C a été identifiée par spectrométrie de masse lors de notre étude protéomique du spermatozoïde humain. Dans le testicule, l'expression du transcrit et de la protéine DCDC2C a été fortement détectée en RT-PCR et en immunofluorescence, et dans une plus faible proportion en immunoempreinte. Les marquages immunofluorescents permettent de visualiser l'expression de la protéine DCDC2C dès les phases précoces de la spermatogenèse. Dans le spermatozoïde, l'expression de DCDC2C a été fortement détectée en immunoempreinte et en immunofluorescence. A notre connaissance, il s'agit de la 1^{ère} étude rapportant la présence d'une protéine à

domaine doublecortine dans le testicule et le spermatozoïde humain à la fois au niveau transcrit et protéine. La localisation dans la pièce terminale du flagelle spermatique de la protéine DCDC2C est à la fois étonnante et intéressante. Dans cette partie du flagelle, les microtubules sont désorganisés ce qui pourrait conférer un rôle spécifique de cette protéine.

2.3 La protéine DCDC2C dans le spermatozoïde et le testicule humain, quel rôle ?

La spécificité des protéines de la famille à domaine doublecortine réside dans la partie C-terminale de la protéine. Le domaine riche en sérine-proline présent chez la DCX, la DCLK1 et la DCLK2, impliqué dans la modulation des protéines associées aux clathrines, est absent chez la DCDC2C. Cette donnée ne permet pas *a priori* d'associer DCDC2C au transport microtubulaire. De la même façon, la DCDC2C ne possède pas de domaine kinase comme les DCLK1 et 2 n'associant pas cette protéine à une activité catalytique. Par ailleurs, une étude protéomique sur le rôle de la stathmine dans la neurogenèse chez le rat démontre l'expression colocalisée de la stathmine et de la doublecortine (Jin et al. 2004). La stathmine est une protéine impliquée dans la dépolymérisation des microtubules alors que la doublecortine intervient dans leur stabilité. Ces données suggèrent une complémentarité de ces protéines agissant de concert dans la dynamique microtubulaire. Par ailleurs, l'expression de la stathmine au cours de la spermatogenèse a été décrite dans le testicule de rat (Guillaume et al. 2001). De façon intéressante, dans notre étude protéomique, la stathmine a été identifiée dans le spermatozoïde. Ainsi, nous pouvons supposer que dans la partie terminale du flagelle, la DCDC2C agirait de concert avec la stathmine dans la désorganisation du réseau microtubulaire.

2.4 D'autres protéines de la famille des protéines à domaine doublecortine ?

La famille des protéines à domaine doublecortine comporte plusieurs protéines et en particulier, la doublecortine (DCX). La doublecortine (DCX) a été identifiée dans le protéome spermatique de Baker et al. (Baker et al. 2013). Cette donnée nous a mené à

rechercher l'expression de DCX dans le spermatozoïde et le testicule humain. Des résultats préliminaires mettent en évidence les transcrits de DCX et la protéine au niveau testiculaire (Figure 23). Le profil d'expression de DCX est différent de celui de la DCDC2C. Ces résultats permettent de penser à un rôle de la DCX dans la spermatogenèse différent de celui de DCDC2C.

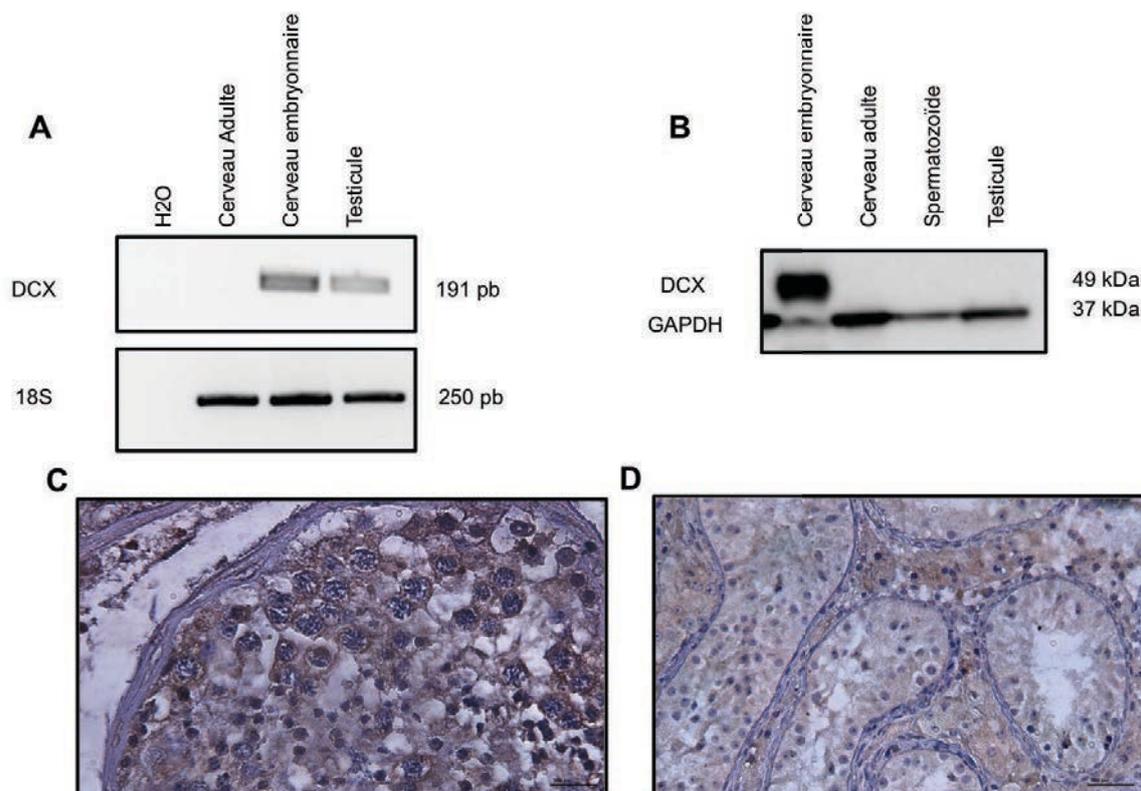


Figure 23 : Caractérisation du profil d'expression de la DCX dans le spermatozoïde et le testicule humain.

- (A) Le transcrite de DCX a été détecté dans le testicule par RT-PCR (Amorce sens : ACCGCTACTTCAAGGGGATT, amorce anti-sens : ATAGCTTCCCTTCCTCCA)
- (B) La présence de la protéine DCX n'a pas été révélée dans le spermatozoïde et le testicule en western-blot (anti-DCX Santa Cruz, C18 sc8066, 1/1000-TNT).
- (C) L'expression de la protéine DCX a été localisée principalement dans le cytoplasme des spermatocytes I par immunohistochimie (x400) (anti-DCX Santa Cruz, C18 sc8066, 1/200-PBS).
- (D) La protéine DCX n'a pas été observée dans le testicule avec arrêt de maturation des cellules germinales par immunohistochimie (x200) (anti-DCX Santa Cruz, C18 sc8066, 1/200-PBS).

En conclusion, ces données suggèrent l'expression de protéines de la famille des protéines à domaines doublecortines dans le testicule et le spermatozoïde humain. Ces protéines ont été principalement décrites au niveau cérébral en accord avec l'organisation microtubulaire de l'axone du neurone.

3. Les protéines impliquées dans la voie du protéasome

3.1 La voie du protéasome

La voie du protéasome est impliquée dans plusieurs étapes : la spermatogenèse, la capacitation du spermatozoïde et la fécondation.

Dans le testicule, l'ubiquitination des histones a été décrite permettant la transition vers les protamines dans les spermatides en élongation (Sutovsky 2003). Une étude chez la drosophile a démontré le rôle des E3-ubiquitine-ligases dans la régulation de la spermatogenèse (Kaplan et al. 2010). La présence d'un inhibiteur à l'E3-ubiquitine-ligase révèle le rôle de ces protéines dans l'orientation de la spermatide vers la différenciation ou la mort cellulaire par la voie apoptotique. Les mitochondries du spermatozoïde sont ubiquitinylées afin d'être détruites après la fécondation (Sutovsky 2003; 2011)

Durant la maturation du spermatozoïde dans l'épididyme, les spermatozoïdes défectueux sont porteurs d'un « tag » ubiquitine induisant leur destruction (Sutovsky 2003). Par ailleurs, une étude a démontré que l'activité du protéasome modulerait la capacitation en amont de l'influx calcique (Chakravarty et al. 2008).

Le protéasome du spermatozoïde lors la fécondation apparaît comme un modulateur de la pénétration du spermatozoïde dans la membrane vitelline (Zimmerman and Sutovsky 2009; Sutovsky 2011). Ces données ont été confirmées par l'utilisation d'anticorps dirigés contre la sous-unité 26S qui bloquent la fécondation. Les spermatozoïdes anormaux présentent une activité diminuée du protéasome (Rawe et al. 2008).

Dans notre étude du protéome du spermatozoïde, 35 des 41 protéines composant le protéasome ont été identifiées. Trois E3-ubiquitine ligases ont également été mises en évidence : les cullines 2, 3 et 4A. Par ailleurs, l'analyse AMEN démontre que la voie du protéasome est surexprimée.

3.2 Les phénotypes d'infertilité associés aux ubiquitine-ligases

La souris KO pour la culline 4A présente une spermatogenèse anormale caractérisée par une mort cellulaire importante au stade spermatocyte I. Les spermatozoïdes produits en petit nombre ont une mobilité réduite et un acrosome anormal. Ces données suggèrent un rôle de la culline 4A dans la méiose (Kopanja et al. 2011; Yin et al. 2011). L'expression de la culline 3 dans le testicule murin a été décrite dans les stades tardifs de la spermatogenèse (Wang et al. 2006). Par ailleurs, dans cette étude, l'expression de cette protéine n'a pas été identifiée ou de façon très faible dans d'autres tissus. Ces données suggèrent une spécificité tissulaire de la culline 3 dans le testicule. Toutefois, le rôle dans la spermatogenèse et son implication dans des phénotypes d'infertilité n'a pas été exploré. Les souris invalidées pour la KLH10, un partenaire de la culline 3, présentent un phénotype d'infertilité caractérisé par une maturation asynchrone des spermatides conduisant à leur dégénérescence. L'épithélium séminifère montre également une diminution du nombre de cellules post-méiotiques. Les auteurs émettent l'hypothèse d'une relation entre les protamines et la KLH10 (Yan et al. 2004). Ces données suggèrent un rôle de la culline 3 dans la spermatogenèse. A notre connaissance, l'expression du transcrite et de la protéine culline 3 n'a pas été caractérisée dans le spermatozoïde et le testicule humain.

3.3 L'expression de la culline 3 dans le spermatozoïde et le testicule humain

Dans notre étude, le transcrite de la culline 3 a été détecté dans les cellules germinales testiculaires. L'expression de la protéine a été révélée dans le spermatozoïde et le testicule. Le profil observé dans le spermatozoïde suggère un épissage alternatif qui n'a pas été constaté dans le testicule.

3.4 La culline 3 dans le spermatozoïde et le testicule humain, quel rôle ?

Dans le testicule, la culline pourrait participer au « turn-over » des protéines par son action dans la voie du protéasome (Glickman et Ciechanover 2002). L'étude chez la

drosophile laisse supposer un rôle pour la culline 3 dans la différenciation des spermatides (Kaplan et al. 2010). Toutefois, nos observations démontrent une expression de la culline 3 dès les phases précoces de la spermatogenèse. Ainsi, chez l'homme, la culline 3 pourrait avoir un rôle plus complexe et intervenir dans la méiose puis la spermiogenèse. Dans le spermatozoïde, le profil protéique de la culline 3 suggère un épissage alternatif de la protéine. Il reste à caractériser les isoformes et à en préciser leur rôle. La culline 3, de part son rôle dans la voie du protéasome, serait impliquée dans l'ubiquitination des protéines avec pour objectif, leur destruction après la fécondation. Par ailleurs, il est démontré que le protéasome joue un rôle dans la digestion de la membrane vitelline de l'ovocyte (Sutovsky 2011). Ainsi, la culline 3 serait impliquée dans le marquage des protéines de la membrane vitelline par l'ubiquitine afin qu'elles soient reconnues par le protéasome et détruites.

La culline 3 est exprimée dans le testicule humain dès les phases précoces de la spermatogenèse et dans le spermatozoïde. Ses partenaires associés à des phénotypes d'infertilité font de la culline 3 une protéine candidate intéressante dans la spermatogenèse.

II. LA PROTEOMIQUE : UN OUTIL POUR DEFINIR DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS DE QUALITE DU SPERMATOZOIDE HUMAIN

1. Le profil protéique des spermatozoïdes humains

L'étude de 161 spermés normaux a permis de définir deux groupes de profils protéiques. Dans le 1^{er} groupe (A), une répartition homogène des protéines est observée. Dans le 2^{ème} groupe (B), une diminution des protéines de poids moléculaires supérieurs à 50 kDa au profit des protéines de bas poids moléculaires a été constatée. Cette observation est en faveur d'une dégradation des protéines. L'addition d'inhibiteurs de protéases après la liquéfaction n'a pas permis d'améliorer le profil protéique. Ainsi, la protéolyse ne serait pas liée à la préparation du sperme mais surviendrait lors de la liquéfaction du sperme, étape incontournable à la manipulation du sperme. Cette étape de dissolution du coagulum fait appel à des enzymes hydrolytiques telle que la PSA. Un

dosage des enzymes prostatiques associé à une évaluation du profil protéique permettrait d'incriminer ou non la composante prostatique dans la protéolyse des protéines spermatiques. Par ailleurs, une précédente étude a montré que les spermatozoïdes anormaux pouvaient présenter des « tags » induisant leurs destructions (Thompson et al. 2003). Il s'agirait d'un mécanisme de régulation et d'élimination des spermatozoïdes défectueux. C'est le cas notamment de la prohibitine dont l'ubiquitination semble plus élevée dans les spermatozoïdes anormaux. Ainsi, bien que les paramètres du sperme soient normaux, il est possible que des anomalies indétectables avec les techniques actuelles induisent l'expression d'un « tag » et soient responsables de la protéolyse des protéines spermatiques. Enfin, bien que peu probable, nous ne pouvons exclure une protéolyse liée à l'âge du spermatozoïde. La protéolyse observée serait alors un marqueur précoce de la sénescence du spermatozoïde. Toutefois, dans cette étude, le délai d'abstinence sexuelle est de 2 à 5 jours conférant peu de crédit à cette hypothèse.

A notre connaissance, il s'agit de la 1^{ère} étude rapportant le profil protéique du spermatozoïde chez l'homme normozoosperme. De plus amples investigations seraient nécessaires afin de comprendre l'origine et le mécanisme de la protéolyse observée.

2. AKAP4 - Hexokinase 1, de nouveaux marqueurs de qualité du spermatozoïde ?

Le profil protéique observé dans le groupe B est notamment caractérisé par la disparition d'une bande intense située à 110 kDa. La spectrométrie de masse a permis d'identifier deux protéines majoritairement contenues dans cette bande. Il s'agit de l'AKAP4 et de l'hexokinase 1. Ces deux protéines se localisent dans la gaine fibreuse de la pièce principale du flagelle du spermatozoïde.

2.1 La famille des protéines AKAPs

La phosphorylation des protéines de la famille AKAPs induit l'interaction avec la PKA. Cette interaction active la voie AMPc, modulatrice de la mobilité spermatique (Luconi 2005). Les protéines AKAPs sont codées par différents gènes et présentent toutes une forte affinité pour la sous-unité RII de la PKA par laquelle la voie AMPc est activée (Michel et Scott 2002; Scott 2003).

2.1.1 L'expression des protéines AKAPs

Les protéines AKAPs sont exprimées dans de nombreux tissus. Toutefois, chaque protéine présente une expression tissu spécifique résumée dans le tableau 9 (Colledge et Scott 1999; Feliciello et al. 2001; Carnegie et al. 2009; Skroblin et al. 2010).

AKAPs	chromosome	Expression
AKAP1	17	Prostate, petit intestin
AKAP2	17	-
AKAP3	12	Testicule, spermatozoïde
AKAP4	X	Testicule, spermatozoïde
AKAP5	14	Cerveau
AKAP6	14	Muscle cardiaque
AKAP7	6	Cerveau, cœur, poumon, pancréas, muscle squelettique
AKAP8	19	Cœur, foie, muscle squelettique, rein, pancréas
AKAP9	7	Ubiquitaire
AKAP10	17	-
AKAP11	13	Testicule, cœur, cerveau, foie, poumon, rein, ovaire
AKAP12	6	Cellules endothéliales
AKAP13	15	Ubiquitaire
AKAP14	X	Cils (trachée, tractus génital masculin)

Tableau 9 : Les protéines de la famille AKAPs.

D'après (Feliciello et al. 2001; Skroblin et al. 2010)

Parmi les AKAPs exprimées dans le tractus génital masculin, les protéines AKAP 3, 4 et 11 sont impliquées dans la voie AMPc à l'origine de l'initiation et du maintien du mouvement spermatique (Moss et Gerton 2001). L'AKAP11 est retrouvée au niveau de la pièce intermédiaire du flagelle. Dans la lignée germinale, des transcrits ont été détectés dans les phases précoces de la spermatogenèse à partir du stade spermatocyte pachytène chez le rat (Reinton et al. 2000). Dans le spermatozoïde, les AKAP3 et 4 composent environ 50% des protéines de la gaine fibreuse (Johnson et al. 1997; Turner et al. 1998; Brown 2002; Eddy et al. 2003). L'AKAP3 est capable de se lier à la protéine SP17 via un domaine homologue à celui de la RII-PKA (Lea et al. 2004). De la même façon, la ropporine interagit avec les AKAP3 et 4 (Fujita et al. 2000; Chen et al. 2010; Li et al. 2011). Ces protéines agissent comme modulatrices de la voie AMPc et par extension, la mobilité spermatique (Vijayaraghavan et al. 1999; Luconi 2005). L'AKAP4 est exprimée dans les stades tardifs de la spermatogenèse au stade spermatide ronde et allongée ainsi que dans le spermatozoïde (Hu et al. 2009).

2.1.2 Les phénotypes d'infertilité associés aux protéines AKAPs

La mutation du gène codant pour l'AKAP4 a été étudiée dans le cadre d'anomalie du flagelle du spermatozoïde humain notamment la dysplasie de la gaine fibreuse (Turner et al. 1999; 2001; Moretti et al. 2007; Zheng et al. 2010). Cette anomalie est associée à une asthénozoospermie sévère et se caractérise par un flagelle court, épais et de calibre irrégulier (Guichaoua et al. 2009).

2.2 L'hexokinase 1

L'isoforme testiculaire de l'hexokinase 1 est une enzyme glycolytique exprimée dans la gaine fibreuse (Eddy et al. 2003; Nakamura et al. 2008b). Sa particularité réside dans le fait qu'elle ne possède pas de domaine de liaison aux porines (Andreoni et al. 2000). Classiquement, l'hexokinase 1 intervient dans les premières étapes de la glycolyse en convertissant le glucose en glucose-6-phosphate. Selon le même mécanisme, elle peut convertir le fructose, substrat énergétique du spermatozoïde, en fructose-6-phosphate. Les études chez la souris ont montré que le spermatozoïde quiescent dans la queue de

l'épididyme présente l'hexokinase 1 sous forme de dimères phosphorylés reliés par des ponts disulfures. L'initiation de la mobilité spermatique coïncide avec une activité phosphatase et la rupture des ponts disulfures induisant l'expression de l'hexokinase 1 sous forme de monomères déphosphorylés. La production d'ATP est également augmentée (Nakamura et al. 2008a). Ainsi, le clivage et la déphosphorylation du dimère d'hexokinase 1 sont intimement liés à l'initiation de la mobilité spermatique.

2.3 Le profil d'expression de l'AKAP4 et de l'hexokinase 1 dans le spermatozoïde humain

Les immunoempreintes dirigées contre les protéines AKAP4 et hexokinase 1 au moyen d'anticorps dirigés contre les parties N-terminale et C-terminale ont révélé une bande unique pour les échantillons non protéolysés (groupe A). En ce qui concerne les échantillons protéolysés (groupe B), une cascade de bandes dans les différents poids moléculaires a été observée. Cette cascade apparaît avec un profil différent selon l'anticorps utilisé. Ces observations sont en faveur d'une protéolyse partielle de l'ensemble de ces protéines dans le groupe B. Toutefois, l'étude immunohistochimique n'a pas révélée de différences entre les deux groupes en ce qui concerne la localisation flagellaire de ces deux protéines.

3. L'index de qualité protéique (SPQI)

La distribution des échantillons au sein des groupes A et B est homogène. Le profil B étant caractérisé par la disparition de la bande située à 110 kDa, nous avons cherché à traduire mathématiquement cette observation. Les bandes de bas et hauts poids moléculaires ont été quantifiées et un ratio a été calculé. Le SPQI A ($1 < \text{SPQI A} < 2$) illustre une répartition homogène des protéines (groupe A). *A contrario*, la protéolyse partielle de l'ensemble des protéines (groupe B) déséquilibre le ratio et se traduit par le SPQI B ($1 > \text{SPQI B} > 2$) Ce ratio révèle alors la qualité protéique observée. Les paramètres spermatiques des deux groupes ont ensuite été comparés. La numération des spermatozoïdes apparaît différente entre les deux groupes en faveur du groupe A. De façon intéressante, la mobilité progressive des spermatozoïdes se révèle statistiquement

très différente entre les deux groupes bien que cette mobilité reste au dessus des limites basses définies par l'OMS. Des marqueurs moléculaires de la protéolyse ont été identifiés, l'AKAP4 et l'hexokinase 1. Les protéines AKAP4 et hexokinase 1 jouent un rôle clé dans la mobilité du spermatozoïde. La protéolyse de ces protéines semble être associée à une perte de mobilité. Ainsi, le SPQI pourrait être un indicateur du mouvement du spermatozoïde.

Les données préliminaires de la Procréation Médicalement Assistée des couples dont le sperme de l'homme a été inclus dans cette étude ont été recueillies et analysées. Les naissances ont été référencées selon la technique de PMA et triées selon le SPQI. En insémination intra-utérine, les taux de naissances sont comparables quelque soit l'index. En fécondation *in vitro*, le profil non protéolysé (groupe A) semble associé à un meilleur taux de réussite en terme de naissances. Ces données sont à prendre avec précaution puisque le nombre de cas n'autorise pas d'étude statistique. Il convient donc d'augmenter les effectifs et de réaliser une étude statistique afin d'associer le SPQI aux résultats de la PMA.

A notre connaissance, il s'agit de la 1^{ère} étude 1) du protéome global du spermatozoïde amenant à la définition d'un index de qualité 2) permettant l'établissement d'un lien entre le protéome spermatique et les paramètres du sperme et 3) mettant en rapport le protéome spermatique et les issues de grossesses en procréation médicalement assistée. Nos données encore préliminaires permettent de penser qu'il existe un lien entre le profil protéique et les chances de réussite en Procréation Médicalement Assistée.

4. Vers un test diagnostique ?

Le calcul du SPQI à partir de l'analyse d'un gel d'électrophorèse coloré au bleu de Coomassie est facilement réalisable au sein d'un laboratoire de Spermologie. Afin d'améliorer la reproductibilité et la standardisation de ce test, nous avons utilisé les puces à protéines Agilent. Les résultats peu reproductibles obtenus ne permettent pas d'envisager leur utilisation. Ainsi, le gel d'électrophorèse coloré au bleu de Coomassie

reste la méthode la moins coûteuse et la plus reproductible dans l'établissement du SPQI.

Outre les immunoempreintes, la protéolyse des protéines AKAP4 et hexokinase 1 peut être mise en évidence par un test ELISA. L'utilisation d'un anticorps de capture dirigé contre la partie C-terminale de la protéine AKAP4 et la révélation au moyen d'un anticorps dirigé contre la partie N-terminale permet de discriminer les échantillons où la protéine est clivée de ceux où la protéine est intègre. L'utilisation de la protéine recombinante pour réaliser une gamme étalon permettra d'établir une valeur seuil suggérant l'absence de protéolyse dans l'échantillon. Cette valeur seuil sera établie à partir de l'étude d'une importante cohorte. Bien que des mises au point soient encore nécessaires, les données préliminaires permettent d'affirmer la faisabilité de ce test. Ce test mis au point dans notre laboratoire permettrait d'identifier facilement et rapidement les échantillons présentant une protéolyse. Des tests ELISA sont d'ores et déjà utilisés dans les laboratoires d'analyses médicales. Notre test pourrait ainsi facilement être intégré dans l'activité d'un laboratoire de Spermologie. Le test ELISA concernant la protéine hexokinase 1 requiert des tests complémentaires avec des anticorps plus efficaces.

Conclusion et Perspectives

L'objectif principal de cette étude était de caractériser le protéome du spermatozoïde humain afin d'améliorer les connaissances sur la physiologie du spermatozoïde et de définir de nouveaux marqueurs de qualité.

Au total, notre étude du protéome du spermatozoïde humain aura permis :

- 1) la caractérisation du protéome du spermatozoïde humain par deux approches complétant les données de la littérature,**
- 2) l'identification et la caractérisation de protéines jamais décrites dans le spermatozoïde et le testicule humain,**

La protéomique permet de générer d'importants jeux de données dont l'exploitation apporte de nouvelles voies d'études du spermatozoïde. Les analyses bioinformatiques nous ont conduit à s'intéresser à la DCDC2C et à la culline 3, non décrites dans le spermatozoïde et le testicule humain.

Le rôle de la protéine DCDC2C dans la dynamique du réseau microtubulaire reste à définir par des études de colocalisation et d'interaction en particulier avec la protéine stathmine. La protéine DCX appartenant à la même famille de protéine que la DCDC2C a été détectée dans le testicule. Son expression différentielle dans le testicule normal et pathologique suggère un rôle de DCX dans la spermatogenèse. Des techniques de protéomique différentielle permettraient de confirmer ces premières observations. L'utilisation d'animaux invalidés pour DCX devrait apporter des informations quant au rôle de DCX dans la spermatogenèse. L'étude de la famille des protéines à domaine doublecortine dans la spermatogenèse et le spermatozoïde devrait permettre de comprendre certaines formes d'infertilité liées à des anomalies du réseau microtubulaire. Le rôle de ces protéines dans les pathologies ciliaires comme le syndrome de Kartagener mériterait d'être exploré.

L'étude menée sur la protéine culline 3 requiert des investigations complémentaires. Les partenaires de la culline 3 sont impliqués dans plusieurs phénotypes d'infertilité chez l'animal. Ces données font de la culline 3, une candidate intéressante pour comprendre les anomalies de la spermatogenèse chez l'homme.

L'exploitation des jeux de données obtenus par la protéomique est à poursuivre en multipliant les méthodes d'analyses. Par exemple, la combinaison de ces données aux résultats de la transcriptomique devrait permettre d'améliorer les connaissances sur la régulation de la physiologie du spermatozoïde.

Enfin, les analyses sont à poursuivre par des approches de protéomique différentielle. Ces méthodes permettront de mieux comprendre les anomalies du spermatozoïde au niveau moléculaire. Les avancées technologiques de la protéomique offrent de nouvelles voies d'études du spermatozoïde normal et pathologique encore peu exploitées.

3) la caractérisation du profil protéique du sperme normal,

4) l'établissement d'un index de qualité protéique en relation avec la mobilité progressive des spermatozoïdes,

5) l'identification de deux marqueurs moléculaires, AKAP4 et hexokinase 1 associée à l'index protéique de qualité,

L'étude du protéome spermatique a mené, pour la 1^{ère} fois, à l'établissement d'un index de qualité protéique en relation avec la mobilité des spermatozoïdes. L'utilisation des protéines AKAP4 et hexokinase 1 comme marqueurs de qualité du spermatozoïde apporterait un élément nouveau dans l'analyse du sperme. Les résultats sont à poursuivre et à systématiser au diagnostic. L'étude du profil protéique du sperme confrontée à l'issue de la Procréation Médicalement Assistée pourrait fournir des données intéressantes en relation directe avec le taux de fécondation. Le développement d'un kit diagnostique de la qualité protéique spermatique associée à celle de l'AKAP4 et de l'hexokinase 1 serait sans conteste d'un intérêt clinique certain dans la prise en charge de l'homme en Procréation Médicalement Assistée.

En conclusion, la protéomique est un outil précieux pour définir de nouveaux marqueurs de qualité du spermatozoïde et permet de comprendre la physiologie spermatique. Les données obtenues devraient permettre d'améliorer et compléter l'analyse de routine du spermogramme-spermocytogramme et plus largement la prise en charge du couple en Procréation Médicalement Assistée.

Bibliographie

A

- Abou-Haila A, Tulsiani DRP. Mammalian Sperm Acrosome: Formation, Contents, and Function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2000 Jul;379(2):173–82.
- Aitken RJ. The Capacitation-Apoptosis Highway: Oxysterols and Mammalian Sperm Function. *Biol Reprod*. 2011 Jun 24;85(1):9–12.
- Aitken RJ, Baker MA. The role of proteomics in understanding sperm cell biology. *Int J Androl*. 2008 Jun;31(3):295–302.
- Alves MG, Rato L, Carvalho RA, Moreira PI, Socorro S, Oliveira PF. Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis. *Cell. Mol. Life Sci*. 2013 Mar;70(5):777–93.
- Amaral A, Castillo J, Estanyol JM, Balleca JL, Ramalho-Santos J, Oliva R. Human Sperm Tail Proteome Suggests New Endogenous Metabolic Pathways. *Mol. Cell Proteomics*. 2013 Feb 5;12(2):330–42.
- Andreoni F, Ruzzo A, Magnani M. Structure of the 5' region of the human hexokinase type I (HK1) gene and identification of an additional testis-specific HK1 mRNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*. Elsevier; 2000;1493(1):19–26.
- Aoki VW, Emery BR, Liu L, Carrell DT. Protamine Levels Vary Between Individual Sperm Cells of Infertile Human Males and Correlate With Viability and DNA Integrity. *J Androl*. 2006 Jul 12;27(6):890–8.
- Asquith KL. Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. *J Cell Sci*. 2004 Jul 15;117(16):3645–57.
- Auger J. Assessing human sperm morphology: top models, underdogs or biometrics? *Asian J Androl*. Nature Publishing Group; 2010 Jan 1;(1):36–46.
- Auger J, Eustache F, David G. Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. *Andrologie*. Springer; 2000;10(4):358–73.

B

- Baker MA, Naumovski N, Hetherington L, Weinberg A, Velkov T, Aitken RJ. Head and flagella subcompartmental proteomic analysis of human spermatozoa. *Proteomics*. 2013 Jan 11;13(1):61–74.
- Baker MA, Reeves G, Hetherington L, Müller J, Baur I, Aitken RJ. Identification of gene products present in Triton X-100 soluble and insoluble fractions of human spermatozoa lysates using LC-MS/MS analysis. *Proteomics Clin Appl*. 2007 May;1(5):524–32.

- Baker MA, Witherdin R, Hetherington L, Cunningham-Smith K, Aitken RJ. Identification of post-translational modifications that occur during sperm maturation using difference in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*. 2005 Mar;5(4):1003–12.
- Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Krausz C, Forti G. Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Front Biosci*. 1996;1:189–205.
- Barroso G, Valdespin C, Vega E, Kershenovich R, Avila R, Avendano C, Oehninger S. Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. *Fertil Steril*. Elsevier Ltd; 2009 Sep 1;92(3):835–48.
- Beardsley A. Characterization of Normal Spermiation and Spermiation Failure Induced by Hormone Suppression in Adult Rats. *Biol Reprod*. 2002 Oct 30;68(4):1299–307.
- Bechstet S, Albert JT, Kreil DP, Iler-Reichert TMU, Pfert MCGO, Howard J. A doublecortin containing microtubule-associated protein is implicated in mechanotransduction in *Drosophila* sensory cilia. *Nature Communications*. Nature Publishing Group; 2010 Apr 12;1(1):1–11.
- Berruti G, Paiardi C. Acrosome biogenesis: Revisiting old questions to yield new insights. *Spermatogenesis*. 2011 Apr 1;1(2):95–8.
- Blas GAD, Roggero CM, Tomes CN, Mayorga LS. Dynamics of SNARE Assembly and Disassembly during Sperm Acrosomal Exocytosis. *Plos Biol*. 2005;3(10):e323.
- Blomberg Jensen M, Jørgensen A, Nielsen JE, Bjerrum PJ, Skalkam M, Petersen JH, Egeberg L, Bangsboll S, Andersen A, Skakkebaek N, Juul A, Rajpert-De Meyts E, Dissing S, Leffers H, Jørgensen N. Expression of the vitamin D metabolizing enzyme CYP24A1 at the annulus of human spermatozoa may serve as a novel marker of semen quality. *Int J Androl*. 2012 Mar 9:1-12.
- Bonde JP, Storgaard L. How work-place conditions, environmental toxicants and lifestyle affect male reproductive function. *Int J Androl*. 2002 Oct;25(5):262–8.
- Brewis IA, Gadella BM. Sperm surface proteomics: from protein lists to biological function. *Mol Hum Reprod*. 2010 Jan 7;16(2):68–79.
- Brouwers JF, Aalberts M, Jansen JWA, van Niel G, Wauben MH, Stout TAE, Helms J, Stoorvogel W. Distinct lipid compositions of two types of human prostasomes. Kislinger T, editor. *Proteomics*. 2013 Apr 2;13(10-11):1660–6.
- Brown PR. A-Kinase Anchoring Protein 4 Binding Proteins in the Fibrous Sheath of the Sperm Flagellum. *Biol Reprod*. 2002 Dec 27;68(6):2241–8.

C

Calvel P, Pineau C. Le plasma séminal à l'heure de la postgénomique. *MT médecine de la*

- reproduction. *John Libbey Eurotext*; 2010;12(3):225–32.
- Cappallo-Obermann H, Schulze W, Jastrow H, Baukloh V, Spiess AN. Highly purified spermatozoal RNA obtained by a novel method indicates an unusual 28S/18S rRNA ratio and suggests impaired ribosome assembly. *Mol Hum Reprod*. 2011 Oct 19;17(11):669–78.
- Carnegie GK, Means CK, Scott JD. A-kinase anchoring proteins: From protein complexes to physiology and disease. *IUBMB Life*. 2009 Apr;61(4):394–406.
- Carrera A, Moos J, Ning XP, Gerton GL, Tesarik J, Kopf GS, Moss S. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation. *Dev Biol*. Elsevier; 1996;180(1):284–96.
- Chakravarty S, Bansal P, Sutovsky P, Gupta SK. Role of proteasomal activity in the induction of acrosomal exocytosis in human spermatozoa. *Reproductive Healthcare Ltd, Duck End Farm, Dry Drayton, Cambridge CB23 8DB, UK*; 2008;16(3):391–400.
- Chalmel F, Primig M. The Annotation, Mapping, Expression and Network (AMEN) suite of tools for molecular systems biology. *BMC Bioinformatics*. 2008;9(1):86.
- Chan C-C, Shui H-A, Wu C-H, Wang C-Y, Sun G-H, Chen H-M, et al. Motility and Protein Phosphorylation in Healthy and Asthenozoospermic Sperm. *J Proteome Res*. 2009 Nov 6;8(11):5382–6.
- Chao H-CA, Chung C-L, Pan H-A, Liao P-C, Kuo P-L, Hsu C-C. Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 14 is a novel sperm-motility biomarker. *J Assist Reprod Genet*. 2011 Jun 24;28(9):851–61.
- Chaudhury K, Das T, Chakravarty B, Bhattacharyya AK. Acrosin activity as a potential marker for sperm membrane characteristics in unexplained male infertility. *Fertil Steril*. 2005 Jan;83(1):104–9.
- Chen J, Wang Y, Wei B, Lai Y, Yan Q, Gui Y, Cai Z. Functional Expression of Ropporin in Human Testis and Ejaculated Spermatozoa. *J Androl*. 2010 Dec 17;32(1):26–32.
- Cheuk BLY, Chew SBC, Fiscus RR, Wong PYD. Cyclooxygenase-2 regulates apoptosis in rat epididymis through prostaglandin D2. *Biol Reprod*. 2002 Feb;66(2):374–80.
- Chia SE, Tay SK, Lim ST. What constitutes a normal seminal analysis? Semen parameters of 243 fertile men. *Hum Reprod*. 1998 Dec;13(12):3394–8.
- Chiu Ming NG, Blackman MR, Wang C, Swerdloff RS. The Role of Carnitine in the Male Reproductive System. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Nov;1033(1):177–88.
- Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, Agarwal A. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *Int Braz J Urol*. 2007 Sep;33(5):603–21.
- Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ. Predictive value of normal sperm morphology: a

structured literature review. *Hum Reprod Update*. 1998 Jan;4(1):73–82.

Colledge M, Scott JD. AKAPs: from structure to function. *Trends Cell Biol*. 1999 Jun;9(6):216–21.

Costello S, Michelangeli F, Nash K, Lefievre L, Morris J, Machado-Oliveira G, Barratt C, Kirkman-Brown J, Publicover S. Ca²⁺-stores in sperm: their identities and functions. *Reproduction*. 2009 Aug 24;138(3):425–37.

D

Da Silva N, Shum WWC, Breton S. Regulation of vacuolar proton pumping ATPase-dependent luminal acidification in the epididymis. *Asian J Androl*. 2007 Jul;9(4):476–82.

Dacheux J-L, Belleannee C, Guyonnet B, Labas V, Teixeira-Gomes A-P, Ecroyd H, Drart X, Gatti JL, Dacheux F. The contribution of proteomics to understanding epididymal maturation of mammalian spermatozoa. *Syst Biol Reprod Med*. 2012 Aug;58(4):197–210.

Dacheux JL, Belghazi M, Lanson Y, Dacheux F. Human epididymal secretome and proteome. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2006 May;250(1-2):36–42.

De Lamirande E, O'Flaherty C. Sperm activation: Role of reactive oxygen species and kinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2008 Jan;1784(1):106–15.

De Mateo S, Castillo J, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R. Proteomic characterization of the human sperm nucleus. *Proteomics*. 2011 Jun 1;11(13):2714–26.

De Mateo S, Gázquez C, Guimerà M, Balasch J, Meistrich ML, Ballescà JL, Oliva R. Protamine 2 precursors (Pre-P2), protamine 1 to protamine 2 ratio (P1/P2), and assisted reproduction outcome. *Fertil Steril*. 2009 Mar;91(3):715–22.

De Mateo S, Ramos L, Van der Vlag J, de Boer P, Oliva R. Improvement in chromatin maturity of human spermatozoa selected through density gradient centrifugation. *Int J Androl*. 2010 Jun 20;34(3):256–67.

Dijkmans TF, van Hooijdonk LWA, Fitzsimons CP, Vreugdenhil E. The doublecortin gene family and disorders of neuronal structure. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 2010 Mar;10(1):32–46.

Domagala A, Kurpisz M. Identification of sperm immunoreactive antigens for immunocontraceptive purposes: a review. *Reprod. Biol. Endocrinol*. 2004 Mar 18;2:11.

Drake RR, Elschenbroich S, Lopez-Perez O, Kim Y, Ignatchenko V, Ignatchenko A, Nyalwidhe J, Basu G, Wilkins C, Gjurich B, Lance R, Semmes J, Medin J, Kislinger T. In-Depth Proteomic Analyses of Direct Expressed Prostatic Secretions. *J Proteome Res*.

2010 May 7;9(5):2109–16.

Drobnis EZ, Zhong CQ, Overstreet JW. Separation of cryopreserved human semen using Sephadex columns, washing, or Percoll gradients. *J Androl.* Wiley Online Library; 1991;12(3):201–8.

E

Eddy EM, Toshimori K, O'Brien DA. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech.* 2003 May 1;61(1):103–15.

Edelman AM. Doublecortin Kinase-2, a Novel Doublecortin-related Protein Kinase Associated with Terminal Segments of Axons and Dendrites. *Journal of Biological Chemistry.* 2004 Dec 16;280(9):8531–43.

Elzanaty S, Erenpreiss J, Becker C. Seminal plasma albumin: origin and relation to the male reproductive parameters. *Andrologia.* 2007 Apr;39(2):60–5.

Enciso M, Iglesias M, Galán I, Sarasa J, Gosálvez A, Gosálvez J. The ability of sperm selection techniques to remove single- or double-strand DNA damage. *Asian J Androl.* 2011 Jul 4;13(5):764–8.

F

Feliciello A, Gottesman ME, Avvedimento EV. The biological functions of A-kinase anchor proteins. *J. Mol. Biol.* 2001 Apr 27;308(2):99–114.

Ferrer M, Rodriguez H, Zara L, Yu Y, Xu W, Oko R. MMP2 and acrosin are major proteinases associated with the inner acrosomal membrane and may cooperate in sperm penetration of the zona pellucida during fertilization. *Cell Tissue Res.* 2012 May 22;349(3):881–95.

Ficarro S. Phosphoproteome Analysis of Capacitated Human Sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation. *Journal of Biological Chemistry.* 2002 Dec 30;278(13):11579–89.

Filipovic R, Santhosh Kumar S, Fiondella C, Loturco J. Increasing Doublecortin Expression Promotes Migration of Human Embryonic Stem Cell-Derived Neurons. *Stem cells.* 2012 Aug 20;30(9):1852–62.

Filippi S. Oxytocin Mediates the Estrogen-Dependent Contractile Activity of Endothelin-1 in Human and Rabbit Epididymis. *Endocrinology.* 2005 Apr 28;146(8):3506–17.

Flesch FM, Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000 Nov 10;1469(3):197–235.

- Fontaine J-M, Rest JS, Welsh MJ, Benndorf R. The sperm outer dense fiber protein is the 10th member of the superfamily of mammalian small stress proteins. *Cell stress & chaperones*. Springer; 2003;8(1):62.
- Friocourt G, Koulakoff A, Chafey P, Boucher D, Fauchereau F, Chelly J, Francis F. Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes. *Cerebral Cortex*. Oxford Univ Press; 2003;13(6):620-6.
- Fu X, Brown KJ, Yap CC, Winckler B, Jaiswal JK, Liu JS. Doublecortin (Dcx) Family Proteins Regulate Filamentous Actin Structure in Developing Neurons. *Journal of Neuroscience*. 2013 Jan 9;33(2):709-21.
- Fujita A, Nakamura K, Kato T, Watanabe N, Ishizaki T, Kimura K, Mizoguchi A, Narumiya S. Ropporin, a sperm-specific binding protein of rhophilin, that is localized in the fibrous sheath of sperm flagella. *J Cell Sci*. 2000 Jan;113 (Pt 1):103-12.
- Fung KYC, Glode LM, Green S, Duncan MW. A comprehensive characterization of the peptide and protein constituents of human seminal fluid. *Prostate*. 2004;61(2):171-81.

G

- Gadella BM, Harrison RA. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development*. 2000 Jun;127(11):2407-20.
- Gadella BM, Tsai P-S, Boerke A, Brewis IA. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int J Dev Biol*. 2008;52(5-6):473-80.
- Galeraud-Denis I, Travert C, de Vienne C, Said L, Saad A, Carreau S. New insights about the evaluation of human sperm quality: the aromatase example. *Folia Histochem Cytobiol*. 2010 Jan 12;47(5):S13-7.
- Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*. Elsevier; 1999;23(2):257-71.
- Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological Reviews*. 2002 Apr;82(2):373-428.
- Griswold MD. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol Reprod. Soc Study Reprod*; 1995;52(2):211-6.
- Grizard G, Jimenez C. Les examens du sperme dans l'exploration de la fertilité masculine. *Progrès en Urologie*. 1997;7:496-504.
- Grunewald S, Paasch U, Glander HJ, Anderegg U. Mature human spermatozoa do not transcribe novel RNA. *Andrologia*. Wiley Online Library; 2005;37(2-3):69-71.

- Guérif FG. Choix de la technique de l'Assistance médicale à la procréation en fonction du spermocytogramme. *Gynecol Obstet Fertil*. Elsevier Masson SAS; 2010 Sep 1;38(9):508-10.
- Guichaoua M-R, Geoffroy-Siraudin C, Mercier G, Achard V, Paulmyer-Lacroix O, Metzler-Guillemain C. Aspects génétiques de la tératozoospermie. *Gynecol Obstet Fertil*. 2009 Jun;37(6):540-5.
- Guillaume E, Evrard B, Com E, Moertz E, Jégou B and Pineau C, Proteome analysis of rat spermatogonia : re-investigation of stathmin spatio-temporal expression within the testis, *Molecular Reproduction and Development*. 2001. 60:439-445.
- Gur Y, Breitbart H. Protein synthesis in sperm: Dialog between mitochondria and cytoplasm. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2008 Jan;282(1-2):45-55.
- Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson S, Cisneros P, Steinkampf M, Hill J, Xu D, Vogel D. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N. Engl. J. Med*. 2001 Nov 8;345(19):1388-93.

H

- Hamatani T. Spermatozoal RNA profiling towards a clinical evaluation of sperm quality. *Reproductive BioMedicine Online*. Reproductive Healthcare Ltd; 2011 Feb 1;22(2):103-5.
- Hamatani T. Human spermatozoal RNAs. *Fertil Steril*. 2012 Feb;97(2):275-81.
- Henkel R, Schreiber G, Sturmhoefel A, Hipler U-C, Zermann DH, Menkveld R. Comparison of three staining methods for the morphological evaluation of human spermatozoa. *Fertil Steril*. 2008 Feb;89(2):449-55.
- Henkel RR, Schill W-B. Sperm preparation for ART. *Reprod. Biol. Endocrinol*. 2003 Nov 14;1:108.
- Hernández-Ochoa I, Sánchez-Gutiérrez M, Solís-Heredia MJ, Quintanilla-Vega B. Spermatozoa nucleus takes up lead during the epididymal maturation altering chromatin condensation. *Reproductive Toxicology*. 2006 Feb;21(2):171-8.
- Horesh D, Sapir T, Francis F, Wolf SG, Caspi M, Elbaum M, Chelly J, Reiner O. Doublecortin, a stabilizer of microtubules. *Hum Mol Genet*. 1999 Sep;8(9):1599-610.
- Hu Y, Yu H, Pask AJ, O'Brien DA, Shaw G, Renfree MB. A-kinase anchoring protein 4 has a conserved role in mammalian spermatogenesis. *Reproduction*. 2009 Jan 7;137(4):645-53.
- Huang HF, He RH, Sun CC, Zhang Y, Meng QX, Ma YY. Function of aquaporins in female and male reproductive systems. *Hum Reprod Update*. 2006 Aug 4;12(6):785-95.

I

Inaba K. Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components. *Mol Hum Reprod*. 2011 Jul 14;17(8):524–38.

J

Jin K, Mao X, Cottrell B, Schilling B, Xie L, Row R, Sun Y, Peel A, Childs J, Gendeh G, Gibson B, Greenberg D. Proteomic and immunochemical characterization of a role for stathmin in adult neurogenesis. *The FASEB Journal*. 2004 Feb 1;18(2):287–99.

Johnson GD, Lalancette C, Linnemann AK, Leduc F, Boissonneault G, Krawetz SA. The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. *Reproduction*. 2010 Dec 14;141(1):21–36.

Johnson LR, Foster JA, Haig-Ladewig L, VanScoy H, Rubin CS, Moss SB, Gerton G. Assembly of AKAP82, a protein kinase A anchor protein, into the fibrous sheath of mouse sperm. *Dev Biol*. 1997 Dec 15;192(2):340–50.

K

Kaplan Y, Gibbs-Bar L, Kalifa Y, Feinstein-Rotkopf Y, Arama E. Gradients of a Ubiquitin E3 Ligase Inhibitor and a Caspase Inhibitor Determine Differentiation or Death in Spermatids. *Developmental Cell*. Elsevier Ltd; 2010 Jul 20;19(1):160–73.

Khatti A, Reddy VP, Pandey RK, Sudhakar DVS, Gupta NJ, Chakravarty BN, Deenadayal M, Singh L, Thangaraj K. Novel mutations in calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV (CAMK4) gene in infertile men. *Int J Androl*. 2012 Aug 17;35(6):810–8.

Kim E, Yamashita M, Kimura M, Honda A, Kashiwabara S-I, Baba T. Sperm penetration through cumulus mass and zona pellucida. *Int J Dev Biol*. 2008;52(5-6):677–82.

Kirchhoff C. Molecular characterization of epididymal proteins. *Rev. Reprod*. 1998 May;3(2):86–95.

Klemm U, Müller-Esterl W, Engel W. Acrosin, the peculiar sperm-specific serine protease. *Hum. Genet*. 1991 Oct;87(6):635–41.

Konno A, Setou M, Ikegami K. Ciliary and Flagellar Structure and Function-Their Regulations by Posttranslational Modifications of Axonemal Tu. 1st ed. *International Review Of Cell and Molecular Biology*. Elsevier Inc; 2012. pp. 133–70.

Kopanja D, Roy N, Stoyanova T, Hess RA, Bagchi S, Raychaudhuri P. *Developmental Biology*. Dev Biol. Elsevier B.V; 2011 Apr 15;352(2):278–87.

Koren E, Lukac J. Mechanism of liquefaction of the human ejaculate. I. Changes of the ejaculate proteins. *J Reprod Fertil*. 1979 Jul;56(2):493–9.

- Kruger TF, Coetzee K. The role of sperm morphology in assisted reproduction. *Hum Reprod Update*. 1999 Mar;5(2):172–8.
- Kumar M, Kumar K, Jain S, Hassan T, Dada R. Novel insights into the genetic and epigenetic paternal contribution to the human embryo. *Clinics*. 2013 Mar 5;68(S1):5–14.
- Kumar S, Tomar AK, Singh S, Saraswat M, Singh S, Singh TP, Yadav S. Human serum albumin as a new interacting partner of prolactin inducible protein in human seminal plasma. *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V; 2012 Mar 1;50(2):317–22.
- Kumar V, Hassan MI, Tomar AK, Kashav T, Nautiyal J, Singh S, et al. Proteomic analysis of heparin-binding proteins from human seminal plasma: a step towards identification of molecular markers of male fertility. *J Biosci*. 2009 Nov 27;34(6):899–908.

L

- Lea IA, Widgren EE, O'Rand MG. Association of sperm protein 17 with A-kinase anchoring protein 3 in flagella. *Reprod. Biol. Endocrinol*. 2004 Jul 16;2:57.
- Lee C, Keefer M, Zhao ZW, Kroes R, Berg L, Liu X, Sensibar J. Demonstration of the Role of Prostate-Specific Antigen in Semen Liquefaction by Two-Dimensional Electrophoresis. *J Androl*. Wiley Online Library; 1989;10(6):432–8.
- Lefevre A, Duquenne C, Rousseau-Merck MF, Rogier E, Finaz C. Cloning and characterization of SOB1, a new testis-specific cDNA encoding a human sperm protein probably involved in oocyte recognition. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 May 27;259(1):60–6.
- Lefièvre L, Chen Y, Conner SJ, Scott JL, Publicover SJ, Ford WCL, Barratt C. Human spermatozoa contain multiple targets for protein S-nitrosylation: An alternative mechanism of the modulation of sperm function by nitric oxide? *Proteomics*. 2007 Sep;7(17):3066–84.
- Legare C. HE1/NPC2 status in human reproductive tract and ejaculated spermatozoa: consequence of vasectomy. *Mol Hum Reprod*. 2006 May 18;12(7):461–8.
- Leßig J, Arnhold J, Glander HJ. α 1-antitrypsin prevents polymorphonuclear leucocyte-elastase effects on spermatozoa quality. *Int J Androl*. 2009 Mar 5;33(1):64–72.
- Lewis SEM. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction*. 2007 Jul 1;134(1):31–40.
- Li C, Zhou X. Gene transcripts in spermatozoa: Markers of male infertility. *Clinica Chimica Acta*. Elsevier B.V; 2012 Jul 11;413(13-14):1035–8.
- Li Y-F, He W, Mandal A, Kim Y-H, Digilio L, Klotz K, Flickinger C, Herr J. CABYR binds to AKAP3 and Ropporin in the human sperm fibrous sheath. *Asian J Androl*.

- 2011;13(2):266–74.
- Lie PPY, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. Cytoskeletal dynamics and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci.* 2010 May 27;365(1546):1581–92.
- Lilja H, Laurell CB. Liquefaction of coagulated human semen. *Scand J Clin Lab Invest.* 1984 Sep;44(5):447–52.
- Lishko PV, Kirichok Y, Ren D, Navarro B, Chung J-J, Clapham DE. The Control of Male Fertility by Spermatozoan Ion Channels. *Annu Rev Physiol.* 2012 Mar 17;74(1):453–75.
- Liu Y, Wang DK, Chen LM. The Physiology of Bicarbonate Transporters in Mammalian Reproduction. *Biol Reprod.* 2012 Apr 5;86(4):99–9.
- Longoni N, Kunderfranco P, Pellini S, Albino D, Mello-Grand M, Pinton S, D'ambrosio G, Sarti M, Sessa F, Chiorino G, Catapano CV, Carbone GM Aberrant expression of the neuronal-specific protein DCDC2 promotes malignant phenotypes and is associated with prostate cancer progression. *Nature Publishing Group;* 2012 Jun 25;32(18):2315–24.
- Luconi M. Increased phosphorylation of AKAP by inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances human sperm motility through tail recruitment of protein kinase A. *J Cell Sci.* 2004 Mar 1;117(7):1235–46.
- Luconi M. Tyrosine Phosphorylation of the A Kinase Anchoring Protein 3 (AKAP3) and Soluble Adenylate Cyclase Are Involved in the Increase of Human Sperm Motility by Bicarbonate. *Biol Reprod.* 2005 Jan 1;72(1):22–32.
- Lukač J, Koren E. Mechanism of liquefaction of the human ejaculate II. Role of collagenase-like peptidase and seminal proteinase. *Reproduction. Soc Reprod Fertility;* 1979;56(2):501–6.

M

- Martin-DeLeon PA. Germ-cell hyaluronidases: their roles in sperm function. *Int J Androl.* 2011 Mar 21;34(5pt2):e306–18.
- Martínez-Heredia J, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R. Proteomic identification of human sperm proteins. *Proteomics.* 2006 Aug;6(15):4356–69.
- Massinen S, Hokkanen M-E, Matsson H, Tammimies K, Tapia-Páez I, Dahlström-Heuser V, Kuja-Panula J, Burghoorn J, Jeppsson K, Swoboda P, Peyrard-Janvid M, Tofgard R, Castren E, Kere J. Increased Expression of the Dyslexia Candidate Gene DCDC2 Affects Length and Signaling of Primary Cilia in Neurons. *Palau F, editor. PLoS ONE.* 2011 Jun 16;6(6):e20580.
- Menkveld R, Holleboom CAG, Rhemrev JPT. Measurement and significance of sperm morphology. *Asian J Androl.* 2011;13(1):59–68.

- Michel JJC, Scott JD. AKAP mediated signal transduction. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2002;42:235–57.
- Miki K, Qu W, Goulding EH, Willis WD, Bunch DO, Strader LF, Perreault S, Eddy E, O'Brien D. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proc Natl Acad Sci USA. National Acad Sciences*; 2004;101(47):16501–6.
- Milardi D, Grande G, Vincenzoni F, Messana I, Pontecorvi A, De Marinis L, Castagnola M, Marana R. Proteomic approach in the identification of fertility pattern in seminal plasma of fertile men. *Fertil Steril.* 2012 Jan;97(1):67–73.e1.
- Moores CA, Perderiset M, Francis F, Chelly J, Houdusse A, Milligan RA. Mechanism of microtubule stabilization by doublecortin. *Molecular cell. Elsevier*; 2004;14(6):833–9.
- Moreno RD, Alvarado CP. The mammalian acrosome as a secretory lysosome: new and old evidence. *Mol Reprod Dev.* 2006;73(11):1430–4.
- Moretti E, Scapigliati G, Pascarelli NA, Baccetti B, Collodel G. Localization of AKAP4 and tubulin proteins in sperm with reduced motility. *Asian J Androl.* 2007 Sep;9(5):641–9.
- Moss SB, Gerton GL. A-kinase anchor proteins in endocrine systems and reproduction. *Trends Endocrinol. Metab.* 2001 Dec;12(10):434–40.
- Mruk DD, Cheng CY. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev.* 2004 Oct;25(5):747–806.

N

- Naaby-Hansen S. Functional and immunological analysis of the human sperm proteome. *Dan Med J.* 2012 Apr;59(4):B4414.
- Nakamura N, Miranda-Vizueté A, Miki K, Mori C, Eddy EM. Cleavage of Disulfide Bonds in Mouse Spermatogenic Cell-Specific Type 1 Hexokinase Isozyme Is Associated with Increased Hexokinase Activity and Initiation of Sperm Motility. *Biol Reprod.* 2008a Aug 21;79(3):537–45.
- Nakamura N, Shibata H, O'Brien DA, Mori C, Eddy EM. Spermatogenic cell-specific type 1 hexokinase is the predominant hexokinase in sperm. *Mol Reprod Dev.* 2008b Apr;75(4):632–40.
- Nallella KP, Sharma RK, Aziz N, Agarwal A. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertil Steril.* 2006 Mar;85(3):629–34.
- Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S. *Andrology.* Springer; 2010.

Nixon B, Aitken RJ. The biological significance of detergent-resistant membranes in spermatozoa. *J Reprod Immunol*. 2009 Dec;83(1-2):8-13.

O

O'Donnell L, Nicholls PK, O'Bryan MK, McLachlan RI, Stanton PG. Spermiation: The process of sperm release. *Spermatogenesis*. 2011 Jan 1;1(1):14-35.

O'Rand MG, Widgren EE, Hamil KG, Silva EJ, Richardson RT. Functional studies of eppin. *Biochem. Soc. Trans*. 2011 Sep 21;39(5):1447-9.

Oh-Oka T, Tanii I, Wakayama T, Yoshinaga K, Watanabe K, Toshimori K. Partial characterization of an intra-acrosomal protein, human acrin1 (MN7). *J Androl*. 2001 Jan;22(1):17-24.

Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update*. 2006 Mar 24;12(4):417-35.

Oliva R, Castillo J. Proteomics and the genetics of sperm chromatin condensation. *Asian J Androl*. 2011;13(1):24-30.

Oliva R, De Mateo S, Castillo J, Azpiazu R, Oriola J, Ballescà JL. Methodological advances in sperm proteomics. *Hum Fertil (Camb)*. 2010 Dec;13(4):263-7.

Oliva R, De Mateo S, Estanyol JM. Sperm cell proteomics. Dunn MJ, editor. *Proteomics*. 2009 Feb;9(4):1004-17.

Oliva R, Luís Ballescà J. Altered histone retention and epigenetic modifications in the sperm of infertile men. *Asian J Androl*. 2011 Nov 7;14(2):239-40.

Oliva R, Martínez-Heredia J, Estanyol JM. Proteomics in the Study of the Sperm Cell Composition, Differentiation and Function. *Syst Biol Reprod Med*. 2008 Jan;54(1):23-36.

P

Pelliccione F, Micillo A, Cordeschi G, D'Angeli A, Necozone S, Gandini L, Lenzi A, Francavilla F, Francavilla S. Altered ultrastructure of mitochondrial membranes is strongly associated with unexplained asthenozoospermia. *Fertil Steril*. Elsevier; 2011;95(2):641-6.

Petersen C, Füzesi L, Hoyer-Fender S. Outer dense fibre proteins from human sperm tail: molecular cloning and expression analyses of two cDNA transcripts encoding proteins of ~ 70 kDa. *Mol Hum Reprod*. Oxford Univ Press; 1999;5(7):627-35.

Pilch B, Mann M. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. *Genome Biol*. 2006;7(5):R40.

Piomboni P, Focarelli R, Stendardi A, Ferramosca A, Zara V. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *Int J Androl*. 2012 Apr;35(2):109–24.

Pixton KL. Sperm proteome mapping of a patient who experienced failed fertilization at IVF reveals altered expression of at least 20 proteins compared with fertile donors: Case report. *Hum Reprod*. 2004 Apr 22;19(6):1438–47.

Plessis du SS, Kashou AH, Benjamin DJ, Yadav SP, Agarwal A. Proteomics: a subcellular look at spermatozoa. *Reproductive Biology and Endocrinology*. BioMed Central Ltd; 2011 Mar 22;9(1):36.

R

Raff EC, Hoyle HD, Popodi EM, Turner FR. Axoneme β -Tubulin Sequence Determines Attachment of Outer Dynein Arms. *Current Biology*. 2008 Jun;18(12):911–4.

Rawe VY, Diaz ES, Abdelmassih R, Wojcik C, Morales P, Sutovsky P, Chemes H. The role of sperm proteasomes during sperm aster formation and early zygote development: implications for fertilization failure in humans. *Hum Reprod*. 2008 Mar 1;23(3):573–80.

Reinton N, Collas P, Haugen TB, Skålhegg BS, Hansson V, Jahnsen T, et al. Localization of a Novel Human A-Kinase-Anchoring Protein, hAKAP220, during Spermatogenesis. *Dev Biol*. 2000 Jul;223(1):194–204.

Roberts KP, Johnston DS, Nolan MA, Wooters JL, Waxmonsky NC, Piehl LB, Ensrud-Bowlin K, Hamilton D. Structure and function of epididymal protein cysteine-rich secretory protein-1. *Asian J Androl*. 2007 Jul;9(4):508–14.

Rolland AD, Lavigne R, Daully C, Calvel P, Kervarrec C, Freour T, Evrard B, Rioux-Leclercq N, Auger J, Pineau C. Identification of genital tract markers in the human seminal plasma using an integrative genomics approach. *Hum Reprod*. 2012 Sep 27.

Romero Y, Calvel P, Nef S. Petits ARN non codants et spermatogénèse. *Med Sci (Paris)*. 2012 May 30;28(5):490–6.

Rousseaux S, Faure A-K, Caron C, Lestrat C, Govin J, Hennebicq S, Sèle B, Khochbin S. Organisation nucléaire du spermatozoïde. *Gynecol Obstet Fertil*. 2004 Sep;32(9):785–91.

S

Saez F, Ouvrier A, Drevet JR. Epididymis cholesterol homeostasis and sperm fertilizing ability. *Asian J Androl*. 2010 Nov 1;13(1):11–7.

Saito K, O'Donnell L, McLachlan RI, Robertson DM. Spermiation Failure Is a Major Contributor to Early Spermatogenic Suppression Caused by Hormone Withdrawal in

- Adult Rats*. *Endocrinology*. 2000 Aug;141(8):2779–85.
- Santi CM, Orta G, Salkoff L, Visconti PE, Darszon A, Treviño CL. K⁺ and Cl⁻ channels and transporters in sperm function. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2013;102:385–421.
- Scott JD. A-kinase-anchoring proteins and cytoskeletal signalling events. *Biochem. Soc. Trans.* 2003 Feb;31(Pt 1):87–9.
- Sendler E, Johnson GD, Mao S, Goodrich RJ, Diamond MP, Hauser R, Krawetz S. Stability, delivery and functions of human sperm RNAs at fertilization. *Nucleic Acids Research*. 2013 Apr 12;41(7):4104–17.
- Shao X, Murthy S, Demetrick DJ, van der Hoorn FA. Human outer dense fiber gene, ODF2, localizes to chromosome 9q34. *Cytogenet. Cell Genet.* 1998;83(3-4):221–3.
- Skroblin P, Grossmann S, Schfer G, Rosenthal W, Klussmann E. Mechanisms of Protein Kinase A Anchoring. 1st ed. *International Review Of Cell and Molecular Biology*. Elsevier Inc; 2010. pp. 235–330.
- Sloboda RD. Chapter 18 - Posttranslational Protein Modifications in Cilia and Flagella. First edition. *Methods in Cell Biology: Volume 94*. Elsevier; 2009. pp. 347–63.
- Sperry AO. The dynamic cytoskeleton of the developing male germ cell. *Biology of the Cell*. 2012 Mar 14;104(5):297–305.
- Stuhrmann M, Dörk T. CFTR gene mutations and male infertility. *Andrologia*. 2000 Mar;32(2):71–83.
- Sutovsky P. Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: Killing three birds with one stone. *Microsc Res Tech*. 2003 May 1;61(1):88–102.
- Sutovsky P. Sperm proteasome and fertilization. *Reproduction*. 2011 Jul 13;142(1):1–14.

T

- Tang EI, Mruk DD, Cheng CY. MAP/microtubule affinity-regulating kinases, microtubule dynamics, and spermatogenesis. *Journal of Endocrinology*. 2013 Apr 15;217(2):R13–R23.
- Thompson WE. Ubiquitination of Prohibitin in Mammalian Sperm Mitochondria: Possible Roles in the Regulation of Mitochondrial Inheritance and Sperm Quality Control. *Biol Reprod*. 2003 Feb 19;69(1):254–60.
- Thomson T, Lin H. The Biogenesis and Function of PIWI Proteins and piRNAs: Progress and Prospect. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2009 Nov;25(1):355–76.
- Tomar AK, Sooch BS, Singh S, Yadav S. Differential proteomics of human seminal plasma: A potential target for searching male infertility marker proteins. *Proteomics Clin*

Appl. 2012 Apr 25;6(3-4):147–51.

Turner RM. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod. Fertil. Dev.* 2006;18(2):25.

Turner RM, Eriksson RL, Gerton GL, Moss SB. Relationship between sperm motility and the processing and tyrosine phosphorylation of two human sperm fibrous sheath proteins, pro-hAKAP82 and hAKAP82. *Mol Hum Reprod.* 1999 Sep;5(9):816–24.

Turner RM, Johnson LR, Haig-Ladewig L, Gerton GL, Moss SB. An X-linked gene encodes a major human sperm fibrous sheath protein, hAKAP82. Genomic organization, protein kinase A-RII binding, and distribution of the precursor in the sperm tail. *J Biol Chem.* 1998 Nov 27;273(48):32135–41.

Turner RM, Musse MP, Mandal A, Klotz K, Jayes FC, Herr JC, Gerton G, Moss S, Chemes H. Molecular genetic analysis of two human sperm fibrous sheath proteins, AKAP4 and AKAP3, in men with dysplasia of the fibrous sheath. *J Androl.* 2001 Mar;22(2):302–15.

U

Utleg AG, Yi EC, Xie T, Shannon P, White JT, Goodlett DR, Hood L, Lin B. Proteomic analysis of human prostasomes. *Prostate.* 2003 May 7;56(2):150–61.

V

Valbuena G, Hernández F, Madrid JF, Sáez FJ. Acrosome Biosynthesis in Spermatocytes and Spermatids Revealed by HPA Lectin Cytochemistry. *Anat Rec.* 2008 Sep;291(9):1097–105.

Van den Bergh M, Revelard P, Bertrand E, Biramane J, Vanin AS, Englert Y. Glass wool column filtration, an advantageous way of preparing semen samples for intracytoplasmic sperm injection: an auto-controlled randomized study. *Hum Reprod.* 1997 Mar;12(3):509–13.

Vijayaraghavan S, Liberty GA, Mohan J, Winfrey VP, Olson GE, Carr DW. Isolation and molecular characterization of AKAP110, a novel, sperm-specific protein kinase A-anchoring protein. *Molecular Endocrinology.* 1999 May;13(5):705–17.

Visconti PE, Ning X, Fornés MW, Alvarez JG, Stein P, Connors SA, Kopf G. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol.* 1999 Oct 15;214(2):429–43.

W

- Wang DY, Chan WM, Tam POS, Baum L, Lam DSC, Chong KKL, Fan BJ, Pang CP. Gene mutations in retinitis pigmentosa and their clinical implications. *Clinica Chimica Acta*. 2005 Jan;351(1-2):5–16.
- Wang G, Guo Y, Zhou T, Shi X, Yu J, Yang Y, Wu Y, Wang J, Liu M, Chen X, Tu W, Zeng Y, Jiang M, Li S, Zhang P, Zhou Q, Zheng B, Yu C, Zhou Z, Guo X, Sha J. In-depth proteomic analysis of the human sperm reveals complex protein compositions. *Journal of Proteomics*. Elsevier B.V; 2013 Feb 21;79(C):114–22.
- Wang S, Zheng H, Esaki Y, Kelly F, Yan W. Cullin3 is a KLHL10-interacting protein preferentially expressed during late spermiogenesis. *Biol Reprod*. 2006 Jan;74(1):102–8.
- Wong PY. CFTR gene and male fertility. *Mol Hum Reprod*. 1998 Feb;4(2):107–10.
- World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010.
- Wuttke MS, Buck J, Levin LR. Bicarbonate-regulated soluble adenylyl cyclase. *JOP*. 2001 Jul;2(4 Suppl):154–8.
- Wykes SM. The Structural Organization of Sperm Chromatin. *Journal of Biological Chemistry*. 2003 Jun 4;278(32):29471–7.

X

- Xu C, Rigney DR, Anderson DJ. Two-dimensional electrophoretic profile of human sperm membrane proteins. *J Androl*. 1994 Nov;15(6):595–602.
- Xu W, Hu H, Wang Z, Chen X, Yang F, Zhu Z, Fang P, Dai J, Wang L, Shi H, Li Z, Qiao Z. Proteomic characteristics of spermatozoa in normozoospermic patients with infertility. *Journal of Proteomics*. Elsevier B.V; 2012 Sep 18;75(17):5426–36.

Y

- Yan W, Ma L, Burns KH, Matzuk MM. Haploinsufficiency of kelch-like protein homolog 10 causes infertility in male mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 May 18;101(20):7793–8.
- Yang K, Meinhardt A, Zhang B, Grzmil P, Adham IM, Hoyer-Fender S. The Small Heat Shock Protein ODF1/HSPB10 Is Essential for Tight Linkage of Sperm Head to Tail and Male Fertility in Mice. *Molecular and Cellular Biology*. 2011 Dec 12;32(1):216–25.
- Yin Y, Lin C, Kim ST, Roig I, Chen H, Liu L, Veith GM, Jin R, Keeney S, Jasin M, Moley K,

Zhou P, Ma L. The E3 ubiquitin ligase Cullin 4A regulates meiotic progression in mouse spermatogenesis. *Dev Biol.* Elsevier Inc; 2011 Aug 1;356(1):51–62.

Yurttas P, Morency E, Coonrod SA. Use of proteomics to identify highly abundant maternal factors that drive the egg-to-embryo transition. *Reproduction.* 2010 Apr 22;139(5):809–23.

Z

Zahn A, Furlong LI, Biancotti JC, Ghiringhelli PD, Marijn-Briggiler CI, Vazquez-Levin MH. Evaluation of the proacrosin/acrosin system and its mechanism of activation in human sperm extracts. *J Reprod Immunol.* 2002 Mar;54(1-2):43–63.

Zalensky AO. Human Testis/Sperm-specific Histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *Journal of Biological Chemistry.* 2002 Sep 3;277(45):43474–80.

Zavos PM, Centola GM. Methods of semen preparation for intrauterine insemination and subsequent pregnancy rates. *Tohoku J Exp Med.* 1992;168(4):583.

Zeng L, Gu S, Li Y, Zhao E, Xu J, Ye X, Mao Y. Identification of a novel human doublecortin-domain-containing gene (DCDC1) expressed mainly in testis. *Journal of Human Genetics.* 2003 Jul 1;48(7):393–6.

Zheng K, Yang F, Wang PJ. Regulation of Male Fertility by X-Linked Genes. *J Androl.* 2010 Feb 16;31(1):79–85.

Zimmerman S, Sutovsky P. The sperm proteasome during sperm capacitation and fertilization. *J Reprod Immunol.* 2009 Dec;83(1-2):19–25.

Zorn B, Golob B, Ihan A, Kopitar A, Kolbezen M. Apoptotic sperm biomarkers and their correlation with conventional sperm parameters and male fertility potential. *J Assist Reprod Genet.* 2012 Apr;29(4):357–64.

Annexes

CURRICULUM VITAE

Fanny JUMEAU

Doctorante en Biologie de la Reproduction – Spermiologie (PhD student)
Diplômée en Management de la Qualité

299 rue Solférino, 59000 LILLE (France)

+33 6 59 74 33 05

fanny.jumeau@inserm.fr

Permis B, véhiculé

Formations et Expériences

➤ **Doctorat (PhD), Spécialité Biologie de la Reproduction – Spermiologie (Soutenance prévue le 16 septembre 2013), Ecole doctorale Biologie-Santé (Université Lille 2)**

- ✓ « Le protéome du spermatozoïde humain : un outil puissant pour comprendre et caractériser la qualité du spermatozoïde »
- ✓ Lauréate de la bourse SALAT- BAROUX 2010
- ✓ Lauréate de la bourse SFEAP 2013 pour une participation au congrès EuPA, Saint Malo, France
- ✓ Directrice de Thèse : Dr Valérie MITCHELL (MCU-PH), Laboratoire de Spermiologie - Institut de Biologie de la Reproduction (CHRU de Lille ; EA 4308 Gamétogénèse et Qualité du Gamète)
Co-directeur de Thèse : Dr Nicolas SERGEANT (DR), Equipe INSERM UMR837 (IPARC Lille), Université Lille 2

➤ **Master biologie de la reproduction (2008-2010) - option Assistance Médicale à la Procréation, mention Bien, classée 4^{ème} /18, Université François Rabelais de Tours**

- ✓ Stage au Laboratoire de Biologie de la Reproduction, polyclinique de Chambray les Tours, sous la direction du Dr JS. Brun
 - ✓ Etude sur l'intérêt de la double sélection des spermatozoïdes (swim-up et gradient de concentration) pendant la préparation du sperme pour les techniques d'AMP

➤ **Licence ingénierie de la santé (2005-2008) – mention Qualité Environnement Santé, Institut Lillois d'Ingénierie de la Santé, Université de Lille 2**

- ✓ Stage suivi d'un CDD (janvier-août 2008) centre antipoison de Lille, sous la direction du Dr M. Mathieu - Nolf
 - ✓ Mise en place des outils d'analyse dans le cadre d'une étude de toxicovigilance et d'évaluation de risques (produits chimiques à usage ménager) en collaboration avec d'autres organismes européens (Allemagne – Royaume Uni – République Tchèque – WHO – HPA)
- ✓ Stage licence 3 (avril-mai 2008) laboratoire de botanique, faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques de Lille, sous la direction du Dr J. Fabure
 - ✓ Impacts du stress hydrique sur le stress oxydant chez les bryophytes
- ✓ Stage licence 2 (avril – mai 2007) laboratoire de police scientifique de Lille sous la direction du commandant P. Chudoba
 - ✓ Rédaction de documents qualité relatifs à l'accréditation selon la norme ISO 17025.
 - ✓ Aide aux techniciens de recherche, mise au point d'une technique de révélation de traces papillaires ensanglantées avec conservation d'ADN

➤ **PCEM 1 (2003-2005), faculté de médecine H. Warembourg, Université de Lille 2**

➤ **Baccalauréat scientifique (2003), Lycée Saint Paul, Lens**





Compétences

- **Techniques de laboratoire**
 - ✓ Assistance Médicale à la Procréation : spermogramme-spermocytogramme
 - ✓ Biochimie : western-blot, immunohistochimie, dosage protéique, électrophorèse 1D, 2D et 2D DIGE, Elisa
 - ✓ Analyse de données : imageJ, mélanie II/samespot (analyse protéomique), statistica, AMEN
- **Management de la qualité**
 - ✓ maîtrise du vocabulaire, connaissance des exigences relatives aux normes de laboratoire (normes ISO) et des outils nécessaires à une démarche qualité (gestion de projet, démarche d'évaluation et de gestion du risque, etc...)
- **Management d'équipe**
 - ✓ Gestion du personnel technique et des étudiants
 - ✓ Gestion d'une association étudiante pendant 3 ans
- **Enseignement**
 - ✓ Chargée des travaux dirigés d'histologie en 2^{ème} et 3^{ème} année de médecine (2010-2013), Faculté de médecine H. Warembourg, Univ. Lille 2
 - ✓ Encadrement et formation d'étudiants en biologie de reproduction, licence de biologie, BTS analyses biochimiques, lycéen
- **Communications écrites et orales**
 - ✓ Rédaction d'articles et de rapports, capacité d'analyse et de synthèse
 - ✓ Présentation de travaux de recherche lors de congrès
- **Recherche et Innovation**
 - ✓ Travaux de recherche menant à la publication d'articles scientifiques
 - ✓ 1 dépôt de brevet en cours
- **Langues étrangères**
 - ✓ Anglais, TOEIC (645 pts)
- **Informatique**
 - ✓ Word, excel, power point, photofiltre, gimp

Publications

- FERNANDEZ-GOMEZ F.J., **JUMEAU F.**, DERISBOURG M., BURNOUFS., TRAN H., EDDARKAOUIS., OBRIOT H., DUTOIT-LEFEVRE V., DERAMECOURT V., MITCHELL V., LEFRANCD., HAMDANE M., BLUM D., BUÉÉL., BUÉE-SCHERRER V. & SERGEANT N., Consensus brain-derived protein, an extraction protocol for the study of human post-mortem and murine brain proteome using both 2D-DIGE and mini 2DE immunoblotting, Article sur invitation accepté pour publication, JoVE, 2013.
- PERDRIX A., TRAVERS A., CLATOT F., SIBERT L., MITCHELL V., **JUMEAU F.**, MACE B., RIVES N., Modification of chromosomal architecture in human spermatozoa with large vacuole, Andrology, 2013 (1) : 57-66.
- MITCHELL V., SIGALA J., **JUMEAU F.**, BALLOT C., PEERS MC., DECANter C., RIVES N., PERDRIX N., RIGOT JM., ESCALIER D., ICSI treatment in severe asthenozoospermia, Gynecol. Obstet. Fertil., 2012 (12) : 776-9.



Article soumis

- CARPENTIER C., FERNANDEZ-GOMEZ FJ., GHANEM D., **JUMEAU F.**, LABUDECK A., DHAENENS C.M., SABLONNIERE B., BEHM-ANSMANT I., GOURIER N., BRANLANT C., CHARLET-BERGUERAND N., MARIE J., SCHREAN-MASCHKE S., BUEE L., SERGEANT N., CAILLET-BOUDIN M.L., Tau exon 2 responsive elements deregulated in myotonic dystrophy type 1 are proximal to exon 2 and synergically regulated by MBNL1 and MBNL2, BBA.

Articles en préparation

- **JUMEAU F.**, SIGALA J., FERNANDEZ-GOMEZ FJ., CARPENTIER C., OBRIOT H., EDDARKAOUI S., DUBAN-DEWEER S., HACHANI J., DHAENENS CM., CAILLET-BOUDIN ML., PEERS MC., RIGOT JM., BUÉE L., SERGEANT N. & MITCHELL V., Human Sperm Proteome Quality Index (SPQI): a new marker to be considered with sperm parameters.
- **JUMEAU F.**, FERNANDEZ-GOMEZ FJ., CARPENTIER C., CHOCU S., OBRIOT H., EDDARKAOUI S., TARDIVEL M., HACHANI J., DUBAN-DEWEER S., DHAENENS CM., HALGAND F., CHALMEL F., CAILLET-BOUDIN ML., RIGOT JM., BUEE L., PINEAU C., SERGEANT N. & MITCHELL V., Human Sperm Proteome reveals DCDC2C as a new microtubule associated protein of sperm flagellum.

Communications orales

- **JUMEAU F.**, FERNANDEZ-GOMEZ FJ., CARPENTIER C., OBRIOT H., EDDARKAOUI S., DUBAN-DEWEER S., HACHANI J., HALGAND F., CHALMEL F., CHOCU S., DHAENENS CM., CAILLET-BOUDIN ML., RIGOT JM., PEERS MC., PINEAU C., BUEE L., SERGEANT N. & MITCHELL V., Human Sperm Protéome : a new approach to understand sperm physiology, 5^{ème} journée des doctorants du JPARC, 27 mars 2013, Lille, France.
- **JUMEAU F.**, BEN MAAMAR M., KELLER L., FERNANDEZ-GOMEZ FJ., OBRIOT H., EDDARKAOUI S., DUBAN-DEWEER S., HACHANI J., RIGOT JM., BUEE L., SERGEANT N. & MITCHELL V., Sperm protein quality assessment and proteomics characterization of the human spermatozoa », 4^{ème} journée des doctorants du JPARC, 17 avril 2013, Lille, France.

Communications affichées

- **JUMEAU F.**, FERNANDEZ-GOMEZ FJ., CARPENTIER C., OBRIOT H., EDDARKAOUI S., DUBAN-DEWEER S., HACHANI J., HALGAND F., CHALMEL F., CHOCU S., DHAENENS CM., CAILLET-BOUDIN ML., RIGOT JM., PEERS MC., PINEAU C., BUEE L., SERGEANT N. & MITCHELL V., Human sperm proteome reveals DCDC2C as a new microtubule associated protein of sperm flagellum, Congrès EuPA, 14-17 octobre 2013, Saint Malo, France.
- **JUMEAU F.**, FERNANDEZ-GOMEZ FJ., BEN MAAMAR M., KELLER L., OBRIOT H., EDDARKAOUI S., DUBAN-DEWEER S., HACHANI J., HALGAND F., PINEAU C., RIGOT JM., BUEE L., SERGEANT N. & MITCHELL V., Proteome of human spermatozoa : a new approach to characterize sperm quality in normozoospermic men », 12^{ème} journée André Verbert, colloque des doctorants de l'école doctorale Biologie-Santé de Lille 2, 11 septembre 2012, Lille, France.
- **JUMEAU F.**, BEN MAAMAR M., OBRIOT H., TARDIVEL M., DUBAN-DEWEER S., FLAHAUT C., FERNANDEZ-GOMEZ FJ., EDDARKAOUI S., FRANCK W., MARLOT C., RIGOT JM., BUEE L., SERGEANT N. & MITCHELL V., Développement d'une méthode d'étude du protéome du spermatozoïde humain : un nouveau marqueur de la qualité spermatique ? », 16^{ème} congrès de la FFER, 21-23 septembre 2011, Marseille, France.
- **JUMEAU F.**, OBRIOT H., TARDIVEL M., FERNANDEZ-GOMEZ FJ., EDDARKAOUI S., FRANCK W., MARLOT C., BUEE L., SERGEANT N. & MITCHELL V., Male Infertility : characterization of the human ejaculated spermatozoa by proteomics », Journée des doctorants du JPARC, 11 avril 2011, Lille, France.

PUBLICATIONS

Article sur invitation accepté pour publication dans le Journal JoVE, 2013.

Consensus brain-derived protein, an extraction protocol for the study of human post-mortem and murine brain proteome using both 2D-DIGE and mini 2DE immunoblotting

Authors:

Francisco-Jose Fernandez-Gomez^{1*}, **Fanny Jumeau**¹, Maxime Derisbourg¹, Sylvie Burnouf¹, Hélène Tran¹, Sabiha Eddarkaoui¹, Hélène Obriot¹, Virginie Dutoit-Lefevre², Vincent Deramecourt³, Valérie Mitchell³, Didier Lefranc², Malika Hamdane¹, David Blum¹, Luc Buée¹, Valérie Buée-Scherrer¹ & Nicolas Sergeant^{1*}

Authors: institution(s)/affiliation(s) for each author:

1. Inserm UMR 837, Team Alzheimer & Tauopathies, Jean-Pierre Aubert Research Centre, IMPRT, F-59045, Lille, France
2. EA 2686, Laboratoire d'immunologie, Faculté de Médecine - Pôle Recherche, Lille, France
3. CHRU-Lille, F-59037 Lille, France

Corresponding author: *Corresponding author: Dr. Francisco-José Fernandez-Gomez or Nicolas Sergeant, Inserm UMR 837, "Alzheimer & Tauopathies", Centre de Recherches Jean-Pierre Aubert, Place de Verdun, 59045, Lille Cedex, France. Tel: + 33320622071, Fax: + 33320622079, e-mail: francisco-jose.fernandez-gomez@inserm.fr ; nicolas.sergeant@inserm.fr

Keywords: proteomics, neurodegeneration, 2DE, human and mice brain tissue, fluorescence, immunoblotting.

Abbreviations: 2DE (two-dimensional gel electrophoresis), 2D-DIGE (two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis), mini-2DE (mini 2DE immunoblotting), IEF (isoelectrofocusing), AD (Alzheimer's disease)

Short Abstract: (48/50 words maximum)

2D-DIGE and mini 2DE immunoblotting are powerful proteomics tools that provide proteins identification, expression changes and post-translational modifications analyses in human and mice brain tissues. The application to limited quantity of protein samples in the field of neuroscience may supply new uncovering in the field of neurological disorders.

Long Abstract: (150 words minimum, 225/300 words maximum)

Two-dimensional gel electrophoresis (2DE) is a powerful tool to uncover proteome modifications potentially related to different physiological or pathological conditions. Basically, this technique is based on the separation of proteins according to their isoelectric point in a first step, and secondly according to their molecular weights by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). In this report an optimized sample preparation protocol for little amount of human post-mortem and mouse brain tissue is described. This method enables to perform both two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2D-DIGE) and mini 2DE immunoblotting. The combination of these approaches allows not only to find new proteins and/or protein modification in their expression thanks to its compatibility with mass spectrometry detection, but also a new insight into markers validation. Thus, mini-2DE coupled to western-blotting permits to identify and validate post-translational modifications, proteins catabolism and provides a qualitative comparison among different conditions and/or treatments. Herein, we provide the method to study component of protein aggregates found in Alzheimer's disease and Lewy body dementia that is the amyloid-beta peptide and the alpha-synuclein. Our method can thus be adapted for the analysis of the proteome but also insoluble proteins extract from human brain tissue and mice models. In parallel, it may provide useful informations for the study of molecular and cellular pathways involved in neurodegenerative diseases as well as potential novel biomarkers and therapeutic targets.

Introduction:

Mental and neurological disorders represent 13% of the global burden of disease, new challenges like pathophysiological mechanism, risk factors and prodromic biomarkers must be explored ¹. In line with this objective, proteomic studies of the human brain become indispensable to uncover molecular pathway involved in processes like memory, behavior, emotions and neuronal plasticity for instance, not only for physiological but also for pathological conditions. Therefore, the use of animal models and more specifically the use of transgenic mice bring a wide range of possibilities to mimic the etiology of human neurodegenerative disorders (For review see Sergeant and Buee, 2011).

Proteomics approaches are nowadays available in order to accomplish these new perspectives in the neuroscience field. Two-dimensional gel electrophoresis (2DE) is a potent and likely simple method that enables to compare the proteome of a wide range of samples. Moreover, it's also a powerful method to isolate a protein from a complex mixture in order to identify and further analyze it by mass spectrometry. This technique essential consists of two successive steps 1) protein separation according to their isoelectric point (pI) by isoelectrofocusing (IEF). More precisely, an electric potential is applied across the immobilized acrylamide strips along a pH gradient and therefore proteins will migrate and focus at a determined pI in function of their global net charge 2) Isoelectrically focused proteins are denatured and negatively charged by the addition of sodium dodecyl sulfate (SDS), thereby proteins in their first structure are separated depending on their apparent molecular weight (MW) by SDS-PAGE ². These two distinct properties allow us to tackle a double value to go further in the study of proteome. On one hand this approach offers the possibility to perform a quantitative analysis using minimal dyes 2D-DIGE method, and on the other hand a qualitative analysis by mini-2DE coupled or not to western blotting.

Quantitative analysis by 2D-DIGE bestows proteins expression changes all over the samples proteome. Briefly, samples are labelled with three cyanines (Cy2, Cy3 and Cy5) emitting at three distinct wavelengths (blue, green and red). These fluor minimal dyes containing N-hydroxy succinimidyl ester group react with the ϵ -amino group of lysines

residues of proteins resulting in covalent amide bonds ³. Lysine residues are labeled only between 1-3% and thus preventing multiple labels addition per protein and major net charge modifications ^{4 5}. Cy3 and Cy5 are often used to label two independent samples while Cy2 tags a mix of equal proportion of the samples to be compared. The two main advantages are that all labelled samples are mixed and IEF and SDS-PAGE are carried out in one gel at once for each step, avoiding the inter variability among experiments due to gels comparison. Moreover, it presents a high detection threshold of around 1 femtomole of protein ⁶. Gels are scanned and 2D software analyses of fluorescence 2D gel images where Cy2 serves as an internal standard allows to identify statistical differences among the spots for their posterior mass spectrometry identification. The 2D analysis software using the internal standard achieves a fast detection of less than 10% of differences between samples with more than 95% of statistical confidence ⁷.

Qualitative analysis by mini-2DE is a crucial step for proteins characterization. The principle is the same as previously described for pI and MW separation, but in this case proteins are transferred from a small polyacrylamide gel to a membrane and immunoblotting is performed downstream. While one dimension gel electrophoresis provides changes in proteins expression for one or several protein epitopes in function of the antibody, the information of mini-2DE endows with two additional parameters. Firstly, the protein isovariants changes in function of the pI, indicating that post-translational modifications might take place. Secondly, mass spectrometry identification may be indicative of plausible zymogens and catabolic by-products of proteins. Therefore, modification observed by 2D-DIGE is likely indicative of the mechanisms underlying change in global proteome profile. Alignments of immunoblots among several samples for the same protein epitope/s by mini-2DE may reflect acidity changes shedding light into post-translational variations slightly or even not observed by monodimensional immunoblotting ⁸⁻⁹. Moreover, this analysis informs about the potential cleavage site due to the knowledge of the pI and MW of the metabolic residues ¹⁰⁻¹¹.

The combination of these two techniques provides a complementary proteomics analysis. On one hand 2D-DIGE affords a type of differences allowing a precise isolation

of polypeptides whose expression is different. These differences consist essentially into the appearance or disappearance of a spot or increase of intensity of a given one by software analysis of the fluorescent gels. However, these observations are unlikely by themselves to explain the nature of the modification observed. For these reasons, once the polypeptide is isolated and identified by mass spectrometry, the use of mini-2DE enables to precisely confirm 1) the identity of the protein isolated and 2) the nature of the difference: change in the isovariant/isoform level of expression, post-translational modifications and cleavage processes for instance. Moreover, the use of mini-2DE enables to analyze the same amount of protein used for a 1D western-blot lane. It is however necessary to develop a starting lysis buffer both compatible with 2D-DIGE and with mini-2DE in order to limit the potential dispersions resulting from the use of extraction protocols that are very dissimilar.

In the present article, we described an adapted a protocol for the preparation, extraction and performance of 2D-DIGE and mini-2DE techniques for brain proteins coming from human and mice tissue.

Protocol Text:

Homogenization and total proteins extraction from human and mice brain tissues

1.1) Brain tissue homogenization. Homogenization of the brain tissue in 10% w/v in 8 M urea, 2 M thiourea and 1% w/v SDS buffer (UTS) using a potter glass (for human samples) or teflon homogenizer (for mice samples) followed by sonication at 60 Hz 30 pulses with a ultrasound generator applied for 0.5 second for total tissue disintegration¹²⁻¹⁵. Protein concentrations were determined with the Bradford reagent kit (Bio-Rad), using BSA as standard. This UTS buffer extraction is totally compatible with one dimension SDS-PAGE as long as lysates are not over-heated to avoid carbamylation¹⁶. Carbamylation occurs on primary amines and can therefore interfere with further Cyanine dye coupling. In order to reduce the amount of uric acid and isocyanic acid, which are in equilibrium with urea in solution, before adding the SDS to the urea / thiourea solution is added with 1% (wt/vol) of Amberlite (G&E healthcare), incubate with gentle mixing during 10 minutes at room temperature and thereafter filtered onto 0.22 μ m syringe filters (Millipore). Note: centrifugation at 12.000xg to discard the tissue debris is not necessary since UTS extraction buffer yield no pellet or a really slight one in comparison to other buffers such as 10 mM Tris/ 1% w/v SDS. Moreover, tissue debris does not enter the immobilin strip during equilibration.

1.2) Protein precipitation. Precipitate between 100-150 μ g of proteins for 11 cm ImmobilinTM DryStrip and 1-1.5 mg for 18 cm ones (independently on the pH range selected to perform the IEF). We use protein precipitation instead of TCA or acetone precipitation methods because chloroform/methanol precipitation enable to efficiently reduce the lipid content. All steps are performed on ice or at 4°C and chloroform and methanol are cooled at 4°C during 30 min before starting the precipitation procedure. Chloroform/Methanol precipitation steps are a) three volumes of MeOH and one volume of chloroform are mixed to one volume of UTS lysate, b) shake manually the mixture and add three volumes of cold water, c) vortex during 1 min and pellet the protein by centrifugation at 12.000xg during 30 min at 4°C, d) discard the supernatant using a Pasteur pipette and add three volumes of cold MeOH, e) vortex again and centrifuge at 12.000xg during 30 min at 4°C, f) discard supernatant and dry pellet under N₂.

1.3) Preparation of protein for 2D analysis. Resuspend the protein-dried pellet in 2D-buffer (8M Urea, 2M Thiourea added with 4% CHAPS). To make the 2D resuspension buffer incubate the urea/thiourea solution for 10 min with 0.1 % Amberlite IRN-150L (G&E Healthcare) and thereafter pass through a 0.22 μm syringe filter. Try to keep the proportion of 500 μg of protein per 200 μL of 2D buffer. Sonicate in the same condition as in 1.1. Store samples at -80°C till carrying out the following step. Noteworthy, this protocol can be used after formic acid solubilization of protein aggregates ¹⁰. Briefly, formic acid should be evaporated under nitrogen and the pellet is resuspended as described.

2D-DIGE

2.1) Samples test quality. For more accuracy, samples are dosed again using Bradford assay and 15 μg of proteins are diluted in NuPAGE sample buffer (Invitrogen), heated ¹⁶ and loaded onto 4-12% NuPAGE Novex gels (Invitrogen).

2.2) Coomassie staining. Stain NuPAGE gel with 0.1% w/v Coomassie Blue G-250, 50% EtOH and 10% v/v acetic acid solution for at least 1h. Background destaining takes place overnight in 7% acetic acid and 10% v/v ethanol solution. Note: steps 2.1 and 2.2 allows us to know the real amount of proteins extract available in the 2D buffer after precipitation and comparing the stained profile gives us information concerning the quality and gross homogeneity between samples. Only samples with similar profiles must be used for 2D-DIGE studies, otherwise the 2D-DIGE may lead to poor staining and poor resolution of protein.

2.3) Pre-electrophoretic labeling of samples. Prior to perform Cy-die labeling, verify the pH of the sample which should be basic but not acid or even neutral since the N-hydroxysuccinimide substitution is more efficient at basic pH and given to be optimal at pH 8.6.

2.3.1) Label minimally the two samples of study with Cy3 or Cy5 fluorescent dyes with a ratio of 50 µg protein/400 pmol dye and kept for 1 h at 4°C in the darkness to facilitate the NHS ester reactive group of the cyanines with the unprotonated amine groups of lysines. To reduce sample variations cross-labeling was done with Cy3 and Cy5 dyes, avoiding in this way a preferential link of one sample to a particular cyanine. Note that the Cyanine-Dye minimal labeling can be adapted for reduce amount of proteins with keeping the proportion of protein amount to dye concentration to 1 µg protein for 8 pmol cyanine-dye. If so, the mini-2DE system can be used instead of the large ETTAN Dalt 6 2D gel system. This will enable the 2D-DIGE analysis of little amount brain tissue material.

2.3.2.) Label A pool of both samples with the same amount of protein (50 µg in total) with Cy2 fluorescent dye and used as internal standard, in the same conditions as the previous step.

2.3.3.) Complete to a total volume 350 µl with 2D buffer containing 1.1% Destreak Reagent, 1.2% of Immobilised pH gradients (IPG) buffer (GE Healthcare) and traces of Bromophenol Blue the total of 150 µg of labeled proteins (50 µg of Cy2, 50 µg of Cy3 and 50 µg of Cy2). Perform this step in quadruplicate in four independent strips. Moreover, prepare two additional non-labeled strips (one for each sample) with 350-450 µg of protein for the preparative gels.

2.3.4) Left for passive rehydration overnight the six loaded strips covered with mineral oil.

2.4) Carry out the IEF in an IPGphor III Isoelectric Focusing Unit (GE Healthcare) at 20°C. For a pH 3-11NL, 18 cm strip the protocol is: maximum current setting is 50 µA/strip during 8 stages: 1) 150 V step for 1h, 2) 200 V step for 5h, 3) 500 V gradient for 2h, 4) 1000 V gradient for 2h, 5) 2000 V gradient for 2h, 6) 4000 V gradient for 2h, 7) 8000 V gradient for 2h and 8) for a total of 24000 Vh step. After IEF, dispatch the excess of mineral oil using Whatman™ filter papers and store the strips at -20°C till the second dimension.

2.5) *ImmobilineTM DryStrip gels equilibration.* Strips are equilibrated in 6 M Urea, 2 % SDS, 30% Glycerol, 50 mM Tris-HCl pH 8.6 buffer with 1% of DTT during 15 min and after with 4.7% of iodoacetamide in the same buffer but without DTT.

2.6) *Second dimension or SDS-PAGE electrophoresis.* Make the six 12% SDS-PAGE gels (1.5 M Tris-HCl pH 8.6, 12% acrylamide/bisacrylamide, 0.1% w/v SDS, 0.072% w/v APS and 0.1% v/v TEMED) at the same time using an Ettan DALTsix Large Electrophoresis System (26 x 20 cm) (GE Healthcare), with four low-fluorescence glass plates (GE Healthcare) for the strip with fluorescence samples and two other glass plates with 1.5 mm of thickness for preparative gels in order to excise the protein spots. Load the six ImmobilineTM DryStrip on the top of the gels and over layered with 0.5% w/v of agarose. Running buffer is composed by 25 mM Tris, 192 mM glycine and 0.1% w/v SDS. Carry out the migration at 2.5 W/gel overnight with a refrigeration system set to 4°C^{17, 18}.

2.7) *Fluorescence images acquisition and analysis.* Typhoon 9400 scanner (GE Healthcare) is used to obtain the fluorescence gels images (12 images for one experiment). Scan Cy2, Cy3 and Cy5 images for each gel at 488/520 nm, 532/580 nm and 630/670 nm excitation/emission wavelengths, respectively. Progenesis SameSpots software (Nonlinear Dynamics) was used to analyze the images. Data are representative of the changes of volume spots associated with the distribution of the signal across the four gels among the two samples studied.

2.8) *Coomassie staining for big gels.* Fix the preparative gels in 50% v/v EtOH and 3% v/v orthophosphoric acid solution for at least 24h. Then after, wash twice with MilliQ water for 20 min. Perform coloration in 34% v/v MeOH, 17% w/v ammonium sulfate and 2 % orthophosphoric acid for 1h before adding 0.1% w/v Coomassie Blue G-250. Keep the gels in coloration for at least 48h and decolorized in MilliQ water.

2.8.1) *Spots for MS identification.* Once fluorescence images are analyzed, the software provides a list of spots whose expression is statistically different. These spots are manually excised from the preparative gels with a OneTouch 2D Gel SpotPicker 1.5 mm (Gel Company, San Francisco, USA), this procedure requires practice and some manual dexterity in order to avoid keratin contamination. Then samples can be kept in water at -

20°C till sending to mass spectrometry. Spot identification is perfectly compatible with Tandem mass spectrometry (MS/MS) and relevance of protein identities was judged according to the probability based Mowse score calculated with a p-value of 0.05 ($p < 0.05$)¹⁹.

Qualitative mini-2DE assay

3.1) Resuspend a maximum 100-150 µg of protein sample in 2D buffer till a final volume of 200 µl for a 11 cm IPG strip. In case of overexpression system or purified protein, the starting amount can be lowered to 20 µg. Note: 2D buffer can be stored at -80°C or kept at 4°C during one week (to prevent urea degradation).

3.2) Add 1.1% v/v DeStreak Reagent, 0.55% v/v IPG buffer (GE Healthcare) and traces of Bromophenol Blue to the final volume of 200 µl. Then, vortex, make a fast spin and load into an IPG strip for passive rehydration (to bring the strip to its original thickness) overnight covered with mineral oil. Note: the proportion of IPG buffer is the same for all the interval of pH desired (pH 3-11, 4-7, 7-11 etc), but its composition varies in function of the pH range selected.

3.3) *Isoelectrofocalisation*. Perform IEF in an IPGphor III Isoelectric Focusing Unit (GE Healthcare) at 20°C. The duration of the program depends on the pH interval selected. Noteworthy, parameters such as electroendosmosis may disturb the IEF profile and in these cases, optimization in electrofocalisation time is required²⁰. Note it is not necessarily a longer IEF that provides better results but shortening the time of IEF can also improve the resolution. After IEF, IPG strips can be stored at -20°C for months.

3.4) *IPG strips equilibration*. Before performing the SDS-PAGE, equilibrate the strips in a buffer containing 25 mM Tris-HCl, 20 mM DTT, 10% glycerol, 5% SDS, 0.05% Bromophenol Blue adjust to pH 6.8. Make three equilibration bathes 15 min each with changing the buffer solution between each bath.

3.5) *2D SDS-PAGE*. Layer the IPG strips onto a Criterion XT™ precast gel (IPG+1 well, 11 cm IPG strip, 13.3 x 8.7 cm from Bio-Rad) with a percentage of polyacrylamide in

function of the MW of the protein of interest. Then, gels are blotted onto a nitrocellulose/PVDF membrane at 100mV during 33 min in a Criterion™ Blotter (Bio-Rad) and incubated overnight with the required antibody.

3.6) Immunoreactive signals are visualized by peroxidase activity with Hyperfilm™ ECL™ (ECL; GE Healthcare). The alignments of immunoblots can be performed using unrelated polypeptides revealed by the secondary antibody and semi-quantitative analysis can be reached by the densitometry of the volume and intensity for the traces/spots with ImageJ software.

Representative Results:

Proteomics on brain tissue remains challenging since no ideal buffer exists to recover 100% of proteins, especially membrane-associated or cytoskeleton proteins. The first set of experiments were focused on the search for a suitable lysis buffer compatible with the two approaches and which enable to recover a large panel of protein. Thus, three lysis buffers were assayed to determine the one which was more appropriate. Firstly, the worldwide used for biochemistry and molecular biology assays Tris-HCl²¹ at 10mM with 1% w/v SDS (Figure 1A). Furthermore, Tris-HCl has a robust application as an electrophoresis buffer for polyacrylamide and agarose gels. The other two lysis buffers were UTS (Figure 1B) and the 2DE one. Tris-SDS yield a poor resolution and the number of spots was considerably lowered (Figure 1B) in comparison with the profile observed with UTS where a high spot separation, no distortion and a far better recovering of proteins was observed (Figure 1B). This point is supported by the fact that UTS extraction yield almost no residual pellet, whereas Tris-HCl owes a thick one after bench centrifugation. The pattern showed in Figure 1B clearly give evidence of the higher protein solubility in UTS regarding other buffers such as Tris-HCl. Noteworthy that even 2DE buffer was also tested, its use was ruled out since despite pellet were neither observed, lipids were not dissolved and they remained in the upper layer difficulting the manipulation. In agreement with these data, it is recommended the use of UTS buffer for several reasons 1) its neutral chaotrope that denatures proteins by disrupting noncovalent and ionic bonds between the amino acid residues and avoid the activity of proteases which degrade cellular proteins²² 2) addition of thiourea to the urea solution enhances drastically the solubility of hydrophobic membrane proteins and proteins prone to aggregate^{23 24} and 3) the adjunction of the anionic detergent SDS breaks lipids bind proteins via hydrophobic interactions, as well as increases protease and phosphatase activity inhibition^{25,26}. Furthermore it was decided to add a precipitation step to eliminate impurities that may disrupt the IEF. In this way, as precipitation method determines the solubility of the proteins²⁷ and that methanol has already been described as the most suitable solvent to remove lipids which are abundant in brain tissue²⁸, brought us to choose the, chloroform/methanol precipitation. The utilization of the zwitterionic detergent CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-Propane sulfonate) for resuspending the proteins pellet in the 2D buffer is due to its suitability for facilitating the protein entrance in the first dimension gels²⁹.

The profile of the human and mice brain proteome by 2D-DIGE is shown in Figures 2A,B respectively. In the Figure 2A merged fluorescent images coming from human control and Alzheimer's disease cortex samples can be observed, in Figure 2B idem for mice samples from hippocampus of a model of Alzheimer's disease-like Tau pathology³⁰. Cy2, Cy3 and Cy5 are respectively illustrated for the human samples In Figures 2C,D,E. Both merged patterns (Figure 2 A,B) present a high spot resolution reflecting a high-quality IEF and second dimension separation in agreement with the profile observed in Figure 1B. This spot definition quality together with the fact that cross-linking is performed in order to eliminate a possible preference of the proteins to a particular cyanine, make these fluorescence images (Figures 2C,D,E) very easy to align throughout the software analysis. Moreover, the preparative gels stained with blue Coomassie evidences an enriched protein map with abundant spots all over the pH range utilized that allow to excise the spots after software analysis and their identification by MS/MS.

The qualitative mini 2DE analysis by immunoblotting for a protein provides high value information for its identification and modifications, not only for post-translational ones but also for oligomers and truncations (Figures 3A,B). The feasibility to perform this technique in mini 2DE provides fast and precise data about the protein of interest. Regarding AD tissue, the characterization of alpha-synuclein enable to visualize a well defined 4-7 pH profile where the native protein is at a pI of 4,67 and a MW of 18 kDa, nonetheless with mini-2DE it can be further seen the presence of dimers (Figure 3A, asterisk), at the same pI than the native forms but also the existence of ubiquitinated forms that are more basic and with a higher MW when more they are ubiquitinated (Figure 3A, arrows). Another protein intimately linked to AD is the amyloid-beta peptide, generated by the complex catabolism of the amyloid precursor protein (APP). In the Figure 3B it is compared the plot of a Sporadic AD case with a familial one. In the case of the familiar AD it can be observed how amyloid-beta 1-42 is decreased respect to the sporadic AD, and moreover, the isovariants amyloid-beta x-42 (4 kDa) are down-regulated all over the gap too, meanwhile the oligomers found at 8 kDa reflect that this is not due to a lower quantity of the protein, since spots intensity is more relevant in familiar AD (Figure 3B).

Discussion:

Discovering pathological expression changes of proteins, search for biomarkers and the modulation of potential pathways for pharmacological targets are among the aims of the neuroproteomics approaches³¹. Amid the emerging tools the 2DE field adds a promising expectative. Nevertheless, a consensus should be reached in order to minimize variability and increase reproducibility in the experiments. In line of this idea a standardized protocol to perform 2D-DIGE (Figure 2) and the subsequent 2DE immunoblotting (Figure 3) for human and mice brain tissue fully compatible with mono-dimensional immunoblotting is herein described in detailed.

Working with human post-mortem brain tissue is probably the most suitable source of material to identify and validate novel biomarkers for neurological diseases. However, the use of human brain samples for researching deals with the many inconvenient, such as ethical/legal and quality (postmortem interval, tissue collection, preparation, diagnosis and storage)^{32, 33}. Identification of proteins degradation due to post-mortem changes and for mental disorders has been already described using 2D-DIGE^{34, 35}. However, none of the protocols have been validated for mice brain tissue and its suitability for mini-2DE in human as well as in mice samples, in order to achieve a complete characterization of the proteins found and their modifications.

Taking into account that 2D-DIGE allows protein identifications and expression changes (Figure 2); the aim of this protocol was to focus on the mini-2DE characterization. 2D-DIGE provides quantitative information about proteins expression changes and their subsequent identification by MS/MS. However, it is possible that isoforms, isovariants, zymogens, post-translational modifications and catabolic products could not be identified since the overlapped fluorescence with another proteins and so, the software analysis does not consider this like a significant variation. To overcome this limitation we propose the use of mini-2DE. In fact, to our knowledge one of the most important pitfall that can be committed is to take the mono-dimensional immunoblotting as a complete validation of the 2D-DIGE results, or even to consider that any proteomic modification is not necessarily validated.

The differences identified after 2D-DIGE may be not detected by mono-dimensional immunoblotting due to only global expression changes may be appreciated. In the line of these observations several studies point out the relevance of this supplemental information. In a transgenic mouse model of myotonic dystrophy it has been described by mono-dimensional immunoblotting the increase of the proteins CELF1 and CELF2, however only after performing mini-2DE it has been demonstrated that CELF1 presented a phosphorylation change while CELF2 was not affected by this post-translational modification ³⁶. Mini 2DE also offers information about oligomerization and degradation pathways as it is presented in the Figure 3A in an AD patient. The antibody for the alpha-synuclein enables to see the protein at a native pI of 4.4 and MW of 18 kDa, but also the dimers (Figure 3A asterisk) at 36 kDa and the ubiquitinated forms (Figure 3A arrows). Noteworthy, that when polyubiquitinated, alpha-synuclein MW raises and a shift toward a pI closer to the ubiquitin pI is observed, as described elsewhere for dementia with Lewy bodies ^{37, 38}. Another example of the information provided by mini 2DE is the truncation of beta amyloid species performed in non-demented and AD cases as a potential target for vaccination approach ³⁹. The presence of oligomers and its differentially degradation it is also shown in Figure 3B depending on a Sporadic or familiar AD patient.

Technical advantages of mini 2DE are 1) the feasibility of using small SDS-PAGE systems, 2) the relatively low material necessary, 3) the broad range of pH ranges existing, 4) the immunoblot sensibility and 5) the easy estimation of the changes. One of the fussiest aspects of mini 2DE technique is the quantification, despite mini-2DE cannot be considered a quantitative approach, after spots or plots alignment it is possible to establish a ratio between the acidic and basic part or vice versa, furnishing in this way a reliable estimation of the changes observed ⁸. Moreover, mini 2DE approach opens a wide and practical window of possibilities since different treatments may be performed. For instance in the field of AD, phosphatase inhibitors can be added and uncover their impact in Tau phosphorylation. Also the pharmacological drugs effect on proteolysis pathways, given that pI and MW identification of the truncated forms may provide the cleavage site according to the antibody's epitope ³⁹. Interestingly, recent data have elucidated using mini-2DE the association of lifestyle and drug treatments with

cognitive impairments in mouse models, as well as the biochemical profile of a new Tau mutations ⁴⁰⁻⁴².

Herein, it is proposed the development of a method enabling the 2D-DIGE of brain tissue obtain from human or mouse origin as well as the validation using mini-2DE behind. Owing the complexity of brain tissue due to the huge lipid composition, proteins insolubility and osmolarity that impacts parameters such as the cyanine labeling, IEF and electrophoresis separation that modify the results, UTS buffer enables a good solubilization and disaggregation of proteins with almost no residual pellet (Figure 1B). Additionally, the utilization of SDS presents the advantage that protease inhibitor supplementation is likely not necessary, facilitating in this manner the efficiency of the methanol/ chloroform precipitation in the elimination of lipids, salts, nucleic acids and charged detergents that might interfere with the IEF step. This protein extraction and posterior applications as mini-2DE, may shed light into uncovering new pharmacological targets and biomarkers for the study of neurological diseases. The fact that this disorders have their origin in the brain, oblige to study this organ as an ideal information source. However, human samples are limited, so the use of animal models become indispensable to achieve this goal. Herein the importance of using approaches in parallel for both types of samples and to validate the results. It is desirable that in the near future reliable candidates will be found and tested in corporal fluids.

Tables and Figures:

Figure 1: 2DE profile after 10 mM Tris 1% SDS w/v buffer extraction (A) and the pattern obtained after UTS utilization (B). In the panel B it can be seen how the number of spots, intensity and resolution is much higher than the one of panel (A). The use of UTS allow an almost total protein extraction that it is reflected in the 2DE Coomassie staining.

Figure 2: 2D-DIGE profiles for human (A) and mice (B) are illustrated. Images (A) and (B) represent the merged images for the three cyanines in a 3-11 pH range of 18 cm strip. In the pictures (C), (D) and (E) cyanines are exposed independently (Cy2 in blue, Cy3 in green and Cy5 in red).

Figure 3: In the upper panel it can be observed the mini-2DE profile of the protein alpha synuclein in an AD patient. The native pI (4.4) and MW (18 kDa) change in function of the dimerization (asterisk) where the MW is the double, and ubiquitination that shifts the pI till a more basic one (arrows) (A). The down picture reveals the profile of an amyloid-beta peptide antibody in a sporadic and genetic case of AD. 2DE pattern show how oligomerization and degradation take place in a different manner according to the etiology of the disease. This immunoblot clearly points out the differences in the APP catabolism between the two conditions. On one hand there is an increase in the catabolic products in the in the sporadic AD regarding the familial one (arrows), while the oligomers seem to be less marked (B). These experiments have been performed in 11 cm strips in a 4-7 pH gap in a 12% Bis-Tris gel and in a 16.5% Tris-Tricine one respectively (A, B).

Acknowledgments: This work was supported by Inserm, University of Lille 2, MEDIALZ, LabEx (excellence laboratory, program invest for the future) and DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary approach to Alzheimer's disease). F-J.F-G is currently a recipient fellowship of ANR (French National Research Agency/ NeuroSplice de Tau Projet ANR- 2010-BLAN-1114 01), but this work was also under the support of a grant from the JCCM (Spain).

Disclosures: Authors have no conflict of interest to declare.

References:

1. Collins, P. Y.; Patel, V.; Joestl, S. S.; March, D.; Insel, T. R.; Daar, A. S.; Anderson, W.; Dhansay, M. A.; Phillips, A.; Shurin, S.; Walport, M.; Ewart, W.; Savill, S. J.; Bordin, I. A.; Costello, E. J.; Durkin, M.; Fairburn, C.; Glass, R. I.; Hall, W.; Huang, Y.; Hyman, S. E.; Jamison, K.; Kaaya, S.; Kapur, S.; Kleinman, A.; Ogunniyi, A.; Otero-Ojeda, A.; Poo, M. M.; Ravindranath, V.; Sahakian, B. J.; Saxena, S.; Singer, P. A.; Stein, D. J., Grand challenges in global mental health. *Nature* 2011, 475, (7354), 27-30.
2. O'Farrell, P. H., High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975, 250, (10), 4007-21.
3. Riederer, B. M., Non-covalent and covalent protein labeling in two-dimensional gel electrophoresis. *J Proteomics* 2008, 71, (2), 231-44.
4. Marouga, R.; David, S.; Hawkins, E., The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem* 2005, 382, (3), 669-78.
5. Westermeier, R.; Scheibe, B., Difference gel electrophoresis based on lys/cys tagging. *Methods Mol Biol* 2008, 424, 73-85.
6. Gong, L.; Puri, M.; Unlu, M.; Young, M.; Robertson, K.; Viswanathan, S.; Krishnaswamy, A.; Dowd, S. R.; Minden, J. S., Drosophila ventral furrow morphogenesis: a proteomic analysis. *Development* 2004, 131, (3), 643-56.
7. Gharbi, S.; Gaffney, P.; Yang, A.; Zvelebil, M. J.; Cramer, R.; Waterfield, M. D.; Timms, J. F., Evaluation of two-dimensional differential gel electrophoresis for proteomic expression analysis of a model breast cancer cell system. *Mol Cell Proteomics* 2002, 1, (2), 91-8.
8. Ando, K.; Dourlen, P.; Sambo, A. V.; Bretteville, A.; Belarbi, K.; Vingtdoux, V.; Eddarkaoui, S.; Drobecq, H.; Ghestem, A.; Begard, S.; Demey-Thomas, E.; Melnyk, P.; Smet, C.; Lippens, G.; Maurage, C. A.; Caillet-Boudin, M. L.; Verdier, Y.; Vinh, J.; Landrieu, I.; Galas, M. C.; Blum, D.; Hamdane, M.; Sergeant, N.; Buee, L., Tau pathology modulates Pin1 post-translational modifications and may be relevant as biomarker. *Neurobiol Aging* 2013, 34, (3), 757-69.
9. Bretteville, A.; Ando, K.; Ghestem, A.; Loyens, A.; Begard, S.; Beauvillain, J. C.; Sergeant, N.; Hamdane, M.; Buee, L., Two-dimensional electrophoresis of tau mutants

reveals specific phosphorylation pattern likely linked to early tau conformational changes. *PLoS One* 2009, 4, (3), e4843.

10. Sergeant, N.; David, J. P.; Goedert, M.; Jakes, R.; Vermersch, P.; Buee, L.; Lefranc, D.; Wattez, A.; Delacourte, A., Two-dimensional characterization of paired helical filament-tau from Alzheimer's disease: demonstration of an additional 74-kDa component and age-related biochemical modifications. *J Neurochem* 1997, 69, (2), 834-44.

11. Sergeant, N.; David, J. P.; Lefranc, D.; Vermersch, P.; Wattez, A.; Delacourte, A., Different distribution of phosphorylated tau protein isoforms in Alzheimer's and Pick's diseases. *FEBS Lett* 1997, 412, (3), 578-82.

12. Rabilloud, T.; Luche, S.; Santoni, V.; Chevallet, M., Detergents and chaotropes for protein solubilization before two-dimensional electrophoresis. *Methods Mol Biol* 2007, 355, 111-9.

13. Bodzon-Kulakowska, A.; Bierczynska-Krzysik, A.; Dylag, T.; Drabik, A.; Suder, P.; Noga, M.; Jarzebinska, J.; Silberring, J., Methods for samples preparation in proteomic research. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007, 849, (1-2), 1-31.

14. Weiss, W.; Gorg, A., Sample solubilization buffers for two-dimensional electrophoresis. *Methods Mol Biol* 2008, 424, 35-42.

15. Wrobel, K.; Caruso, J. A., Pretreatment procedures for characterization of arsenic and selenium species in complex samples utilizing coupled techniques with mass spectrometric detection. *Anal Bioanal Chem* 2005, 381, (2), 317-31.

16. McCarthy, J.; Hopwood, F.; Oxley, D.; Laver, M.; Castagna, A.; Righetti, P. G.; Williams, K.; Herbert, B., Carbamylation of proteins in 2-D electrophoresis--myth or reality? *J Proteome Res* 2003, 2, (3), 239-42.

17. Chafey, P.; Finzi, L.; Boisgard, R.; Cauzac, M.; Clary, G.; Broussard, C.; Pegorier, J. P.; Guillonnet, F.; Mayeux, P.; Camoin, L.; Tavitian, B.; Colnot, S.; Perret, C., Proteomic analysis of beta-catenin activation in mouse liver by DIGE analysis identifies glucose metabolism as a new target of the Wnt pathway. *Proteomics* 2009, 9, (15), 3889-900.

18. Kahn, J. E.; Dutoit-Lefevre, V.; Duban-Deweert, S.; Chafey, P.; Pottiez, G.; Lefranc, D.; Fain, O.; Cordier, J. F.; Hatron, P. Y.; Bletry, O.; Prin, L., Comparative proteomic analysis of blood eosinophils reveals redox signaling modifications in patients with FIP1L1-PDGFR α -associated chronic eosinophilic leukemia. *J Proteome Res* 2011, 10, (4), 1468-80.

19. Pottiez, G.; Deracinois, B.; Duban-Deweere, S.; Cecchelli, R.; Fenart, L.; Karamanos, Y.; Flahaut, C., A large-scale electrophoresis- and chromatography-based determination of gene expression profiles in bovine brain capillary endothelial cells after the re-induction of blood-brain barrier properties. *Proteome Sci* 2010, 8, 57.
20. Stochaj, W. R.; Berkelman, T.; Laird, N., Preparative 2D Gel Electrophoresis with Immobilized pH Gradients: IPG Strip Equilibration. *CSH Protoc* 2006, 2006, (5).
21. Azimzadeh, O.; Barjaktarovic, Z.; Aubele, M.; Calzada-Wack, J.; Sarioglu, H.; Atkinson, M. J.; Tapio, S., Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) proteome analysis using gel-free and gel-based proteomics. *J Proteome Res* 2010, 9, (9), 4710-20.
22. Singh, S.; Powell, D. W.; Rane, M. J.; Millard, T. H.; Trent, J. O.; Pierce, W. M.; Klein, J. B.; Machesky, L. M.; McLeish, K. R., Identification of the p16-Arc subunit of the Arp 2/3 complex as a substrate of MAPK-activated protein kinase 2 by proteomic analysis. *J Biol Chem* 2003, 278, (38), 36410-7.
23. Rabilloud, T., Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 1998, 19, (5), 758-60.
24. Molloy, M. P.; Herbert, B. R.; Walsh, B. J.; Tyler, M. I.; Traini, M.; Sanchez, J. C.; Hochstrasser, D. F.; Williams, K. L.; Gooley, A. A., Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1998, 19, (5), 837-44.
25. Ericsson, C.; Peredo, I.; Nister, M., Optimized protein extraction from cryopreserved brain tissue samples. *Acta Oncol* 2007, 46, (1), 10-20.
26. Shaw, M. M.; Riederer, B. M., Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 2003, 3, (8), 1408-17.
27. Ye, X.; Johann, D. J., Jr.; Hakami, R. M.; Xiao, Z.; Meng, Z.; Ulrich, R. G.; Issaq, H. J.; Veenstra, T. D.; Blonder, J., Optimization of protein solubilization for the analysis of the CD14 human monocyte membrane proteome using LC-MS/MS. *J Proteomics* 2009, 73, (1), 112-22.
28. Centlow, M.; Hansson, S. R.; Welinder, C., Differential proteome analysis of the preeclamptic placenta using optimized protein extraction. *J Biomed Biotechnol* 2010, 2010, 458748.
29. Perdew, G. H.; Schaup, H. W.; Selivonchick, D. P., The use of a zwitterionic detergent in two-dimensional gel electrophoresis of trout liver microsomes. *Anal Biochem* 1983, 135, (2), 453-5.

30. Schindowski, K.; Bretteville, A.; Leroy, K.; Begard, S.; Brion, J. P.; Hamdane, M.; Buee, L., Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. *Am J Pathol* 2006, 169, (2), 599-616.
31. Veenstra, T. D.; Marcus, K., Multidimensional advancement of neuroproteomics. *Expert Rev Proteomics* 2008, 5, (2), 149-51.
32. Birdsill, A. C.; Walker, D. G.; Lue, L.; Sue, L. I.; Beach, T. G., Postmortem interval effect on RNA and gene expression in human brain tissue. *Cell Tissue Bank* 2011, 12, (4), 311-8.
33. Bell, J. E.; Alafuzoff, I.; Al-Sarraj, S.; Arzberger, T.; Bogdanovic, N.; Budka, H.; Dexter, D. T.; Falkai, P.; Ferrer, I.; Gelpi, E.; Gentleman, S. M.; Giaccone, G.; Huitinga, I.; Ironside, J. W.; Klioueva, N.; Kovacs, G. G.; Meyronet, D.; Palkovits, M.; Parchi, P.; Patsouris, E.; Reynolds, R.; Riederer, P.; Roggendorf, W.; Seilhean, D.; Schmitt, A.; Schmitz, P.; Streichenberger, N.; Schwalber, A.; Kretschmar, H., Management of a twenty-first century brain bank: experience in the BrainNet Europe consortium. *Acta Neuropathol* 2008, 115, (5), 497-507.
34. Crecelius, A.; Gotz, A.; Arzberger, T.; Frohlich, T.; Arnold, G. J.; Ferrer, I.; Kretschmar, H. A., Assessing quantitative post-mortem changes in the gray matter of the human frontal cortex proteome by 2-D DIGE. *Proteomics* 2008, 8, (6), 1276-91.
35. Swatton, J. E.; Prabakaran, S.; Karp, N. A.; Lilley, K. S.; Bahn, S., Protein profiling of human postmortem brain using 2-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2-D DIGE). *Mol Psychiatry* 2004, 9, (2), 128-43.
36. Hernandez-Hernandez, O.; Guiraud-Dogan, C.; Sicot, G.; Huguet, A.; Luillier, S.; Steidl, E.; Saenger, S.; Marciniak, E.; Obriot, H.; Chevarin, C.; Nicole, A.; Revillod, L.; Charizanis, K.; Lee, K. Y.; Suzuki, Y.; Kimura, T.; Matsuura, T.; Cisneros, B.; Swanson, M. S.; Trovero, F.; Buisson, B.; Bizot, J. C.; Hamon, M.; Humez, S.; Bassez, G.; Metzger, F.; Buee, L.; Munnich, A.; Sergeant, N.; Gourdon, G.; Gomes-Pereira, M., Myotonic dystrophy CTG expansion affects synaptic vesicle proteins, neurotransmission and mouse behaviour. *Brain* 2013, 136, (Pt 3), 957-70.
37. Deramecourt, V.; Bombois, S.; Maurage, C. A.; Ghestem, A.; Drobecq, H.; Vanmechelen, E.; Lebert, F.; Pasquier, F.; Delacourte, A., Biochemical staging of synucleinopathy and amyloid deposition in dementia with Lewy bodies. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006, 65, (3), 278-88.

38. Tofaris, G. K.; Razaq, A.; Ghetti, B.; Lilley, K. S.; Spillantini, M. G., Ubiquitination of alpha-synuclein in Lewy bodies is a pathological event not associated with impairment of proteasome function. *J Biol Chem* 2003, 278, (45), 44405-11.
39. Sergeant, N.; Bombois, S.; Ghestem, A.; Drobecq, H.; Kostanjevecki, V.; Missiaen, C.; Wattez, A.; David, J. P.; Vanmechelen, E.; Sergheraert, C.; Delacourte, A., Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach. *J Neurochem* 2003, 85, (6), 1581-91.
40. Le Freche, H.; Brouillette, J.; Fernandez-Gomez, F. J.; Patin, P.; Caillierez, R.; Zommer, N.; Sergeant, N.; Buee-Scherrer, V.; Lebuffe, G.; Blum, D.; Buee, L., Tau phosphorylation and sevoflurane anesthesia: an association to postoperative cognitive impairment. *Anesthesiology* 2012, 116, (4), 779-87.
41. Leboucher, A.; Laurent, C.; Fernandez-Gomez, F. J.; Burnouf, S.; Troquier, L.; Eddarkaoui, S.; Demeyer, D.; Caillierez, R.; Zommer, N.; Vallez, E.; Bantubungi, K.; Breton, C.; Pigny, P.; Buee-Scherrer, V.; Staels, B.; Hamdane, M.; Tailleux, A.; Buee, L.; Blum, D., Detrimental effects of diet-induced obesity on tau pathology are independent of insulin resistance in tau transgenic mice. *Diabetes* 2013, 62, (5), 1681-8.
42. Deramecourt, V.; Lebert, F.; Maurage, C. A.; Fernandez-Gomez, F. J.; Dujardin, S.; Colin, M.; Sergeant, N.; Buee-Scherrer, V.; Clot, F.; Ber, I. L.; Brice, A.; Pasquier, F.; Buee, L., Clinical, neuropathological, and biochemical characterization of the novel tau mutation P332S. *J Alzheimers Dis* 2012, 31, (4), 741-9.

Figure 1

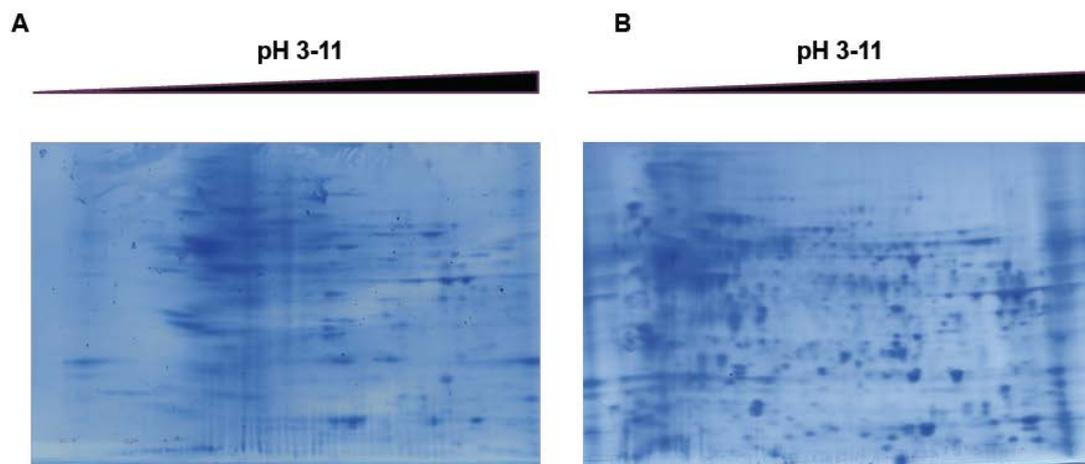


Figure 2

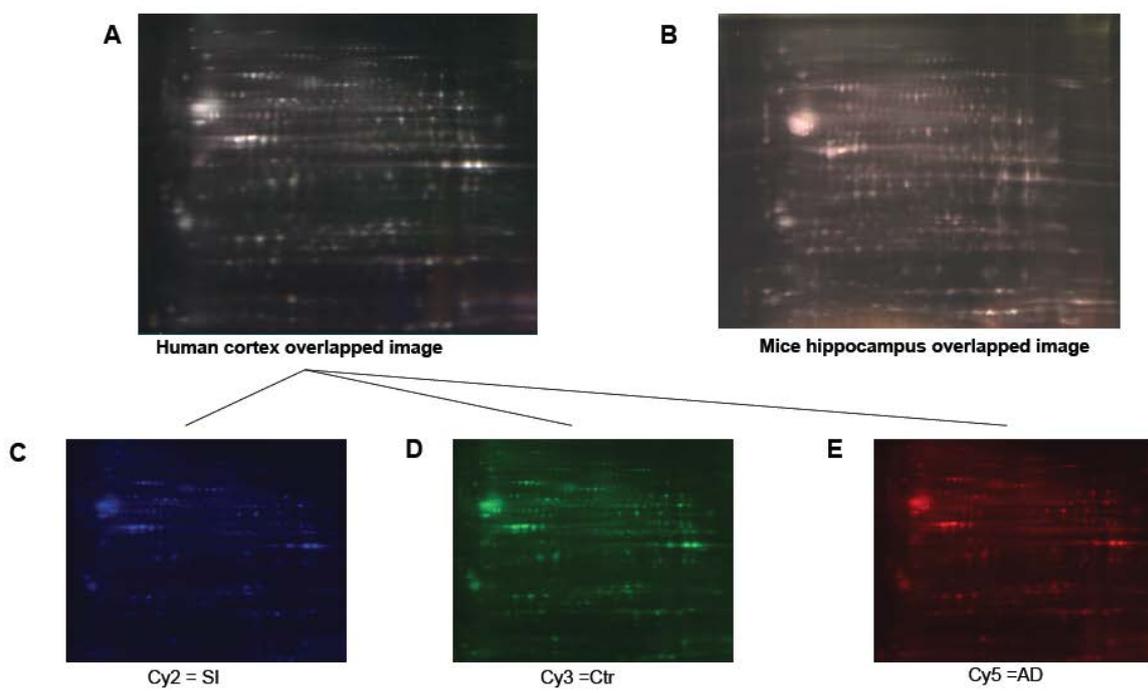
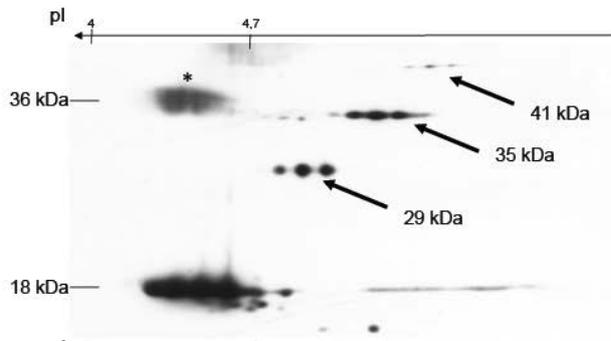


Figure 3

A

α -synuclein

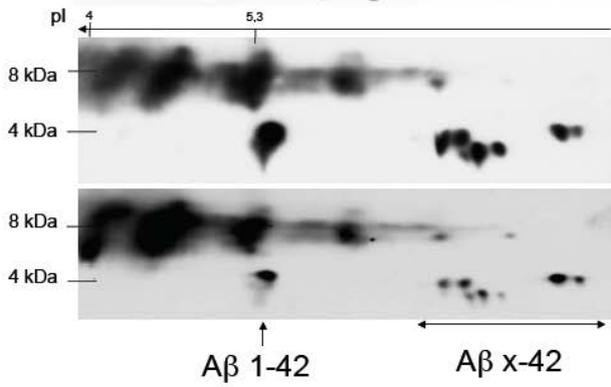


* = dimers
 ← = ubiquitinated

12 % Bis-Tris gel

B

$A\beta$ 42
 21F12



Sporadic AD

Familial AD
 APPI717L

16.5% Tris-Tricine gel

$A\beta$ 1-42

$A\beta$ x-42

ORIGINAL ARTICLE

Correspondence:

Anne Perdrix, Reproductive Biology Laboratory – CECOS, EA 4308 “Spermatogenesis and male gamete quality”, Rouen University Hospital, 1 rue de Germont, 76031 Rouen Cedex, France.
E-mail: anne.perdrix@chu-rouen.fr

Modification of chromosomal architecture in human spermatozoa with large vacuoles

Keywords:

aneuploidy, chromatin, chromosome positioning, spermatozoa, sperm large vacuoles

A. Perdrix,* A. Travers,* F. Clatot,† L. Sibert,* V. Mitchell,‡ F. Jumeau,‡ B. Macé* and N. Rives*

Received: 13-Mar-2012

Revised: 5-Jul-2012

Accepted: 6-Jul-2012

*Reproductive Biology Laboratory – CECOS, EA 4308 “Spermatogenesis and male gamete quality”, Rouen University Hospital, Rouen Cedex, †Department of Oncology, Henry Becquerel Center, Rouen, and ‡Department of Reproductive Biology – CECOS, EA 4308 “Spermatogenesis and male gamete quality”, Lille University Medical Center, Lille, France

doi: 10.1111/j.2047-2927.2012.00016.x

SUMMARY

Human normal spermatozoa present a specific chromatin organization, illustrated particularly by the non-random chromosome positioning. Spermatozoa with large vacuoles, described using motile sperm organelle morphology organization (MSOME), are associated with nuclear alterations, such as abnormal chromatin condensation and aneuploidy. To question a probable association between large nuclear vacuoles and chromatin disorganization, we evaluated chromosomes X, Y and 18 topography in normal spermatozoa (NS) compared with spermatozoa with large vacuoles (SLV). After centrifugation on a gradient density system, 229 NS (spermatozoa presenting a normal nuclear shape and a vacuole area <6.5% of head area) from 10 normal semen samples and 221 SLV (spermatozoa presenting a vacuole area >13% of head area) from 10 semen samples with teratozoospermia were selected using MSOME. A three-colour FISH was carried out using α -satellite centromeric probes for chromosomes X, Y and 18. For each chromosome, longitudinal and spatial positioning of centromeres was analysed. Distribution of each chromosome was non-random in NS and in SLV, whatever the methodology used. Using longitudinal positioning, distribution of chromosome 18 and chromosome Y centromeres did not differ significantly between SLV and NS. On the contrary, chromosome X centromeres were more frequently positioned in the posterior region of sperm nucleus in SLV ($p = 0.01$). Considering spatial positioning, distributions differed significantly between SN and SLV for chromosome Y ($p = 0.02$) and chromosome 18 ($p < 10^{-4}$) and marginally for chromosome X ($p = 0.08$). Our study concluded to a modification in chromosomes X, Y and 18 centromere topography between NS and SLV, representing a novel and supplementary evidence to argue chromatin disorganization in SLV.

INTRODUCTION

Spermatozoa are characterized by a unique chromatin organization, based on the replacement during spermiogenesis of histones by protamines; as a result, sperm chromatin is coiled into toroids (Ward, 1993), instead of nucleosome organization observed in somatic cells (Ward & Coffey, 1991), allowing an extreme compaction of sperm DNA. A supplementary level of complex nuclear organization is represented by chromosome topology. Indeed, as observed in somatic cells (Foster & Bridger, 2005; Cremer & Cremer, 2010), individual chromosomes occupy distinct territories (Haaf & Ward, 1995; Zalensky *et al.*, 1995) and the preferential longitudinal positioning has been established for 11 chromosomes in human spermatozoa (Zalensky & Zalenskaya, 2007).

The condensed, insoluble and highly organized nature of sperm chromatin acts to protect genetic integrity during

transport of the paternal genome through the male and female reproductive tracts. It also ensures that paternal DNA is delivered in the form that sterically allows the proper fusion of two gametic genomes and enables the developing embryo to correctly express the genetic information (Erenpreiss *et al.*, 2006). Sperm nucleus seems consequently crucial for fertilization and embryo development. Moreover, accumulating evidence suggests that disturbances in the organization of the genomic material in sperm nuclei are negatively correlated with the fertility potential of spermatozoa (Agarwal & Said, 2003). Several sperm nuclear alterations have been associated with infertility: sperm DNA damage (Barratt *et al.*, 2010), sperm chromatin immaturity (Oliva, 2006), sperm aneuploidy (Tempest & Griffin, 2004). Role of sperm chromosome topography in male infertility have also been questioned (Finch *et al.*, 2008; Ioannou *et al.*, 2011), and the specific architecture of sperm chromatine seemed to be an

integral part of epigenetic mechanism in embryogenesis (Cremier *et al.*, 2004; Claussen, 2005).

As a consequence, in Assisted Reproduction Technology (ART), sperm nucleus appeared more and more determinant to improve pregnancy rates and became the centre of interest of several studies (Lewis, 2007; Barratt *et al.*, 2010). Among sperm nuclear investigations, Bartoov *et al.* (2001) proposed an observation system, in real time and at a high magnification of up to $\times 6600$ called the Motile Sperm Organelle Morphology Examination (MSOME), using an inverted microscope equipped with Nomarski interferential contrast optics. Normal spermatozoa have been defined, and new abnormalities, as nuclear vacuoles, have been described (Bartoov *et al.*, 2002). Large vacuoles have been associated with sperm nuclear alterations (i) DNA damage (Franco *et al.*, 2008; Garolla *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2010; de Almeida Ferreira Braga *et al.*, 2011), (ii) aneuploidy (Garolla *et al.*, 2008; Perdrix *et al.*, 2011), and (iii) chromatin immaturity (Boitrelle *et al.*, 2011; Cassuto *et al.*, 2011; Franco *et al.*, 2012; Perdrix *et al.*, 2011). The presence of large vacuoles in sperm heads has been suspected to be deleterious on ART outcome (Berkovitz *et al.*, 2006a; Vanderzwalmen *et al.*, 2008; Cassuto *et al.*, 2009; de Almeida Ferreira Braga *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2011). To clarify vacuole impact on embryo development, the chromatin assessment in spermatozoa with large vacuoles became of major interest (Boitrelle *et al.*, 2011).

The purpose of this study was to precise the chromatin alterations associated with the presence of large vacuoles in sperm head. We used chromosome positioning to assess chromatin integrity, comparing chromosome topology between spermatozoa with large vacuoles and normal spermatozoa.

MATERIALS AND METHODS

Patients

A total of 20 men were included in this study. All the participants gave their agreement to provide semen samples for the study. Ten men, with age ranged from 26 to 41 years, presented normal semen parameters [according to World Health Organization (WHO) criteria; WHO, 2010] and were considered as controls. Ten other men, with age ranged from 28 to 43 years, presented altered semen parameters, with, at least, teratozoospermia (normal forms $<50\%$, according David's modified classification) (Auger *et al.*, 2001). Karyotypes in peripheral blood lymphocytes were analyzed for patients with altered sperm parameters and were normal for every patient.

Cell preparation

Semen samples were collected after 3–5 days of sexual abstinence, and liquefied for 20 min at 37 °C. After performing semen analysis according to WHO (2010) guidelines for each sample, 1 mL of native spermatozoa was centrifugated on a gradient density system (PureSperm 100; JCD, La Mulatière, France). A droplet of the motile fraction obtained was placed into a glass box (Willco Sterile, GWST-100; Biosoft International, Amsterdam, The Netherlands) under sterile paraffin oil (Ovoil 100; Vitrolife, Göteborg, Sweden) to perform high magnification observations. For each patient, spermatozoa morphology was carried out at high magnification (MSOME) ($\times 6600$) using an inverted microscope equipped with Nomarski differential interference contrast optics (Leica DMI 6000B; Leica, Solms,

Germany). Twenty-five spermatozoa were randomly photographed (Leica Application Suite version 3.4.0; Leica) and morphology assessment was conducted using Leica IM 1000 software. Length, width and surface of head, number as well as area of vacuoles were also assessed with this software (Saïdi *et al.*, 2008).

Then, motile spermatozoa selection was performed at $\times 6600$ magnification using a micropipette injection (ICSI Micropipets MIC-50-30; Humagen, Charlottesville, VA, USA) and a micromanipulator system. Two types of spermatozoa were isolated from the two types of semen samples (i) normal spermatozoa (NS), representing spermatozoa without any vacuoles, or with a unique small vacuole (vacuole area $<6.4\%$ of head area), from the 10 samples with normal semen parameters, (ii) spermatozoa with large vacuoles (SLV), representing spermatozoa with a vacuole area $>13\%$ of sperm head area, from the 10 abnormal semen samples (Saïdi *et al.*, 2008; Perdrix *et al.*, 2012). For each type of spermatozoa 20–50 spermatozoa per patient were selected and put down on glass slides (Cytoslides; Thermo Fisher Scientific, Runcom, Cheshire, UK) in a spotted area. The number of isolated spermatozoa was limited by the selection duration. A maximum time of 2 hours has been used for this technique to avoid possible effects of time selection on the incidence of vacuolated spermatozoa (Peer *et al.*, 2007). After air-drying, sperm cells were fixed with methanol (Chelli *et al.*, 2010; Perdrix *et al.*, 2011). The slides were stored in a freezer at -20 °C until their use.

Slides were washed in phosphate-buffered saline (PBS) (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France), then in $2 \times$ SSC (standard saline citrate) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Sperm cells were briefly decondensed using a solution of 25 mM DTT (Dithiothreitol) (Sigma Chemical CO, Saint Louis, MO, USA), 1 M TrisHCl pH 9.5 at room temperature. Treatment with DTT has been proved to preserve sperm nucleus structure (Hazouri *et al.*, 2000), not only sperm shape (Celik-Ozenci *et al.*, 2003) but also sperm chromocenter (Gurevitch *et al.*, 2001). Slides were washed in $2 \times$ SSC, then in PBS, and dehydrated in a 70–100% ethanol series and air-dried.

FISH

A three-colour FISH was carried out using α -satellite centromeric probes for chromosome X in green (CEP X Spectrum Green; Abbott, Rungis, France), chromosome Y in yellow (CEP Y Sat III Spectrum Orange, CEP Y Sat III Spectrum Green; Abbott) and chromosome 18 in red (CEP 18 Spectrum Orange; Abbott). The yellow colour was obtained by mixing an equal volume of CEP Y labelled with Spectrum Orange and CEP Y labelled with Spectrum Green (Milazzo *et al.*, 2006; Garolla *et al.*, 2008; Wiland *et al.*, 2008; Perdrix *et al.*, 2011).

Briefly, probes and hybridization solution were removed from the freezer (-20 °C) and allowed to warm up to room temperature. The hybridization mixture contained each centromeric probe filled up with hybridization solution to a final volume of 9 μ L. Nine microlitre of the hybridization mixture were placed on the spotted area of the slide, and a 20 mm \times 20 mm coverslip was carefully applied. Both sperm cells and probes were simultaneously denatured at 73 °C for 5 min on heated plate (Hybaid; Omnigene, Teddington, UK) and hybridized overnight at 37 °C.

After hybridization, coverslips were removed. Slides were washed once in a solution of SSC 0.4X/NP40 0.3% (Ipegal; Sigma

Chemical CO) for 2 min at 73 °C and once in a solution of SSC 2X/NP40 0.1% at room temperature for 1 min. After dehydration in a 70–100% ethanol series, slides were counterstained with a 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Counterstain 1, Adgenix, Voisin le Bretonneux, France) solution diluted in antifade mounting medium (Antifade; MP-QBio-Gene, Illkirch, France) and coverslips were mounted. A highly concentrated DAPI solution (1 µg/mL) was used to detect more easily the few number of MSOME selected spermatozoa fixed on glass slide.

Microscopy

Spermatozoa were examined with an epifluorescence microscope (Nikon Microphot-FXA; Nikon Instruments, Champigny sur Marne, France) at a magnification of $\times 630$. A triple band-pass filter set (FITC/rhodamine/DAPI) was used. Images were acquired with a CCD camera (MetaSystems, Aldusheim, Germany). The positioning of the chromosome centromeres in the sperm cells was analysed using ISIS (In Situ Imaging System) MetaSystems software (v. 5.0; Aldusheim, Germany). Green, yellow and red signals detected chromosomes X, Y and 18, respectively. Two fluorescent spots of comparable size and intensity, separated by at least one spot diameter, were considered as two copies of the corresponding chromosome. Spermatozoa with diffuse fluorescent signals and overlapping nuclei were classified as ambiguous and were not included in the count. Chromosome relative positions were analyzed in a minimum of 200 normal spermatozoa and 200 spermatozoa with large vacuoles. Aneuploidy frequency was defined by the sum of frequencies of 1818XX, 1818YY and 1818XY diploid spermatozoa, XX, YY and 1818 disomic spermatozoa as well as XY hyperhaploid spermatozoa.

Chromosome positioning

Centromere positions of chromosomes X, Y and 18 were analysed using 2 methodologies: linear positioning and positioning in 2 dimensions (2D).

Linear positioning

Sperm nucleus was divided into three equal parts along its long axis, from the acrosome to the point of sperm tail attachment, defining anterior part (a), median part (m) and posterior part (p). The frequency of centromeres for each chromosome

positioned in the anterior, median and posterior part of the sperm head was calculated (Fig. 1).

2D positioning

Centromeres were localized along the short and long sperm axis to evaluate if chromosomes were situated deep inside the nucleus (central localization) or close to the sperm membrane (peripheral localization), close to the acrosome (anterior localization) or near the tail (posterior localization). We used the graphic model described by Zalenskaya & Zalensky (2004). Several geometrical parameters such as length of long axis (L: from tail attachment point to acrosome); distance from FISH centromere signal to tail attachment point (D); distance from FISH centromere signal and long axis (H) were assessed. Values of D/L and H/L were calculated, corresponding to the chromosome centromere coordinates along the long and the short axis, respectively, of the sperm head. The highest D/L values close to 1.0 marked the position of centromeres close to an acrosome area. The lowest H/L values close to 0.0 marked the central position of the centromeres within the sperm nucleus; the highest H/L values close to 0.5 marked position more peripherally (Fig. 1).

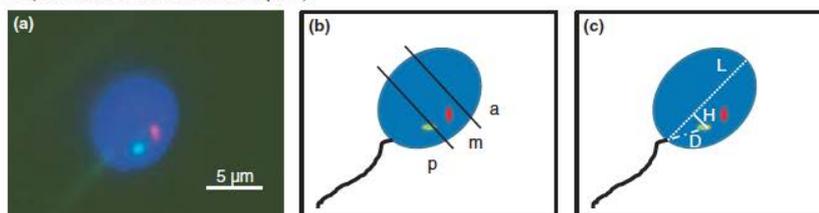
Statistical analysis

Semen and MSOME parameters were compared between patients and controls using Mann-Whitney *U*-test. Vacuole distributions obtained with MSOME analysis were compared using Chi-squared test. Aneuploidy frequencies were compared between normal spermatozoa and large vacuoles spermatozoa using Chi-squared test.

For linear positioning, Chi-squared test was used to determine whether the distribution of chromosome centromeres between anterior, median and posterior parts of the sperm nuclei were statistically different from random distribution. Then, chromosome positionings were compared between normal spermatozoa and spermatozoa with large vacuoles using Chi-squared test.

For 2D positioning, Kolmogorov-Smirnov test was used to compare chromosome distribution to random distribution. Mean H/L and D/L values were compared between the two types of spermatozoa using the *t*-test or Mann-Whitney *U*-test. Then, to assess chromosome topography in 2D, using individual values in opposition with mean values, a table was created with three columns representing the D/L values varying from 0.0 to

Figure 1 Determination of linear and spatial positioning of chromosome centromeres in human sperm nuclei. (a) Example of FISH centromere signals in sperm cells. The nuclear counterstain is DAPI (blue), the chromosome X centromeric probe is green and the chromosome 18 centromeric probe is red. Assessment was performed at $\times 630$ magnification. (b and c) Schematic view of the sperm nucleus presenting a red signal for chromosome 18 centromere and a green signal for chromosome X centromere. (b) Illustration of linear positioning: sperm nucleus was divided in three equal parts: anterior (a), median (m) and posterior (p); FISH centromere signals were localized within each part. (c) Illustration of spatial positioning: using the methodology proposed by Zalenskaya & Zalensky (2004): each FISH signal was localized using three geometrical parameters: L (length of the long sperm head axis), H (elevation over the long axis) and D (distance from the tail attachment point).



1.0 and spaced by 0.33, and two lines for H/L values from 0.0 to 0.5 and spaced by 0.25. In the 6 table-cells, centromere distribution of each chromosome was compared between normal spermatozoa and spermatozoa with large vacuoles using the chi-squared test. A value of $p < 0.05$ was considered to be significant.

RESULTS

Studied population

Semen parameters and MSOME analysis are summarized in Table 1. Teratozoospermia was observed in all patient semen sample; combined with asthenozoospermia (progressive motility <32%) for five patients, and with oligoasthenozoospermia (sperm concentration $<15 \times 10^6$ /mL or $<39 \times 10^6$ /ejaculate, and progressive motility <32%) for three patients. Sperm cell count ($p = 0.0005$), progressive motility ($p = 0.0003$) and normal forms ($p < 10^{-4}$) were significantly decreased in patients compared with controls.

Using MSOME analysis, despite a sperm head width increased in patients ($p = 0.001$), sperm head size did not differ significantly between patients and controls ($p = 0.06$). Vacuole area was larger in patients than in controls ($p < 10^{-4}$), but vacuole number was similar ($p = 0.16$). Vacuoles were preferentially localized in the anterior and median parts of sperm heads, (91.8% in controls, 93.5% in patients). Vacuole distributions differed significantly between controls and patients ($p < 10^{-4}$), with more vacuoles located in the anterior part of sperm heads in patients.

There was no significant difference in aneuploidy rates in SLV from patients (13.7%) compared with SN from controls (8.3%) ($p = 0.09$) (Table 1).

Chromosome positioning

Linear positioning

Results of linear positioning assessment are presented in Table 2. Centromere distributions were not random for each chromosome, in normal spermatozoa and in spermatozoa with large vacuoles. Most of centromeres were located in the median part of sperm head (range of means: 44.3–64.3%), whatever the chromosome and whatever the type of spermatozoa. Topographies of chromosome 18 and chromosome Y centromeres did not differ significantly between normal spermatozoa and spermatozoa with large vacuoles. On the contrary, chromosome X distribution was significantly different in normal spermatozoa compared with spermatozoa with large vacuoles ($p = 0.01$); indeed, chromosome X centromeres were more frequently posterior in spermatozoa with large vacuoles.

2D positioning

Results of centromere distribution evaluated using H/L and D/L parameters are presented in Table 3. Figure 2 provides an illustration of the centromere distribution in 2D, in the virtual matrix used for Chi-squared test. Centromere distributions were not random for each chromosome, in normal spermatozoa and in spermatozoa with large vacuoles. Considering mean values (i) comparing D/L values using *T*-test, chromosomes 18, X and Y appeared substantially more anterior in normal spermatozoa vs. spermatozoa with large vacuoles and (ii) comparing H/L values

using Mann–Whitney *U*-test, chromosomes 18 and X appeared more peripheral in normal spermatozoa vs. spermatozoa with large vacuoles, but no difference was observed for chromosome Y. Considering every individual centromere values (i) distributions in 2D of chromosome 18 and chromosome Y centromeres differed significantly between normal spermatozoa and spermatozoa with large vacuoles ($p < 10^{-3}$ and $p = 0.04$ respectively) and (ii) for chromosome X, 2D distribution was marginally different between normal spermatozoa compared with spermatozoa with large vacuoles ($p = 0.08$).

Haploid spermatozoa population

To evaluate aneuploidy influence on chromosome topography, we performed chromosome positioning assessment in the restricted haploid spermatozoa population.

With linear positioning assessment, a non-random distribution in normal haploid spermatozoa (chr X: $p < 10^{-4}$; chr Y: $p < 10^{-4}$; chr 18: $p < 10^{-4}$) and in haploid spermatozoa with large vacuoles (chr X: $p = 0.02$; chr Y: $p = 0.001$; chr 18: $p = 0.002$) was confirmed. As observed in the whole spermatozoa population, comparisons of centromere distributions between normal haploid spermatozoa and haploid spermatozoa with large vacuoles demonstrated no significant difference for chromosome Y ($p = 0.59$) and chromosome 18 ($p = 0.1$); chromosome X topography remained significantly modified between normal haploid spermatozoa and haploid spermatozoa with large vacuoles ($p = 0.0001$).

With 2D positioning, the analysis of chromosome centromeres distribution, restricted to haploid spermatozoa, confirmed the data obtained for the whole spermatozoa population: we demonstrated (i) a non-random topography in normal haploid spermatozoa (chr X: $p < 10^{-4}$; chr Y: $p < 10^{-4}$; chr 18: $p < 10^{-4}$) and in haploid spermatozoa with large vacuoles (chr X: $p < 10^{-4}$; chr Y: $p < 10^{-4}$; chr 18: $p < 10^{-4}$) and (ii) a modified topography in haploid spermatozoa with large vacuoles for chromosome Y ($p < 10^{-3}$), chromosome 18 ($p < 10^{-3}$) and not for chromosome X ($p = 0.14$).

DISCUSSION

To evaluate the impact of sperm vacuoles on chromosome positioning, our study was based on (i) a MSOME selection of defined spermatozoa considered normal or with large vacuoles, (ii) an evaluation of chromosome topography for each type of spermatozoa, and (iii) a comparison of the chromosome distributions between normal spermatozoa and spermatozoa with large vacuoles.

In our MSOME selection methodology, spermatozoa with large vacuoles were isolated when their vacuole area was superior to 13%. In the absence of consensus on 'large' vacuole definition, varying from more than 25% (Boitrelle *et al.*, 2011) or 50% of sperm head area (Franco *et al.*, 2008, 2012; Mauri *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2010; Akl *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012) to a diameter of more than 1.5 μm and visible at 400 \times magnification (Watanabe *et al.*, 2011), this cut-off has been proposed to define abnormal sperm vacuole area, using a strict objective MSOME analysis (Saïdi *et al.*, 2008; Perdrix *et al.*, 2012); this value represented the smallest mean vacuole area observed only in abnormal semen samples. Isolation of spermatozoa with large vacuoles was performed using spermatozoa of selected infertile patients presenting semen alterations, whereas normal

Table 1 Conventional semen parameters, MSOME parameters and aneuploidy rates in MSOME selected spermatozoa considered as normal or with large vacuoles, in 10 patients and ten controls. A value of $p < 0.05$ was considered to be significant

	Semen parameters				MSOME parameters				Selected spermatozoa							
	Sperm count (10^6 /mL)	Progressive motility (%)	Normal Morphology (%)	Sperm head length (μ m)	Sperm head width (μ m)	Sperm head size (μ m ²)	Sperm vacuoles mean number	Mean vacuoles area (%)	Vacuole localization				Number of SLV	Number of NS	Aneuploidy rate (%)	
									Ant		Post					
									%	n	%	n				
Patients																
P1	10	10	33	4.5	3.3	12.4	1.6	8.2	33.3	13	59	23	7.7	3	29	3.5
P2	45	25	48	5.2	3.1	13.9	1.7	10.9	48.8	21	48.8	21	0	0	27	0.0
P3	2	20	10	5.4	3.2	14.2	2.3	16.6	43.9	25	54.4	31	1.8	1	29	13.8
P4	58	30	26	5	3	12.1	1.3	8.5	51.5	17	39.4	13	9.1	3	17	17.6
P5	20	40	21	5.5	3.1	14.2	1.7	10.4	26.2	11	57.1	24	16.7	7	14	35.7
P6	16	30	42	4.8	3.2	13.3	1.9	8.2	58.3	28	37.5	18	0	0	23	13.0
P7	16	35	23	5.2	3.2	13.9	1.9	17	55.3	26	38.3	18	6.4	3	15	13.3
P8	8	20	15	5.4	2.9	13.8	1.8	12.2	54.3	25	43.5	20	2.2	1	21	14.3
P9	5	20	18	4.9	3	12.5	1.8	15	46.7	21	48.9	22	2.2	1	22	9.1
P10	19	25	16	5	3.2	13	2.2	11.5	48.1	26	42.6	23	9.3	5	24	16.7
Mean \pm SEM	19.9 \pm 5.5 ^a	25.5 \pm 2.7 ^b	25.2 \pm 3.9 ^c	5.1 \pm 0.1 ^d	3.1 \pm 0.1 ^e	13.3 \pm 0.2 ^f	1.8 \pm 0.1 ^g	11.8 \pm 1.1 ^h	46.6 \pm 3.1		46.9 \pm 2.5	23	5.5 \pm 1.7	22.1 \pm 1.7		13.7 \pm 3.0 ⁱ
Controls																
C1	50	35	62	5.1	3.5	15.5	1.3	4	9.4	3	84.4	27	6.3	2	22	4.5
C2	48	45	76	4.8	3.4	13.5	2.2	3.4	32.7	18	27.3	15	40	22	32	12.5
C3	24	35	53	3.2	3.2	13.8	1.7	6	38.1	16	61.9	26	0	0	21	9.5
C4	65	40	61	4.9	3.4	14.1	2	4.5	35.3	18	58.8	30	5.9	3	25	16.0
C5	90	35	69	5.2	3.4	14.4	1.9	5.4	36.2	17	59.6	28	4.3	2	21	0.0
C6	30	35	51	5.4	3.4	15.4	1.6	4	12.2	5	80.5	33	7.3	3	9	11.1
C7	60	45	54	5.1	3.3	14.7	1.4	7.8	22.9	8	71.4	25	5.7	2	20	10.0
C8	185	40	50	5	3.3	13.6	1.3	7.5	24.2	8	75.8	25	0	0	18	5.5
C9	165	45	63	5	3.2	13.7	1.2	2.2	35.5	11	58.1	18	6.5	2	39	5.1
C10	38	40	52	4.8	3.2	13.4	1.4	7.9	26.5	9	67.6	23	5.9	2	22	9.1
Mean \pm SEM	75.5 \pm 17.7 ^a	39.5 \pm 1.4 ^b	59.1 \pm 2.7 ^c	5.1 \pm 0.1 ^d	3.3 \pm 0.1 ^e	14.2 \pm 0.2 ^f	1.6 \pm 0.1 ^g	5.2 \pm 0.6 ^h	27.3 \pm 3.2		64.5 \pm 5.1	23	8.1 \pm 3.6	22.9 \pm 2.5		8.3 \pm 1.4 ⁱ

Ant: anterior; Med: median; MSOME: Motile Sperm Organelle Morphology Examination; n: number of vacuoles observed; NS: normal spermatozoa; Post: posterior; SEM: standard error of the mean; SLV: spermatozoa with large vacuoles. ^a $p = 0.0005$; ^b $p = 0.0003$; ^c $p < 10^{-4}$; ^d $p = 0.57$; ^e $p = 0.001$; ^f $p = 0.06$; ^g $p = 0.16$; ^h $p < 10^{-4}$; ⁱ $p = 0.09$.

Table 2 Linear positioning of chromosome X, Y and 18 centromeres, distributed between the anterior, median and posterior parts of sperm head, in normal spermatozoa and spermatozoa with large vacuoles. A value of $p < 0.05$ was considered to be significant

Chromosome	Chromosome distribution in normal spermatozoa % _(n)				Chromosome distribution in spermatozoa with large vacuoles % _(n)				Comparison of chromosome distributions between normal spermatozoa and spermatozoa with large vacuoles (p^b)
	Anterior localization	Median localization	Posterior localization	Comparison to random distribution (p^a)	Anterior localization	Median localization	Posterior localization	Comparison to random distribution (p^a)	
X	35 (41)	60.7 (71)	4.3 (5)	$<10^{-4}$	42.5 (42)	44.3 (47)	13.2 (14)	0.002	0.01
Y	27.7 (31)	64.3 (72)	8 (9)	$<10^{-4}$	28.7 (35)	57.4 (70)	13.9 (17)	10^{-4}	0.09
18	22.6 (48)	60.4 (128)	17 (36)	$<10^{-4}$	23 (48)	52.6 (110)	24.4 (51)	$<10^{-3}$	0.14

n : number of centromeres observed. ^aChromosome distributions compared with an expected random distribution of 33.3/33.3/33.3 using the chi-squared test.

^bComparison of chromosome distributions between normal spermatozoa and spermatozoa with large vacuoles using the chi-squared test.

spermatozoa were selected from spermatozoa presenting normal semen parameters. Indeed, vacuole area seemed to be correlated with semen alterations (Cassuto *et al.*, 2012; Perdrix *et al.*, 2012); in particular, vacuoles have been supposed to increase when percentage of spermatozoa with normal form decreases (Sermondade *et al.*, 2007; Saïdi *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2009; Perdrix *et al.*, 2011, 2012). The number of MSOME selected spermatozoa was limited not only because of time consuming of the technique but also to avoid the potential effects of incubation time on sperm vacuole occurrence (Peer *et al.*, 2007). Consequently, our study was limited to 200 normal spermatozoa and 200 spermatozoa with large vacuoles; this sample size corresponded to previously reported data focused on individual MSOME selected spermatozoa sample size varying from 100 (Garolla *et al.*, 2008) to 350 (Franco *et al.*, 2008), 360 (Cassuto *et al.*, 2012), 400 (Perdrix *et al.*, 2011) and 450 (Boitrelle *et al.*, 2011) for each type of selected spermatozoa.

Assessment of centromere topography was performed using two methodologies. The first one, named linear positioning and based on a simple localization of the FISH signals among the long axis of the sperm head, represented the most instinctive and the most common method used in literature (Luetjens *et al.*, 1999; Hazzouri *et al.*, 2000; Terada *et al.*, 2000; Sbracia *et al.*, 2002; Zalenskaya & Zalensky, 2004; Foster *et al.*, 2005; Mudrak *et al.*, 2005; Olszewska *et al.*, 2008; Wiland *et al.*, 2008). Using this methodology, we observed a preferential localization of chromosome X, Y and 18 centromeres in the median part, in vacuolated and not vacuolated spermatozoa, as described by Olszewska *et al.* (2008) (medial located 18, X and Y centromeres: 55–65%) or Wiland *et al.* (2008) (medial located X and Y centromeres: 58–68%). On the contrary, other authors reported a preferential anterior position for chromosome X centromere (Luetjens *et al.*, 1999; Hazzouri *et al.*, 2000; Zalenskaya & Zalensky, 2004) or chromosome Y centromere (Sbracia *et al.*, 2002), and a preferential posterior position for chromosome 18 centromere (Sbracia *et al.*, 2002). Confronted with these contradictions, Olszewska *et al.* (2008) pointed the imperfections of this method (influence of FISH probes used, of studied sub-regions number in sperm head, of borderline FISH signals) and concluded to the importance of applying a 'more objective' model with normalized coordinates. Indeed, the simplicity of the linear positioning allowed to assess several spermatozoa: from 100 spermatozoa per chromosome (Mudrak *et al.*, 2005) to 1000 spermatozoa per chromosome (Sbracia *et al.*, 2002), with most of publications based on an analysis of 200 spermatozoa per chromosome

(Luetjens *et al.*, 1999; Zalenskaya & Zalensky, 2004; Olszewska *et al.*, 2008; Wiland *et al.*, 2008). However, this methodology presents some limits: linear positioning, by definition, only provided centromere localization information among one dimension, considering the long axis of sperm head. Three-dimensional analysis was performed to observe chromosome distribution in sperm head, but such studies required a confocal laser scanning microscope (Hazzouri *et al.*, 2000), and the number of assessed spermatozoa was limited (about 30 spermatozoa per chromosome (Hazzouri *et al.*, 2000). Zalenskaya & Zalensky (2004) proposed a semi-quantitative method describing chromosome positioning in two dimensions, and based on a precise measurement of chromosome centromere coordinates along the long and the short axis of sperm head. This method allowed a positioning assessment of a large number of spermatozoa close to 200 spermatozoa per chromosome (Zalenskaya & Zalensky, 2004; Olszewska *et al.*, 2008), and provided information about chromosome topography not only from the acrosome to the tail but also from the periphery to the centre of sperm head. This is the reason why this method has been chosen in our study. To interpret data obtained from multiple measurements of hundreds of spermatozoa, Zalenskaya & Zalensky (2004) used mean values; this statistical strategy, instinctive and very useful, suffered anyway from a little loss of information because of the heterogeneity of the values. Consequently, we proposed in our study, to take into account each centromere of chromosome, individually, defined by both long axis coordinate and short axis coordinate into the sperm head.

Our first results confirmed a non-random localization of chromosome X, Y and 18 centromeres in human sperm head (Haaf & Ward, 1995; Tilgen *et al.*, 2001; Zalenskaya & Zalensky, 2004; Manvelyan *et al.*, 2008), independently of the presence or the absence of vacuoles. Secondly, our study demonstrated the following (i) with linear positioning method, a significant difference for chromosome X distribution between normal spermatozoa and vacuolated spermatozoa, and not for chromosomes 18 and Y and (ii) using 2D method, a marginal difference for chromosome X, and a significant difference for chromosome 18 and Y distributions, between normal spermatozoa and vacuolated spermatozoa. Seemingly contradictory, these results were complementary: linear positioning assessment proved a modification in chromosome distributions among the long axis of sperm head between the two types of spermatozoa, whereas 2D positioning added information about chromosome distributions among the short axis. In our study, X chromosomes varied

Table 3 Positioning in two dimensions of chromosome X, Y and 18 centromeres, using the graphic model proposed by Zalenskaya & Zalensky (2004), in normal spermatozoa and spermatozoa with large vacuoles. A value of $p < 0.05$ was considered to be significant

Centromere co-ordinate	Chromosome X				Chromosome Y				Chromosome 18			
	Normal spermatozoa (n = 116)	Spermatozoa with large vacuoles (n = 103)	Comparison between normal spermatozoa and spermatozoa with large vacuoles (p ^a)	Mean ± SE	Normal spermatozoa (n = 112)	Spermatozoa with large vacuoles (n = 122)	Comparison between normal spermatozoa and spermatozoa with large vacuoles (p ^b)	Mean ± SE	Normal spermatozoa (n = 212)	Spermatozoa with large vacuoles (n = 209)	Comparison between normal spermatozoa and spermatozoa with large vacuoles (p ^b)	Mean ± SE
D/L	0.64 ± 0.01	0.59 ± 0.01	<10 ⁻⁴	0.59 ± 0.01	0.60 ± 0.01	0.56 ± 0.01	<10 ⁻⁴	0.60 ± 0.01	0.56 ± 0.01	<10 ⁻⁴	0.53 ± 0.01	0.53 ± 0.01
H/L	0.16 ± 0.01	0.12 ± 0.01	<10 ⁻⁴	0.12 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.14 ± 0.01	<10 ⁻⁴	0.16 ± 0.01	0.18 ± 0.01	<10 ⁻⁴	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01

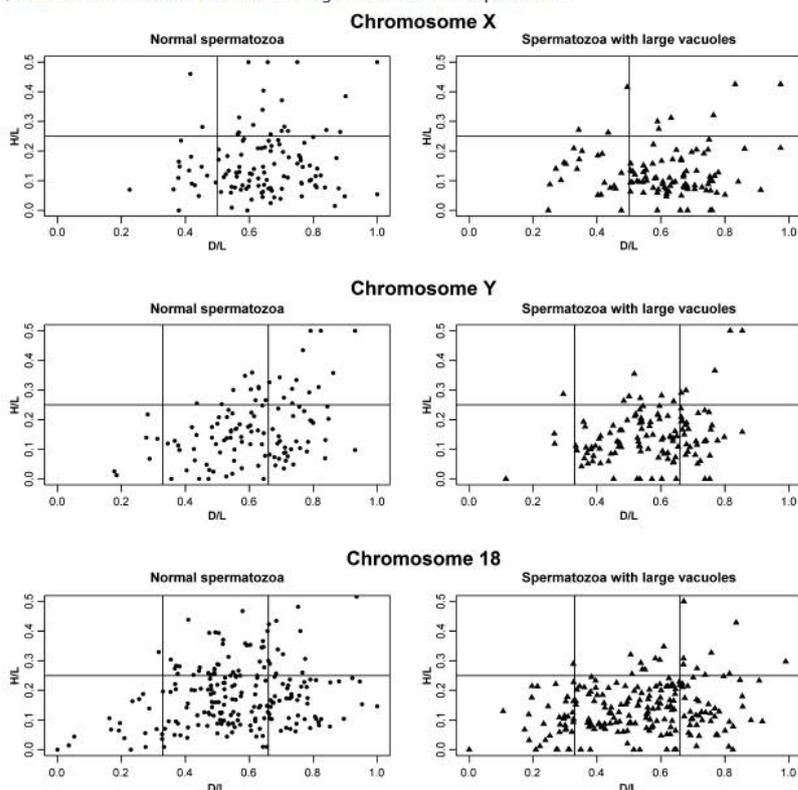
D/L: chromosome centromere co-ordinate along the long axis of the sperm head; H/L: chromosome centromere co-ordinate along the short axis of the sperm head; n: Number of centromeres observed. ^aChromosome 2D distributions compared with an expected random distribution using Kolmogorov-Smirnov test. ^bComparison of D/L and H/L mean values obtained for chromosome X, Y and 18 centromeres in normal spermatozoa and spermatozoa with large vacuoles using t-test or Mann-Whitney U-test.

essentially in the anteroposterior distributions between vacuolated and not vacuolated spermatozoa; on the contrary, chromosomes 18 and Y varied predominantly in their positions in depth. The complementarity of linear and 2D-positioning results have already been demonstrated as following; Olszewska *et al.* (2008) concluded to an absence of difference in the longitudinal localization of chromosomes 15, 18 and X between control males and infertile patients with increased level of aneuploidy evaluated using linear positioning method, but demonstrated a significant difference using spatial positioning method.

Considering that our study was performed on particular spermatozoa, selected from patients with specific semen profile, it appeared necessary to discuss a confusion bias, potentially implicated in chromosome topography modifications between normal spermatozoa and spermatozoa with large vacuoles. Firstly, semen alterations have been suspected to be associated with sex chromosome position changes (Finch *et al.*, 2008), and abnormal sperm morphology has been specifically supposed to be related with an abnormal nuclear organization (Gurevitch *et al.*, 2001); in our study, nuclear disorganization cannot be dissociated from altered spermatogenesis. However, a recent publication seemed to minimize the impact of altered spermiogenesis on chromosome topography (Ioannou *et al.*, 2011). Secondly, oligozoospermia (Rives *et al.*, 1999; Vegetti *et al.*, 2000; Calogero *et al.*, 2001; Tempest & Griffin, 2004), asthenozoospermia (Vegetti *et al.*, 2000; Tempest & Griffin, 2004) and teratozoospermia (Calogero *et al.*, 2001; Harkonen *et al.*, 2001; Machev *et al.*, 2005) have been related to sperm aneuploidy. Confusingly, sperm aneuploidy has been associated with modification of chromosome localization in sperm heads: Olszewska *et al.* (2008) demonstrated disturbances in the centromere area in sperm nuclei of infertile patients with an increased level of aneuploidy compared with fertile males; in sperm cells of infertile patients with an increased level of aneuploidy, 'some differences in the preferential longitudinal centromere positioning between sperm nuclei with hyperhaploid karyotype (n + 1) vs. normal karyotype (n)' were observed. Consequently, impact of aneuploidy in our results must be considered (i) aneuploidy level was not significantly increased in vacuolated spermatozoa from OAT patients compared with non-vacuolated spermatozoa from controls and (ii) exclusion of aneuploid spermatozoa did not modify our results, confirming the independency of chromosome topography changes with respect to aneuploidy, as previously observed by Sbracia *et al.* (2002).

The association between vacuoles and changes in chromosomes positioning observed in our study should be reinforced considering reported common points between these two semen characteristics. Both sperm head vacuoles (Zamboni, 1987; Mundy *et al.*, 1994) and chromosome topology modifications in sperm nucleus (Finch *et al.*, 2008; Wiland *et al.*, 2008) have been described to be the result of a global spermiogenesis alteration. Furthermore, sperm head vacuoles and chromosome topography seemed to have concordant impact on embryonic development: nuclear architecture has been supposed to influence the early embryonic development (Haaf & Ward, 1995; Foster *et al.*, 2005), but also later stages of zygote development; in parallel, sperm vacuoles have been associated with a poorer embryonic quality (Berkovitz *et al.*, 2006b; Vanderzwalmen *et al.*, 2008; Cassuto *et al.*, 2009) essentially because of an effect on late embryonic development (Berkovitz *et al.*, 2006a; Hazout *et al.*,

Figure 2 Schematic representation of 2D-positioning assessment for chromosome X, Y and 18 centromeres, in normal spermatozoa and spermatozoa with large vacuoles. Centromeres were localized in a plan using their coordinates among the long sperm head axis (D/L) and the short sperm head axis (H/L). Areas of centromere distribution were virtually divided into six (for chromosomes 18 and Y) or four (for chromosome X) table-cells, in order to compare chromosome distributions between normal spermatozoa and spermatozoa with large vacuoles, using the chi-squared test within each table-cell. Normal spermatozoa are represented by black points and spermatozoa with large vacuoles by black triangles. D/L: chromosome centromere coordinate along the long axis of the sperm head. H/L: chromosome centromere coordinate along the short axis of the sperm head.



2006; Vanderzwalmen *et al.*, 2008). Both sperm head vacuoles (Figueira Rde *et al.*, 2011) and chromosome topography (Luetjens *et al.*, 1999; Terada *et al.*, 2000; Zalensky & Zalenskaya, 2007; Olszewska *et al.*, 2008) have been implicated in sex-chromosome aneuploidy in ICSI-derived embryos.

In conclusion, chromosome architecture was modified in spermatozoa with large vacuoles compared with normal spermatozoa. Considering chromosome positioning as a reflect of chromatin integrity, our results emphasize the hypothesis of an association between nuclear vacuoles and sperm chromatin alterations. Consequently, MSOME analysis could be considered more informative than a strict morphological assessment of spermatozoa to improve male infertility diagnosis and treatment. However, further studies are necessary to confirm our preliminary results and to determine mechanism implicated in the association between chromosome disorganization and sperm vacuoles.

ACKNOWLEDGEMENTS

Anne Perdrix and Albanne Travers performed experiments. Nathalie Rives designed the research study. Anne Perdrix and Florian Clatot analysed the data. Louis Sibert, Valérie Mitchell,

Fanny Jumeau and Bertrand Macé recruited patients, participated in design of the study and revised the manuscript critically. Anne Perdrix and Nathalie Rives wrote the article.

The authors wish to thank Julien Dutheil, staff member at Max-Planck Institute for Terrestrial Microbiology, junior researcher in the Institute of Evolutionary Sciences of Montpellier (ISE-M, UMR 5554), who performed statistical analysis.

REFERENCES

- Agarwal A & Said TM. (2003) Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 9, 331–345.
- Akl LD, Oliveira JB, Petersen CG, Mauri AL, Silva LF, Massaro FC, Baruffi RL, Cavagna M & Franco JG Jr. (2011) Efficacy of the motile sperm organelle morphology examination (MSOME) in predicting pregnancy after intrauterine insemination. *Reprod Biol Endocrinol* 9, 120.
- de Almeida Ferreira Braga DP, Setti AS, Figueira RC, Nichi M, Martinhago CD, Iaconelli A Jr & Borges E Jr. (2011) Sperm organelle morphologic abnormalities: contributing factors and effects on intracytoplasmic sperm injection cycles outcomes. *Urology* 78, 786–791.
- Auger J, Eustache F, Andersen AG, Irvine DS, Jorgensen N, Skakkebaek NE, Suominen J, Toppari J, Vierula M & Jouannet P. (2001) Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical

- history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Hum Reprod* 16, 2710–2717.
- Barratt CL, Aitken RJ, Bjornndahl L, Carrell DT, de Boer P, Kvist U *et al.* (2010) Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications – a position report. *Hum Reprod* 25, 824–838.
- Bartoov B, Berkovitz A & Eltes F. (2001) Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection. *N Engl J Med* 345, 1067–1068.
- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezes Y & Barak Y. (2002) Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl* 23, 1–8.
- Berkovitz A, Eltes F, Ellenbogen A, Peer S, Feldberg D & Bartoov B. (2006a) Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? *Hum Reprod* 21, 1787–1790.
- Berkovitz A, Eltes F, Lederman H, Peer S, Ellenbogen A, Feldberg B & Bartoov B. (2006b) How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection. *Reprod Biomed Online* 12, 634–638.
- Boitrelle F, Ferfourri F, Petit JM, Segretain D, Tourain C, Bergere M, Bailly M, Vialard F, Albert M & Selva J. (2011) Large human sperm vacuoles observed in motile spermatozoa under high magnification: nuclear thumbprints linked to failure of chromatin condensation. *Hum Reprod* 26, 1650–1658.
- Calogero AE, De Palma A, Grazioso C, Barone N, Burello N, Palermo I, Gulisano A, Pafumi C & D'Agata R. (2001) High sperm aneuploidy rate in unselected infertile patients and its relationship with intracytoplasmic sperm injection outcome. *Hum Reprod* 16, 1433–1439.
- Cassuto NG, Bouret D, Plouchart JM, Jellad S, Vanderzwalmen P, Balet R, Larue I & Barak Y. (2009) A new real-time morphology classification for human spermatozoa: a link for fertilization and improved embryo quality. *Fertil Steril* 92, 1616–1625.
- Cassuto NG, Le Foll N, Chantot-Bastarud S, Balet R, Bouret D, Rouen A, Bhourri R, Hyon C & Siffroi JP. (2011) Sperm fluorescence in situ hybridization study in nine men carrying a Robertsonian or a reciprocal translocation: relationship between segregation modes and high-magnification sperm morphology examination. *Fertil Steril* 96, 826–832.
- Cassuto NG, Hazout A, Hammoud I, Balet R, Bouret D, Barak Y, Jellad S, Plouchart JM, Selva J & Yazbeck C. (2012) Correlation between DNA defect and sperm-head morphology. *Reprod Biomed Online* 24, 211–218.
- Celik-Ozenci C, Catalanotti J, Jakab A, Aksu C, Ward D, Bray-Ward P, Demir R & Huszar G. (2003) Human sperm maintain their shape following decondensation and denaturation for fluorescent in situ hybridization: shape analysis and objective morphometry. *Biol Reprod* 69, 1347–1355.
- Chelli MH, Albert M, Ray PF, Guthauser B, Izard V, Hammoud I, Selva J & Vialard F. (2010) Can intracytoplasmic morphologically selected sperm injection be used to select normal-sized sperm heads in infertile patients with macrocephalic sperm head syndrome? *Fertil Steril* 93, 1347. e1–e5.
- Claussen U. (2005) Chromosomics. *Cytogenet Genome Res* 111, 101–106.
- Cremer T & Cremer M. (2010) Chromosome territories. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003889.
- Cremer T, Kupper K, Dietzel S & Fakan S. (2004) Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function. *Biol Cell* 96, 555–567.
- Erenpreiss J, Spano M, Erenpreiss J, Bungum M & Gwercman A. (2006) Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl* 8, 11–29.
- Figueira Rde C, Braga DP, Setti AS, Iaconelli A Jr & Borges E Jr. (2011) Morphological nuclear integrity of sperm cells is associated with preimplantation genetic aneuploidy screening cycle outcomes. *Fertil Steril* 95, 990–993.
- Finch KA, Fonseka KG, Abogrein A, Ioannou D, Handyside AH, Thornhill AR, Hickson N & Griffin DK. (2008) Nuclear organization in human sperm: preliminary evidence for altered sex chromosome centromere position in infertile males. *Hum Reprod* 23, 1263–1270.
- Foster HA & Bridger JM. (2005) The genome and the nucleus: a marriage made by evolution. *Genome organisation and nuclear architecture. Chromosoma* 114, 212–229.
- Foster HA, Abeydeera LR, Griffin DK & Bridger JM. (2005) Non-random chromosome positioning in mammalian sperm nuclei, with migration of the sex chromosomes during late spermatogenesis. *J Cell Sci* 118, 1811–1820.
- Franco JG Jr, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB & Vagnini L. (2008) Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. *Reprod Biomed Online* 17, 42–45.
- Franco JG Jr, Mauri AL, Petersen CG, Massaro FC, Silva LF, Felipe V *et al.* (2012) Large nuclear vacuoles are indicative of abnormal chromatin packaging in human spermatozoa. *Int J Androl* 35, 46–51.
- Garolla A, Fortini D, Menegazzo M, De Toni L, Nicoletti V, Moretti A, Selice R, Engl B & Foresta C. (2008) High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. *Reprod Biomed Online* 17, 610–616.
- Gurevitch M, Amiel A, Ben-Zion M, Fejgin M & Bartoov B. (2001) Acrocentric centromere organization within the chromocenter of the human sperm nucleus. *Mol Reprod Dev* 60, 507–516.
- Haaf T & Ward DC. (1995) Higher order nuclear structure in mammalian sperm revealed by in situ hybridization and extended chromatin fibers. *Exp Cell Res* 219, 604–611.
- Harkonen K, Suominen J & Lahdetie J. (2001) Aneuploidy in spermatozoa of infertile men with teratozoospermia. *Int J Androl* 24, 197–205.
- Hazout A, Dumont-Hassan M, Junca AM, Cohen Bacrie P & Tesarik J. (2006) High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI. *Reprod Biomed Online* 12, 19–25.
- Hazzouri M, Rousseaux S, Mongelard F, Usson Y, Pelletier R, Faure AK, Vourc'h C & Sele B. (2000) Genome organization in the human sperm nucleus studied by FISH and confocal microscopy. *Mol Reprod Dev* 55, 307–315.
- Ioannou D, Meershoek EJ, Christopikou D, Ellis M, Thornhill AR & Griffin DK. (2011) Nuclear organisation of sperm remains remarkably unaffected in the presence of defective spermatogenesis. *Chromosome Res* 19, 741–753.
- Lewis SE. (2007) Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction* 134, 31–40.
- Luetjens CM, Payne C & Schatten G. (1999) Non-random chromosome positioning in human sperm and sex chromosome anomalies following intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 353, 1240.
- Machev N, Gosset P & Viville S. (2005) Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: teratozoospermia. *Cytogenet Genome Res* 111, 352–357.
- Manvelyan M, Hunstig F, Bhatt S, Mrasek K, Pellester F, Weise A, Simonyan I, Aroutiounian R & Liehr T. (2008) Chromosome distribution in human sperm – a 3D multicolor banding-study. *Mol Cytogenet* 1, 25.
- Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB, Massaro FC, Baruffi RL & Franco JG Jr. (2010) Comparison of day 2 embryo quality after conventional ICSI versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) using sibling oocytes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 150, 42–46.
- Milazzo JP, Rives N, Mousset-Simeon N & Mace B. (2006) Chromosome constitution and apoptosis of immature germ cells present in sperm of two 47,XXX infertile males. *Hum Reprod* 21, 1749–1758.
- Mudrak O, Tomilin N & Zalensky A. (2005) Chromosome architecture in the decondensing human sperm nucleus. *J Cell Sci* 118, 4541–4550.

- Mundy AJ, Ryder TA & Edmonds DK. (1994) A quantitative study of sperm head ultrastructure in subfertile males with excess sperm precursors. *Fertil Steril* 61, 751–754.
- Oliveira R. (2006) Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 12, 417–435.
- Oliveira JB, Massaro FC, Mauri AL, Petersen CG, Nicoletti AP, Baruffi RL & Franco JG Jr. (2009) Motile sperm organelle morphology examination is stricter than Tygerberg criteria. *Reprod Biomed Online* 18, 320–326.
- Oliveira JB, Massaro FC, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Silva LF, Vagnini LD & Franco JG Jr. (2010) Correlation between semen analysis by motile sperm organelle morphology examination and sperm DNA damage. *Fertil Steril* 94, 1937–1940.
- Oliveira JB, Cavagna M, Petersen CG, Mauri AL, Massaro FC, Silva LF, Baruffi RL & Franco JG Jr. (2011) Pregnancy outcomes in women with repeated implantation failures after intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI). *Reprod Biol Endocrinol* 9, 99.
- Olszewska M, Wiland E & Kurpisz M. (2008) Positioning of chromosome 15, 18, X and Y centromeres in sperm cells of fertile individuals and infertile patients with increased level of aneuploidy. *Chromosome Res* 16, 875–890.
- Peer S, Eltes F, Berkovitz A, Yehuda R, Itsykson P & Bartoov B. (2007) Is fine morphology of the human sperm nuclei affected by in vitro incubation at 37 degrees C? *Fertil Steril* 88, 1589–1594.
- Perdrix A, Travers A, Chelli MH, Escalier D, Do Rego JL, Milazzo JP, Mousset-Simeon N, Mace B & Rives N. (2011) Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles. *Hum Reprod* 26, 47–58.
- Perdrix A, Saïdi R, Menard JF, Gruel E, Milazzo JP, Mace B & Rives N. (2012) Relationship between conventional sperm parameters and motile sperm organelle morphology examination (MSOME). *Int J Androl* 35, 491–498.
- Rives N, Saint Clair A, Mazurier S, Sibert L, Simeon N, Joly G & Mace B. (1999) Relationship between clinical phenotype, semen parameters and aneuploidy frequency in sperm nuclei of 50 infertile males. *Hum Genet* 105, 266–272.
- Saïdi R, Rives N, Gruel E, Mazurier S, Mousset-Siméon N & Macé B. (2008) High magnification spermatozoa morphology evaluation. *Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie* 10, 315–324.
- Sbracia M, Baldi M, Cao D, Sandrelli A, Chiandetti A, Poverini R & Aragona C. (2002) Preferential location of sex chromosomes, their aneuploidy in human sperm, and their role in determining sex chromosome aneuploidy in embryos after ICSI. *Hum Reprod* 17, 320–324.
- Sermondade N, Vialard F, Bergere M, Hammoud I, Cavelot P, Selva J & Albert M. (2007) Evaluation de l'apport de la méthode d'observation des spermatozoïdes à fort grossissement en ICSI. *Andrologie* 17, 212–221.
- Silva LF, Oliveira JB, Petersen CG, Mauri AL, Massaro FC, Cavagna M, Baruffi RL & Franco JG Jr. (2012) The effects of male age on sperm analysis by motile sperm organelle morphology examination (MSOME). *Reprod Biol Endocrinol* 10, 19.
- Tempest HG & Griffin DK. (2004) The relationship between male infertility and increased levels of sperm disomy. *Cytogenet Genome Res* 107, 83–94.
- Terada Y, Luetjens CM, Sutovsky P & Schatten G. (2000) Atypical decondensation of the sperm nucleus, delayed replication of the male genome, and sex chromosome positioning following intracytoplasmic human sperm injection (ICSI) into golden hamster eggs: does ICSI itself introduce chromosomal anomalies? *Fertil Steril* 74, 454–460.
- Tilgen N, Guttenbach M & Schmid M. (2001) Heterochromatin is not an adequate explanation for close proximity of interphase chromosomes 1–Y, 9–Y, and 16–Y in human spermatozoa. *Exp Cell Res* 265, 283–287.
- Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P, Bach M, Neyer A, Stecher A et al. (2008) Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reprod Biomed Online* 17, 617–627.
- Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, Liebaers I & Van Steirteghem A. (2000) Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod* 15, 351–365.
- Ward WS. (1993) Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol Reprod* 48, 1193–1201.
- Ward WS & Coffey DS. (1991) DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 44, 569–574.
- Watanabe S, Tanaka A, Fujii S, Mizunuma H, Fukui A, Fukuhara R et al. (2011) An investigation of the potential effect of vacuoles in human sperm on DNA damage using a chromosome assay and the TUNEL assay. *Hum Reprod* 26, 978–986.
- Wiland E, Zegalo M & Kurpisz M. (2008) Interindividual differences and alterations in the topology of chromosomes in human sperm nuclei of fertile donors and carriers of reciprocal translocations. *Chromosome Res* 16, 291–305.
- World Health Organization. (2010) *Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. WHO Press, Geneva, Switzerland.
- Zalenskaya IA & Zalensky AO. (2004) Non-random positioning of chromosomes in human sperm nuclei. *Chromosome Res* 12, 163–173.
- Zalensky A & Zalenskaya I. (2007) Organization of chromosomes in spermatozoa: an additional layer of epigenetic information? *Biochem Soc Trans* 35, 609–611.
- Zalensky AO, Allen MJ, Kobayashi A, Zalenskaya IA, Balhorn R & Bradbury EM. (1995) Well-defined genome architecture in the human sperm nucleus. *Chromosoma* 103, 577–590.
- Zamboni L. (1987) The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility: the role of electron microscopy in the evaluation of semen quality. *Fertil Steril* 48, 711–734.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



Revue générale

Asthénozoospermie sévère à vitalité normale et ICSI[☆]

ICSI treatment in severe asthenozoospermia[☆]

V. Mitchell^{a,b,*}, J. Sigala^b, F. Jumeau^a, C. Ballot^b, M.C. Peers^b, C. Decanter^c, N. Rives^{a,d}, A. Perdrix^{a,d}, J.-M. Rigot^{a,e}, D. Escalier^f

^a EA4308 gamétogenèse et qualité du gamète, 59037 Lille cedex, France

^b Institut de biologie de la reproduction-spermiologie-CECOS, hôpital Jeanne-de-Flandre, CHRU, 59037 Lille cedex, France

^c Médecine de la reproduction, hôpital Jeanne-de-Flandre, CHRU, 59037 Lille cedex, France

^d Biologie de la reproduction-CECOS, hôpital Charles-Nicolas, CHU, 76031 Rouen cedex, France

^e Andrologie, hôpital A.-Calmette, CHRU, 59037 Lille cedex, France

^f Inserm U933, hôpital Armand-Trousseau, université Pierre-et-Marie-Curie, 26, avenue du Docteur-Arnold-Netter, 75012 Paris, France

INFO ARTICLE

Historique de l'article :
 Reçu le 13 juin 2012
 Accepté le 10 octobre 2012
 Disponible sur Internet le xxx

Mots clés :
 Asthénozoospermie
 AMP
 Microscopie électronique à transmission

Keywords:
 Asthenozoospermia
 ART
 Sperm ultrastructure

RÉSUMÉ

L'ICSI permet à des patients infertiles de devenir pères avec leurs propres gamètes malgré des pathologies spermatiques sévères. Dans l'asthénozoospermie sévère, la distinction entre nécrospermie et vitalité des spermatozoïdes, l'identification et la quantification des anomalies spermatiques au spermocytogramme courant occupent une place diagnostique importante en amont de la prise en charge en AMP. Dans l'asthénozoospermie, le tableau et les antécédents cliniques ainsi que les paramètres du spermogramme-spermocytogramme orientent l'étude ultrastructurale des spermatozoïdes. Devant une infertilité primaire sans contexte génital masculin et féminin, une concentration spermatique normale, une asthénozoospermie sévère, inexpliquée, persistante et irréversible, une vitalité spermatique supérieure à 50 % et un défaut de migration des spermatozoïdes dans le mucus cervical, une analyse des spermatozoïdes en microscopie électronique pourra être discutée en commission multidisciplinaire. Les altérations flagellaires ultrastructurales, susceptibles d'affecter au moins une structure flagellaire dans la plupart des spermatozoïdes, sont diverses. En ICSI, des dysfonctionnements allant de la paucifécondation à l'échec de fécondation sont observés dans certaines altérations morphologiques spécifiques axonémales et/ou péri-axonémales. Dans ce contexte d'asthénozoospermie sévère, l'ICSI permet des grossesses mais il demeure important d'en poser les indications et le périmètre.

© 2012 Publié par Elsevier Masson SAS.

ABSTRACT

In the management of asthenozoospermia, the spermogram-spermocytogram plays an important role during diagnosis. It is of major importance to distinguish between necrospermia and sperm vitality. An ultrastructural study of spermatozoa is processed in the case of primary infertility without female implication, severe, unexplained and irreversible asthenozoospermia, sperm vitality at least 50 % and normal concentration of spermatozoa. Ultrastructural flagellar abnormalities are numerous and involve most spermatozoa. ICSI provides a suitable solution for patients with sperm flagellar defects to conceive children with their own gametes but the rate of ICSI success may be influenced by the type of flagellar abnormality. Some fertilization and birth rate failures which are related to some flagellar abnormalities might occur.

© 2012 Published by Elsevier Masson SAS.

1. Introduction

L'asthénozoospermie sévère caractérisée par une diminution voire une absence de mobilité des spermatozoïdes éjaculés est une cause fréquente d'infertilité. La mobilité des spermatozoïdes est acquise durant le transit épидidymaire. Le mouvement

[☆] Cet article a fait l'objet d'une communication présentée dans le cadre des 17^{es} Journées nationales de la Fédération française d'étude de la reproduction, à Paris, les 19-21 septembre 2012, publiées dans *Gynecol Obstet Fertil* 2012;40:465-523.

* Auteur correspondant.
 Adresse e-mail : valerie.mitchell@chru-lille.fr (V. Mitchell).

spermatique est important pour la migration du vagin vers les trompes de Fallope, pour la pénétration dans le cumulus oophorus et pour les processus impliqués dans la fécondation. Ainsi, il existe une association entre la mobilité spermatique et les chances de concevoir naturellement [1].

Depuis l'introduction de l'ICSI en 1992 [2], les couples présentant des facteurs d'infertilité masculine sévères peuvent obtenir une grossesse. Cependant, l'injection de spermatozoïdes peu mobiles a un impact négatif sur le taux de succès de fécondation et de grossesse [3]. Une étude chez une cohorte d'hommes présentant une asthénospermie sévère avec des anomalies flagellaires identifiées en microscopie électronique a montré que l'issue de l'ICSI utilisant les spermatozoïdes éjaculés peut être influencée par le phénotype flagellaire [4].

L'asthénospermie sévère peut être expliquée soit par la présence d'altérations flagellaires d'origine génétique ou congénitale avec des spermatozoïdes viables mais immobiles, soit par une nécrozoospermie secondaire à des infections génitales, au stress oxydatif, à la présence d'anticorps antispermatozoïdes [5], d'altérations de la production d'ATP [6], d'une exposition toxique [7], d'anomalies du transport épидидymaire des spermatozoïdes [8], ou d'une anéjaculation.

Cet article a pour objectif de faire le point sur la prise en charge diagnostique et thérapeutique de populations présentant une asthénospermie sévère idiopathique caractérisée par la présence d'anomalies flagellaires ultrastructurales. Nous discuterons dans ce contexte de la place du spermogramme-spermocytogramme courant, des indications de l'analyse morphologique des spermatozoïdes, et des résultats de l'ICSI. La place d'indicateurs de la qualité spermatique et nucléaire dans cette exploration sera abordée.

2. Spermogramme-spermocytogramme dans l'asthénospermie sévère

Le spermogramme-spermocytogramme occupe une place importante dans la prise en charge de l'asthénospermie sévère. Dans ce contexte, la concentration spermatique est en général normale, l'absence de mouvement peut être complète ou partielle, persistante ou non. Les récentes recommandations de l'Organisation mondiale de la santé prennent en compte la somme des mobilités progressive et peu progressive « a + b » des spermatozoïdes [9]. Il est important dans le contexte de l'asthénospermie sévère de distinguer quantitativement et qualitativement les mobilités progressive « a » et peu progressive « b ». En effet, il n'est pas rare d'observer une absence de mobilité progressive alors que la mobilité peu progressive est conservée. Dans l'évaluation, il est également important de distinguer l'asthénospermie vraie, non améliorée par les méthodes de sélection (centrifugation-gradient de densité, swim-up) de l'asthénospermie virtuelle.

Le cadre diagnostique et étiologique de la nécrozoospermie est tout autre et il convient de l'identifier par des tests de vitalité des spermatozoïdes : tests conjoints à l'éosine et à l'éosine-nigrosine. Les spermatozoïdes vivants excluent le colorant et apparaissent blancs ou très légèrement rosés [9]. La nigrosine permet d'augmenter le contraste entre le fond et les spermatozoïdes facilitant ainsi la distinction entre les spermatozoïdes vivants et morts.

Malgré ses limites de grossissement ($\times 1000$), le spermocytogramme courant est un complément diagnostique indispensable car l'asthénospermie sévère s'accompagne volontiers d'une tératozoospermie. L'utilisation de la grille de lecture de David modifiée [10], fondée sur l'examen détaillé du spermatozoïde, permet de détecter les anomalies de la tête, de la pièce intermédiaire et du flagelle. Dans ces situations d'asthénospermie sévère, certaines altérations ultrastructurales flagellaires

sont associées à des anomalies de la longueur et du calibre du flagelle en microscopie optique [11,12]. La dysplasie de la gaine fibreuse est visible à l'examen des spermatozoïdes en microscopie optique et se manifeste par la présence de flagelles courts, épais et de calibre irrégulier. Ces observations reflètent probablement un défaut de croissance flagellaire pendant la maturation spermatique. À côté des anomalies de la pièce intermédiaire et du flagelle, il est fréquent d'observer des anomalies de l'acrosome et de la base céphalique en microscopie optique. Le spermogramme et le spermocytogramme sont des partenaires importants à l'étude en microscopie électronique des pathologies flagellaires.

3. Indications de l'analyse des spermatozoïdes en microscopie électronique

L'asthénospermie isolée n'est pas à elle-seule une indication de la prise en charge de l'analyse des spermatozoïdes en microscopie électronique. Elle est discutée devant un faisceau d'observations clinico-biologiques. Sans définir véritablement de seuil, l'asthénospermie doit présenter un caractère inexplicable, persistant et irréversible au travers d'au moins deux spermogrammes. Les méthodes de sélection sur gradient de macromolécules et swim-up n'améliorent pas la mobilité spermatique. Le contexte est celui d'une infertilité primaire avec paramètres spermatiques non fluctuants, défaut de migration des spermatozoïdes dans le mucus cervical, et vitalité spermatique égale ou supérieure à 50 %. Lors de la consultation andrologique, les causes acquises d'altération de la spermatogenèse seront également écartées dans ce contexte (infection génitale, anticorps antispermatozoïdes, toxiques, varicocèle, anéjaculation...). Si ces indications sont peu fréquentes, elles imposent la vigilance car elles ne sont cependant pas rares dans le quotidien du centre d'AMP.

Le coût de cette étude et le nombre de centres expérimentés suggèrent de réserver cette analyse à des cas spécifiques pour lesquels on suspecte des altérations morphologiques spécifiques et monomorphes.

4. Altérations flagellaires en microscopie électronique à transmission dans l'asthénospermie sévère

Compte tenu de la complexité des structures impliquées dans le mouvement du spermatozoïde, les phénotypes pathologiques décrits sont identifiés en fonction de l'anomalie qui prédomine [4,13–17]. Les phénotypes anormaux retenus sont ceux qui affectent au moins une structure flagellaire dans la plupart des spermatozoïdes.

4.1. Altérations des structures axonémales

Des malformations de tous les composants de l'axonème flagellaire ont été décrites. Les altérations axonémales spécifiques concernent l'absence des bras de dynéine conduisant à une asthénospermie totale. Les patients qui présentent un *situs inversus*, des bronchectasies et sinusites sont regroupés sous le syndrome de Kartagener. La complète absence de l'axonème est une autre situation rare et ne s'accompagne généralement pas d'altérations péri-axonémales. D'autres phénotypes compatibles avec la présence d'une mobilité résiduelle des spermatozoïdes sont observés et appartiennent au large groupe des dyskinésies flagellaires. Ils correspondent à une absence partielle des bras de dynéine ou des microtubules centraux. Lorsque ces altérations affectent tous les spermatozoïdes, une origine génétique peut être suspectée, en particulier dans les cas familiaux et lorsqu'il existe une consanguinité des ascendants. Cependant, la diversité des manifestations des dyskinésies flagellaires rend compte d'une probable hétérogénéité génétique.

À côté de ces altérations spécifiques et homogènes, des anomalies axonémales hétérogènes peuvent affecter une proportion variable des spermatozoïdes, chez les patients présentant une asthénospermie isolée. Les anomalies les plus couramment observées sont des altérations du nombre et de l'arrangement des doublets de microtubules ou des fibres denses. Dans de nombreux cas, il n'est pas retrouvé de causes à ces anomalies et la présence de cas familiaux exclut qu'il s'agisse de phénotypes acquis. Ces phénotypes sont plus fréquemment observés que ceux objectivant l'absence des bras de dynéine ou de microtubules centraux.

4.2. Altérations péri-axonémales

Les altérations péri-axonémales concernent la dysplasie ou l'absence de la gaine fibreuse, les altérations de la gaine mitochondriale ou des fibres denses. La dysplasie de la gaine fibreuse fait partie des anomalies flagellaires primitives qui constituent une vaste entité liée à diverses anomalies de structure du flagelle. Un certain nombre de ces patients présente des pathologies respiratoires avec des anomalies axonémales ciliaires associées. L'absence totale de la gaine fibreuse est une condition très rare [18] et associe une pièce intermédiaire anormale pour la totalité des spermatozoïdes. Un désordre d'orientation/forme voire une absence de la gaine mitochondriale s'accompagnent d'une asthénospermie. Les altérations péri-axonémales associent volontiers un défaut d'assemblage d'autres constituants flagellaires (structures centrales, doublets périphériques) et des altérations du noyau et de l'acrosome [4,14,19,20]. Les structures péri-axonémales sont plus volontiers normales dans le contexte d'altérations de l'axonème. Des malformations de l'ancrage tête-flagelle avec flagelles isolés et immobiles ont été observées [21,22]. Plus rarement, une absence de l'annulus à la jonction des pièces intermédiaires et principales a été mise en évidence chez des sujets infertiles présentant une asthénospermie modérée [23].

Au total, les altérations des structures flagellaires dans l'asthénospermie sévère idiopathique sont diverses et complexes. La majorité des malformations flagellaires entraîne également des altérations des autres structures flagellaires et des constituants de la tête. La diversité des phénotypes d'altération flagellaire conduit à recommander une estimation quantitative des anomalies des spermatozoïdes en microscopie électronique dans l'asthénospermie sévère.

5. Résultats de l'ICSI dans l'asthénospermie sévère à vitalité normale

Lorsqu'une asthénospermie sévère est diagnostiquée, la procréation par ICSI est la seule ressource possible au traitement de l'infertilité. Son indication est posée en concertation multidisciplinaire. En amont de cette prise en charge, il reste nécessaire d'identifier l'origine de l'asthénospermie. Certaines altérations flagellaires spécifiques observées dans des cas familiaux et de consanguinité pourraient avoir une origine génétique [24]. Certaines malformations flagellaires sont également retrouvées au niveau des cils. Ainsi, une attention particulière est portée sur les atteintes bronchopulmonaires des patients asthénospermes. Dans l'état actuel des connaissances, la plupart des gènes impliqués dans les dyskinésies ciliaires code pour des protéines constitutives des structures axonémales des cils (DNAI1, DNAH5, DNA12, TXNDC3, DNALI). Cependant, l'origine génétique est suspectée mais rarement prouvée. Le caractère probablement récessif de ces mutations amène exceptionnellement à renoncer à une prise en charge de l'infertilité en ICSI.

Plusieurs études rapportent les résultats d'ICSI chez des patients présentant une asthénospermie sévère caractérisée

par des altérations axonémales et/ou péri-axonémales des spermatozoïdes. Ces études sont limitées par des petites cohortes qui rendent compte de la faible fréquence de ces pathologies. Deux séries un peu plus importantes de 21 et 20 patients sont rapportées [4,25]. Dans ces études, certains phénotypes sont rares ce qui ne permet pas de conclure. Néanmoins, les taux de fécondation, de grossesses cliniques et d'accouchement semblent varier selon le phénotype flagellaire. Le taux de fécondation pour la plupart des patients est cependant supérieur à 50 % malgré des altérations flagellaires dans la plupart des spermatozoïdes. Le taux de grossesse de cette série (23 %) est comparable à celui des ICSI dans l'oligospermie. Il semble cependant que les couples dont l'homme présente un phénotype axonémal « 9+0 » spécifique aient des chances plus réduites de concevoir que dans les autres phénotypes flagellaires alors que le taux de naissances par cycle est plus élevé chez les patients présentant des anomalies axonémales hétérogènes. L'injection de spermatozoïdes mobiles dans l'ovocyte est un facteur discriminant des chances de procréation en ICSI [26], en particulier dans le cadre des altérations flagellaires dans l'asthénospermie sévère à vitalité normale [4]. En effet, en deçà de 5 % de spermatozoïdes mobiles progressifs, les taux de grossesse clinique sont significativement diminués (11,11 vs 40,97 %, $p = 0,04$) [4]. Le recours à un test de vitalité (test hypoosmotique ou pentoxifyline) des spermatozoïdes en ICSI pourra également être utilisé dans le cas d'une asthénospermie absolue lorsqu'on suspecte une nécrozoospermie [27].

À côté de la mobilité spermatique, la morphologie des spermatozoïdes au spermocytogramme courant pourrait également venir en support de ces observations. Les anomalies de l'acrosome, de la pièce intermédiaire et du flagelle sont observées et associées à l'absence des bras de dynéine et des doublets centraux et à un faible taux de fécondation en ICSI.

L'ICSI permet à des patients infertiles de devenir pères avec leurs propres gamètes malgré des déficiences spermatiques sévères. Dans les pathologies flagellaires, des dysfonctionnements apparaissent allant de l'échec de fécondation ou paucifécondation et absence de naissance [4,25] et le projet parental de ces couples peut ne pas se concrétiser. Certains de ces couples se dirigeront alors vers le don de sperme.

6. Asthénospermie sévère et qualité nucléaire des spermatozoïdes

Les pathologies flagellaires s'accompagnent généralement d'altérations des constituants céphaliques des spermatozoïdes. Une chromatine mal condensée, des vacuoles nucléaires et un acrosome malformé ou absent sont fréquemment observés. Chez les patients asthénospermes, la proportion de spermatozoïdes avec un ADN fragmenté est majorée [28-35]. De nombreuses études rapportent l'existence d'un lien entre le taux de fragmentation de l'ADN et les taux d'implantation et de grossesse en ICSI [36] avec un risque augmenté de fausses couches [37]. Les anomalies flagellaires semblent être associées également à des anomalies chromosomiques des spermatozoïdes conduisant à des échecs d'ICSI, en particulier dans la dysplasie de la gaine fibreuse [38-41]. La présence de vacuoles céphaliques peut être reliée à des altérations de l'ADN (fragmentation/décondensation) ayant pour conséquence des défauts de développement embryonnaire [42]. Dans l'asthénospermie sévère avec anomalies morphologiques spécifiques des spermatozoïdes, l'analyse par FISH, l'étude de la fragmentation de l'ADN et la sélection des spermatozoïdes au fort grossissement (IMSI) avant l'AMP pourraient contribuer à augmenter les taux d'implantation et de grossesse mais sont des volets restant à explorer.

7. Conclusion

Les asthénozoospermies sévères correspondent à des entités morphologiques et physiopathologiques diverses qui posent un réel problème d'infertilité, irréversible dans la plupart des cas. Elles sont le quotidien des biologistes et cliniciens de la reproduction et le déploiement de plusieurs outils diagnostiques représente un apport considérable dans la prise en charge en amont de l'ICSI. Nous commençons seulement à entrevoir la dimension génétique de ces entités et le retentissement de certaines altérations flagellaires sur les résultats de l'ICSI. Sans accentuer leur angoisse, la nécessité est d'informer les patients des risques d'échec de fécondation et des arrêts précoces du développement embryonnaire. Si l'ICSI permet des grossesses avec les spermatozoïdes présentant des pathologies flagellaires, il reste important d'en poser les indications et le périmètre.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Remerciements

Nos travaux sont soutenus par le Programme Hospitalier de Recherche Clinique régional 2009 et le CHRU de Lille.

Références

- Beauchamp PJ, Galle PC, Blasco L. Human sperm velocity and postinsemination cervical mucus test in the evaluation of the infertile couple. *Arch Androl* 1984;13:107–12.
- Palemo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992;340:17–8.
- Liu J, Nagy Z, Joris H, Tournaye H, Smitz J, Camus M, et al. Analysis of 76 total fertilization failure cycles out of 2732 intracytoplasmic sperm injection cycles. *Hum Reprod* 1995;10:2630–6.
- Mitchell V, Rives N, Albert M, Peers MC, Selva J, Clavier B, et al. Outcome of ICSI with ejaculated spermatozoa in a series of men with distinct ultrastructural flagellum anomalies. *Hum Reprod* 2006;21:2065–74.
- Lee R, Goldstein M, Ullery BW, Ehrlich J, Soares M, Razzano RA, et al. Value of serum antisperm antibodies in diagnosing obstructive azoospermia. *J Urol* 2009;181:264–9.
- Folgerø T, Bertheussen K, Lindal S, Torbergsen T, Oian P. Mitochondrial disease and reduced sperm motility. *Hum Reprod* 1993;8:1863–8.
- Hauser R, Sokol R. Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult male. *Fertil Steril* 2008;89:e59–65.
- Wilton LJ, Temple-Smith PD, Baker HW, de Kretser DM. Human male infertility caused by degeneration and death of sperm in the epididymis. *Fertil Steril* 1988;49:1052–8.
- World Health Organisation. Laboratory Manual for the Examination and processing of Human Semen, 5th ed. Geneva: World Health Organization 2010.
- Auger J, Eustache F. Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. *Andrologie* 2000;10:358–73.
- Feneux D, Serres C, Jouannet P. Sliding spermatozoa: a dyskinesia responsible for human infertility? *Fertil Steril* 1985;44:508–11.
- Chemes HE, Olmedo SB, Carrere C, Osés R, Carizza C, Leisner M, et al. Ultrastructural pathology of the sperm flagellum: association between flagellar pathology and fertility prognosis in severely asthenozoospermic men. *Hum Reprod* 1998;13:2521–6.
- Afzelius BA, Eliasson R. Flagellum mutants in man: on the heterogeneity of the immotile-cilia syndrome. *J Ultrastr Res* 1979;69:43–52.
- Escalier D, David G. Pathology of the cytoskeleton of the human sperm flagellum: axonemal and peri-axonemal anomalies. *Biol Cell* 1984;50:37–52.
- Escalier D, Serres C. Aberrant distribution of the peri-axonemal structures in the human spermatozoon: possible role of the axoneme in the spatial organization of the flagellar components. *Biol Cell* 1985;53:239–50.
- Baccetti B. Microscopical advances in assisted reproduction. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2004;36:333–9.
- Escalier D, Touré A. Morphological defects of sperm flagellum implicated in human male infertility. *Med Sci (Paris)* 2012;28:503–11.
- Baccetti B, Bruni E, Gambera L, Moretti E, Piomboni P. An ultrastructural and immunocytochemical study of a rare genetic sperm tail defect that causes infertility in humans. *Fertil Steril* 2004;82:463–8.
- Courtade M, Lagorce C, Bujan L, Caratero C, Mieuisset R. Clinical characteristics and light and transmission electron microscopic sperm defects of infertile men with persistent unexplained asthenozoospermia. *Fertil Steril* 1998;70:297–304.
- Mobberley MA. Electron microscopy in the investigation of asthenozoospermia. *Br J Biomed Sci* 2010;67:92–100.
- Holstein AF, Schill WB, Breucker H. Dissociated centriole development as a cause of spermatid malformation in man. *J Reprod Fertil* 1986;78:719–25.
- Baccetti B, Burrini AG, Collodel G, Magnano AR, Piomboni P, Renieri T, et al. Morphogenesis of the decapitated and decaudated sperm defect in two brothers. *Gamete Res* 1989;23:181–8.
- Lhuillier P, Rode B, Escalier D, Lorès P, Dirami T, Bienvenu T, et al. Absence of annulus in human asthenozoospermia: case report. *Hum Reprod* 2009;24:1296–303.
- Baccetti B, Capitani S, Collodel G, Di Cairano G, Gambera L, Moretti E, et al. Genetic sperm defects and consanguinity. *Hum Reprod* 2001;16:1365–71.
- Fauque P, Albert M, Serres C, Viallon V, Davy C, Epelboin S, et al. From ultrastructural flagellum sperm defects to the health of babies conceived by ICSI. *Reprod Biomed Online* 2009;19:326–36.
- Nagy ZP, Verheyen G, Toumaye H, Van Steirteghem AC. Special applications of intracytoplasmic sperm injection: the influence of sperm count, motility, morphology, source and sperm antibody on the outcome of ICSI. *Hum Reprod* 1998;13(Suppl. 1):143–54.
- Ortega C, Verheyen G, Raick D, Camus M, Devroey P, Toumaye H. Absolute asthenozoospermia and ICSI: what are the options? *Hum Reprod Update* 2011;17:684–92.
- Gandini I, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familian G, Verlengia C, et al. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000;15:830–9.
- Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 2001;75:674–7.
- Marchetti C, Obert G, Defoesez A, Formstecher P, Marchetti P. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum Reprod* 2002;17:1257–65.
- Benchabib M, Braun V, Lomage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003;18:1023–8.
- Liu CH, Tsao HM, Cheng TC, Wu HM, Huang CC, Chen CI, et al. DNA fragmentation, mitochondrial dysfunction and chromosomal aneuploidy in the spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic males. *J Assist Reprod Genet* 2004;21:119–26.
- Huang CC, Lin DP, Tsao HM, Cheng TC, Liu CH, Lee MS. Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril* 2005;84:130–40.
- Piasecka M, Gaczarzewicz D, Laszczyńska M, Starczewski A, Brodowska A. Flow cytometry application in the assessment of sperm DNA integrity of men with asthenozoospermia. *Folia Histochem Cytobiol* 2007;45:5127–36.
- Varum S, Bento C, Sousa AP, Gomes-Santos CS, Henriques P, Almeida-Santos T, et al. Characterization of human sperm populations using conventional parameters, surface ubiquitination, and apoptotic markers. *Fertil Steril* 2007;87:572–83.
- Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2008;23:2663–8.
- Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S, et al. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2012;27:2908–17.
- Baccetti B, Collodel G, Gambera L, Moretti E, Serafini F, Piomboni P. Fluorescence in situ hybridization and molecular studies in infertile men with dysplasia of the fibrous sheath. *Fertil Steril* 2005;84:123–9.
- Rives N, Mousset-Simeon N, Mazunier S, Mace B. Primary flagellum abnormality is associated with an increased rate of spermatozoa aneuploidy. *J Androl* 2005;26:61–9.
- Collodel G, Moretti E. Sperm morphology and aneuploidies: defects of supposed genetic origin. *Andrologia* 2006;38:208–15.
- Dada R, Mahfouz RZ, Kumar R, Venkatesh S, Shamsi MB, Agarwal A, et al. A comprehensive work up for an asthenozoospermic man with repeated intracytoplasmic sperm injection (ICSI) failure. *Andrologia* 2011;43:368–72.
- Junca AM, Cohen-Bacrie P, Belloc S, Dumont M, Ménezio Y. Teratozoospermia at the time of intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI). *Gynecol Obstet Fertil* 2009;37:552–7.

Pour citer cet article : Mitchell V, et al. Asthénozoospermie sévère à vitalité normale et ICSI. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.gyobfe.2012.10.003>

Article soumis dans BBA

Tau exon 2 responsive elements deregulated in myotonic dystrophy type I are proximal to exon 2 and synergistically regulated by MBNL1 and MBNL2

C. Carpentier (1,2,3), F-J. Fernandez-Gomez (1,2,3), D. Ghanem (1,2,3), F. Jumeau (1,2,3,4), A. Labudeck (1,2,3,4), C-M. Dhaenens (1,2,3), B. Sablonnière (1,2,3), I. Behm-Ansmant (5), N. Gourier (5), C. Branlant (5), N. Charlet-Berguerand (5), J. Marie (5), S. Schraen-Maschke (1,2,3), L. Buée (1,2), N. Sergeant (1,2,3) & M-L. Caillet-Boudin (1,2,3)

1. Inserm UMR837-1, Alzheimer & Tauopathies, F-59045 Lille, France

2. Université Lille Nord de France, F-59000 Lille, France

3. UDSL, Jean-Pierre Aubert Research Center, F-59045 Lille cedex

4. University regional hospital of Lille, France.

5. Laboratoire ARN-RNP structure-fonction-maturation, Enzymologie Moléculaire et Structurale (AREMS), Nancy Université-CNRS, UMR 7214, FR 3209, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France.

Corresponding authors:

Nicolas.sergeant@inserm.fr &

Marie-laure.caillet-boudin@inserm.fr

Inserm UMR 837

Alzheimer & Tauopathies

Univ. Lille Nord de France, CHRU Lille, IMPRT

1, place de Verdun

59045 Lille

France

Keywords: myotonic dystrophy, Tauopathies, splicing, muscleblind-like protein, microtubule-associated protein Tau

Abstract

Alternative splicing contributes to the proteome diversity. Its modification is associated with a growing number of neurological diseases. Alternative splicing of exon 2, 3 and 10 generates 6 human brain microtubule-associated protein Tau isoforms. Tau exon 2 and 10 skipping is abnormally enhanced in myotonic dystrophy of type 1 (DM1), precluding the six isoforms expression. This modified expression pattern is associated to a progressive process of neurofibrillary degeneration in the adult brain of DM1 individuals. DM1 is a multisystemic genetic disease with an unstable CTG-repeat expansion which transcript is responsible for a RNA gain-of-toxic functions. However, the basic mechanism leading to Tau mis-splicing remains unknown. Based on our previous results, we focused our analysis on splicing factors of the MBNL family, which are instrumental to DM1 physiopathology and potential Tau splicing regulatory factors. We further investigated the mechanism of action of MBNL1 and 2 using newly developed hTau minigenes containing Tau constitutive exons 1 and 4 in between which Tau exon 2 surrounded by intronic sequences of different lengths was inserted. Potential MBNL binding sites were determined using SpliceAid and minigenes were mutated at those sites. MBNL1 or 2 splicing factors, minigenes and DM1 mutation (DT960) were transiently over-expressed in T98G cells. Tau exon 2 splicing was analyzed by RT-PCR. In WT minigene, MBNL1 favored Tau exon 2 inclusion, which activity was not modulated by DM1 mutation. In Tau mutated minigene, MBNL1 action on Tau exon 2 was abolished. In contrast, MBNL2 had no regulatory activity on Tau splicing whereas it could counteract the DM1 mutation effect. A result comforted using the mutated Tau minigene. Our study suggests that MBNL1 and 2 have different splicing regulatory function but can act synergistically on Tau exon 2 in physiological and pathological conditions.

COMMUNICATIONS ORALES

5^{ème} journée des doctorants du JPARC, 27 mars 2013, Lille, France

	5th Ph.D. Student Day 27 March 2013
Abstract n° (à remplir par les organisateurs)	
Authors : F. Jumeau (1,2), F.J. Fernandez-Gomez (2), C. Carpentier (2), H. Obriot, (2) S. Eddarkaoui (2), S. Duban-Deweere (3), J. Hachani (3), F. Halgand (4), F. Chalmel (4), S. Chocu (4), CM. Dhaenens (2), ML. Caillet-Boudin (2), JM. Rigot (1), MC. Peers (1), C. Pineau (4), L. Buée (2), N. Sergeant (2) & V. Mitchell (1).	
Institutional affiliations:	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Institut de Biologie de la Reproduction – CHRU Lille, EA 4308 Gametogenesis and Quality of the Gamete, F-59045 Lille 2. Inserm UMR 837-1, Alzheimer & Tauopathies, Jean-Pierre Aubert Research Center, Univ. Lille 2, F-59045 Lille 3. Plateforme Protéomique de l'Artois CAPA, Univ. de l'Artois, F-62300 Lens 4. Plateforme Biogenouest, F-35000 Rennes 	
PhD supervisor: N. Sergeant & V. Mitchell	
Title Human Sperm Proteome : a new approach to understand sperm physiology	
Abstract (please respect the sub-headings). Do not exceed 2000 characters including spaces	
<p>Introduction Spermatozoa is a haploid cell produced in testis from germ cells and its function is to deliver male genome to oocyte. During the spermatogenesis, sperm cell loosed its cellular organism and could not realize protein synthesis or limited. However, beyond the testis, spermatozoa could not move and is unable to fertilize an oocyte. By different interaction with its environment (epididymis, female genital tractus), it acquires these functions. These different steps are translated by proteome modification. Thus, sperm proteome represents an interesting approach to understand sperm physiology and spermatogenesis.</p> <p>Methods Semen of 161 individuals was collected in our reproductive biology department and classified as normal according to the WHO 2010 criteria. Spermatozoa were isolated from seminal plasma by one-step density gradient. Sperm proteins were extracted and separated by 1D/2D SDS-PAGE with Coomassie blue staining, proteins were identified by mass spectrometry and markers were assessed by immunoblotting and immunochemistry.</p> <p>Results Whole proteome of human spermatozoa showed 2016 proteins with a homogeneous distribution in subcellular component, biological and molecular functions. Gene Ontology annotations are coherent with function of spermatozoa. For example, proteins implied in reproductive process and spermatogenesis are significantly over expressed. In sharp contrast, proteins belongs to gene expression are under expressed. Comparative analysis with published dataset of human sperm proteome showed more than 200 new proteins identified. Bioinformatic analyses of proteome permitted to isolate candidate proteins as new factors implied in spermatogenesis and are actually assessing.</p> <p>Conclusions Altogether, our results suggest that proteome analysis of human spermatozoa may be a powerfull tool to understand sperm physiology and identify new sperm quality marker. In the future, proteomic could improve knowledges about male infertility due to proteome failure.</p>	
Bourse CHRU Lille – Bourse Salat-Baroux 2010, PHRC Lille – Rouen 2009 <i>Number of characters : 1998</i>	

5^{ème} journée des doctorants du JPARC, 27 mars 2013, Lille, France

	5th Ph.D. Student Day 27 March 2013
Abstract n° (à remplir par les organisateurs)	
Authors : C. Carpentier ^{1,2,3} , F. Jumeau ^{1,2,3} , F.-J. Fernandez-Gomez ^{1,2,3} , A. Labudeck ^{1,2,3} , C.-M. Dhaenens ^{1,2,3} , L. Buée ^{1,2} , N. Sergeant ^{1,2,3} & M.-L. Caillet-Boudin ^{1,2,3}	
Institutional affiliations: 1. Inserm UMR837-1, Alzheimer & Tauopathies, F-59045 Lille, France 2. Université Lille Nord de France, F-59000 Lille, France 3. UDSL, Jean-Pierre Aubert Research Center, F-59045 Lille cedex	
PhD supervisor: Marie-Laure Caillet-Boudin	
Title Regulation and deregulation of Tau exon 2 splicing by MBNL1 and MBNL2 in the pathological context of myotonic dystrophy of type 1	
Abstract (please respect the sub-headings). Do not exceed 2000 characters including spaces	
<p>Introduction. Alternative splicing contributes to the diversity of the proteome. Its modification is associated with a growing number of neurological diseases. Alternative splicing of exon 2, 3 & 10 generates 6 human brain microtubule-associated Tau isoforms. Tau exon 2 and 10 splicing is abnormally enhanced in myotonic dystrophy of type 1 (DM1), leading to enhanced expression of the shortest Tau isoform as in a fetus human brain. This Tau mis-splicing is associated to progressive development of neurofibrillary degeneration resulting from aggregation of abnormally modified Tau proteins. DM1 is a multisystemic genetic disease with an unstable CTG-repeat expansion which transcript is responsible of RNA gain-of-toxic functions. However, the basic mechanism leading to Tau mis-splicing remains unknown. Based on our previous results, we focused our analysis on MBNL family of splicing factors, which is instrumental to DM1 and potential Tau splicing regulatory factors. Our purpose was to precise the mechanism of action of MBNL1 and 2 using Tau minigenes.</p> <p>Methods. We generated Tau minigenes containing Tau constitutive exons 1 and 4 interrupted by Tau exon 2 surrounded by intronic sequences of 878 bp upstream and 2100 bp downstream. Potential MBNL binding site were determined using SpliceAid and mutated in our minigenes. MBNL1 or 2 splicing factors, minigenes and DM1 mutation (DT₉₆₀) were transiently over-expressed in T98 cells (human glioblastoma). Tau exon 2 splicing was analyzed by RT-PCR.</p> <p>Results. In WT minigene, MBNL1 favored Tau exon 2 inclusion, which activity was not modulated by DM1 mutation. In Tau mutated minigene, MBNL1 action on Tau exon 2 was abolished. In contrast, MBNL2 had no regulatory activity on Tau splicing whereas it could counteract the DM1 mutation effect. A result comforted using the mutated Tau minigene.</p> <p>Conclusions. Our study suggest that MBNL1 and 2 have different splicing regulatory function on Tau exon 2 in physiological and pathological context.</p>	
Doctoral Contract	
<i>Number of characters(< 2000)</i>	

4^{ème} journée des doctorants du JPARC, 17 avril 2012, Lille, France

**4th Ph.D. Student Day, JP Arc
April 17 2012**

Abstract n° (à remplir par les organisateurs)
Author list: Fanny JUMEAU ^{1,2} , Millissia BEN MAAMAR ¹ , Laura Keller ¹ , Francisco FERNANDEZ-GOMEZ ² , Hélène OBRIOT ² , Sabiha EDDARKAOUJ ² , Sophie DUBAN-DEWEER ³ , Johann HACHANI ³ , Jean Marc RIGOT ¹ , Luc BUEE ² , Nicolas SERGEANT ² & Valérie MITCHELL ¹
Affiliations: <ol style="list-style-type: none"> EA 4308 Spermatogenèse et Qualité du gamète mâle, Institut de Biologie de la Reproduction – Spermologie – CECOS- Service d'Andrologie, CHRU Lille F-59000 Lille, France. Inserm UMR837, Equipe 1 Alzheimer & Tauopathies, F-59045 Lille, France Plateforme de Protéomique de l'Artois, Université de l'Artois, Faculté des Sciences Jean Perrin, F-62300 Lens, France.
PhD supervisor: Nicolas SERGEANT & Valérie MITCHELL
Title Sperm protein quality assessment and proteomics characterization of the human spermatozoa
Abstract (please respect the sub-headings). Do not exceed 2000 characters including spaces
<p>Introduction Nowadays, it is established that male fertility declined. Current technologies give us many informations about sperm cells but it persists a lack of knowledge concerning molecular explications of male fertility. Proteomics methods bring a new overview of male gamete. In this study, we propose to define a method to evaluate the quality of sperm proteome and a proteomic characterization of human spermatozoa by 2D-electrophoresis.</p> <p>Methods Human sperm samples were collected in our semen analysis laboratory (CHRU Lille, N=161). After liquefaction, the sperm parameters were evaluated according to the WHO 2010 criteria. Spermatozoa were isolated from seminal plasma and cells rounds by density gradient method. Sperm proteins were extracted and processed by 1D-SDS-PAGE and 2D-electrophoresis. Gels were staining with coomassie blue. Results from 1D-SDS-PAGE were analyzed with ImageJ (NIH) and a quality index is determined. Spots issued from 2D-electrophoresis were identified by mass spectrometry (MALDI TOF) and classification of proteins were realized via <i>gene ontology</i>.</p> <p>Results 1D-SDS-PAGE represents our quality control of sperm proteins. Three kinds of profile were observed. One of them represents samples with a sufficient quality of extracted proteins. This profile seems to be correlated with sperm characteristics specifically the motility of spermatozoa. The others profiles show both protein alteration. Normal spermatozoa (pool from 5 samples) were processed on 2D-electrophoresis (N=3). 200 different proteins were identified from pI 3 to 10 and 10 kDa to 120 kDa by mass spectrometry. Proteins belong to every subcellular compartment.</p> <p>Conclusions In this study, we propose a non selective method to extract sperm protein and evaluate their quality. This step is necessary to perform a 2D-electrophoresis approach. Secondly, we realized a proteomic characterization of the human spermatozoa with the goal to identify proteins implied in sperm dysfunction.</p>
<p>Aknowledgement CHRU Lille Bourse SALAT – BAROUX 2010</p>

COMMUNICATIONS AFFICHEES

Abstract Congrès EuPA, 14-17 octobre 2013, Saint-Malo, France

Human Sperm Proteome reveals DCDC2C as a new microtubule associated protein of sperm flagellum

F. Jumeau (1,2), F.J. Fernandez-Gomez (2), C. Carpentier (2), H. Obriot, (2) S. Eddarkaoui (2), S. Duban-Deweer (3), J. Hachani (3), F. Halgand (4), F. Chalmel (4), S. Chocu (4), CM. Dhaenens (2), ML. Caillet-Boudin (2), JM. Rigot (1), MC. Peers (1), C. Pineau (4), L. Buée (2), **N. Sergeant (2) & V. Mitchell (1)**.

1. Institut de Biologie de la Reproduction – CHRU Lille, EA 4308 Gametogenesis and Quality of the Gamete, F-59045 Lille
2. Inserm UMR 837-1, Alzheimer & Tauopathies, Jean-Pierre Aubert Research Center, Univ. Lille 2, F-59045 Lille
3. Plateforme Protéomique de l'Artois CAPA, Univ. de l'Artois, F-62300 Lens
4. Plateforme Biogenouest, F-35000 Rennes

During the sperm maturation in epididymis and in female genital tractus, spermatozoa interacts with its environment. These are translated by proteome modification and proteomics represents a relevant approach to understand sperm physiology. Flagellum permits to spermatozoa to progress through female genital tractus to reach the oocyte. Cytoskeleton is composed by a microtubular network and is implicated in sperm motility. In this study, we focused on proteins related to the microtubular network regulation and specifically DCDC2C (DoubleCortin Domain Containing 2C), a potential microtubules associated protein.

Spermatozoa were isolated from semen of 20 normozoospermic individuals (WHO 2010 criteria) in our reproductive biology department. Sperm proteins were extracted, separated by 1D/2D SDS-PAGE and identified by mass spectrometry. Dataset obtained were analyzed with AMEN software. Interest protein was selected among overexpressed protein family from sperm flagellum and yet not described in testis or spermatozoa. DCDC2C expression was assessed by RT-PCR, immunoblotting and immunochemistry.

In testis, DCDC2C was detected by immunoblotting, RT-PCR and localized in late state of spermatogenesis (long spermatid and spermatozoa). In spermatozoa, DCDC2C was strongly detected in immunoblotting and localized in terminal piece of sperm flagellum.

Altogether, our results suggest that proteome analysis of human spermatozoa may be a powerful tool to further assess and understand sperm physiology. A functional flagellum is necessary for sperm motility considered as a sperm quality marker in assisted reproductive medicine. Among flagellar protein, DCDC2C expression was characterized for the first time in human testis and spermatozoa. DCDC2C belongs to doublecortin domain containing protein family implied in microtubules stabilization. DCDC2C could be implied in sperm motility failure and further investigations are needed to define the role of DCDC2C.

Abstract Congrès Neurosciences, 9-13 novembre 2013, San Diego, USA

06/05/13

Oasis, The Online Abstract Submission System



Neuroscience
2013

 [Print this Page for Your Records](#)

[Close Window](#)

Control/Tracking Number: 2013-S-3626-SfN

Activity: Scientific Abstract

Current Date/Time: 5/6/2013 11:15:37 AM

Impact of endogenous tau in a mouse model of myotonic dystrophy

AUTHOR BLOCK: F.-J. FERNANDEZ-GOMEZ¹, S. EDDARKAOUI¹, S. CARRIER¹, H. OBRIOT¹, A. HUGUET², F. JUMEAU¹, C. CARPENTIER¹, A. LABUDECK¹, L. ARANDEL³, M. DERISBOURG¹, C. LAURENT¹, M. HAMDANE¹, D. FURLING³, D. BLUM¹, M. GOMES-PEREIRA², M. CAILLET-BOUDIN¹, *L. BUEE¹, G. GOURDON², N. SERGEANT¹;

¹Alzheimer & Tauopathies, Inserm, Lille, France; ²Inserm, Paris, France; ³UPMC Univ. Paris 6, Um76 / Inserm, U974 / CNRS, Umr7215, Paris, France

Abstract:

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) or Steinert's disease belongs to the fourth group of Tauopathy classification characterized by a missplicing of microtubule-associated protein tau (MAPT) with neurofibrillary degeneration. This neuromuscular disease is clinically characterized by a multisystem alteration affecting metabolic and nervous systems. Neurofibrillary degeneration is a neuropathological hallmark that has been found in the limbic system of DM1 patients, including in the hippocampus and cortical areas. The intraneuronal aggregates of hyper- and abnormally phosphorylated isoforms of tau are directly linked with cognitive decline in tauopathies. In order to determine the contribution of tau to cognitive deficits, we have used a well-characterized model of DM1, referred to as DMSXL. In comparison to other transgenic models, DMSXL mice express the human locus of DM1 with long unstable CTG repeats (over a thousand) in the DMPK gene. The transgene is expressed in the brain enabling the assessment of behavioural consequences associated with the transgene expression. The aim of the present study was to investigate the impact of the presence of two, one and no copy of the endogenous mouse MAPT gene in DMSXL mice. To reach this goal eight groups were generated: WT, Tau +/-, Tau KO, DM1 tg/o, DM1 tg/o Tau +/-, DM1 tg/o Tau KO, DM1 tg/tg, DM1 tg/tg Tau +/- and DM1 tg/tg Tau KO. Behavioural studies such as the Morris water maze and the elevated plus maze revealed a loss of spatial memory depending on the number of MAPT copies among each group. These observations are sustained by biochemical and molecular biology analyses of signalling cascade in relationship with tau biology. Our data suggest that tau affects synaptic plasticity in DMSXL mice as well as changes in splicing pattern. Our results stress the role of endogenous tau proteins in the pathogenesis of DM1.

:

Presentation Preference (Complete): Poster Only

Linking Group (Complete): None selected

Nanosymposium Information (Complete):

Theme and Topic (Complete): C.05.d. Repeat expansion diseases: Non-Huntington's disease

Keyword (Complete): TAU ; MYOTONIC DYSTROPHY ; SYNAPTIC PLASTICITY

06/05/13

Oasis, The Online Abstract Submission System

Support (Complete):

Support: Yes

Grant/Other Support: : ANR NeuroSpliceDeTau

Grant/Other Support: : INSERM

Grant/Other Support: : AFM

Grant/Other Support: : LABEX DISTALZ

Grant/Other Support: : MEDIALZ

Special Requests (Complete):

Would you be interested in being considered for a dynamic poster?: No, I am not interested in presenting a Dynamic Poster

Is the first (presenting) author of this abstract a high school or undergraduate student?: None

Religious Conflict?: No Religious Conflict

Additional Conflict?: No

Status: Finalized

[OASIS Helpdesk](#)

[Leave OASIS Feedback](#)

Powered by [OASIS](#), The Online Abstract Submission and Invitation SystemSM

© 1996 - 2013 [Coe-Truman Technologies, Inc.](#) All rights reserved.

12^{ème} Journée André Verbert, école doctorale Biologie-Santé Lille 2, 11 septembre 2012, Lille, France.



PROTEOME OF HUMAN SPERMATOZOA : A NEW APPROACH TO CHARACTERIZE SPERM QUALITY IN NORMOZOOSPERMIC MEN

Fanny JUMEAU^{1,2}, Francisco FERNANDEZ-GOMEZ², Millissia BEN MAAMAR³, Laura KELLER¹, Héliène OBRIOT², Sabiha EDDARKAOUI², Sophie DUBAN-DEWEER², Johann HACHANI², Frédéric HALGAND², Charles PINEAU⁴, Jean-Marc RIGOT³, Luc BUEE², Nicolas SERGEANT² & Valérie MITCHELL¹

- EA 4306 Gaméto-genèse et Qualité du gamète - Institut de Biologie de la Reproduction - Spermologie - CECOS- Service d'Andrologie, CHRU Lille F-59000 Lille, France.
- Inserm UMR837, Equipe 1 Alzheimer & Tauopathies, F-59045 Lille, France
- Plateforme de Protéomique de l'Artois, Université de l'Artois, Faculté des Sciences Jean Perrin, F-62300 Lens, France.
- Plateforme Protéomique Biogenouest, F- Rennes, France.

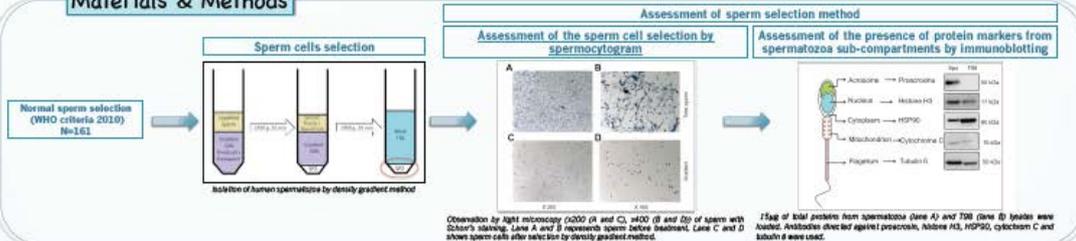
Introduction

Nowadays, it is established that male fertility declined. To evaluate the fecundity of the semen, a descriptive analysis is performed. The number of cells, the motility and the morphology of spermatozoa are considered as fertility marker. The lower references limits are given according to the WHO criteria (WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, fifth edition, 2010). Despite having apparently normal sperm parameters, the origin of men infertility remains unknown in 50% of normozoospermic men.

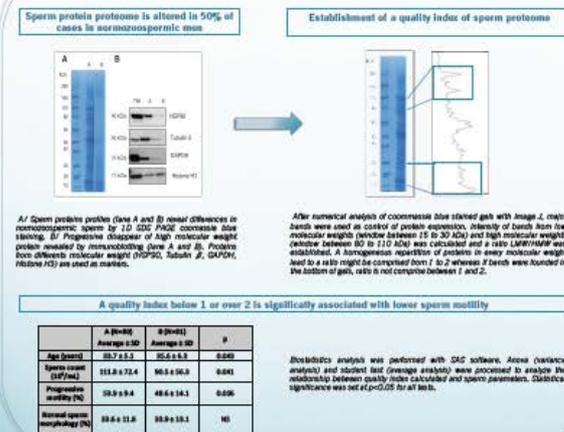
Spermatozoa are considered to be highly differentiated cells with a compartmentalized protein pattern. During spermatogenesis, it progressively loses its cellular organism with the cytoplasmic droplet and became motile and able to fertilize during its maturation in the epididymis. Hereby, there is no or weak protein synthesis in a mature spermatozoa. However, sperm cell and its environment (epididymis, male and female genital tracts) interact that is translated by proteome modification. Thus, it is clear that focusing on sperm proteome is pertinent. In this way, proteomics methods bring a new overview of male gamete.

We hypothesize that assessment of protein profile quality could reflect sperm quality. To address this issue, we have studied a cohort of men (N=161) with normal sperm parameters. In this study, we propose to define a method to evaluate the quality of sperm proteome and a proteomic characterization of human spermatozoa.

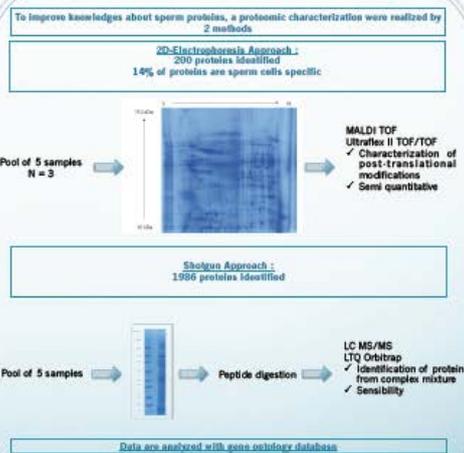
Materials & Methods



Protein quality index : a new marker of human spermatozoa quality?



Human spermatozoa proteome



Conclusion

In this study, we setted a method to isolate sperm cell, extracted sperm proteins and analyzed sperm proteome.

Despite having normal sperm parameters, sperm protein profiles observed were different among normozoospermic men. In about 50% of cases, a decreased of proteins from high molecular weight were observed in spite of a same quantity of protein were loaded. After gel analysis, a quality index was defined. This index seems to be related to sperm parameters, specifically sperm motility, and could be used routinely as marker of sperm quality.

Secondly, we characterized human sperm proteome by two proteomics approach and 1986 proteins were identified. Differential proteomics method is in development to identify proteome failure between normal and abnormal spermatozoa.

Acknowledgement CHRU LILLE and Bourse SALAT-BAROUX 2010

Congrès Neurosciences, 12-16 novembre 2011, Washington, USA

AN OPTIMIZED 2D-DIGE PROTOCOL FOR THE SEARCH OF POTENTIAL BIOMARKERS IN BRAINS OF ALZHEIMER'S DISEASE

Francois-Joel Fernandez-Garcia, Sabina Eddifarbaoui, Hélène Olivier, Emory Jimenez, Antoine Lechevalier, Cyril Laurent, Nicolas Derdikman, Céline Carpentier, Sophie Dubois*, Christoph Hubauer*, Marie-Laure Caillit-Roualis, Valérie Bero-Scherrer, Malika Haddadi, David Blau, Luc Bado & Nicolas Sergeant. [Contact: nicolas.sergeant@inserm.fr / luc.bado@inserm.fr](mailto:nicolas.sergeant@inserm.fr)

Inserm U875, Université Lille-Nord de France, UDSR, Jean-Pierre Aubert Research Center, IMPRT, Lille, France. * 2146, # Article - Pascale Jean-Pierre, Lille, France.

INTRODUCTION

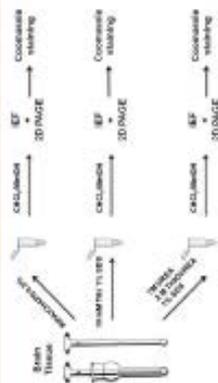
Alzheimer's disease is the first cause of dementia in developed countries. By year 2040 it is expected that over 30 million of people will be affected worldwide. Current pharmacological treatments slightly provide an amelioration of clinical symptoms. For this reason, nowadays it is indispensable the development of new therapeutic strategies based on the search of new targets and molecular pathways involved in the progression of the disease.

The advances in the proteomics field-aided light into new accomplishments in order to elucidate the biological machinery responsible for worsening cognitive decline in these patients. Two-dimensional differential gel electrophoresis (2D-DIGE) is a powerful method to compare in a single experiment 2D-gel electrophoresis images of different samples. This technique is easily combinable in enriched cytosolic labeling of lysine residues, separation according to their isoelectric point (pI) and separation of proteins according their apparent molecular weights (MW) by SDS polyacrylamide gel electrophoresis.

The identified proteins as well as their changes in expression, post-translational and degradation may offer new candidates for studying biomarker evolution during the pathology and the establishment of novel drug design.

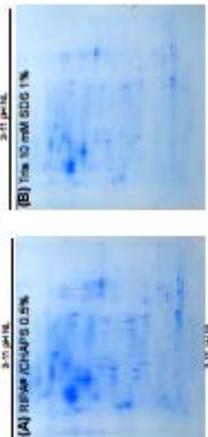
METHODS

Preparation of protein samples should ensure the quality of protein labeling and 2D resolution, taking into account the wide variability of extraction buffers, the diversity of biological samples and the pI of gel used, we compared the use of CHAPS (0.5%), Triton X-100 (0.5%), and Triton X-100 (0.5%) + Triton X-100 (0.5%) (T100) for the protein extraction of post-mortem human brain tissue in the present study for frontal cortex from adult human control brains were used and homogenates performed with the different extraction buffers indicated above using a glass / Teflon® Potter homogenizer. Protein lysates were subsequently pooled to average inter-variability due to the differences occurring among samples. Pooled homogenates were subsequently sonicated at 80 Hz 30 times and centrifuged at 12,000.g to discard tissue debris. Noteworthy, the T100 extraction buffers yielded no pellet or a very slight one when compared to the other buffers. After choosing the buffer for protein extraction, we performed 2D-DIGE between Controls and AD. Differences in protein expression were determined with SureSpots and characterized by MS/MS.



RESULTS

1 2D PROFILE WITH DIFFERENT EXTRACTION BUFFERS

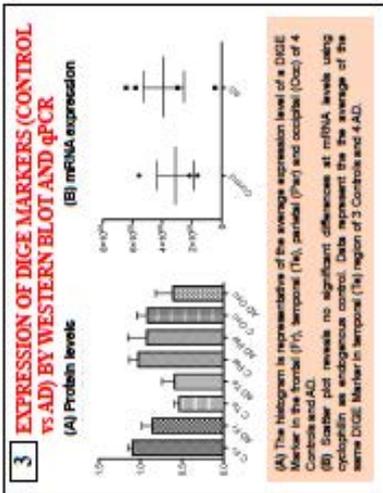


(A) 2D profile after NIPAC/CHAPS 0.5% extraction.
 (B) 2D profile after Tis 10 mM SDS 1% extraction.
 (C) 2D profile after Urea (Thiourea) SDS 1% extraction.
 Urea/Thiourea extraction shows the most elevated quantity of protein spots and quality of focalisation.

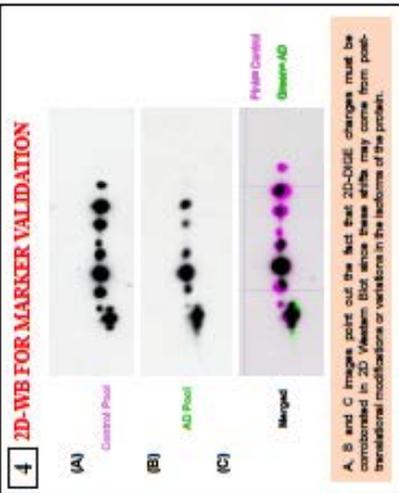
2 2D-DIGE IN CONTROL AND AD



(A) 2D-DIGE profile of Cyt, Cyt2 and Cyt3 overlapped. This experiment was performed for frontal, temporal, parietal and occipital cortex from a pool of 4 different patients in each case.
 (B) Spots show the spots analyzed by MS/MS in two brain regions. These proteins are significantly upregulated or downregulated in AD compared to control cases.
Parietal Cortex
 -Thiostathine
 -Hist about 70kDa
 -Hist about 60kDa
 -VCP synthase
 -Chaperone
 -Storage-deposition-associated protein 1
 -Chaperone
 -Choline kinase
 -Vdrh, tub
 -Glyoxalase-3-phosphate dehydrogenase
 -4-4-epimerase-aminotransferase factor
 -Thiostathine
 -Thiostathine
 -Biphenyl-epoxide c reductase
 -Cofilin 1
Temporal Cortex
 -Glyoxalase-3-phosphate dehydrogenase
 -Thiostathine
 -Hist about 70kDa
 -Hist about 60kDa
 -VCP synthase
 -Chaperone
 -Storage-deposition-associated protein 1
 -Chaperone
 -Choline kinase
 -Vdrh, tub
 -Glyoxalase-3-phosphate dehydrogenase
 -4-4-epimerase-aminotransferase factor
 -Thiostathine
 -Thiostathine
 -Biphenyl-epoxide c reductase
 -Cofilin 1



3 EXPRESSION OF DIGE MARKERS (CONTROL VS AD) BY WESTERN BLOT AND qPCR
 (A) Protein levels
 (B) mRNA expression
 (A) The histogram is representative of the average expression level of a DIGE marker in the frontal (F), temporal (T), parietal (P) and occipital (O) of 4 Control and 4 AD.
 (B) Scatter plot reveals no significant differences at mRNA levels using cyclophilin as endogenous control. Data represent the the average of the same DIGE marker in temporal (T) region of 3 Controls and 4 AD.



4 2D-WB FOR MARKER VALIDATION
 A, B and C images point out the fact that 2D-DIGE changes must be corroborated in 2D Western Blot since these latter may come from post-translational modifications or variations in the isoforms of the protein.
CONCLUSIONS
 -Urea/thiourea SDS 1% buffer is the most suitable lysis buffer to perform 2D-DIGE in brain tissue.
 -2D-DIGE provides undefined differences in protein expression that should be further analyzed by 1D WB, qPCR, IHC and 3D WB in order to establish the post-translational modifications.

16^{ème} congrès FFER, 21-23 septembre 2011, Marseille, France



DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE D'ETUDE DU PROTEOME DU SPERMATOZOIDE HUMAIN : UN NOUVEAU MARQUEUR DE LA QUALITE SPERMATIQUE ?

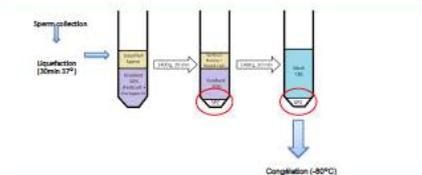
F. JUMEAU¹, M. BEN MAAMAR¹, H. OBRIOU², M. TARDIVEL³, S. DUBAN-DEWEER⁴, C. FLAHAUT⁴, F.J. FERNANDEZ-GOMEZ², S. EDDARKAOUI², W. FRANCK⁵, C. MARLOT⁵, J.M. RIGOT^{1,6}, L. BUEE², N. SERGEANT² & V. MITCHELL^{1,5}

¹EA 4308 Spermatogenèse et Qualité du gamète
²Inserm U837-1 Alzheimer & Tauopathies, JPARC, Université Lille Nord de France, Univ. Lille 2, CHRU Lille
³FR 114 IMPRT, Plateforme Imagerie Cellulaire
⁴Centre d'analyse protéomique de l'Artois
⁵Institut de Biologie de la Reproduction, CHRU LILLE
⁶Service d'Andrologie, CHRU LILLE

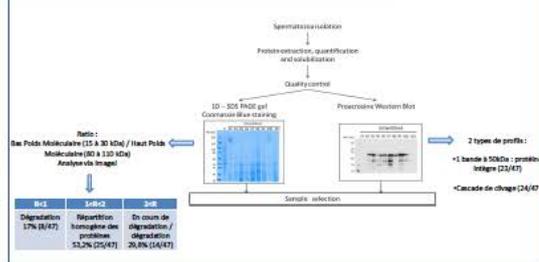
INTRODUCTION

Des avancées récentes dans le domaine de la protéomique permettent maintenant l'étude du contenu protéique du sperme et des spermatozoïdes. Cependant, peu de données sont actuellement disponibles sur ce sujet. Nous nous proposons de développer une méthode d'étude afin de caractériser le protéome du spermatozoïde humain et, à terme, de la comparer à celui d'hommes infertiles présentant des altérations spermatiques.

PREPARATION DES ECHANTILLONS SPERMATIQUES



CONTRÔLE DE LA QUALITE DES PROTEINES



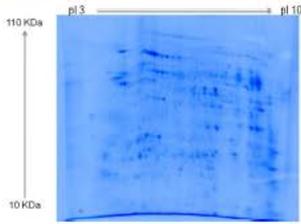
HETEROGENEITE DES PROFILS PROTEIQUES



PROTEOME PRELIMINAIRE DU SPERMATOZOIDE HUMAIN

La protéomique se définit par l'étude des protéines et de leurs modifications post-traductionnelles et permet la séparation de ces molécules via leurs propriétés électrophorétiques (gel et poids moléculaire). La spermatozoïde post-éjaculatoire synthétise peu de protéines de novo. Toutefois, les modifications post-traductionnelles, qui surviennent dans l'épididyme et le tractus génital mâle et femelle régulent en partie son activité. L'approche protéomique pour étudier la spermatozoïde et les variations de son protéome en relation avec une altération spermatique devient pertinente.

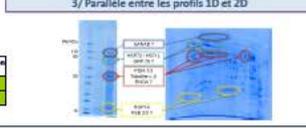
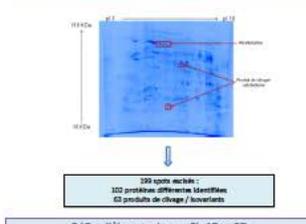
1/ Carte protéique préliminaire du spermatozoïde humain à partir d'un pool de 3 échantillons normospermes



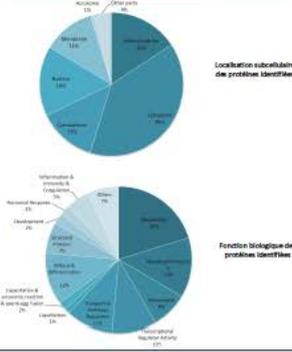
Analyse Spectrométrie de masse (MALDI TOF)

Spot	Accession	MW (kDa)	pI	Score	IP/Peptide	Proteins	MS	MS/MS	Validation
180	ZFP29_HUMAN	29.2	7.5	75.0	0.28	ZNF292	+	+	+
182				140.0	0.28	Indoleamine 2,3-dioxygenase	+	+	+
183				3.15	0.28	Proteinase 3 (Cathepsin B)	+	+	+

2/ Analyse des protéines, de ses isovariants et de ses produits de catabolisme (exemple de la HSP72)



4/ Analyse des protéines identifiées en spectrométrie de masse (via gene ontology)



CONCLUSION

La moitié des échantillons sélectionnés sur la base des paramètres spermatiques conventionnels présente un protéome de qualité protéique suffisante pour une utilisation en protéomique. La préparation des échantillons spermatisques destinés à l'analyse protéomique requiert des analyses et contrôles préalables afin de s'assurer de la qualité du protéome global et de l'intégrité des organites cellulaires en particulier celle de l'acrosome. A terme, cette étude pourrait permettre de caractériser le protéome spermatique à l'échelle individuelle et la compréhension des voies moléculaires impliquées dans les altérations du spermatozoïde qui apparaît d'un intérêt clinique majeur pour le conseil et la prise en charge des couples en Assistance Médicale à la Procréation.

Travaux réalisés avec le soutien des CHUs de Lille et Rouen (PHRC 2009) et la bourse SALAT-BAROUX 2010

Journée des doctorants du JPARC, 11 avril 2011, Lille, France

MALE INFERTILITY : CHARACTERIZATION OF THE HUMAN EJACULATED SPERMATOZOA BY PROTEOMICS

F. Jumeau^{1,2}, H. Obriot², M. Tardivel³, F.J. Fernandez-Gomez², S. Eddarkaoui², W. Franck¹,
C. Marlot¹, L. Buée², N. Sergeant² & V. Mitchell¹

1.EA 4308 Spermatogenèse et Qualité du gamète mâle, Laboratoire de Spermiologie, CHRU LILLE
2.INSERM U837, Equipe Alzheimer & Tauopathies, JPARC, Université de Lille 2, CHRU LILLE
3.JFR 114 IMPRT, Plateforme Imagerie Cellulaire

INTRODUCTION

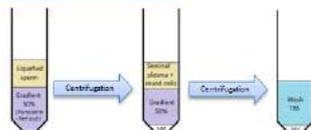
Infertility affects 20% of couples and for half of the cases, infertility originates from male. Nowadays, molecular mechanisms underlying male infertility remain unknown.

Previous networks showed that a qualitative or quantitative deficit of the protein of the spermatozoa is correlated with spermatozoa fertility loss-of-function. One possible way to assess those molecular dysfunction is to study the proteome of spermatozoa, which or cell that do not synthesize protein *de novo*. Our objective was therefore to develop an accurate method to analyze the proteome of human spermatozoa in order to investigate the mechanism of male infertility.

Samples used for this study were obtained from the semen analysis unit, CHRU, Lille.

METHODS

1. SPERM PREPARATION

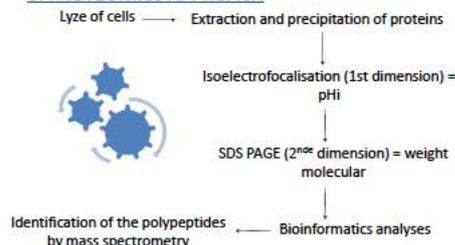


2. QUALITY CONTROL OF THE SPERM PREPARATION

SEMEN ANALYSIS CRITERIA	PROTEIC QUALITY CONTROL
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Normal semen analysis <ul style="list-style-type: none"> → Number of spermatozoa (≥20 millions/mL) → Mobility (≥45%) → Morphology (≥30% typical form) ✓ Acrosomic feature ? 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Specific markers of the spermatozoa in the proteomic extraction? <ul style="list-style-type: none"> Western Blot Proacrosine : specific protein of acrosome vesicle Identification by mass spectrometry of flagellar protein : Ropporine ✓ Quality of the protein?
<p>Immunocytochemistry (Confocal microscopy) *Acrosome vesicle is revealed by the staining in green of the proacrosine *The nucleus of the spermatozoa appears in blue (DAPI)</p>	<ul style="list-style-type: none"> Gel 1D SDS PAGE Coomassie blue staining 2D electrophoresis No altered profil Liquefaction 51h Coomassie blue staining 2D electrophoresis Altered profil Liquefaction 22h Coomassie blue staining

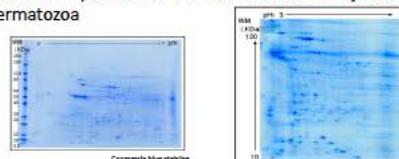
- ❖ The head of the spermatozoa is not altered by sperm preparation .
- ❖ Specific markers of the spermatozoa are found in the proteomic extraction.
- ❖ Many factors could influence the quality of the spermatozoa as the liquefaction. In this case, more proteins were focalised in the low molecular weight in the comparison with the not altered profil.

3. PROTEOMICS APPROACH



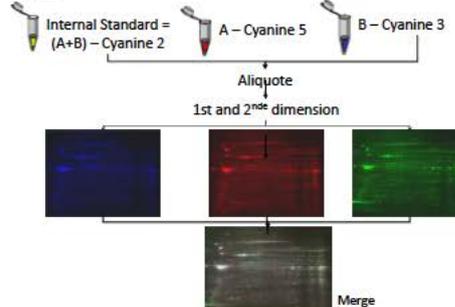
PRELIMINARY RESULTS

- ✓ Proteome pattern of the normal human ejaculated spermatozoa



- ❖ Low quantity of proteins (400µg per ejaculate) lead us to adapt 2D electrophoresis on mini-gel (7*8cm).
→ Individual proteome
- ❖ 2D electrophoresis (22*22cm) should be optimized (IEF)
→ Pool proteome

- ✓ Characterization of inter-individual variation by 2D DIGE



- ❖ Many samples can be analyzed in the same time and the internal standard permits us to normalize results.
- ❖ 2D DIGE on mini gel could be used to characterize inter-individual variations.

The proteomics approach (mini and large gels) is optimized for the study of the proteome of normal and pathological human ejaculated spermatozoa .

SCHEDULES

- ✓ 1st year : normal human ejaculated spermatozoa proteome and sampling (normal sperm).
- ✓ 2nd year : characterization of inter-individual variations, identification of proteic markers of head anomalies, sampling (pathological sperm).
- ✓ 3rd year : Molecular characterization of head anomalies and fecundance evaluation of the spermatozoa in assisted reproductive protocole.

Journée des doctorants du JPARC, 11 avril 2011, Lille, France

Development of minigenes as molecular tools for the study of Tau alternative splicing in Myotonic Dystrophy Type I

Céline Carpentier^{1,2}, Fanny Jumeau^{1,2}, Claire-Marie Dhaenens^{1,2}, Hélène Obriot^{1,2}, Suzanna Schraen-Maschke^{1,2}, Bernard Sablonnière^{1,2}, Marion Le Jeune³, Luc Buée^{1,2}, Martine Duterque³, Nicolas Sergeant^{1,2} & Marie-Laure Caillet-Boudin^{1,2}

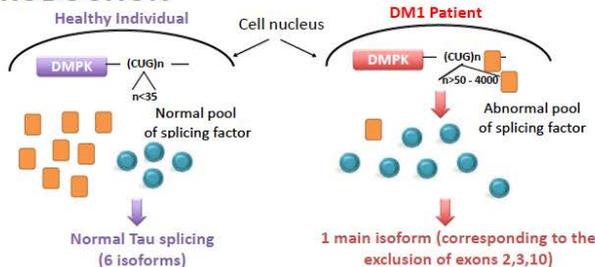
1. Inserm U837, Equipe Alzheimer & Tauopathies, Université Lille 2, CHRU Lille. 2. Plateforme Imagerie Cellulaire, IFR 114 IMPRT
3. UMR8161 CNRS, Institut de Biologie de Lille, Laboratoire « Approches génétiques, fonctionnelles et structurales des cancers »

INTRODUCTION

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is a multisystemic inherited disease characterized by an unstable CTG-repeat expansion in the 3' UTR of *DMPK* gene.

This mutation results in a toxic gain-of-function of RNA containing CUG repeats by modifying the pool of available splicing regulating factors.

Consequently, splicing of numerous RNAs, such microtubule-associated Tau RNA, is altered in DM1. In human control brain, six Tau RNA isoforms are issued from alternative splicing of exons 2, 3 and 10. In DM1 brain, inclusion of these exons is repressed.



Objective: To identify a splicing reporter vector: 1- allowing a correct splicing of tau minigenes 2-making easier the splicing analysis by study of recombinant protein localisation instead of RNA analysis

MATERIAL & METHODS

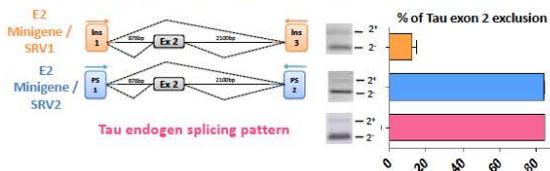
1. Transfection of SY5Y neuroblastoma cells by Minigenes for Tau Exon2 : genomic Tau sequences (878 bp-Exon2-2100 bp; 250 bp-Exon2-250 bp) have been inserted in two plasmidic Splicing Reporter Vector : SRV1, SRV2



2- Splicing study - by RT-PCR experiments for Minigenes cloned in SRV1 ou SRV2
- by western blotting of proteins extracted from different cellular compartments for SRV2

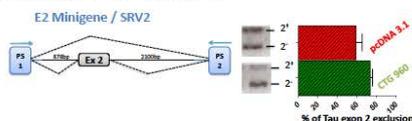
PRELIMINARY RESULTS

1. Tau splicing comparison in the two minigenes



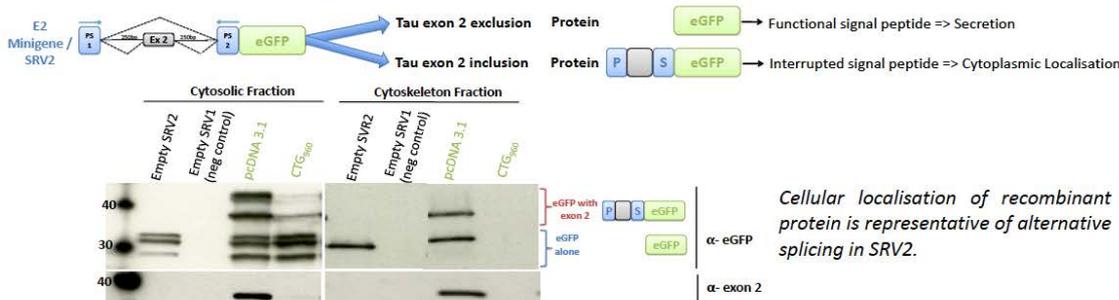
Only Minigene obtained using SRV2 allows to observe an exon 2 exclusion level similar to this observed for endogenous RNAs.

2. Respons of minigene / SRV2 to DM1 mutation at RNA level (RT-PCR analysis)



Tau exon2 mis-splicing is detectable by RT-PCR analysis of Minigene/SRV2 RNAs after cell co-transfection with pcDNA3.1 plasmid (control condition) or with *DMPK* minigenecontaining 960 CTG repeats (DM1 condition).

3. Minigene /SRV2 enables to detect CTG trans-dominant effect on splicing via the study of eGFP secretion



Cellular localisation of recombinant protein is representative of alternative splicing in SRV2.

SCHEDULES



RESUME

CARACTERISATION DU PROTEOME DU SPERMATOZOÏDE HUMAIN

La spermatogenèse est un processus complexe qui se déroule dans le tube séminifère du testicule. Au cours de ce processus, la cellule germinale entre en méiose puis réalise de profondes transformations cytologiques comme la compaction de la chromatine, la formation de l'acrosome et du flagelle. Les organites cytoplasmiques comme l'appareil de Golgi et le reticulum endoplasmique sont éliminés. Le spermatozoïde est alors une cellule organisée qui ne réalise pas ou peu de synthèse protéique. De plus, à la sortie du testicule, le spermatozoïde n'est pas mobile et incapable de féconder l'ovocyte. C'est par des interactions avec son environnement, l'épididyme et les voies génitales féminines, qu'il acquiert pleinement ces fonctions. Ces interactions se traduisent par des modifications du protéome comme le clivage des protéines ou des modifications post-traductionnelles. Ainsi, l'approche protéomique représente une méthode pertinente pour appréhender la physiologie spermatique. Dans cette étude, le protéome du spermatozoïde humain a été réalisé selon deux approches. L'électrophorèse bidimensionnelle est particulièrement adaptée pour l'étude des modifications post-traductionnelles tandis que le shotgun constitue une technologie puissante en terme de sensibilité et d'identification des protéines. Les analyses bioinformatiques ont permis d'identifier les familles de protéines surexprimées de façon significative au sein du protéome spermatique. Parmi celles-ci, les protéines d'association aux microtubules et de la voie du protéasome ont été sélectionnées. Le profil d'expression de la DCDC2C (famille des protéines à domaines doublecortine) et la culline 3 (E3-ubiquitine-ligase) ont été caractérisés dans le testicule et le spermatozoïde humain. De plus amples investigations sont nécessaires afin de préciser son rôle dans la physiologie spermatique.

Outre la compréhension de processus physiologiques, les outils protéomiques permettent l'identification de nouveaux marqueurs de qualité du spermatozoïde. La caractérisation de la qualité spermatique repose actuellement sur un examen descriptif, le spermogramme-spermocytogramme, qui ne permet pas toujours d'expliquer l'infertilité du couple. Ainsi, l'amélioration des outils diagnostics et de la prise en charge de la fertilité sont les enjeux de la Procréation Médicalement Assistée. Dans ce contexte, nous avons observé le protéome de 161 échantillons de spermés normaux (OMS 2010). L'analyse de ce protéome a permis de définir un index de qualité protéique significativement associé à la mobilité progressive du spermatozoïde. Un kit permettant d'établir la qualité protéique spermatique est en cours de développement.