



HAL
open science

Infertilité masculine : fragmentation de l'ADN spermatique, ségrégation méiotique et facteurs génétiques

Minh Huong Nguyen

► **To cite this version:**

Minh Huong Nguyen. Infertilité masculine : fragmentation de l'ADN spermatique, ségrégation méiotique et facteurs génétiques. Génétique humaine. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2015. Français. NNT : 2015BRES0034 . tel-02014211

HAL Id: tel-02014211

<https://theses.hal.science/tel-02014211>

Submitted on 11 Feb 2019

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.

THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE
OCCIDENTALE**

Mention : Biologie-Santé

École Doctorale SICMA

présentée par

Minh Huong NGUYEN

Préparée au laboratoire de

Cytogénétique, INSERM U1078

**INFERTILITE MASCULINE : FRAGMENTATION DE L'ADN SPERMATIQUE,
SEGREGATION MEIOTIQUE ET FACTEURS GENETIQUES**

Thèse soutenue le 7 septembre 2015

devant le jury composé de :

Jacqueline SELVA

PU-PH, Centre Hospitalier Intercommunal de Poissy / Saint-Germain-en-Laye

Franck PELLESTOR

MCU-PH, CHRU Montpellier

Frédéric MOREL

MCU-PH, Université de Bretagne Occidentale

Marc DE BRAEKELEER

PU-PH, Université de Bretagne Occidentale

Aurore PERRIN

MCU-PH, Université de Bretagne Occidentale

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

Invitée

**Infertilité masculine : Fragmentation de
l'ADN spermatique, ségrégation méiotique
et facteurs génétiques**

Minh-Huong NGUYEN

15 octobre 2015

... à mon papa

Remerciements

Je souhaite tout d'abord exprimer ma gratitude et mes remerciements à mon directeur de thèse, **Monsieur le Professeur Marc De Braekeleer**, de m'avoir accueillie chaleureusement au sein son équipe et d'avoir dirigé cette thèse. Je lui suis également reconnaissante pour le temps qu'il m'a accordé, ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa disponibilité et sa sympathie. J'ai beaucoup appris à ses côtés, pour cela je lui adresse mes remerciements les plus sincères.

J'adresse mes reconnaissances profondes à mes encadrants, **Madame le Docteur Aurore Perrin** et **Monsieur le Docteur Frédéric Morel**, pour leur attention de tout instant sur mes travaux, pour leurs conseils et leur disponibilité à tout moment. Je les remercie sincèrement de m'avoir guidée pendant mes 4 ans de thèse, de m'avoir toujours encouragée dans les moments difficiles et d'avoir pris du temps pour corriger ce manuscrit. J'ai pris un grand plaisir à travailler à leurs côtés.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à **Madame le Professeur Jacqueline Selva** et **Monsieur le Docteur Franck Pellestor** qui me font l'honneur d'avoir accepté de juger ces travaux. Leurs remarques et leurs suggestions permettent d'améliorer la qualité de cette thèse et pour cela je leur suis très reconnaissante.

Je tiens à remercier **Madame le Docteur Catherine Metzler-Guillemain** (TAGC UMR_1091) et **Madame le Docteur Laurence Louis** (UMR_S_910) pour leur gentillesse et leur disponibilité dans l'analyse des données de microarray.

J'adresse ma profonde reconnaissance à **Monsieur le Docteur Laurent Corcos** de m'avoir permise d'utiliser l'équipement dans son laboratoire. Je remercie vivement **Brigitte Simon** pour son aide dans l'apprentissage de techniques et ses conseils ainsi que sa gentillesse.

Je tiens à remercier **Madame le Docteur Véronique Amice** et **Monsieur le Docteur Damien Beauvillard** pour le matériel biologique fourni et leur gentillesse.

Je souhaite remercier **Claire**, **Edith** et **Carole**, en Biologie de la Reproduction,

d'avoir toujours pensé à moi quand il y avait des prélèvements et de m'avoir appris à analyser le spermocytogramme.

Mes grands remerciements vont aux **personnes** de différents laboratoires qui nous ont fourni du matériel biologique et des données nécessaires.

Je voudrais également remercier tous les **personnels**, les **doctorants** de l'unité INSERM U1078 pour leur gentillesse et leur amitié.

Un grand merci va à **Madame le Docteur Nathalie Douet-Guilbert** pour ses conseils, son aide notamment pour les articles qu'elle a volontairement commandés pour moi.

J'adresse mes chaleureux remerciements à **Corinne, Nadia, Clément, Pierre, Catherine et Brigitte** pour leur disponibilité et m'avoir appris les techniques en cytogénétique et en biologie moléculaire. Je remercie profondément **Gisèle et Véronique** d'avoir libéré le microscope aussi tôt que possible.

Je souhaite remercier tous les stagiaires, surtout **Manon et Marion**, pour leurs contributions dans ces travaux.

J'adresse particulièrement mes remerciements aux **personnels** du laboratoire de Cytogénétique pour leur accueil chaleureux et les soutiens qu'ils m'ont adressés volontairement durant les moments difficiles. Je n'oublierai jamais les déjeuners avec **Christine N, Christine R, Nadia, Caroline, Corinne, Kévin, Marion, Perinne, Zeinab et Sahar**.

Je tiens à adresser mes profondes reconnaissances aux **patients** pour leur compréhension et leur contribution permettant la réussite de cette thèse.

Un grand merci va à **mes amis** qui m'ont toujours soutenue.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes grands remerciements envers **ma famille, ma maman, mes beaux-parents, mes sœurs et frères** pour leur amour, leur confiance, leur soutien et leurs encouragements.

Je souhaite remercier particulièrement mon mari **Quang-Thang Nguyen** pour son amour, ses encouragements et son soutien volontaire durant ma thèse, pour avoir partagé les moments de joie mais aussi la tristesse.

Cette thèse est dédiée à mon papa.

Table des matières

Remerciements	i
Table des matières	x
Abréviations	xi
Table des figures	xvi
Liste des tableaux	xviii
Résumé	xix
Abstract	xxi
Introduction générale	1
A. Formation des gamètes mâles	2
1. Appareil génital masculin	2
1.1. Testicule	3
1.2. Voies excrétrices	4
1.3. Glandes annexes du tractus génital mâle	4
2. Spermatogenèse	5
2.1. Epithélium séminifère	5
2.2. Phase de multiplication	6
2.3. Phase d'accroissement	6
2.4. Phase de maturation	6
2.5. Phase de différenciation	7

3.	Emission des gamètes	9
3.1.	Transit intra-testiculaire	9
3.2.	Transit extra-testiculaire	9
4.	Spermatozoïde	10
4.1.	Morphologie	10
4.2.	Caractéristiques physiologiques	10
B.	Infertilité masculine : du diagnostic au traitement	12
1.	Définition et diagnostic de l'infertilité	12
1.1.	Définition de l'infertilité	12
1.2.	Exploration de l'infertilité masculine	12
2.	Un cas particulier : infertilité due à une tératozoospermie monomorphe	16
3.	Méthodes d'assistance médicale à la procréation (AMP)	16
3.1.	Insémination intra-utérine	16
3.2.	Fécondation in vitro	17
3.3.	Fécondation assistée par microinjection	17

Première partie – Ségrégation méiotique et fragmentation de l'ADN spermatique dans les gamètes d'hommes infertiles porteurs d'une anomalie chromosomique 19

1.	Introduction	21
A.	Infertilité masculine et anomalies chromosomiques	21
1.	Anomalies chromosomiques constitutionnelles	21
1.1.	Anomalies chromosomiques de nombre	22
1.2.	Anomalies chromosomiques de structure	22
2.	Anomalies chromosomiques et ségrégation méiotique	27
2.1.	Ségrégation méiotique et anomalie chromosomique de nombre	27

2.2.	Ségrégation méiotique et anomalie chromosomique de structure	29
3.	Analyse de l'équipement chromosomique dans les gamètes mâles	36
3.1.	Fécondation hétérosécifique du spermatozoïde humain avec l'ovocyte de hamster doré	37
3.2.	Hybridation in situ fluorescente (FISH)	37
B.	Infertilité masculine et fragmentation de l'ADN spermatique	38
1.	Structure de la chromatine spermatique	38
2.	Origines de la fragmentation de l'ADN spermatique	41
2.1.	Défaut du remodelage de la chromatine spermatique	42
2.2.	Substances oxygénées réactives	42
2.3.	Apoptose	45
2.4.	Autres facteurs	47
3.	Evaluation de la fragmentation de l'ADN dans les gamètes mâles	47
3.1.	Test au bleu d'aniline	47
3.2.	Test CMA3 (Chromomycine A3)	48
3.3.	Test de comètes	48
3.4.	Test SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay)	48
3.5.	Test à l'acridine orange	49
3.6.	Test SCD (Sperm Chromatin Dispersion)	49
3.7.	Test TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labelling)	49
4.	Fragmentation de l'ADN spermatique et infertilité	50
C.	Analyse de l'intégrité de l'ADN spermatique et de l'équipement chromosomique chez les hommes infertiles	52
D.	Exposé des objectifs	53
2.	Patients et Méthodes	55
A.	Patients	55
B.	Méthodes	55

1.	Cytogénétique conventionnelle	55
2.	Evaluation de la fragmentation de l'ADN spermatique	56
3.	Analyse d'équipement chromosomique dans les gamètes	57
3.1.	Préparation des sondes	57
3.2.	Principes de FISH sur sperme	61
4.	Protocole développé afin de combiner l'équipement chromosomique du gamète et son ADN	62
3.	Travaux réalisés	65
A.	Réarrangement chromosomique complexe dans l'infertilité masculine : un cas rapporté et revue de la littérature	65
B.	Etude de la ségrégation méiotique chez les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure	76
1.	Chapitre : Etude de la ségrégation méiotique dans les gamètes mâles chez les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure	76
2.	Article : Caractérisation et ségrégation méiotique d'un marqueur chromosomique surnuméraire dans les spermatozoïdes d'hommes infertiles : cas rapporté et revue de la littérature	87
C.	Etude de la fragmentation de l'ADN spermatique et de la ségrégation méiotique dans les gamètes mâles	94
1.	Article : Etude de la fragmentation de l'ADN spermatique et de la ségrégation méiotique dans les gamètes d'hommes porteurs d'une mosaïque gonosomique	94
2.	Article : Etude de la fragmentation de l'ADN spermatique et de la ségrégation méiotique dans les gamètes mâles chez les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure	101

Deuxième partie – Expression de la signature génétique dans les spermatozoïdes : mise au point de l'étude du

transcriptome dans les spermatozoïdes et premiers résultats 115

1. Introduction	117
A. Facteurs génétiques et infertilité masculine	117
1. Gènes liés aux chromosomes sexuels impliqués dans l'infertilité masculine	117
1.1. Gènes liés au chromosome X	117
1.2. Gènes liés au chromosome Y	118
2. Gènes liés aux chromosomes autosomiques impliqués dans l'infertilité masculine	119
B. Signature génétique paternelle dans les spermatozoïdes	121
1. Présence des ARN dans les spermatozoïdes	121
2. Méthodes de détection des ARN dans les spermatozoïdes	123
3. Fonctions des ARN spermatiques	124
3.1. Implication des ARN spermatiques dans le remodelage de la chromatine	126
3.2. Traduction <i>de novo</i> des ARN spermatiques	128
3.3. Incorporation des ADN, ARN étrangers et l'activité reverse transcriptase dans les spermatozoïdes	128
3.4. Effets épigénétiques des ARN sur l'embryon	130
3.5. Rôles des ARN spermatiques dans le développement embryonnaire	132
4. Applications pratiques des ARN spermatiques	135
C. Infertilité masculine et étude du transcriptome dans les gamètes	136
1. Signature génétique de la spermatogenèse	137
1.1. Gènes spécifiques selon le stade de la spermatogenèse	137
1.2. Profil d'expression des gènes dans les spermatozoïdes matures	138
2. Facteurs génétiques et méthodes d'AMP	142
D. Exposé des objectifs	143

2. Matériels et Méthodes	147
A. Matériels	147
B. Méthodes	147
1. Purification des spermatozoïdes à partir du sperme	147
1.1. Purification des spermatozoïdes à partir du sperme frais	148
1.2. Purification des spermatozoïdes à partir du sperme congelé	150
2. Evaluation de l'efficacité de deux kits d'extraction d'ARN	153
3. Evaluation de la pureté des ARN spermatiques	156
3.1. RT-PCR	157
3.2. Bioanalyzer 2100	158
4. Amplification et marquage des ARN spermatiques	159
5. Hybridation des ARN marqués sur puces à ARN	162
6. Analyse des données	164
3. Résultats	167
1. Purification des spermatozoïdes à partir du sperme	167
1.1. Du sperme frais	167
1.2. Du sperme congelé	170
2. Evaluation de l'efficacité de deux kits d'extraction d'ARN	173
3. Evaluation de la pureté des ARN spermatiques	173
3.1. RT-PCR	173
3.2. Bioanalyzer 2100	175
3.3. Corrélation de résultats obtenus par la RT-PCR et le Bioanalyzer 2100	177
4. Amplification et marquage des ARN spermatiques	177
5. Hybridation des ARN marqués sur puces à ARN	178
6. Analyse des données	179
6.1. Validation de base des données de microarray	181

6.2.	Comparaison du profil d'expression des gènes entre les échantillons de sperme frais et de sperme cryoconservé ayant un spermogramme normal	185
6.3.	Comparaison du profil d'expression des gènes entre les échantillons de sperme issus des patients asthénozoospermiques et des hommes ayant un spermogramme normal	188
4.	Discussion	191
1.	Purification des spermatozoïdes à partir du sperme	191
2.	Extraction d'ARN spermatiques	193
3.	Evaluation de la pureté des ARN spermatiques	194
4.	Validation et analyse des données de microarray	195
4.1.	Validation de base des données de microarray	195
4.2.	Comparaison du profil d'expression des gènes entre les échantillons de sperme frais et de sperme cryoconservé chez des patients ayant un spermogramme normal . . .	197
4.3.	Comparaison du profil d'expression des gènes entre les échantillons de sperme issu des patients asthénozoospermiques et des hommes ayant un spermogramme normal	199
5.	Communications écrites	201
1.	Préparation de l'ARN spermatique humain pour l'étude du transcriptome	201
2.	Etude du transcriptome dans les spermatozoïdes humains	202
3.	Sperme frais versus sperme cryoconservé : Analyse transcriptomique des spermatozoïdes humains.	203
	Conclusion générale et perspectives	205
A.	Etude de la ségrégation méiotique et de la fragmentation de l'ADN spermatique dans les gamètes d'hommes infertiles porteurs d'une anomalie chromosomique	205

B. Expression de la signature génétique dans les spermatozoïdes : mise au point de l'étude du transcriptome dans les spermatozoïdes	209
Bibliographie	215
Annexe 1	251
Annexe 2	273

Abréviations

8OHdG	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMP	Assistance médicale à la procréation
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
AZF	AZoospermia Factor
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BET	Bromure d'éthidium
CBAVD	Congenital bilateral absence of vas deferens
CCR	Réarrangements chromosomiques complexes
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CHRU	Centre hospitalier régional et universitaire
CMA3	Chromomycine A3
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
dATP	DéoxyAdénosine TriPhosphate
dCTP	DéoxyCytidine TriPhosphate
DFI	DNA fragmentation index
dGTP	DéoxyGuanosine TriPhosphate
DSB	Coupures double-brin
DTT	Dithiothreitol
dTTP	DéoxyThimidine TriPhosphate
dUTP	DéoxyUridine TriPhosphate
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
FISH	Hybridation <i>in situ</i> fluorescente
FIV	Fécondation <i>in vitro</i>
FSH	Hormone folliculo-stimulante
GTE	Glucose Tris EDTA

ICSI	ICSI-Intra-Cytoplasmic Sperm Injection
IUI	Inséminations intra-utérines
IMSI	Intracytoplasmic Morphological selected Sperm Injection
LBC	Luria Bertani Chloramphénicol
LH	Luteinizing Hormone
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MCS	Marqueur chromosomique surnuméraire
MDB	Membrane Desalting Buffer
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	Phosphate Buffered Saline
PRINS	Primed <i>in situ</i> labelling
RIN	RNA Integrity Number
RNP	Ribonucléoprotéine
ROSI	Round spermatid injection
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SCD	Sperm Chromatin Dispersion
SCLB	Somatic Cells Lysis Buffer
SCSA	Sperm Chromatin Structure Assay
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SOR	Substances oxygénées réactives
SSC	Sodium Saline Citrat
TCPE	Tris 2-carboxyethyl phosphine
TSH	Thyroid-stimulating hormone
TUNEL	TdT-mediated-dUTP nick-end labeling

Table des figures

1.	Appareil reproducteur masculin	2
2.	Structure du testicule humain	3
3.	Structure des tubes séminifères avec les différentes cellules	7
4.	Etapes de la spermiogenèse	8
5.	Structure d'un spermatozoïde	11
6.	Classification des CCR selon leur structure.	25
7.	Types des CCR avec le diagramme pendant le stade pachytène.	26
8.	Ségrégation méiotique théorique de trois gonosomes chez un patient 47,XXY.	28
9.	Ségrégation méiotique théorique de trois gonosomes chez un patient 47,XYY.	29
10.	Formation d'un trivalent au stade pachytène de la méiose I et différents modes de ségrégation méiotique chez un patient porteur d'une translocation robertsonienne.	30
11.	Formation d'un quadrivalent au stade pachytène de la méiose I et différents modes de ségrégation méiotique chez un patient porteur d'une translocation réciproque équilibrée.	31
12.	Formation d'une boucle d'inversion au stade pachytène de la méiose I et équipement chromosomique des gamètes après ségrégation méiotique chez un patient porteur d'une inversion péricentrique	33
13.	Configuration en hexavalent lors du stade pachytène de la méiose I pour un CCR three-way.	34

14. Ségrégation méiotique théorique chez un homme porteur d'un marqueur chromosomique surnuméraire (MCS) : 50% de spermatozoïdes chromosomiquement normaux (A) et 50% de spermatozoïdes présentant le MCS (B).	36
15. Structure de la chromatine de la cellule somatique et du spermatozoïde.	40
16. Deux étapes de la production des dommages de l'ADN spermatique . .	44
17. Rôle de Fas pendant la spermatogenèse chez l'homme avec des paramètres spermatiques normaux et anormaux (oligozoospermie, asthénozoospermie et tératozoospermie)	46
18. Principes de la technique TUNEL sur les spermatozoïdes.	50
19. Principes du marquage par Nick translation	60
20. Principales étapes de la FISH sur les spermatozoïdes	62
21. Stratégie employée pour analyser l'équipement chromosomique en combinant avec son ADN dans chaque gamète.	63
22. Gènes situés sur les régions AZF du bras long du chromosome Y	119
23. Population d'ARNm présente dans le testicule, le pool des spermatozoïdes et le sperme individuel	125
24. Rôles possibles des ARN spermatiques	126
25. Relation entre l'ADN, l'ARN et la matrice nucléaire dans les spermatozoïdes.	127
26. Modèle pour la reverse transcriptase dans les spermatozoïdes	130
27. Gènes surexprimés dans les échantillons	143
28. Principes du swim-up	148
29. Schéma des différentes couches cellulaires après un gradient de densités discontinues.	150
30. Schéma de la purification en utilisant le gradient de densités discontinues et la lyse.	150
31. Schéma de l'organisation de l'optimisation de la lyse sur du sperme congelé.	151
32. Schéma de l'organisation de l'optimisation du gradient de densités discontinues sur du sperme congelé	152

33.	A : Différents composants du gradient de densités discontinues. B : Différentes couches cellulaires obtenues après la centrifugation.	153
34.	Schéma de l'organisation de l'optimisation du gradient de densités discontinues suivi de la lyse sur du sperme congelé	154
35.	Schéma de l'organisation de l'optimisation de l'extraction d'ARN spermatique	155
36.	Schéma du protocole d'amplification et de marquage de l'ARNc.	160
37.	Perte en spermatozoïdes (%) avec différents gradients de densités discontinues	168
38.	Perte en spermatozoïdes et en cellules somatiques (%) après association du gradient de densités discontinues et de la lyse des cellules somatiques à partir du sperme frais	169
39.	Résultats de la purification du sperme par la lyse des cellules somatiques	170
40.	Résultats de la purification du sperme par le gradient de densités discontinues	171
41.	Perte en spermatozoïdes et en cellules somatiques (%) après association du gradient de densités discontinues et de la lyse des cellules somatiques à partir du sperme congelé	172
42.	Rendement d'extraction d'ARN des deux kits à partir du sperme frais et du sperme congelé.	173
43.	Présence des amplicons CD45 à 847pb, C-Kit à 780pb, E-Cadhérine à 476pb et Protamine 2 à 149pb pour un échantillon de sperme traité par la lyse des cellules somatiques (1) ainsi que pour le témoin positif (T) révélée par la RT-PCR. Le témoin H ₂ O est négatif pour les 4 amorces. (PM : poids moléculaire).	174
44.	Absence des amplicons du CD45 à 847pb, C-Kit à 780pb, E-Cadhérine à 476pb et présence de l'amplicon à 149pb de la Protamine 2 pour les deux échantillons (1 et 2) indiquant la pureté. Présence de l'amplicon du CD45 à 847pb et de la Protamine 2 à 149pb indiquant une contamination par des leucocytes pour l'échantillon 3. Le témoin sperme frais (T) est positif pour les 4 amorces révélées par la RT-PCR et le témoin H ₂ O est négatif pour les 4 amorces. (PM : poids moléculaire).	175

45.	Différents profils obtenus par le Bioanalyzer 2100.	176
46.	Sondes de contrôle retrouvées dans les quatre coins de chaque array . .	179
47.	Distribution des signaux sur l'histogramme du témoin somatique (A), de l'échantillon F6 (B), de l'échantillon C2 (C) et de l'échantillon F4 (D).	180
48.	Profil d'expression des gènes entre les échantillons ayant un spermogramme normal issus de sperme frais et de sperme cryoconservé sans correction multiparamétrique (A) et avec la correction "Storey with Bootstrapping" (B) et la correction "Storey with Curve Fitting" (C). Les points en rouge représentent des gènes qui sont significativement exprimés différemment entre les deux groupes ($p < 0,05$).	186
49.	Profil d'expression des gènes dans les gamètes des hommes ayant une asthénozoospermie par rapport à celui des hommes ayant un spermogramme normal sans correction multiparamétrique	189
50.	Schéma de la séparation des spermatozoïdes par MACS.	208
51.	Etude de la ségrégation méiotique d'un patient 46,XY,t(9;22)(q21;q11.2).	209
52.	Protocole employé dans l'étude du transcriptome dans les spermatozoïdes	211
53.	Méthodologie employée afin d'étudier le profil d'expression génomique, la fragmentation de l'ADN spermatique et l'équipement chromosomique dans deux populations de spermatozoïdes séparées par MACS (EPS : Externalisation de la phosphatidylsérine)	213

Liste des tableaux

1.	Paramètres spermatiques normaux selon l’OMS. 2010 et la classification de David modifiée.	13
2.	Protocole employé pour la transcription inverse par le SuperScript II .	157
3.	Cycle d’amplification des séquences spécifiques des cellules somatiques (CD45, E-Cadherine et C-Kit) et des spermatozoïdes (Protamine 2) . . .	158
4.	Préparation du Master Mélange pour une synthèse des ADNc.	161
5.	Préparation du mélange pour le marquage des ARNc.	161
6.	Préparation du mélange pour la fragmentation des ARNc.	163
7.	Composants et temps d’incubation de chaque bain de lavage.	164
8.	Résultats obtenus après capacitation pour 5 échantillons.	167
9.	Résultats obtenus après lyse des cellules somatiques pour 5 échantillons.	168
10.	Tableau récapitulatif de résultats obtenus par RT-PCR et Bioanalyzer 2100 sur 11 échantillons. Les résultats montrent clairement une bonne corrélation de ces deux méthodes dans l’évaluation de la pureté des ARN spermatiques. E-Cad : E-Cadhérine, Prm2 : Protamine 2, N/D : non disponible.	178
11.	Caractéristiques des échantillons d’ARN amplifiés et marqués en vue de l’hybridation sur puce. F1→F7 de la puce n°1 et F8 de la puce n°2 : échantillons du sperme frais. T : Témoin somatique. C1→C7 : échantillons de sperme congelé.	179
12.	Spermogramme des échantillons interprétables issus des deux puces à ARN	181
13.	Gènes retrouvés dans les spermatozoïdes impliqués dans différents stades de la spermatogenèse. (Spz : spermatozoïdes).	184

14. Gènes retrouvés dans les spermatozoïdes impliqués dans différents stades de la fécondation et le développement embryonnaire. 185
15. Gènes sous-exprimés et surexprimés dans les spermatozoïdes frais par rapport aux spermatozoïdes cryoconservés 188

Résumé

L'infertilité affecte environ 15% des couples et l'étiologie est masculine dans la moitié des cas. Cette thèse étudie trois facteurs de l'infertilité masculine et se divise en deux parties décrites ci-dessous.

Dans la première partie, l'équipement chromosomique et la fragmentation de l'ADN spermatique dans les gamètes d'hommes infertiles ont été étudiés par la technique FISH et TUNEL. Chez 4 patients présentant une mosaïque gonosomique, un taux élevé de gamètes aneuploïdes et de fragmentation de l'ADN spermatique a été observé. Concernant les 13 patients ayant une anomalie chromosomique de structure, l'équipement chromosomique et l'état de l'ADN spermatique ont été analysés dans chaque gamète. Les résultats montrent que les gamètes chromosomiquement déséquilibrés ont un ADN plus fragmenté que ceux dont l'équipement chromosomique est normal ou équilibré.

Dans la deuxième partie, la mise au point d'une technique d'étude du transcriptome dans les spermatozoïdes a été faite sur des échantillons de sperme frais et congelé. La combinaison d'un gradient de densités discontinues et d'une lyse des cellules somatiques permet d'éliminer complètement des cellules somatiques en récupérant le maximum possible de spermatozoïdes dans le sperme. Le kit NucleoSpin RNA XS (Macherey Nagel) est plus adapté pour l'extraction d'ARN spermatiques que le kit d'extraction d'ARN de chez Qiagen. La pureté des ARN spermatiques est vérifiée par RT-PCR et le Bioanalyzer 2100. Ces deux méthodes donnent des résultats similaires et concordants. L'analyse de microarray montre que les spermatozoïdes frais ne partagent pas le même profil d'expression génétique que les spermatozoïdes congelés.

Mots-clés : Infertilité, ségrégation méiotique, fragmentation, microarray, ARNm, profil d'expression des gènes

Abstract

Infertility affects about 15% of couples with male factor found in half of the cases. This Ph.D thesis investigates three causes of male infertility including chromosomal abnormality, genetic disorder and factors related to alterations in sperm DNA quality. The thesis is organized into two parts.

In the first part, the chromosomal equipment and sperm DNA fragmentation in gametes of infertile men were assessed by FISH and TUNEL. On the one hand, a high rate of aneuploid gametes and sperm DNA fragmentation were observed in four patients with gonosomal mosaicism. On the other hand, analysis of chromosomal equipment and sperm nuclear DNA in each gamete from 13 patients with structural chromosome abnormalities showed that unbalanced gametes have more fragmented DNA than normal or balanced ones.

In the second part, a technique for analysing the transcriptome in spermatozoa was developed on fresh and frozen semen. In fact, the combination of a discontinuous density gradient and a somatic cell lysis solution makes it possible to completely eliminate somatic cells and to recover as many sperms in the semen as possible. The XS Nucleospin RNA kit (Macherey Nagel) was found to be more suitable for RNA extraction than the RNA extraction kit from Qiagen. The purity of sperm RNA was verified by both RT-PCR and the Bioanalyzer 2100. These two methods have yielded similar and consistent results. The microarray analysis showed that fresh sperms do not share the same gene expression profile than frozen ones.

Keywords : Infertility, meiotic segregation, fragmentation, microarray, mRNA, gene expression profile

Introduction générale

Dans les pays industrialisés, l'infertilité affecte jusqu'à 15% des couples en âge de procréer (Boivin *et al.* 2007, Thonneau *et al.* 1991). L'infertilité peut être d'origine masculine (20%), féminine (34%), mixte (38%) ou bien idiopathique (8%) (Thonneau *et al.* 1991). L'infertilité masculine est principalement associée à des perturbations de la spermatogenèse qui peuvent provoquer des anomalies quantitatives et/ou qualitatives dans le sperme comme des oligo et/ou asthéo et/ou tératozoospermies, plus rarement une azoospermie. Les causes de ces perturbations peuvent être chromosomiques, génétiques ou liées à des altérations de la qualité de l'ADN spermatique.

En effet, il a été démontré dans la littérature que les hommes infertiles présentent environ 10 fois plus d'anomalies chromosomiques par rapport à la population générale (Berger. 1975, De Braekeleer *et al.* 2006). Il est estimé que 20% de l'infertilité masculine peuvent être expliqués par les anomalies chromosomiques lors de la mitose et/ou la méiose (De Braekeleer et Dao. 1991). L'anomalie chromosomique gonosomique (de nombre ou de structure) est plus fréquente chez les hommes infertiles présentant une azoospermie tandis que les hommes infertiles ayant une oligozoospermie semblent avoir plus d'anomalies chromosomiques autosomiques (translocations, inversions, marqueurs chromosomiques surnuméraires) (De Braekeleer *et al.* 2006).

De plus, la fragmentation de l'ADN spermatique est considérée également comme étant une cause de l'infertilité masculine. En fait, le taux de la fragmentation de l'ADN spermatique est plus élevé chez les hommes infertiles que chez les témoins fertiles (Zini *et al.* 2009, Tang *et al.* 2010). Les dommages de l'ADN spermatique peuvent augmenter le risque de l'échec d'implantation, le taux de fausse couche, le taux de malformation congénitale voire le risque de cancer chez l'enfant (Cho *et al.* 2003, Lewis and Aitken. 2005).

Récemment, la présence d'une population complexe des ARN a été mise en évidence dans les spermatozoïdes humains permettant d'ouvrir la porte sur l'étude du transcriptome dans ces cellules. Le microarray est une technique puissante permettant

d'identifier un grand nombre de gènes exprimés dans les gamètes mâles (Ostermeier *et al.* 2002). Ces transcrits sont non seulement le reflet des événements intervenus lors de la spermatogenèse mais également des facteurs impliqués dans le développement précoce du zygote (Ostermeier *et al.* 2004, Krawetz. 2005).

Cette thèse contribue à étudier, dans la première partie, la fragmentation de l'ADN spermatique et l'équipement chromosomique dans les spermatozoïdes des hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de nombre ou de structure. Dans la deuxième partie, nous rapporterons la mise au point de la technique d'étude du transcriptome dans les spermatozoïdes humains par le microarray et les premiers résultats.

A. Formation des gamètes mâles

1. Appareil génital masculin

L'appareil génital masculin comprend différents organes et structures permettant la production, la maturation, le stockage et le transport des spermatozoïdes jusqu'à l'appareil génital féminin. Il possède de chaque côté un testicule, un épididyme, un canal déférent, un canal éjaculateur et dans sa partie terminale, les organes sont impairs : le canal uro-génital et la prostate (Figure 1). La structure de l'appareil génital masculin décrit ci-dessous respecte le trajet des spermatozoïdes depuis leur production jusqu'à leur émission (Dadoune. 2006, Humeau et Arnal. 2008).

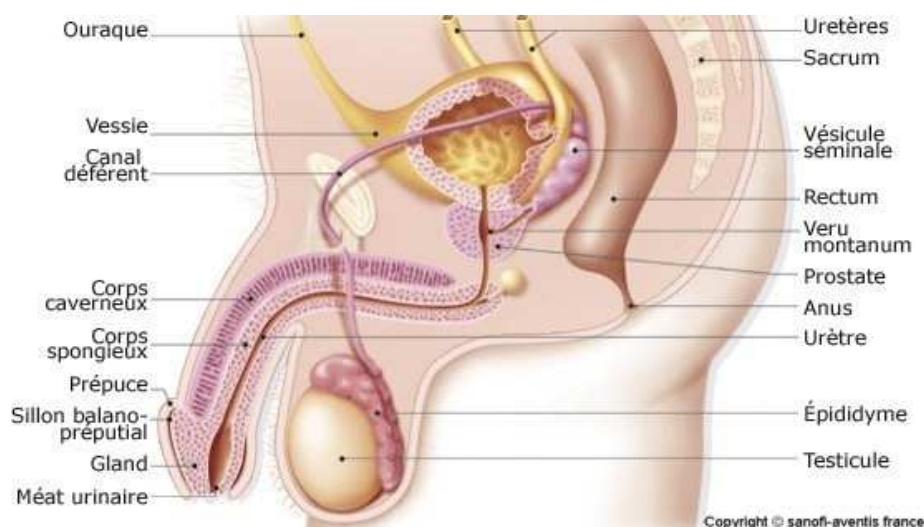


Figure 1 – Appareil reproducteur masculin

(http://lordutarot.com/systeme-reproducteur/anatomie_appareil_genital_masculin.jpg)

1.1. Testicule

Les deux testicules sont localisés dans le scrotum, hors de la cavité abdominale. Ils ont deux fonctions principales : exocrine et endocrine. La fonction exocrine assure la production des spermatozoïdes et la fonction endocrine la production d'hormones sexuelles, essentiellement la testostérone. Le testicule est enveloppé d'une capsule fibreuse, l'albuginée, contenant des cellules musculaires lisses. Au bord supérieur du testicule, l'albuginée s'épaissit et s'enfonce en profondeur pour constituer le corps de Highmore, perforé par les vaisseaux et les canaux qui constituent le rete testis. Entre l'albuginée et le corps de Highmore sont tendues des cloisons ou septa qui délimitent environ trois cents lobules testiculaires, chacun contenant 1 à 4 tubes séminifères (Figure 2). Les tubes séminifères sont constitués par une fine membrane conjonctive externe appelée membrane propre et un épithélium germinal. La membrane propre contient des cellules myoïdes contractiles qui ont un rôle important dans l'évacuation des spermatozoïdes des tubes séminifères. Dans l'épithélium germinal, il y a deux types de cellules : des cellules de Sertoli et des cellules de la lignée germinale. Chaque tube séminifère se termine par des segments rectilignes : les tubes droits qui viennent s'aboucher dans le rete testis. Ce dernier est drainé par des canaux de l'épididyme : les canaux efférents qui se prolongent par le canal épидидymaire.

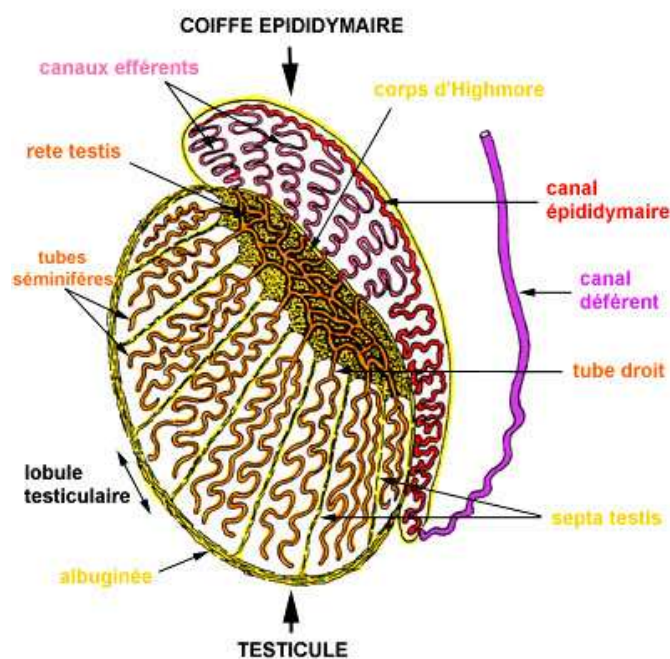


Figure 2 – Structure du testicule humain

(<http://www.romius.free.fr/histologie/cris-cirs-wnts.univ-lyon1.fr>)

Les espaces interstitiels sont très riches en vaisseaux sanguins, lymphatiques et en nerfs, au sein desquels sont répartis des petits amas de cellules de Leydig qui sécrètent des androgènes, essentiellement la testostérone.

1.2. Voies excrétrices

- Les tubes droits sont courts de 1 à 2 mm de long et font suite aux tubes séminifères : un tube droit peut recevoir 1 à 4 tubes séminifères.
- Le rete testis ou le réseau de Haller est un réseau labyrinthisque de canaux parcourant le corps de Highmore qui communique avec les tubes droits.
- Les canaux efférents drainent le rete testis. Environ 10 à 12 canaux traversent l'albuginée et se jettent dans la tête de l'épididyme.
- L'épididyme comprend trois parties : la tête, le corps et la queue. Il a un rôle important dans le transit et la maturation des spermatozoïdes.
- Le canal déférent fait suite à l'épididyme. Il mesure environ 45 cm avec une paroi épaisse (2 à 3 mm). Sa fonction est de modifier la composition biochimique du plasma séminal.
- Le canal éjaculateur chemine dans l'épaisseur de la glande prostatique et vient ouvrir à la face postérieure de l'urètre.
- L'urètre comprend trois parties qui se succèdent du col de la vessie au méat urinaire : l'urètre prostatique où s'abouchent les canaux éjaculateurs et les glandes prostatiques, l'urètre membraneux qui va de l'extrémité de la prostate à l'origine du pénis, l'urètre spongieux est situé au niveau du pénis.

1.3. Glandes annexes du tractus génital mâle

La prostate est un organe musculo-glandulaire exocrine entourant la partie initiale de l'urètre avec une partie caudale et une partie crâniale. Les sécrétions prostatiques (liquide séminal), légèrement acide, entrent dans la composition du plasma séminal. Elles contiennent de l'acide citrique, de l'albumine, des enzymes protéomiques, de la phosphatase acide et des ions (Zn, Mg, Ca). La prostate est androgéno-dépendante : la castration entraîne l'atrophie de la glande et l'arrêt des sécrétions.

Les vésicules séminales sont des organes pairs, sacculaires et bosselés, qui participent à l'élaboration du plasma séminal. La sécrétion des vésicules séminales est composée de substances variées : électrolytes, hydrates de carbone (fructose), protéines, glycerylphosphorylcholine, prostaglandines. Le fructose joue un rôle important pour la

nutrition et la mobilité des spermatozoïdes.

Les glandes bulbo-urétrales, appelées également les glandes de Cowper, sont des petites glandes tubulo-alvéolaires de la taille d'un petit pois. Elles sécrètent un liquide mucoïde, responsable de la lubrification de l'urètre avant l'éjaculation et de la protection des spermatozoïdes contre l'urine acide.

2. Spermatogenèse

La spermatogenèse commence dans les testicules au début de la puberté. Ce processus englobe la totalité du développement, allant de la spermatogonie (cellule germinale primordiale différenciée) jusqu'au spermatozoïde. Les cordons sexuels se transforment en tubes séminifères contournés lors de la puberté. Ils sont constitués par un épithélium germinale qui est composé de deux populations cellulaires : les cellules de soutien (cellules de Sertoli) et les différents stades des cellules germinales en division et en différenciation.

2.1. Epithélium séminifère

L'épithélium est constitué par les cellules de Sertoli et les cellules de la lignée germinale (Figure 3). Les cellules de Sertoli avec d'autres éléments (l'endothélium des capillaires sanguins, les cellules péri-tubulaires, la lame basale de la gaine péri-tubulaire) forment une barrière hématotesticulaire. Cette barrière laisse passer l'eau, les acides aminés, les ions et des sucres mais elle empêche le passage des grosses molécules comme les protéines dans l'espace inter-cellulaire du compartiment adluminal des tubes séminifères. D'une part, cette barrière contrôle le transit des composants du sang vers le compartiment adluminal. D'autre part, elle a un rôle important dans la protection de l'organisme des réactions immunitaires en évitant le contact des cellules germinales contenant des antigènes spécifiques avec les cellules du système immunitaire.

En outre, les cellules de Sertoli sont, non seulement, les cellules de soutien mais également les cellules nourricières de la spermatogenèse notamment de par le nombre de facteurs de croissance sécrétés et les contacts physiques avec les cellules germinales.

Les cellules germinales sont composées de grandes catégories de cellules correspondant à des phases de la spermatogenèse. La phase de multiplication implique les spermatogonies et permet la continuité de la spermatogenèse chez l'adulte. La phase d'accroissement concerne les spermatocytes I. La phase de maturation concerne les

spermatocytes I et II et permet la création de cellules haploïdes. Enfin, pendant la phase de différenciation, la spermatide va subir un processus majeur de différenciation aboutissant au spermatozoïde.

2.2. Phase de multiplication

La phase de multiplication met en jeu les spermatogonies qui sont des cellules souches diploïdes situées dans le compartiment basal du tube séminifère (Figure 3). Il existe trois types de spermatogonies selon leur structure :

- Les spermatogonies de type Ad (d=dark) : possèdent un noyau arrondi avec une chromatine finement granuleuse et sombre.
- Les spermatogonies de type Ap (p=pâle) : possèdent un noyau ovalaire avec une chromatine fine, dispersée et claire.
- Les spermatogonies de type B : possèdent un noyau arrondi, foncé avec une chromatine en amas.

Les spermatogonies Ad sont considérées comme les cellules souches de la spermatogenèse chez un adulte. Elles ne rentrent en division qu'en cas d'un déficit cellulaire en aval. Une spermatogonie Ad peut se diviser pour donner une autre spermatogonie Ad et une spermatogonie Ap. Cette spermatogonie Ap va se diviser pour donner deux spermatogonies B. Ces dernières se divisent pour donner les spermatocytes I. La division des spermatogonies Ad permet à la fois une production de spermatozoïdes en continu et un renouvellement des cellules souches dans la réserve.

2.3. Phase d'accroissement

Cette phase correspond à l'interphase et au début de prophase I. Les spermatocytes I, initialement localisés dans le compartiment externe du tube séminifère, passent dans le compartiment interne. Durant cette phase, il existe de nombreuses modifications cytoplasmiques et des synthèses importantes avec la réplication de l'ADN. Les spermatocytes I doublent leur ADN (2n chromosomes, 4n ADN).

2.4. Phase de maturation

La première division de méiose (méiose I) dite réductionnelle entraîne la séparation des chromosomes homologues appariés, pour aboutir au spermatocyte II, cellule haploïde ayant n chromosomes remaniés mais 2n ADN (Figure 3).

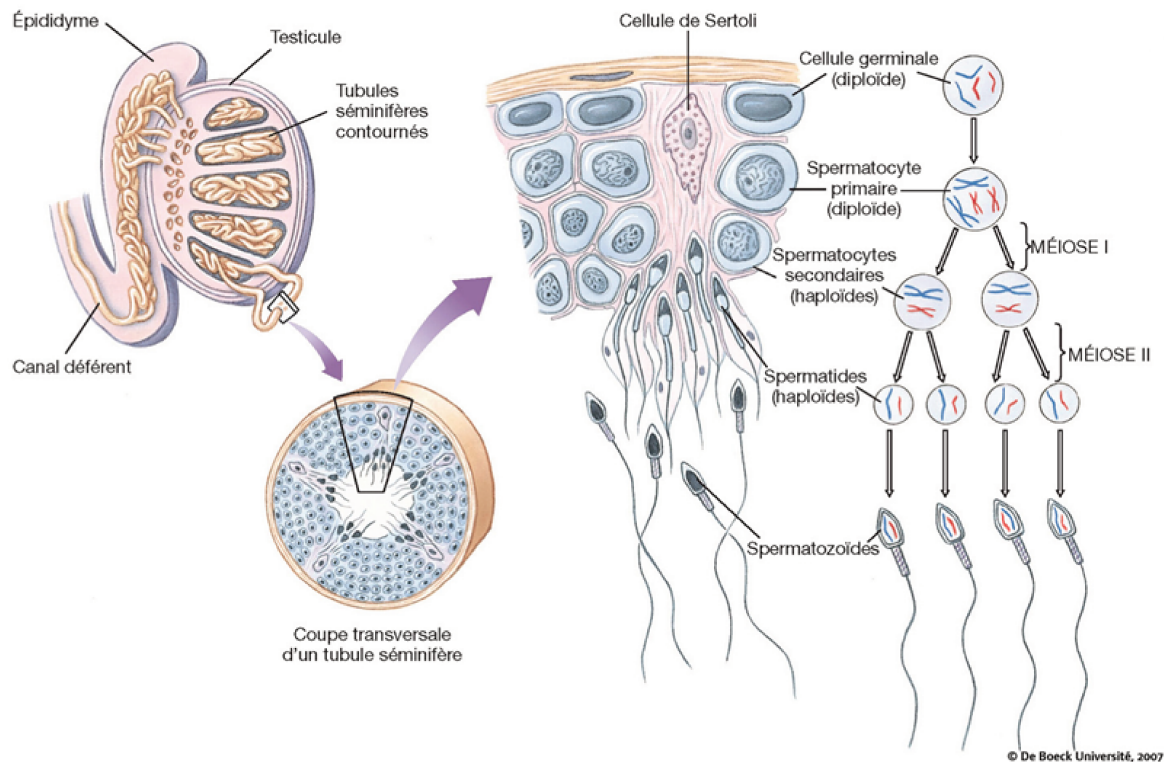


Figure 3 – Structure des tubes séminifères avec les différentes cellules
(<http://forum.cemp6.org>)

Les spermatocytes II situés dans le compartiment adluminal, au-dessus des précédents, entrent en deuxième division de méiose qui est similaire à une division de mitose sans réplication de l'ADN préalable aboutissant à la formation de spermatides haploïdes (n chromosomes, n ADN).

2.5. Phase de différenciation

La phase de différenciation appelée également la spermiogenèse ne comporte pas de division cellulaire mais uniquement une différenciation des spermatides en spermatozoïdes (Figure 4). Les spermatides rondes subissent plusieurs modifications morphologiques : la condensation du noyau, la formation de l'acrosome, la formation de la flagelle, la formation du manchon mitochondrial, l'élimination des restes cytoplasmiques.

- **Condensation du noyau**

Les histones sont remplacées par des nucléoprotéines de transition puis par des protamines permettant la compaction de la chromatine spermatique. Les détails seront précisés ultérieurement.

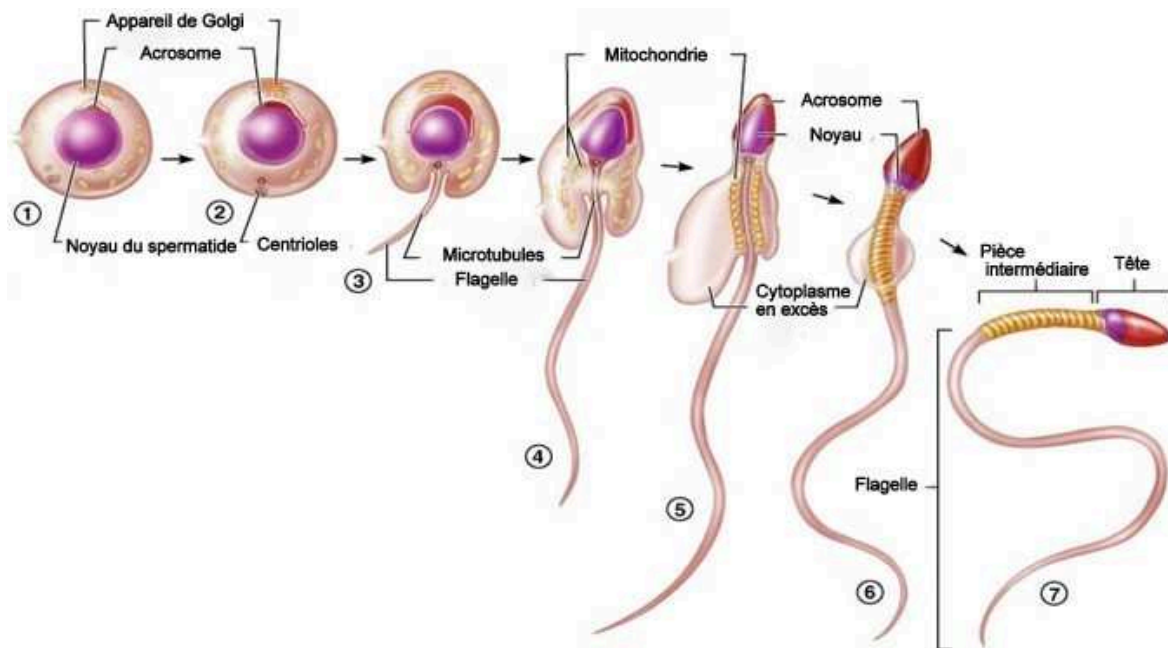


Figure 4 – Etapes de la spermiogenèse

(<http://www.dematice.org/ressources/PCEM1/Histologie/>)

- **Formation de l'acrosome**

L'appareil de Golgi fournit des petites vésicules qui fusionnent pour donner une vésicule unique : la vésicule acrosomiale qui se dispose sur un pôle du noyau, le futur pôle antérieur du futur spermatozoïde. Elle s'étale progressivement sur la surface du noyau et couvre les deux tiers antérieurs ; son contenu devient dense par accumulation d'enzymes protéolytiques indispensables à la fécondation.

- **Formation du flagelle**

Le centriole distal vient se loger dans une légère dépression du noyau au pôle opposé à l'acrosome donc au pôle postérieur. Il se transforme en microtubules de l'axonème qui se compose de 9 doublets de microtubules périphériques et un doublet central. Cet axonème s'allonge progressivement en repoussant la membrane plasmique en un doigt de gant.

- **Formation du manchon mitochondrial**

Les mitochondries sont d'abord dispersées dans le cytoplasme, puis, elles se regroupent autour de l'axonème dans la pièce intermédiaire du flagelle, sous forme d'une spirale. Elles sont la source principale d'énergie fournie pour le mouvement flagellaire.

- **Elimination du cytoplasme**

Le cytoplasme s'écoule sous forme de corps résiduels le long du flagelle et est majoritairement phagocyté par les cellules de Sertoli.

3. Emission des gamètes

Les spermatozoïdes sont produits et formés dans les testicules, puis suivent leur trajet dans les voies génitales masculines ; ce trajet peut être distingué en deux étapes : intra et extra-testiculaire.

3.1. Transit intra-testiculaire

Après la production dans l'épithélium séminifère, les spermatozoïdes à l'état immobile sont transportés dans un liquide sécrété par les cellules de Sertoli, le fluide testiculaire (très riche en testostérone), sous l'effet des contractions des tubes séminifères, via les tubes droits, le rete testis.

3.2. Transit extra-testiculaire

Les spermatozoïdes cheminent des canaux efférents jusqu'au canal épидидymaire, où ils peuvent être stockés dans la queue de l'épididyme. A ce niveau là, les spermatozoïdes subissent encore des modifications pour acquérir leurs fonctions complètes.

En fait, sous l'influence de la carnitine et des facteurs protéiques sécrétés par les cellules épидидymaires, les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité, une propriété essentielle. La mobilité des spermatozoïdes est améliorée successivement dans les trois parties de l'épididyme.

Les spermatozoïdes sont décapités par les modifications de la répartition des protéines, du changement de composition des lipides, de l'intégration de nouvelles protéines d'origine épидидymaire. Toutes ces modifications rendent les spermatozoïdes provisoirement inaptés à la fécondation. Les derniers restes cytoplasmiques sont évacués et libérés dans le liquide épидидymaire, la compaction complète du noyau est achevée, le manchon mitochondrial acquiert sa forme définitive, des modifications des protéines acrosomiales et l'intégration de protéines membranaires intervenant dans la fixation du spermatozoïde à la zone pellucide et à la membrane ovocytaire ont lieu.

Les spermatozoïdes sont stockés dans la queue de l'épididyme et émis hors de

l'organisme de manière discontinue, dans le liquide séminal, par éjaculation. Un éjaculat est constitué au moins de 1,5ml de sperme et contient environ 15 millions de spermatozoïdes par ml (selon l'OMS. 2010). Au moment de l'éjaculation, la première partie de l'éjaculat est constituée des sécrétions épидидymaires, des sécrétions prostatiques et des spermatozoïdes ; le premier jet est donc très fécondant. La deuxième partie de l'éjaculat, quant à elle, est constituée des sécrétions des vésicules séminales et est beaucoup plus riche en fructose.

4. Spermatozoïde

4.1. Morphologie

Le spermatozoïde est une cellule très allongée (environ $60\mu\text{m}$), composée de trois parties : la tête, le col et le flagelle (Figure 5).

La tête est constituée d'un noyau et d'un acrosome. Le noyau occupe la majorité de la tête, il contient du matériel génétique extrêmement condensé (ADN). L'acrosome est une vésicule aplatie, recouvrant les 2/3 supérieurs du noyau. Il contient de nombreuses enzymes hydrolytiques : glucuronidase, hyaluronidase, phosphatase acide. . . permettant au spermatozoïde de traverser la zone pellucide de l'ovocyte pour le féconder.

Le col est la zone de jonction entre la tête et le flagelle, dans laquelle se trouve un appareil centriolaire et une pièce connective.

Le flagelle se lie avec le col et se divise en trois parties : la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale. Elles ont toutes en commun une structure axiale, l'axonème, tandis que les pièces intermédiaire et principale diffèrent de la pièce terminale par les structures concentriques. Dans la pièce intermédiaire, l'axonème est entouré de mitochondries qui fournissent l'énergie nécessaire à la mobilité du spermatozoïde.

4.2. Caractéristiques physiologiques

La mobilité est un caractère essentiel du spermatozoïde. Le mouvement flagellaire est de type ondulatoire, les ondes naissant au niveau du col et se propageant vers l'extrémité selon une fréquence de 10 par seconde. Le déplacement du spermatozoïde est sinusoïdal suivant une direction générale plus ou moins rectiligne. La vitesse du spermatozoïde dépend de l'environnement (liquide séminal liquéfié ou non, glaire

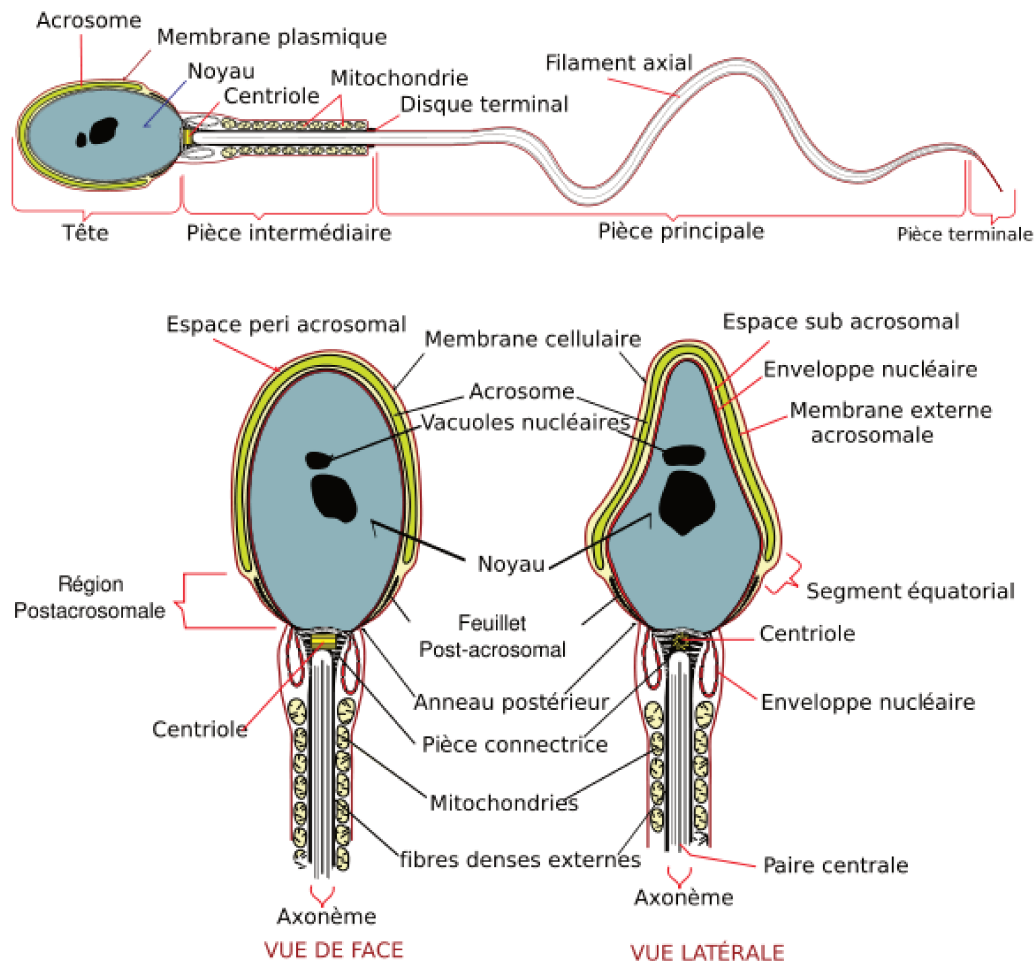


Figure 5 – Structure d'un spermatozoïde

([wikipedia.org/wiki/spermatozo](https://www.wikipedia.org/wiki/spermatozo)\unhbox\voidb@x\bgroup\accent127\OT1\i\penalty\M\hskip\z@skip\egroupde)

cervicale, liquide utéro-tubaire).

La capacité fécondante d'un spermatozoïde dépend de plusieurs facteurs : sa morphologie, sa mobilité, l'équipement enzymatique acrosomial, le degré de condensation de la chromatine, la présence de protéines cytoplasmiques, des caractéristiques membranaires... Dans un sperme, les spermatozoïdes ne sont pas tous féconds.

La vitalité du spermatozoïde est limitée. En fait, dans un sperme maintenu *in vitro* à 37°C, seulement 20% des spermatozoïdes sont encore vivants au bout de 24h. Dans le tractus génital féminin leur survie est au moins de 48 heures en conservant leur fécondance mais peut être plus longue en perdant progressivement la fécondance.

Concernant les activités métaboliques, le spermatozoïde est inerte, c'est-à-dire il n'existe pas d'activité transcriptionnelle et traductionnelle à cause d'une chromatine condensée et de l'absence des ARN ribosomiaux. Seule l'activité respiratoire des mitochondries permet au spermatozoïde la mobilité.

En regardant l'équipement chromosomique, il y a deux sortes de spermatozoïdes : 23,X et 23,Y. Ils ne peuvent pas être différenciés morphologiquement les uns des autres.

B. Infertilité masculine : du diagnostic au traitement

1. Définition et diagnostic de l'infertilité

1.1. Définition de l'infertilité

L'infertilité est définie selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2009) par l'absence de conception après au moins 12 mois de rapports non protégés. En France, la prévalence de l'infertilité est de l'ordre de 15%, ce qui signifie qu'un couple sur six au cours de sa vie reproductive a des difficultés à concevoir. Le terme de "*stérilité*" doit être réservé à l'incapacité totale et définitive de concevoir. Environ 3 à 4% des couples sont stériles (Spiral, 1986). Les facteurs masculins d'infertilité comprennent principalement des altérations quantitatives et/ou qualitatives du sperme.

1.2. Exploration de l'infertilité masculine

L'exploration de l'infertilité masculine consiste en plusieurs examens : l'examen clinique, l'examen biologique, les examens complémentaires.

- **Examen clinique**

L'interrogatoire est une étape importante du diagnostic car elle fournit des informations permettant d'orienter l'origine de l'infertilité : la fertilité personnelle et familiale, les antécédents médicaux, les antécédents chirurgicaux, la sexualité, les risques professionnels et l'exposition aux toxiques. Ensuite, les signes de carence androgénique et de dysfonction endocrinienne sont recherchés. A l'examen physique, les organes génitaux sont particulièrement examinés : le pénis, les testicules, les canaux déférents, la recherche de varicocèle et le toucher

rectal pour examiner la prostate et les vésicules séminales.

- **Examens complémentaires**

Plusieurs examens complémentaires sont utilisés afin de diagnostiquer et rechercher les causes de l'infertilité afin d'orienter au mieux le traitement.

- ◇ **Spermogramme et spermocytogramme**

Les examens de première intention sont le spermogramme et le spermocytogramme qui permettent d'apprécier les caractéristiques du sperme. Ces examens fournissent différentes informations sur le volume de l'éjaculat, le nombre de spermatozoïdes, la mobilité et la morphologie de spermatozoïdes. Les caractères normaux selon les critères de l'OMS, 2010 et la classification de David modifiée (Auger et Eustache. 2000) sont précisés dans le tableau ci-dessous :

Paramètres	Normalité
Volume (ml)	$\geq 1,5$
pH	$> 7,2$
Nombre total de spermatozoïdes (10^6 /éjaculat)	> 39
Concentration (10^6 /ml)	≥ 15
Vitalité (% spermatozoïdes vivants)	≥ 58
Mobilité (%)	≥ 40 de mobiles ≥ 32 de progressants
Morphologie (% forme normale)	≥ 15
Leucocyte (10^6 /ml)	< 1

Tableau 1 – Paramètres spermatiques normaux selon l'OMS. 2010 et la classification de David modifiée.

Une origine masculine est marquée par des anomalies au spermogramme et au spermocytogramme :

- Aspermie : un manque total du sperme
- Hypospermie : le volume du sperme $< 1,5$ ml
- Azoospermie : absence totale de spermatozoïdes qui peut être d'origine obstructive (obstruction des voies séminales) ou non-obstructive (absence de la production par le testicule)
- Oligozoospermie : moins de 15 millions de spermatozoïdes par ml ou moins de 39 millions dans l'éjaculat.
- Asthénozoospermie : se traduit par une diminution de la mobilité des spermatozoïdes par rapport aux valeurs normales.

- Nécrozoospermie : est défini par une diminution de spermatozoïdes vivants $< 58\%$.
- Tératozoospermie : se traduit par une diminution de spermatozoïdes avec une forme normale ($< 15\%$).
- Cryptozoospermie : moins de 100 000 spermatozoïdes dans l'éjaculat.

◇ **Bilan immunologique**

Le bilan immunologique permet de rechercher des anticorps anti-spermatozoïdes. Ce test est proposé dans le cas de patients avec des antécédents de lésion de la paroi des voies génitales ou devant une agglutination spontanée des spermatozoïdes dans l'éjaculat ou dans le cas de non pénétration des spermatozoïdes dans la glaire cervicale. La recherche peut être directe par la détection des anticorps à la surface des spermatozoïdes ou indirecte par la détection des anticorps anti-spermatozoïdes plasmatiques ou séminaux.

◇ **Bilan endocrinien**

Il est recommandé en cas d'azoospermie, d'oligoasthénozoospermie sévère, de trouble de l'érection avec baisse de libido ou de signe clinique d'endocrinopathie. L'évaluation se fait sur le dosage de FSH, LH, TSH et testostérone.

◇ **Biochimie du liquide séminal**

Des marqueurs biochimiques spécifiques peuvent être dosés dans le liquide séminal afin d'apprécier la contribution des différentes glandes dans la formation de l'éjaculat. Les plus couramment mesurés sont l'alpha glucosidase et la L-carnitine pour l'épididyme, l'acide citrique, les phosphatases acides ou le zinc pour la prostate et le fructose pour les vésicules séminales. La mesure de ces marqueurs apporte des renseignements importants dans les azoospermies puisqu'elle permet dans certains cas d'en préciser l'origine (sécrétoire ou excrétoire) et éventuellement de localiser le niveau de l'occlusion (Grizard et Jimenez. 1997).

◇ **Bilan génétique**

Le bilan génétique peut permettre de mieux comprendre les causes de l'infertilité et également de donner des conseils génétiques.

- Le caryotype doit être proposé dans les situations comme : une azoospermie non obstructive, une oligozoospermie avec moins de 5

millions de spermatozoïdes par ml, une oligozoospermie avec antécédent familial de trouble de la reproduction.

- L'étude du gène *CFTR* est faite en cas d'agénésie bilatérale des déférents. Il existe une forte association entre agénésie vésiculo-déférentielle et mucoviscidose.
- La recherche d'une microdélétion du chromosome Y concernant la région AZF peut être proposée aux hommes présentant une azoospermie non obstructive ou une oligozoospermie avec moins d'un million de spermatozoïdes par ml.

◇ **Cytogénétique conventionnelle**

Les anomalies chromosomiques peuvent provoquer des perturbations de la gamétogenèse et peuvent être liées aux troubles de la reproduction. La cytogénétique conventionnelle se fait sur un prélèvement sanguin permettant de déterminer le caryotype du patient. Cet examen est réalisé chez les couples infertiles lors d'une révélation d'une altération importante des paramètres spermatiques et/ou des fausses couches spontanées à répétition. Le caryotype est réalisé systématiquement chez l'homme avant de pratiquer une ICSI (Intra Cytoplasm Sperm Injection).

◇ **Evaluation de la fragmentation de l'ADN spermatique**

La fragmentation de l'ADN spermatique est liée à l'infertilité masculine. L'évaluation de la fragmentation de l'ADN spermatique peut être proposée lors d'une infertilité inexplicée ou avant les méthodes d'assistance médicale à la procréation (Sakkas et Alvarez. 2010). Il existe plusieurs techniques pour détecter les dommages de l'ADN spermatique : TUNEL (TdT-mediated-dUTP nick-end labeling), SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay), SCD (Sperm Chromatin Dispersion), test de comètes.

◇ **Analyse de l'équipement chromosomique dans les gamètes**

Chez les hommes infertiles porteurs d'une anomalie chromosomique ou non, le taux de gamètes chromosomiquement anormaux est plus élevé que celui du groupe témoin d'hommes fertiles (Brugnon et al. 2010, Perrin et al. 2011, Enciso et al. 2013). Le taux élevé de spermatozoïdes aneuploïdes est corrélé négativement avec le taux d'implantations et de grossesses lors de la fécondation assistée (Burrello et al. 2003). Par la technique d'hybridation *in situ* fluorescente (FISH), l'équipement chromosomique des gamètes peut

être analysé permettant d'évaluer le taux des gamètes déséquilibrés et donc de personnaliser des conseils lors du traitement de l'infertilité.

2. Un cas particulier : infertilité due à une tératozoospermie monomorphe

La tératozoospermie peut être subdivisée en deux catégories : polymorphe et monomorphe. La tératozoospermie polymorphe est caractérisée par la présence dans l'éjaculat d'une majorité de spermatozoïdes présentant plus d'un type d'anomalie. La tératozoospermie est dite monomorphe, lorsque la totalité des spermatozoïdes présente la même anomalie morphologique. La tératozoospermie monomorphe peut se présenter sous la forme de globozoospermie ou de macrozoospermie. La globozoospermie, observée dans moins de 0,1% des hommes infertiles, est caractérisée par la tête ronde des spermatozoïdes avec l'absence d'acrosome, la membrane nucléaire aberrante et des défauts de pièce intermédiaire (Schirren *et al.* 1971). Les spermatozoïdes globozoospermiques sont incapables de féconder à cause d'un déficit de la capacité d'activation de l'ovocyte (Aitken *et al.* 1990, Rybouchkin *et al.* 1996). L'ICSI est le seul traitement pour les patients globozoospermiques. La macrozoospermie est une anomalie morphologique des spermatozoïdes rare observée dans moins de 1% des hommes infertiles. Elle est caractérisée par la présence d'un grand nombre de spermatozoïdes macrocéphales avec une forme de la tête mutiflagellée (Nista *et al.* 1977). Ces deux formes rares ont fait l'objet d'articles de revue (Annexe 1).

3. Méthodes d'assistance médicale à la procréation (AMP)

Il existe trois types de traitement des problèmes de fertilité : le traitement médical, le traitement chirurgical et l'AMP. La dernière comprend les inséminations intra-utérines (IIU), la fécondation *in vitro* (FIV) et la fécondation assistée (ICSI-Intra-Cytoplasmic Sperm Injection) (Amar-Hoffet *et al.* 2010).

3.1. Insémination intra-utérine

C'est la plus simple, la moins invasive et la moins coûteuse des techniques d'AMP. Un traitement de stimulation ovarienne préalable est prescrit à la femme afin d'obtenir le développement d'un ou deux follicules, le monitoring est assuré par l'échographie et des prises de sang. Lorsque le ou les follicules sont matures, l'insémination est

programmée. Les spermatozoïdes sont déposés à l'intérieur de l'utérus à l'aide d'un cathéter. Les spermatozoïdes mobiles vont remonter vers les trompes à la rencontre de l'ovocyte. La fécondation se fait *in vivo* naturellement. Les spermatozoïdes doivent être recueillis par masturbation au laboratoire et préparés le jour de l'insémination. L'âge maternel est négativement corrélé avec le taux de grossesses après IIU (Tomlinson *et al.* 1996, Montanaro *et al.* 2001, Dorjpurev *et al.* 2011). Cette méthode est indiquée dans les troubles de l'éjaculation, d'hypospadias sévère, les sub-fertilités masculines, certaines infertilités immunologiques, des cas de problèmes de glaire cervicale ainsi qu'en cas d'infertilité inexplicée (Khallouk *et al.* 2010). Dans les cas de sub-fertilité masculine avec une mobilité spermatique $\leq 30\%$ et une concentration de spermatozoïdes mobiles ≥ 10 millions/ml, l'IIU peut être une option efficace (Cohlen BJ. 2005, Dorjpurev *et al.* 2011). En utilisant une double IIU par cycle (la première IIU est faite dans la période pré-ovulatoire et la seconde dans la période péri-ovulatoire), le taux de grossesse clinique est plus élevé en comparaison avec l'utilisation d'une simple IIU par cycle (l'IIU est faite autour de l'ovulation) (Zavos *et al.* 2013).

3.2. Fécondation in vitro

Cette technique est mise au point dans les dernières années 1970 dans le cadre d'infertilité tubaire et elle est rapidement reconnue comme une excellente option pour le traitement de l'infertilité masculine (Cohen *et al.* 1984). La FIV est proposée quand aucune conception n'a été obtenue après 3-4 cycles d'IIU chez les couples dont les altérations spermatiques sont modérées (Marcelli *et al.* 2009, Tournaye. 2012). La procédure impose une stimulation ovarienne intensive contrôlée chez la femme afin d'obtenir le maximum d'ovocytes pour pratiquer les techniques de fécondation *in vitro*. Les spermatozoïdes (frais ou congelés) sont mis en contact avec les ovocytes. Après 48-72h, les embryons de meilleure qualité sont sélectionnés ; le nombre raisonnable d'embryons transférés dans la cavité utérine varie, selon les pays, 1 à 2, voire 3 dans certaines situations très particulières (âge de la patiente, qualité médiocre des embryons,...) en sachant que la chance de grossesse pour chaque embryon est de 27% (Khallouk *et al.* 2010).

3.3. Fécondation assistée par microinjection

C'est une technique de fécondation *in vitro* consistant en l'injection d'un seul spermatozoïde dans l'ovocyte. Elle permet l'interaction ovocyte-spermatozoïde en

supprimant les obstacles mécaniques que constituent la zone pellucide et la membrane plasmique ovocytaire. L'ICSI est réservée aux infécondités masculines sévères : azoospermie avec prélèvement chirurgical des spermatozoïdes, oligo et/ou asthénospermie et/ou tératozoospermie majeure et auto-immunisation anti-spermatozoïdes sévère (Khallouk *et al.* 2010). Le taux de fécondation des ovocytes est plus élevé chez les couples dont le conjoint présente une tératozoospermie en utilisant l'ICSI que la FIV (Payne *et al.* 1994). Très récemment, en étudiant 249 couples avec une infertilité masculine modérée subissant leur premier cycle FIV/ICSI, l'équipe de Xie *et al.* remarque que la fécondation, l'implantation et le taux de grossesse ne diffèrent pas selon la méthode d'AMP utilisée (Xie *et al.* 2013).

Pour cette méthode, un spermatozoïde est choisi en fonction de sa mobilité et de sa morphologie avant d'être injecté dans l'ovocyte. Pourtant, l'évaluation faite au microscope avec un grossissement de 200 à 400 ne pourrait pas détecter des micro-malformations de la tête du spermatozoïde qui peuvent avoir un impact négatif sur l'efficacité de l'ICSI (Bartoov *et al.* 2002, Berkovitz *et al.* 2006). La méthode de sélection de spermatozoïde mobile sous un grossissement de 6000 à 12000 est suggérée, appelée IMSI (Intracytoplasmic Morphological selected Sperm Injection) (Bartoov *et al.* 2002, Perrin *et al.* 2013a) (Annexe 2). Cette méthode pourrait augmenter la qualité d'embryon, l'implantation et le taux de grossesse et également baisser le taux de fausses couches (Setti *et al.* 2010). En regardant les patients présentant une tératozoospermie sévère, l'utilisation de l'IMSI augmente le taux de grossesses et le taux de naissances vivantes en comparaison à l'ICSI conventionnelle (Knez *et al.* 2012, Khattabi *et al.* 2013). Par contre, l'IMSI ne semble pas donner plus de bénéfices pour les patients avec des échecs répétés d'ICSI en absence d'une tératozoospermie (Khattabi *et al.* 2013). Contrairement à cette opinion, plusieurs équipes ont suggéré que l'utilisation de l'IMSI après des échecs par les méthodes d'AMP conventionnelles (FIV/ICSI) améliore la qualité de l'embryon et donc augmente le taux de grossesses ainsi que le taux de naissances (Delaroche *et al.* 2013, Klement *et al.* 2013). Pourtant les études sur l'efficacité de l'IMSI et l'ICSI ont des limites : le nombre de patients minoritaire, les critères d'inclusion et d'exclusion non homogènes. Il faut donc être prudent sur l'interprétation de la supériorité de l'IMSI par rapport à l'ICSI (Perrin *et al.* 2013b) (Annexe 2).

Première partie

Ségrégation méiotique et
fragmentation de l'ADN
spermatique dans les gamètes
d'hommes infertiles porteurs d'une
anomalie chromosomique

SECTION 1 Introduction

A. Infertilité masculine et anomalies chromosomiques

Dès 1957, Ferguson-Smith *et al* ont suspecté l'existence d'anomalies chromosomiques chez les patients vus pour infertilité masculine. Ils ont trouvé des corps de Barr chez 10 des 91 hommes étudiés pour une azoospermie ou une oligozoospermie sévère (Ferguson-Smith *et al.* 1957). Deux ans plus tard, Jacobs et Strong ont montré chez ces hommes présentant le syndrome de Klinefelter, la présence d'une constitution chromosomique 47,XXY (Jacobs et Strong. 1959). Très tôt, Kjessler a révélé sur 1363 couples infertiles, 70 hommes présentant des anomalies chromosomiques des chromosomes sexuels, 16 présentant une translocation et 4 ayant un marqueur chromosomique surnuméraire. En plus, cette étude a montré une relation entre la baisse du nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat et l'augmentation du taux d'anomalies chromosomiques (Kjessler. 1966). La probabilité de trouver une anomalie chromosomique chez les hommes infertiles est 8 fois plus élevée que dans la population d'hommes fertiles. Dans 20% des cas, l'infertilité masculine est liée aux anomalies dans la mitose et/ou la méiose (Van Assche *et al.* 1996). De plus, chez 668 patients infertiles, 55 (8,2%) présentent des anomalies chromosomiques constitutionnelles (Yatsenko *et al.* 2010) tandis que sur 10202 caryotypes des hommes fertiles, seulement 38 (0,37%) présentent des anomalies chromosomiques (Ravel *et al.* 2006). Plus intéressant, les anomalies chromosomiques se trouvent plus chez les hommes infertiles présentant une azoospermie non-obstructive ou une oligozoospermie en comparaison avec les hommes infertiles normozoospermiques (Pylyp *et al.* 2013).

1. Anomalies chromosomiques constitutionnelles

Les anomalies chromosomiques sont connues comme affectant la fertilité depuis longtemps. Chez les hommes infertiles, 13,7% d'hommes azoospermiques et 4,6%

d'hommes oligozoospermiques présentent un caryotype anormal (Van Assche *et al.* 1996). La fréquence des anomalies chromosomiques chez les hommes infertiles varie de 3% à 19% (Yoshida *et al.* 1997).

1.1. Anomalies chromosomiques de nombre

Parmi 10728 caryotypes réalisés chez des hommes infertiles, l'aneuploïde gonosomique (homogène ou mosaïque) représente 3,48% (373 individus). C'est l'anomalie la plus fréquente qui est 49 fois plus élevée que celle retrouvée chez les nouveau-nés (Van Assche *et al.* 1996). De plus, parmi 668 patients étudiés, 55 présentent une anomalie chromosomique, 53% sont des aneuploïdes des gonosomes et 18% sont des anomalies chromosomiques de structure des chromosomes sexuels (Yatsenko *et al.* 2010). Le syndrome de Klinefelter (47,XXY) est présent chez 4% des hommes infertiles (Yatsenko *et al.* 2010). Il est lié souvent à une azoospermie ou une oligozoospermie sévère (Morel *et al.* 2000). Les hommes ayant un chromosome Y supplémentaire et porteurs d'une mosaïque gonosomique sont généralement fertiles. Pourtant, leurs paramètres spermatiques sont variables, allant d'une normozoospermie à une oligozoospermie sévère (Rives *et al.* 2005). Grâce à l'ICSI, 54 enfants normaux sont nés à partir de 122 hommes présentant un syndrome de Klinefelter (revue dans Ferlin *et al.* 2005).

1.2. Anomalies chromosomiques de structure

En étudiant le caryotype de 1000 hommes infertiles, les auteurs ont trouvé 13,5% présentant une anomalie chromosomique et parmi eux, 39,3% ont une anomalie chromosomique de structure (Elghezal *et al.* 2006). Parmi 55/668 hommes infertiles présentant une anomalie chromosomique, 26 (47%) ont une anomalie chromosomique de structure. Dix ont une anomalie de structure des gonosomes et 16 hommes présentent une anomalie de structure des autosomes (Yatsenko *et al.* 2010).

1.2.1 Anomalie de structure des chromosomes sexuels

Le taux d'anomalie de structure des chromosomes sexuels est plus élevé chez les hommes infertiles que dans la population des nouveau-nés (Van Assche *et al.* 1996).

Les anomalies de structure des chromosomes sexuels rapportées dans la littérature sont : les translocations réciproques entre un gonosome et un autosome (Pinho *et al.*

2005, Ishikawa *et al.* 2007, Perrin *et al.* 2008), le chromosome Y dicentrique (Adachi *et al.* 1997, Codina-Pascual *et al.* 2004), le chromosome Y en anneau (Lin *et al.* 2004). Les hommes porteurs de ces anomalies sont azoospermiques ou oligozoospermiques.

1.2.2 Translocation robertsonienne

Cette anomalie concerne uniquement les 5 chromosomes acrocentriques (13, 14, 15, 21, 22) dont le bras court est très petit et se présente sous la forme d'une masse condensée appelée satellite. La translocation robertsonienne entraîne la perte des deux bras courts et une réunion des deux bras longs pour former un chromosome dérivé. Cette anomalie est considérée comme équilibrée malgré la perte de bras courts car les séquences répétées en tandem contenant des gènes codant des ARN ribosomiques qu'ils portent sont présentes sur tous les bras courts des acrocentriques et la perte n'a pas de conséquence phénotypique pour le porteur. Par contre, cette anomalie peut avoir un impact sur le contenu chromosomique des spermatozoïdes des hommes porteurs. La fréquence des translocations robertsoniennes dans la population d'hommes infertiles (0,73%) est 9 fois supérieure à celle des nouveau-nés (De Braekeleer *et al.* 2006). Dans la plupart des cas, cette anomalie affecte les chromosomes 13 et 14 (Van Assche *et al.* 1996, Morel *et al.* 2004). Cette anomalie se trouve plus chez les hommes présentant une oligozoospermie (Morel *et al.* 2004).

1.2.3 Translocation réciproque équilibrée

Cette anomalie consiste en l'échange de matériel chromosomique entre deux chromosomes sans perte ni gain de matériel; elle est dite équilibrée. En effet, elle est sans conséquence phénotypique pour le porteur mais peut provoquer des anomalies chromosomiques dans les spermatozoïdes. La fréquence de la translocation réciproque équilibrée chez les hommes infertiles est de 5 à 6 fois supérieure à celle des nouveau-nés (Van Assche *et al.* 1996, De Braekeleer *et al.* 2006). Ce type de réarrangement chromosomique est trouvé 11,5 fois plus souvent chez les hommes inclus dans les programmes d'ICSI que chez les nouveau-nés (Morel *et al.* 2004). Il est fréquemment rencontré chez les hommes ayant une oligozoospermie ou une azoospermie (Morel *et al.* 2004).

1.2.4 Inversion

Ce réarrangement ne concerne qu'un seul chromosome. Deux cassures chromosomiques se produisent dans le même chromosome et la partie médiane du chromosome se retourne de 180° avant de se réinsérer à la même place. Il existe deux types d'inversion : paracentrique (deux cassures sur le même bras d'un chromosome) et péricentrique (deux cassures de part et d'autre du centromère). En dehors de la configuration particulière où les points de cassure sur les bras p et q sont à égale distance du centromère, une inversion péricentrique entraîne une modification de l'indice centromérique. L'inversion préserve le nombre de gènes et donc n'affecte pas le phénotype du porteur. En revanche, lors de la méiose, le chromosome remanié a des difficultés pour s'apparier avec son homologue normal et la formation d'une boucle d'inversion est nécessaire. Cela peut provoquer la formation de gamètes chromosomiquement déséquilibrés. Cette anomalie est de 8 à 13 fois plus fréquente chez les hommes infertiles que chez les nouveau-nés (Van Assche *et al.* 1996, De Braekeleer *et al.* 2006).

1.2.5 Réarrangements chromosomiques complexes (CCR)

Les réarrangements chromosomiques complexes (CCR) sont des anomalies chromosomiques de structure qui impliquent au moins trois chromosomes et trois points de cassure. Les CCR sont classés en trois catégories selon leur structure (Kausch *et al.* 1988) (Figure 6) :

- [1] “three-way exchange” : est le plus commun. Cette anomalie implique trois segments de trois chromosomes qui se détachent, transloquent et s'unissent.
- [2] “Double two-way exchange” : est le plus simple. Il y a une coïncidence de deux translocations réciproques simples et indépendantes chez un individu.
- [3] “CCR exceptionnel” : est le plus compliqué. Il y a plus d'un point de cassure sur un des chromosomes impliqués dans le CCR.

Dans la revue de Farra *et al.* parmi 37 hommes porteurs d'un CCR décrits dans la littérature ayant des problèmes de reproduction, 15 cas sont issus du type [1], 9 cas sont issus du type [2] et 13 cas sont issus du type [3] (Farra *et al.* 2011).

Les CRR peuvent être classés selon leur origine (familiale ou *de novo*) ou l'intégrité du matériel génétique (équilibrés ou déséquilibrés). Les CCR familiaux sont souvent équilibrés avec une origine maternelle et les porteurs sont majoritairement

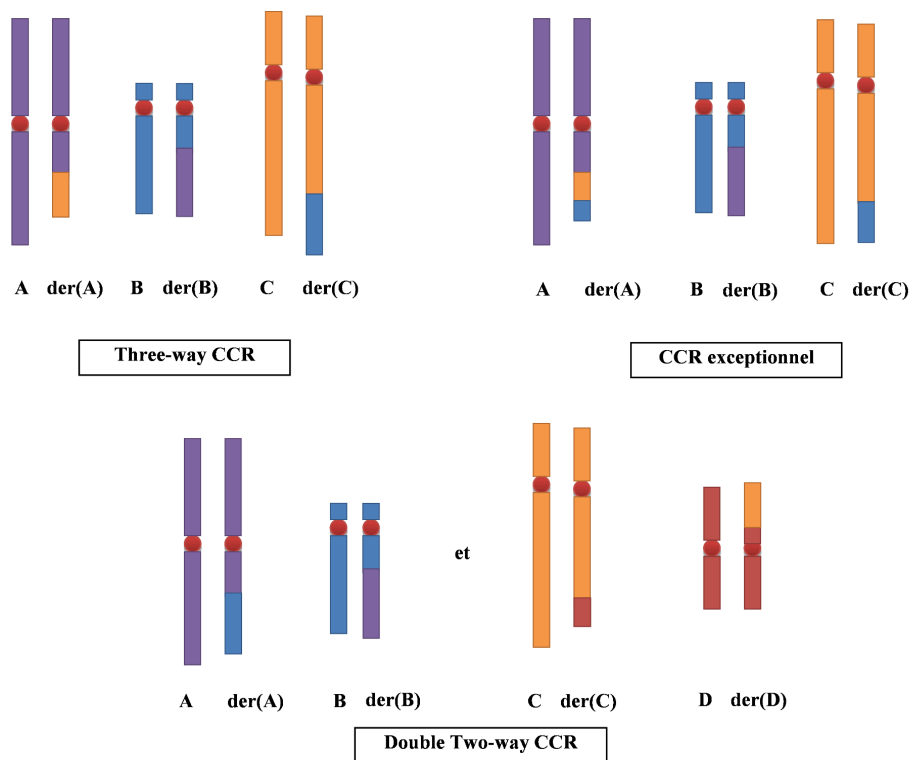


Figure 6 – Classification des CCR selon leur structure.

phénotypiquement normaux. Pourtant, la majorité des CCR sont *de novo* (70-75%) et les porteurs sont phénotypiquement normaux ou anormaux selon l'intégrité du matériel chromosomique (Pellestor *et al.* 2011). Ces réarrangements *de novo* sont préférentiellement d'origine paternelle. La plupart des hommes porteurs d'un CCR équilibré *de novo* phénotypiquement normaux sont diagnostiqués à cause de troubles de la fertilité (Pellestor *et al.* 2011, Farras *et al.* 2011, Li *et al.* 2013). En fait, le CCR est souvent lié à une perturbation sévère de la spermatogenèse qui résulte en une azoospermie ou une oligozoospermie associée à une asthénozoospermie et/ou une tératozoospermie (Salahshourifar *et al.* 2009, Kim *et al.* 2011, Kirkpatrick et Ma. 2012, Li *et al.* 2013).

Concernant les CCR équilibrés, il est possible de diviser les CCR en 4 types selon leur structure (Mandan. 2012) (Figure 7).

- Type I (nombre de points de cassure = nombre de chromosomes impliqués) est caractérisé par la présence d'un point de cassure sur un chromosome impliqué dans la translocation “three-way” ou “four-way”.
- Type II (nombre de points de cassure = nombre de chromosomes impliqués plus un, incluant une inversion).

- Type III (nombre de points de cassure > nombre de chromosomes impliqués et une ou plusieurs insertions).
- Type IV (nombre de points de cassure > nombre de chromosomes impliqués et un segment intermédiaire).

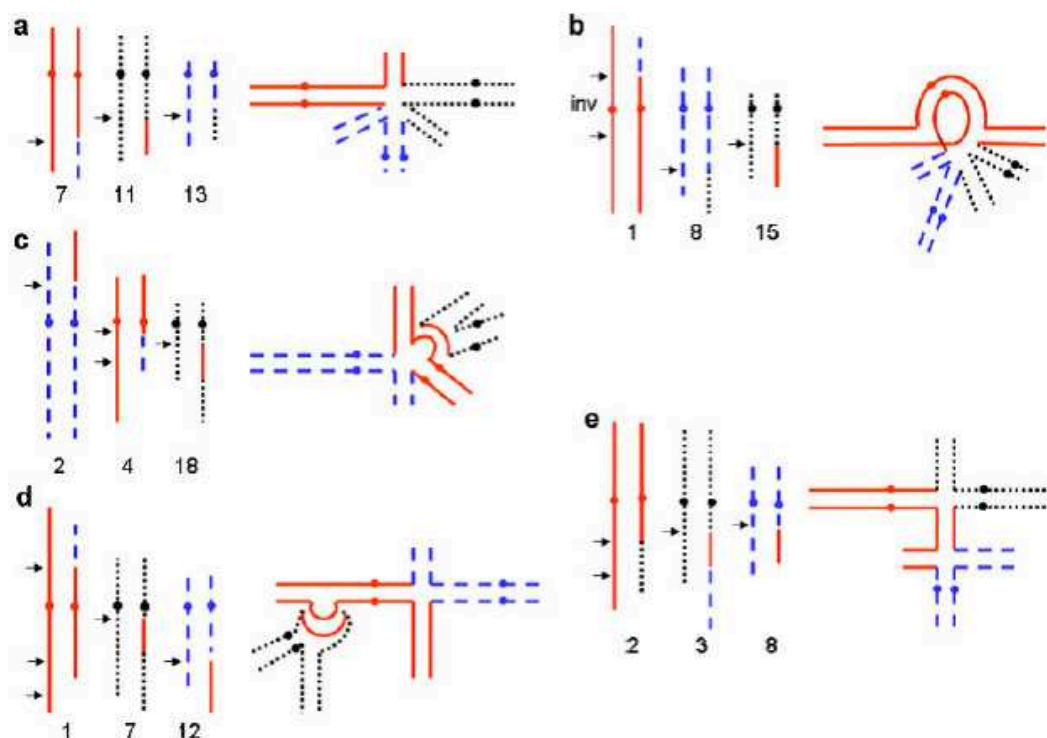


Figure 7 – Types des CCR avec le diagramme pendant le stade pachytène. Les chromosomes normaux avec la flèche indiquant les points de cassure sont à gauche de chaque paire. a : type I avec trois chromosomes et trois points de cassure. b : type II avec trois chromosomes, quatre points de cassure et une inversion péricentrique. c : type III avec trois chromosomes, quatre points de cassure et une insertion. d : type III avec trois chromosomes, quatre points de cassure et une insertion. e : type IV avec trois chromosomes, quatre points de cassure et un segment intermédiaire (Mandan. 2012).

1.2.6 Marqueur chromosomique surnuméraire (MCS)

Les marqueurs chromosomiques surnuméraires sont des chromosomes additionnels dont la structure est indéterminée par les techniques de cytogénétique conventionnelle (ISCN 2009). Le MCS est six fois plus fréquent chez les hommes infertiles que dans la population des nouveau-nés. Il est plus souvent retrouvé parmi les hommes oligozoospermiques que les hommes azoospermiques (De Braekeleer *et al.* 2006). De plus, la probabilité de trouver un MCS est 7,5 fois plus fréquente chez les hommes que les femmes infertiles (Liehr et Weise. 2007). Les MCSs sont préférentiellement transmis

maternellement suggérant une réduction de la fertilité chez les hommes porteurs ou une exclusion du marqueur lors de la spermatogenèse (Wang *et al.* 2009). Si le marqueur est hérité, le risque de conséquence clinique est plus faible (Douet-Guilbert *et al.* 2008). Pourtant les MCSs sont *de novo* dans 60 à 70% des cas (Liehr *et al.* 2004). Les MCSs familiaux ou *de novo* peuvent être associés à des problèmes de la fertilité. Dans la majorité des cas, les MCSs sont dérivés des chromosomes acrocentriques dont les chromosomes 14 et 15 sont les plus impliqués (Manvelyan *et al.* 2008). Les MCSs contenant de l'euchromatine conduisent au retard mental ou retard psychomoteur tandis que les MCSs contenant de l'hétérochromatine n'affectent pas le phénotype du porteur mais sont retrouvés souvent parmi les hommes infertiles (Eggermann *et al.* 2002).

2. Anomalies chromosomiques et ségrégation méiotique

La ségrégation anormale des chromosomes pendant la méiose peut être responsable de fausses couches spontanées, de la naissance d'enfants porteurs d'anomalies chromosomiques de nombre ou de structure et de l'infertilité masculine (Van Assche *et al.* 1996). La technique d'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) a été réalisée sur les spermatozoïdes pour la première fois par l'équipe de Pieters *et al.* en 1990 afin d'analyser l'aneuploïde dans les gamètes mâles et dans le zygote (Pieters *et al.* 1990). En effet, chez les patients infertiles avec un caryotype normal présentant des paramètres spermatiques anormaux, le taux de gamètes chromosomiquement anormaux est plus élevé que chez les témoins fertiles (Pang *et al.* 1995, Machev *et al.* 2005). Grâce à la technique fluorescente, l'étude de la ségrégation méiotique des gamètes permet de comprendre le mécanisme de la production des gamètes chromosomiquement déséquilibrés et d'évaluer la fertilité ainsi que le risque d'hériter d'une telle anomalie pour la descendance.

2.1. Ségrégation méiotique et anomalie chromosomique de nombre

Le syndrome de Klinefelter (47,XXY) est l'aneuploïde du chromosome sexuel la plus fréquente chez l'homme se produisant chez 0,1-0,2% des nouveau-nés mâles (Ferlin *et al.* 2005). Le pourcentage d'hommes présentant un syndrome de Klinefelter dans la population infertile est très élevé, 5% parmi les hommes ayant une oligozoospermie sévère et 10% chez les hommes présentant une azoospermie (De Braekeleer et Dao. 1991, Yoshida *et al.* 1996, Foresta *et al.* 2002). En fait, plus de 90% des hommes 47,XXY homogène sont azoospermiques, tandis que les patients atteints du syndrome

de Klinefelter en mosaïque (47,XXY/46,XY) produisent un nombre de spermatozoïdes variable (Ferlin *et al.* 2005).

Il est suggéré que seules les cellules de la lignée germinale 46,XY peuvent passer la méiose et produire des spermatozoïdes. En revanche, l'évaluation des équipements chromosomiques dans les gamètes mâles par la technique de FISH chez les patients atteints du syndrome de Klinefelter homogène ou en mosaïque montre que le taux des gamètes 24,XY et 24,XX est plus élevé qu'attendu si seulement les cellules germinales 46,XY sont supposées compléter la méiose. Cette observation permet de suggérer que quelques cellules germinales 47,XXY peuvent entrer et terminer la méiose (Morel *et al.* 2000, Ferlin *et al.* 2005). Théoriquement, la division cellulaire lors de la spermatogénèse chez l'homme présentant 47,XXY est comme le schéma suivant :

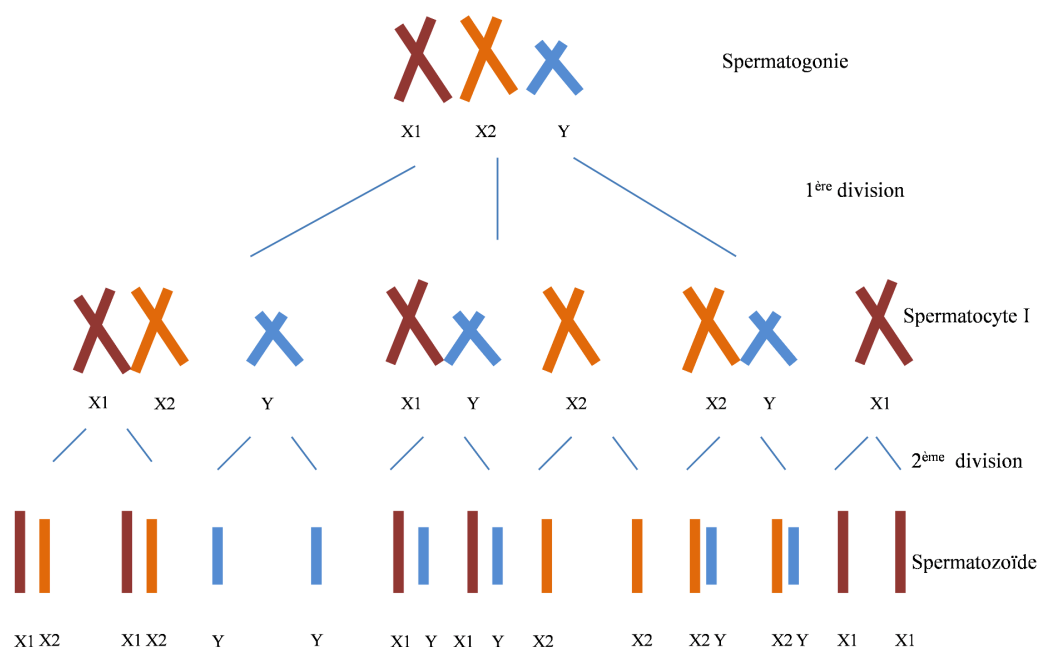


Figure 8 – Ségrégation méiotique théorique de trois gonosomes chez un patient 47,XXY. La distribution aléatoire du chromosome X supplémentaire lors de la 1^{ère} division donne la formation des spermatozoïdes aneuploïdes.

Quant aux hommes porteurs d'un caryotype 47,XYY homogène ou en mosaïque, ils sont souvent fertiles avec une perturbation au niveau des paramètres spermatiques plus ou moins sévère. Les cellules germinales XYY sont capables d'échapper au contrôle du stade pachytène et de subir la méiose. Ainsi, des spermatozoïdes aneuploïdes pour les chromosomes sexuels sont formés. Pour la plupart des études menées sur les patients 47,XYY, le taux d'aneuploïdie autosomique est plus élevé en comparaison avec les témoins fertiles (Rives *et al.* 2005, Milazzo *et al.* 2006, Wong *et al.*

2008). Cela pourrait être expliqué par la perturbation de l'environnement testiculaire causée par la présence de la lignée cellulaire XYY. Par conséquent, la plupart des spermatozoïdes chromosomiquement anormaux est éliminée par l'apoptose, entraînant des perturbations des paramètres spermatiques chez ces patients. La ségrégation méiotique chez les patients porteurs d'un caryotype 47,XYY est théoriquement comme le schéma suivant :

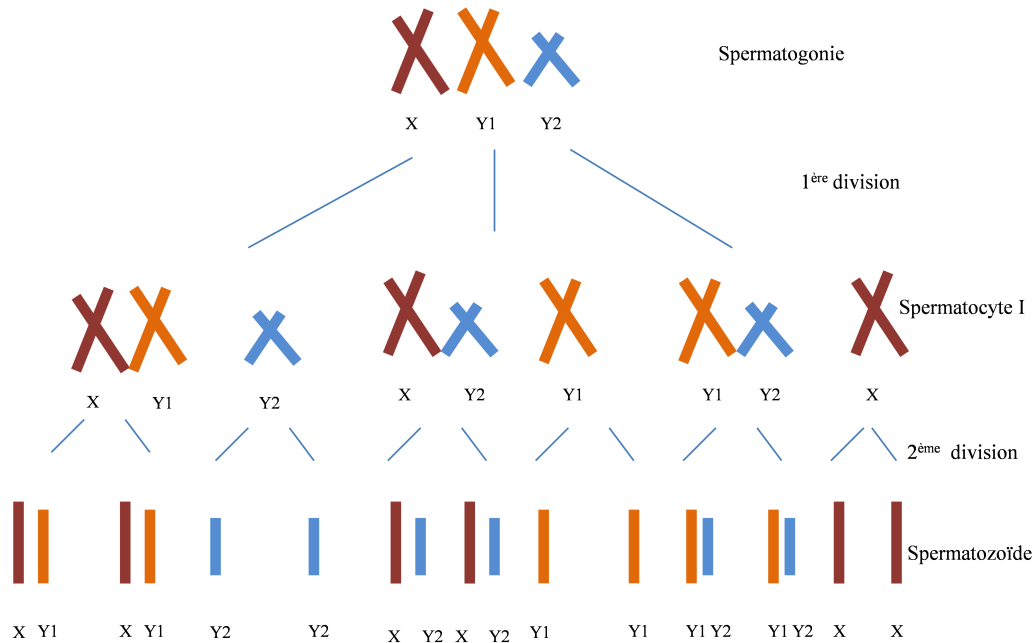


Figure 9 – Ségrégation méiotique théorique de trois gonosomes chez un patient 47,XYY. La distribution aléatoire du chromosome Y supplémentaire lors de la 1^{ère} division donne la formation des spermatozoïdes aneuploïdes.

2.2. Ségrégation méiotique et anomalie chromosomique de structure

Dans la population d'hommes infertiles, la probabilité de trouver une anomalie chromosomique de structure est de 2 à 20 fois plus élevée que dans la population générale (De Braekeleer et Dao. 1991). Le porteur d'une anomalie chromosomique de structure possède souvent au moins une anomalie au bilan de sperme (Vincent *et al.* 2002, Vozdova *et al.* 2013, Yatsenko *et al.* 2010). Une augmentation du taux de gamètes chromosomiquement déséquilibrés se trouve dans l'éjaculat d'hommes porteurs d'une anomalie de structure à cause d'une perturbation de la spermatogenèse lors de la méiose. Cette perturbation peut affecter des chromosomes non dérivés et par conséquent, augmenter le taux de gamètes aneuploïdes (appelé l'effet interchromosomique) (Douet-Guilbert *et al.* 2005). En fait, la plupart des

anomalies chromosomiques détectées grâce à un diagnostic prénatal chez les fœtus conçus par ICSI sont d'origine paternelle (Vegetti *et al.* 2000). L'évaluation de l'équipement chromosomique dans les gamètes chez les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure permet d'envisager ou non une FIV/ICSI ultérieurement.

2.2.1 Translocation robertsonienne

Au stade pachytène de la méiose I, le chromosome normal et le chromosome dérivé forment théoriquement un trivalent en configuration *cis* ou *trans*. En réalité, le trivalent en configuration *trans* n'est pas observé lors du stade pachytène (Vidal *et al.* 1982, Templado *et al.* 1984). La configuration en *cis* permet de séparer les chromosomes homologues en mode alterne (normal ou équilibré) et en mode déséquilibré (Figure 10).

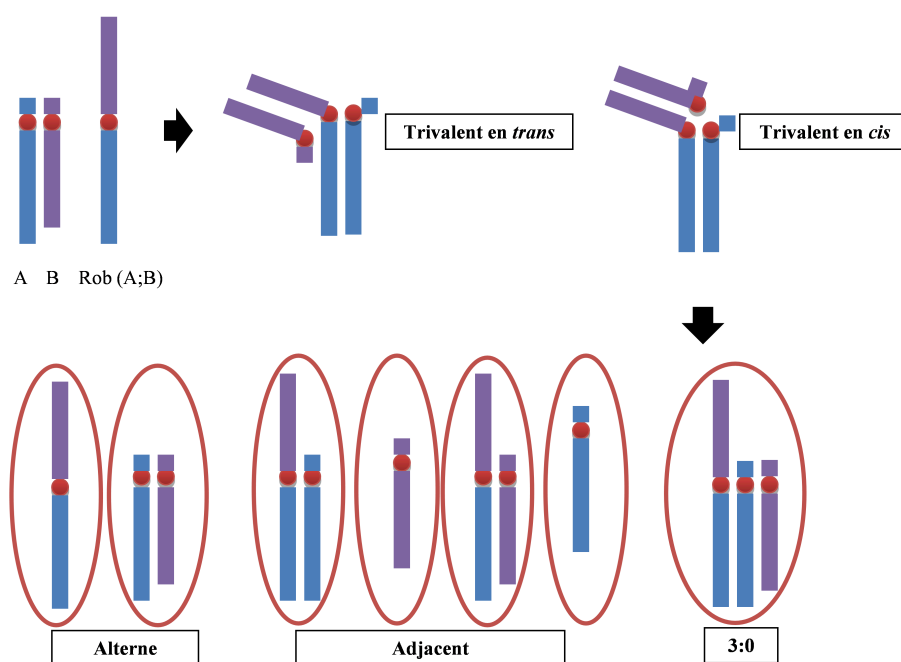


Figure 10 – Formation d'un trivalent au stade pachytène de la méiose I et différents modes de ségrégation méiotique chez un patient porteur d'une translocation robertsonienne.

Seul le mode de ségrégation méiotique alterne peut former des spermatozoïdes chromosomiquement normaux ou équilibrés. Le mode de ségrégation méiotique adjacent et 3:0 forme des spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés. Ainsi, la fécondation d'un ovocyte normal par ce type de gamètes résultera dans la formation

d'un embryon chromosomiquement déséquilibré. Les gamètes issus du mode de ségrégation méiotique alterne sont prédominants puisqu'ils représentent de 70 à 91,2% des gamètes d'un éjaculat (Ogur *et al.* 2006, Perrin *et al.* 2010, Cassuto *et al.* 2011). En fait, la prévalence très élevée du mode alterne peut être expliquée par la configuration adoptée lors de la méiose I qui est toujours en *cis* favorisant la production des gamètes chromosomiquement normaux ou équilibrés (Luciani *et al.* 1984). Même si le risque d'anomalie du fœtus lors d'un diagnostic prénatal est relativement faible (1-2%), le risque d'avoir un fœtus présentant une trisomie d'origine paternelle lors d'une ICSI est possible (Martin. 2008).

2.2.2 Translocation réciproque équilibrée

Au stade pachytène de la méiose I, la formation d'un quadrivalent est nécessaire, ce qui donne 5 modes de ségrégation méiotique différents (Figure 11).

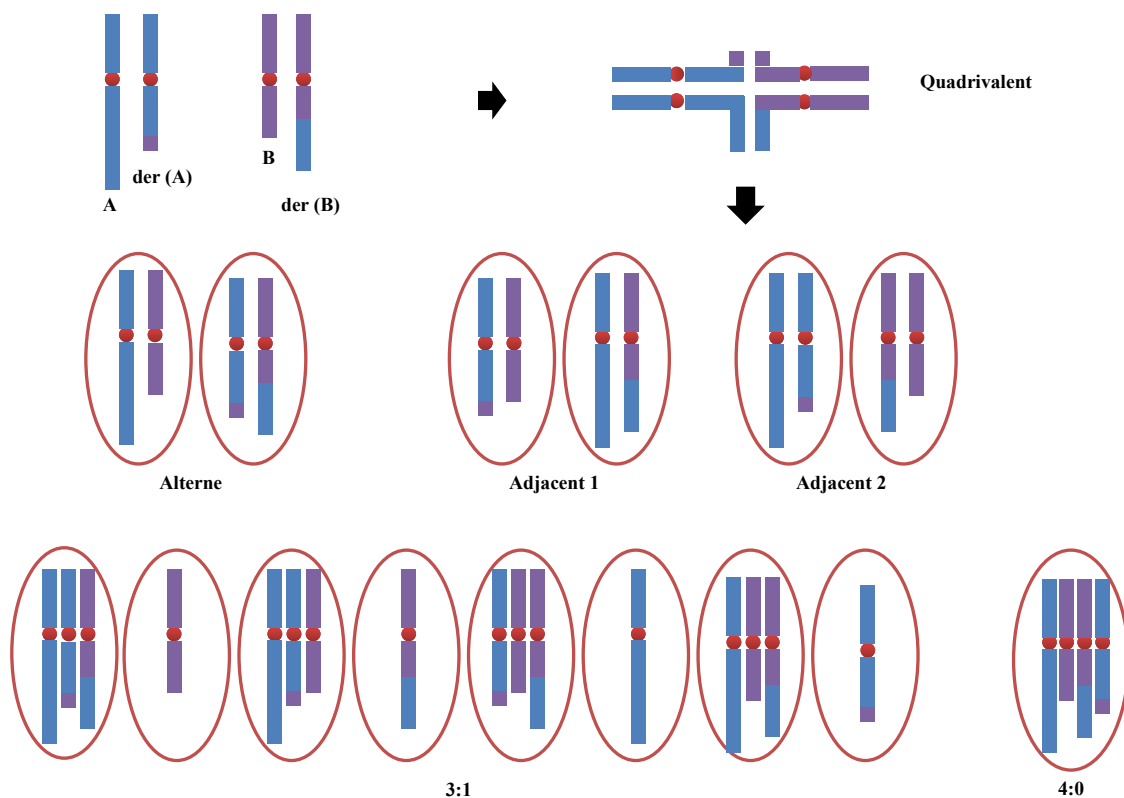


Figure 11 – Formation d'un quadrivalent au stade pachytène de la méiose I et différents modes de ségrégation méiotique chez un patient porteur d'une translocation réciproque équilibrée.

Le mode de ségrégation alterne est le seul permettant la formation des gamètes chromosomiquement normaux ou équilibrés. Les modes de ségrégation méiotique adjacent 1, adjacent 2, 3:1 et 4:0 forment des gamètes déséquilibrés. La fréquence des gamètes déséquilibrés chez les patients porteurs d'une translocation réciproque équilibrée varie de 19% à plus de 80% (Morel *et al.* 2004b, Anton *et al.* 2007, Perrin *et al.* 2010, Cassuto *et al.* 2011). Ces variations s'expliquent par le fait que le pourcentage de gamètes chromosomiquement déséquilibrés dépend du type de chromosomes impliqués (la taille des segments transloqués, la position du centromère) et de la localisation des points de cassure (Morel *et al.* 2004b).

2.2.3 Inversion

Les études sur l'analyse de l'équipement chromosomique dans les gamètes d'hommes porteurs d'une inversion paracentrique sont limitées. En fait, les études de la ségrégation méiotique chez les hommes porteurs d'une inversion paracentrique montrent que le taux des spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés varie de 0% à 12,6% (Vialard *et al.* 2007, Bhatt *et al.* 2009). La production de gamètes recombinants est corrélée avec la taille du segment inversé (Bhatt *et al.* 2009). La possibilité de transmettre des recombinants déséquilibrés au fœtus est généralement faible. Par contre, les naissances des nouveau-nés porteurs d'un recombinant issu d'une inversion paracentrique chez un des parents ont été rapportées (Worsham *et al.* 1989, Whiteford *et al.* 2000, Lefort *et al.* 2003). Par conséquent, l'inversion paracentrique n'est pas inoffensive et il faut savoir qu'elle peut produire des gamètes déséquilibrés lors de la méiose.

Quant à l'inversion péricentrique, une boucle d'inversion se fera au cours du stade pachytène de la méiose I. Cette boucle d'inversion permet d'associer le chromosome inversé avec son homologue. Avec un nombre pair de crossing-over dans la boucle d'inversion il y a formation de gamètes porteurs de la chromatide normale (50%) et de gamètes porteurs de la chromatide inversée (50%). Les embryons formés sont, respectivement, chromosomiquement normaux ou équilibrés. Si un nombre impair de crossing-over a lieu au sein de la boucle d'inversion, il y a alors, d'une part, la formation d'une chromatide avec une duplication d'une partie du bras court et une délétion d'une partie du bras long et d'autre part, la formation d'une chromatide avec une délétion d'une partie du bras court associée à une duplication d'une partie du bras long (Figure 12).

L'inversion péricentrique peut impliquer tous les chromosomes mais le plus souvent

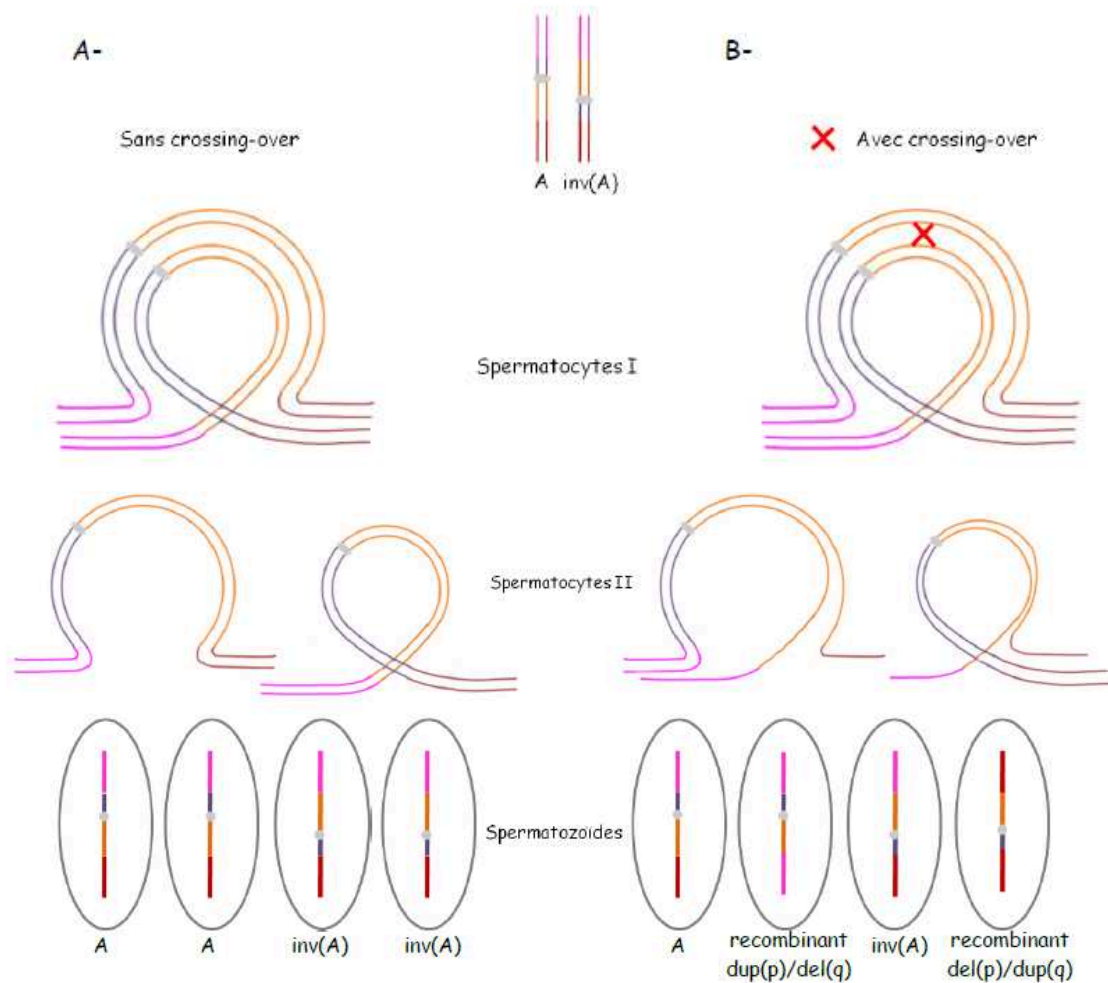


Figure 12 – Formation d’une boucle d’inversion au stade pachytène de la méiose I et équipement chromosomique des gamètes après ségrégation méiotique chez un patient porteur d’une inversion péricentrique (thèse d’Aurore Perrin).

les chromosomes 2 et 8 (Morel *et al.* 2007). Le pourcentage de gamètes recombinants chez un patient porteur d’une inversion péricentrique est hétérogène entre 0 et 43,9% (Anton *et al.* 2005, Morel *et al.* 2007, Pan *et al.* 2012). Cette variation s’explique par le chromosome impliqué, la région inversée, les points de cassure mais surtout par le ratio de la taille du segment inversé par rapport à la taille totale du chromosome impliqué. En effet, si la taille du segment inversé est inférieure à 30% de la taille du chromosome impliqué, il n’y aura pas de production de gamètes recombinants. Entre 30% et 50%, quelques gamètes recombinants peuvent être produits. Le risque de production des gamètes recombinants devient important quand le segment inversé est supérieur à 50% de la taille du chromosome impliqué (Morel *et al.* 2007).

2.2.4 Réarrangements chromosomiques complexes

Chez l'homme, la présence d'un réarrangement chromosomique complexe peut facilement altérer le synapsis chromosomique au cours de la prophase I de méiose et faciliter l'association avec le bivalent X-Y provoquant l'arrêt de la spermatogenèse. Pourtant, chez quelques hommes porteurs d'un CCR, la spermatogenèse peut être finalisée en produisant une fréquence élevée de spermatozoïdes chromosomiquement anormaux dus à la ségrégation aberrante des chromosomes réarrangés lors de la méiose.

Chez les patients porteurs d'un CCR de type "three-way", une configuration d'hexavalent sera formée lors de la méiose I entraînant différents modes de ségrégation méiotique : 3:3, 4:2, 5:1, 6:0 formant des gamètes déséquilibrés (Pellestor *et al.* 2011) (Figure 13).

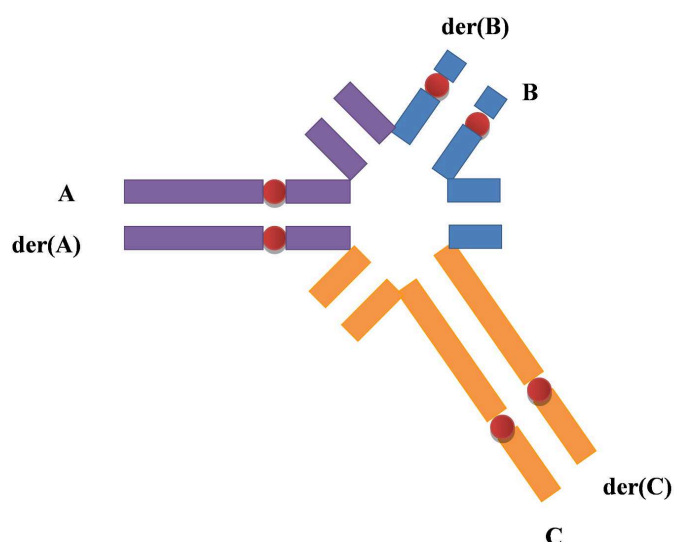


Figure 13 – Configuration en hexavalent lors du stade pachytène de la méiose I pour un CCR three-way.

La formation d'hexavalent permet d'avoir 20 combinaisons chromosomiques, seul le mode alterne peut former les gamètes chromosomiquement normaux ou équilibrés, les 18 autres combinaisons sont chromosomiquement déséquilibrées. Si la disjonction est asymétrique, 44 gamètes déséquilibrés peuvent être produits. Il est à noter que les gamètes issus du mode de ségrégation alterne sont relativement rares et que les modes de ségrégation méiotique 3:3 et 4:2 sont les plus fréquents (Godo *et al.* 2013).

Le type CCR "double two-way exchange" doit former deux quadrivalents indépendants. La ségrégation méiotique donne ensuite différentes combinaisons qui

forment des gamètes chromosomiquement équilibrés et déséquilibrés (Soler *et al.* 2005).

La ségrégation méiotique d'un CCR exceptionnel provoque plus de gamètes anormaux. Dans l'étude d'une femme porteuse d'un CCR avec 5 points de cassure incluant une translocation et une inversion, il a été démontré plus de 70 gamètes déséquilibrés différents, correspondant à la configuration octavalent (Kausch *et al.* 1988). Chez l'homme, la spermatogenèse est plus sensible que l'ovogenèse et peut être arrêtée à cause du point de contrôle du stade pachytène. L'homme porteur d'un CCR exceptionnel est souvent azoospermique (Coco *et al.* 2004, Bartels *et al.* 2007). En effet, la complexité du CCR pourrait augmenter la gravité de la déficience spermatogénétique plutôt que le nombre de chromosomes impliqués ou la localisation de points de cassure (Kim *et al.* 2011).

L'analyse par FISH de 667 gamètes chez un homme porteur d'un CCR équilibré $t(5;13;14)$ a montré que 69,4% des gamètes étaient chromosomiquement déséquilibrés, 27% des gamètes étaient chromosomiquement normaux ou équilibrés et 3,15% des gamètes présentaient des signaux inattendus correspondants aux non-disjonctions lors de la deuxième division méiotique (Liehr *et al.* 2002, Pellestor *et al.* 2011). En combinant la FISH avec le PRINS (Primed *in situ* labelling), Loup *et al.* ont analysé l'équipement chromosomique de 1822 spermatozoïdes chez un patient porteur d'un CCR $t(1;19;13)$. Ils ont trouvé que 75,9% des gamètes étaient chromosomiquement déséquilibrés, 14,8% étaient chromosomiquement normaux ou équilibrés et 9,3% présentaient des combinaisons des signaux inattendus (Loup *et al.* 2010).

Toutes les études ont montré une production des gamètes chromosomiquement déséquilibrés très élevée chez un patient porteur d'un CCR. Le diagnostic préimplantatoire est donc recommandé chez les couples dont le/la conjoint(e) présente un CCR lors d'une ICSI/FIV (Pellestor *et al.* 2011).

2.2.5 Marqueur chromosomique surnuméraire

La spermatogenèse chez un homme porteur d'un marqueur chromosomique surnuméraire peut être perturbée à cause de l'excès de matériel hétérochromatique ou euchromatique. Théoriquement, la méiose dans les spermatogonies 47,XY,+mar formera un nombre identique de spermatozoïdes normaux et de spermatozoïdes avec le marqueur (Figure 14).

Certains auteurs ont montré que la fréquence de spermatozoïdes ayant un marqueur chromosomique surnuméraire n'est pas différente de 50% chez les hommes porteurs d'un

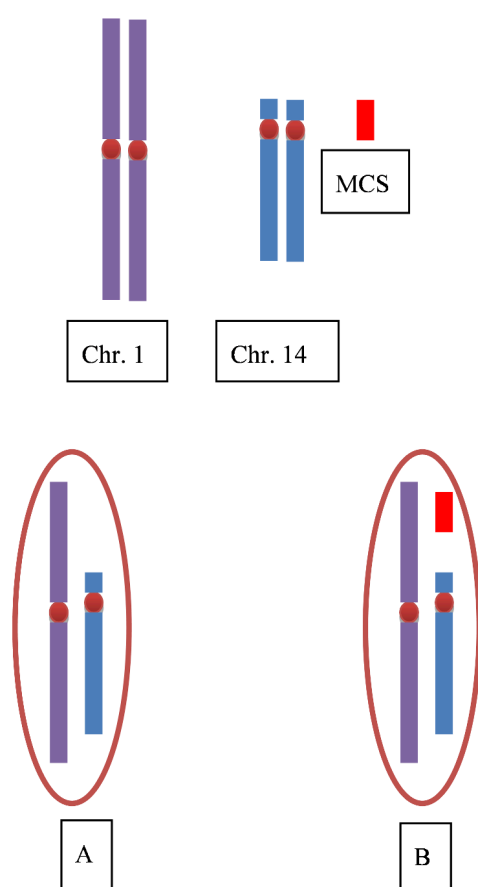


Figure 14 – Ségrégation méiotique théorique chez un homme porteur d'un marqueur chromosomique surnuméraire (MCS) : 50% de spermatozoïdes chromosomiquement normaux (A) et 50% de spermatozoïdes présentant le MCS (B).

marqueur chromosomique surnuméraire (Martin *et al.* 1986, Mennick *et al.* 1997). Par contre, dans d'autres études, le pourcentage de spermatozoïdes ayant le marqueur varie de 6% à 37% (Cotter *et al.* 2000, Oracova *et al.* 2009, Guediche *et al.* 2012).

3. Analyse de l'équipement chromosomique dans les gamètes mâles

Environ 0,52% des nouveau-nés sont porteurs d'une anomalie chromosomique de nombre ou de structure (Van Assche *et al.* 1996). Approximativement 10 à 15% de toutes les grossesses se terminent par un avortement spontané et plus de 50% des produits de fausses couches présentent des anomalies chromosomiques (Eiben *et al.* 1990, Gardo et Bajnoczky. 1992, Bettio *et al.* 2008). Par conséquent, il est estimé que 50% de toutes les conceptions possèdent une anomalie chromosomique (Boué *et al.* 1975) et 1% à 2% des conceptions connues sont formées par un

spermatozoïde chromosomiquement anormal (Jacobs. 1971). L'analyse de l'équipement chromosomique dans les gamètes mâles permet d'une part de mieux comprendre les mécanismes de la ségrégation méiotique et d'autre part d'évaluer le risque d'avoir une conception avec un spermatozoïde anormal, surtout lors d'une AMP. L'analyse des chromosomes dans un gamète mâle se fait par la fécondation du spermatozoïde humain avec un ovocyte de hamster doré ou par la technique de FISH directement sur les noyaux des spermatozoïdes.

3.1. Fécondation hétérospécifique du spermatozoïde humain avec l'ovocyte de hamster doré

L'étude des chromosomes dans les spermatozoïdes par la coloration en bande s'avère difficile à cause de la compaction du nucléus spermatique. Le nucléus spermatique est réactivé et décondensé dans le cytoplasme de l'ovocyte. Le fait qu'un spermatozoïde humain est capable de pénétrer dans un ovocyte dépellucidé de hamster doré après quelques heures d'incubation a été mis en évidence pour la première fois par Yanagimachi *et al.* en 1975 dans le but d'évaluer la capacité de fertilisation des spermatozoïdes humains dans le cas où les ovocytes humains ne sont pas toujours disponibles (Yanagimachi *et al.* 1975). Plus tard, cette découverte est utilisée pour étudier l'équipement chromosomique dans les gamètes mâles par une coloration en bandes C (Rudak *et al.* 1978) ou bandes G (Martin *et al.* 1982). En fait, les analyses ont montré que la fréquence de spermatozoïdes chromosomiquement anormaux était de 5% (3/60) dans l'étude de Rudak et de 9,2% (22/240) dans l'étude de Martin (Rudak *et al.* 1978, Martin *et al.* 1982). Cette méthode permet de détecter les anomalies chromosomiques de nombre et de structure dans les spermatozoïdes. Pourtant elle n'était pas appliquée largement à cause du prix, de la main-d'œuvre et de la difficulté de mise en place. De plus, seulement les spermatozoïdes qui sont capables de pénétrer dans l'ovocyte de hamster doré peuvent être analysés tandis que les spermatozoïdes ayant une mobilité réduite ou une morphologie anormale ne sont pas capables de fertiliser l'ovocyte d'hamster.

3.2. Hybridation in situ fluorescente (FISH)

Des sondes d'ADN spécifique de chromosomes ont d'abord été marquées avec des composants radioactifs permettant la détection de la sonde hybridée (Joseph *et al.* 1984) puis avec des fluorochromes (Pieters *et al.* 1990) permettant la détection

simultanée de multiples chromosomes. Dans les années 1990s, cette technique a été largement utilisée afin d'évaluer l'aneuploïdie dans les spermatozoïdes, surtout les chromosomes 13, 18, 21, X et Y à cause de maladies connues liées à ces chromosomes. Cette méthode est très sensible et spécifique, permettant une analyse fiable sur un nombre de spermatozoïdes beaucoup plus grand que la méthode mentionnée avant. De plus, l'analyse par la FISH n'est pas affectée par la capacité de féconder ou la morphologie des spermatozoïdes (Egozcue *et al.* 1997, Robbins *et al.* 1997). Quant au comptage des chromosomes aneuploïdes, il faut déterminer le nombre et les caractères des signaux avec des critères très stricts : (1) ne pas compter les spermatozoïdes superposés ou dont la tête spermatique n'est pas bien définie, (2) ne compter que les signaux avec la même intensité et les signaux doivent être séparés les uns des autres par une distance au moins égale au diamètre d'un signal, (3) les nullisomies ne sont pas comptées directement mais considérées comme équivalent à l'incidence de disomies (Blanco *et al.* 1996). Ces critères permettent d'éliminer les variations subjectives. La limitation de cette technique est qu'elle ne peut détecter les anomalies que pour les chromosomes étudiés et qu'elle ne donne aucune information pour les autres chromosomes.

Plusieurs études sur l'analyse de l'équipement chromosomique dans les spermatozoïdes chez les hommes porteurs d'une anomalie de nombre et de structure ont été réalisées. Ces études permettent d'une part de mieux comprendre le mécanisme de ségrégation méiotique lors de la spermatogenèse et d'autre part d'évaluer le risque de transfert d'une anomalie aux descendances de ces hommes et également de personnaliser au mieux les conseils génétiques lors d'une AMP (Rives *et al.* 2005, Anton *et al.* 2007).

B. Infertilité masculine et fragmentation de l'ADN spermatique

1. Structure de la chromatine spermatique

Dans les cellules somatiques, 147 pb d'ADN s'enroulent autour d'un octamère d'histone pour former un nucléosome. Chaque octamère complexe contient deux copies de chaque histone H2A, H2B, H3 et H4 (Kornberg and Thomas, 1974). Pendant la spermiogenèse (post-méiotique), l'ADN spermatique subit une sévère métamorphose

afin d'être bien protégé dans un petit nucléus. Dans ce processus, l'ubiquitination des histones H2A et H2B promeut l'acétylation d'histone H4. Ces modifications des histones rendent l'ADN plus accessible aux modifications créées par la topoisomérase II et facilitent le remplacement des histones par des protéines de transition PT1 et PT2 (Oliva. 2006, Lu *et al.* 2010, Carrell. 2012). L'absence d'une protéine peut être compensée par l'autre pour que la production des spermatozoïdes soit assurée (Yu *et al.* 2000, Zhao *et al.* 2001). Les protéines de transition sont ensuite complètement remplacées par des protamines P1 et P2. Les protamines sont des protéines riches en arginine (70%) qui contiennent des charges positives par le groupe NH_3^+ . Une fois la protamine liée à l'ADN, la formation des ponts disulfures entre les cystéines des protamines se fait afin de stabiliser le complexe nucléoprotamine (Balhorn. 2007). Par conséquent, grâce à la formation des ponts disulfures, la chromatine spermatique est environ 10 fois plus condensée que celle des cellules somatiques (Miller *et al.* 2010) (Figure 15). Quand le spermatozoïde féconde un ovocyte, la chromatine est décondensée par la réduction des ponts disulfures entre les protamines permettant d'enlever des protamines et de réorganiser l'ADN en nucléosome (Oliva. 2006).

Le remodelage de la chromatine spermatique est indispensable. D'abord, la réduction de la taille et la forme du nucléus spermatique rend au spermatozoïde une structure hydrodynamique permettant de se déplacer plus vite, d'être capable de féconder un ovocyte en premier. Ensuite, la compaction de l'ADN par les protamines protège le génome paternel des attaques de nucléases ou d'autres agressions lors des transits dans les tractus génitaux. Ces deux caractéristiques ont été évolutivement optimisées afin de conserver l'intégrité du génome au long du trajet dans l'appareil reproductif féminin jusqu'à la fécondation. Les protamines sont indispensables pour la réussite de la fécondation. En fait, l'altération de la quantité des protamines provoque une condensation de la chromatine spermatique incomplète entraînant la susceptibilité aux dommages de l'ADN qui résulte en un échec du développement embryonnaire lors de l'ICSI (Cho *et al.* 2001, 2003). Les protamines participent également à la mise en place de l'empreinte du génome paternel et peuvent accorder une marque épigénétique dans le génome spermatique qui affecte la réactivation ou la répression du génome lors de la fécondation (Jodar et Oliva. 2014).

La plupart des histones est remplacée par des protamines pendant la spermiogenèse, une fraction de 3% à 15% du génome paternel échappe à la protamination chez les hommes fertiles (Oliva. 2006, Hammoud *et al.* 2011). Ces régions encodent des transcrits nécessaires pendant la compaction, ou contiennent des gènes indispensables pour le

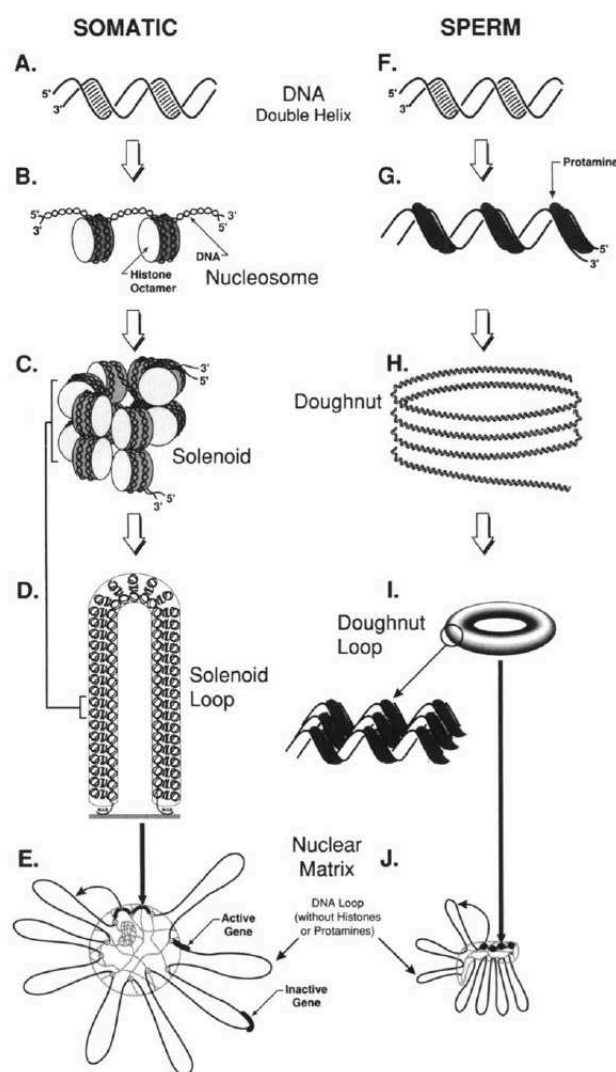


Figure 15 – Structure de la chromatine de la cellule somatique (à gauche) et du spermatozoïde (à droite) (selon Ward. 1993).

développement de l'embryon, ou assurent la décondensation de la chromatine après la fécondation (Balhorn. 2007, Li *et al.* 2008). La distribution des histones et protamines le long de la chromatine paternelle ne se fait pas au hasard (Wykes et Krawetz. 2003, Hammoud *et al.* 2011, Carrell. 2012). En fait, les promoteurs des gènes *PRM1*, *PRM2*, *TP2* (rôle dans la condensation de la chromatine) et les gènes *IGF2* et *SOCS1* (qui ont un rôle important pour le développement précoce de l'embryon) sont riches en histones (Wykes et Krawetz. 2003). De plus, plusieurs gènes associés aux facteurs de développement comme *EVX1*, *EVX2*, *ID1*, *STAT3*, *KLF5*, *FGF9*, *SOX7* et *SOX9* sont marqués par des modifications des histones avec la transcription active lors de la délivrance dans l'ovocyte (Hammoud *et al.* 2009). En outre, la modification des

histones contribue au stade pluripotent des cellules souches embryonnaires (Hammoud *et al.* 2009, Jenkins and Carrell. 2012). Il est donc vraisemblable que la rétention des histones et ses modifications sont très importantes pour non seulement une fonction normale des spermatozoïdes mais également une embryogenèse normale.

2. Origines de la fragmentation de l'ADN spermatique

Les dommages de l'ADN dans les lignées des cellules germinales peuvent être à l'origine de l'infertilité, des fausses couches et des anomalies congénitales dans la descendance (Aitken *et al.* 2009). L'ADN cassé est un processus physiologique pendant la maturation des spermatozoïdes (Marcon et Boissonneault. 2004, Sakkas et Alvarez. 2010). La topoisomérase a été considérée comme une candidate idéale permettant l'accès à la structure hyperenroulée de l'ADN (Laberge et Boissonneault. 2005b). Les topoisomérases de type II sont impliquées dans plusieurs processus, y compris la réplication de l'ADN, la transcription, la séparation des chromatides, et la condensation des chromosomes. Elles modifient la topologie de l'ADN par des coupures double-brin (DSB) et sa nouvelle ligature ultérieure (Wang. 2002). Chez l'homme, il y a deux isoformes de la topoisomérase : topoisomérase II α et topoisomérase II β . Il a été montré que l'hyperacétylation des histones H3 et H4 était une condition préalable pour que la topoisomérase II β cause les cassures double brin de l'ADN (Laberge et Boissonneault. 2005a). En fait, l'hyperacétylation de ces histones diminue l'affinité des histones à l'ADN permettant de retirer les nucléosomes et ainsi de relâcher l'ADN superenroulé (Leduc *et al.* 2008a, Leduc *et al.* 2008b, Meyer-Ficca *et al.* 2011).

L'intégrité de l'ADN spermatique peut être affectée tout au long de la différenciation depuis les spermatogonies jusqu'aux spermatozoïdes matures. Le spermatozoïde possédant un ADN fragmenté est capable de féconder un ovocyte et de compléter les 2-3 premiers clivages du zygote. Pourtant la formation du blastocyste va être bloquée induisant l'apoptose (Fatehi *et al.* 2006). L'ADN cassé peut être restauré par des systèmes de réparation de l'ovocyte et dans l'embryon (Wells *et al.* 2005, Gasca *et al.* 2007). La capacité de réparation de l'ovocyte dépend du cytoplasme et de la qualité génomique de l'ovocyte qui est influencée par l'âge maternel. En plus, l'efficacité de la réparation dépend également de la qualité de l'ADN paternel (Sakkas *et al.* 2010). Si l'ovocyte fait des erreurs lors de la réparation des cassures de l'ADN paternel après la fécondation, il provoque des mutations *de novo* dans l'embryon qui peuvent avoir un impact sur la santé de la descendance.

Dans un éjaculat, il subsiste toujours quelques spermatozoïdes présentant un ADN fragmenté. Mais pour diverses raisons, il est possible d'avoir un taux anormalement élevé de spermatozoïdes avec un ADN fragmenté. La fragmentation de l'ADN peut se faire pendant le processus de production ou bien lors du transport des spermatozoïdes. Plusieurs mécanismes responsables de la fragmentation de l'ADN sont proposés : le défaut de la compaction de l'ADN spermatique, l'apoptose abortive pendant la spermatogenèse, les substances oxygénées réactives (SOR) et des facteurs environnementaux (pesticides, tabac, toxique...).

2.1. Défaut du remodelage de la chromatine spermatique

Les altérations du remodelage de la chromatine pendant la spermiogenèse peuvent provoquer une fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes éjaculés. Comme présenté précédemment, la compaction de la chromatine spermatique nécessite des activités endonucléasiques afin de créer et ligaturer des cassures dans le but de faciliter la protamination. Les altérations dans le contrôle de ce processus peuvent causer des anomalies du remodelage de la chromatine et des cassures de l'ADN non réparées persistant dans les gamètes matures (Leduc *et al.* 2008a, Sakkas and Alvarez. 2010).

La protamine P1 est synthétisée comme une protéine mature tandis que la protamine P2 est générée par la protéolyse d'un précurseur (Oliva. 2006). Chez l'homme, le ratio normal P1/P2 est de 1:1. Une corrélation positive a été démontrée entre la présence du ratio P1/P2 altéré ou la présence du précurseur de la protamine 2 et la présence des dommages de l'ADN (Aoki *et al.* 2005, Torregrosa *et al.* 2006, Castillo *et al.* 2011). D'une part, les protamines P1 et P2 ne sont pas distribuées aléatoirement tout le long de l'ADN. D'autre part, ces deux molécules peuvent incorporer les différentes séquences d'ADN selon leur taille moléculaire (Aoki *et al.* 2005). Le ratio incorrect des protamines peut provoquer une diminution de la quantité de protamines liées à l'ADN. Par conséquent, un nombre trop faible de ponts disulfures rend la chromatine spermatique moins bien protégée. Une chromatine moins protégée et des cassures endogènes non réparées rendent les spermatozoïdes plus susceptibles aux attaques post-testiculaires.

2.2. Substances oxygénées réactives

Les substances oxygénées réactives sont des agents oxydants dont le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion superoxyde (O_2^-) et des radicaux libres. Ils peuvent se

combiner avec d'autres molécules provoquant directement l'oxydation qui induit des changements de la structure et de la fonction cellulaire. La production des SOR est un processus physiologique normal, pourtant le déséquilibre entre la génération des SOR et leur activité peut être nuisible pour les spermatozoïdes et être associé à l'infertilité masculine. Il a été démontré qu'une faible dose de stress oxydatif peut avoir des effets bénéfiques comme stimuler la fusion du spermatozoïde avec l'ovocyte et réguler la capacitation des spermatozoïdes et la réaction acrosomiale (Agarwal *et al.* 2004). Pourtant, avec un stress oxydatif plus important, la chromatine spermatique commence à être fragmentée et une perte de la capacité de fécondation des spermatozoïdes a été notée (Aitken *et al.* 1998). De plus, chez les hommes subfertiles, lorsque l'ADN subit l'action des SOR, la production de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OHdG), un marqueur du stress oxydatif, est augmentée (Kodama *et al.* 1997). Une forte corrélation entre la formation des 8OHdG dans les spermatozoïdes, la fragmentation de l'ADN et une protamination déficiente a été observée (De Iuliis *et al.* 2009). Cette corrélation indique que la plupart des dommages de l'ADN spermatique est induite par le stress oxydatif (Aitken *et al.* 2014).

Des SOR sont produits majoritairement par les leucocytes et les spermatozoïdes eux-mêmes, notamment les immatures et les défectueux (Aitken *et al.* 1994, Barroso *et al.* 2000, Sati *et al.* 2008). Tous les spermatozoïdes humains contiennent des leucocytes particulièrement des neutrophiles et des macrophages. A cause de leur capacité à générer des SOR, ils peuvent produire une quantité importante de SOR exogènes dans le sperme humain (Aitken et West. 1990). Si les leucocytes sont présents dans le liquide séminal dans un état activé et produisent des radicaux libres, ils sont capables de générer des dommages oxydatifs pour les spermatozoïdes (Aitken et De Iuliis. 2010). La production des SOR est associée avec la fragmentation de l'ADN spermatique (Alvarez *et al.* 2002, Kullisaar *et al.* 2008, Haidl *et al.* 2008).

Quant aux spermatozoïdes, la mitochondrie est la source majeure générant des SOR. En fait, l'apoptose est une condition par défaut pour les spermatozoïdes en absence de fécondation. Ce processus est caractérisé par une perte rapide de la mobilité, la production de SOR par les mitochondries, l'activation des caspases dans le cytosol, l'exposition de la phosphatidylsérine à la surface cellulaire et des dommages de l'ADN (Koppers *et al.* 2011). Il est démontré que l'augmentation de la concentration des leucocytes séminaux est non seulement la cause de la production des SOR séminaux mais est également capable de déclencher des caspases dans les cellules germinales et la production des SOR intrinsèques par les spermatozoïdes eux-mêmes (Mupfiga *et al.*

2013)

Aitken *et al* ont proposé deux étapes par lesquelles les dommages de l'ADN spermatique sont générés. Ils ont suggéré qu'il y a plusieurs facteurs génétiques, métaboliques et environnementaux pouvant perturber la spermiogenèse, ce qui provoque une sous-protamination, un ratio P1/P2 anormal, une persistance importante des histones dans les spermatozoïdes. Ces défauts lors du remodelage de la chromatine donnent aux spermatozoïdes une susceptibilité accrue aux attaques par des SOR. Ensuite, à leur tour, les SOR vont attaquer la chromatine spermatique, qui n'est pas bien protégée à cause d'un mauvais remodelage, et vont induire la formation de bases oxygénées (8OHdG), ce qui résulte en des cassures de l'ADN (Aitken et Koppers. 2011, Aitken *et al.* 2013) (Figure 16)

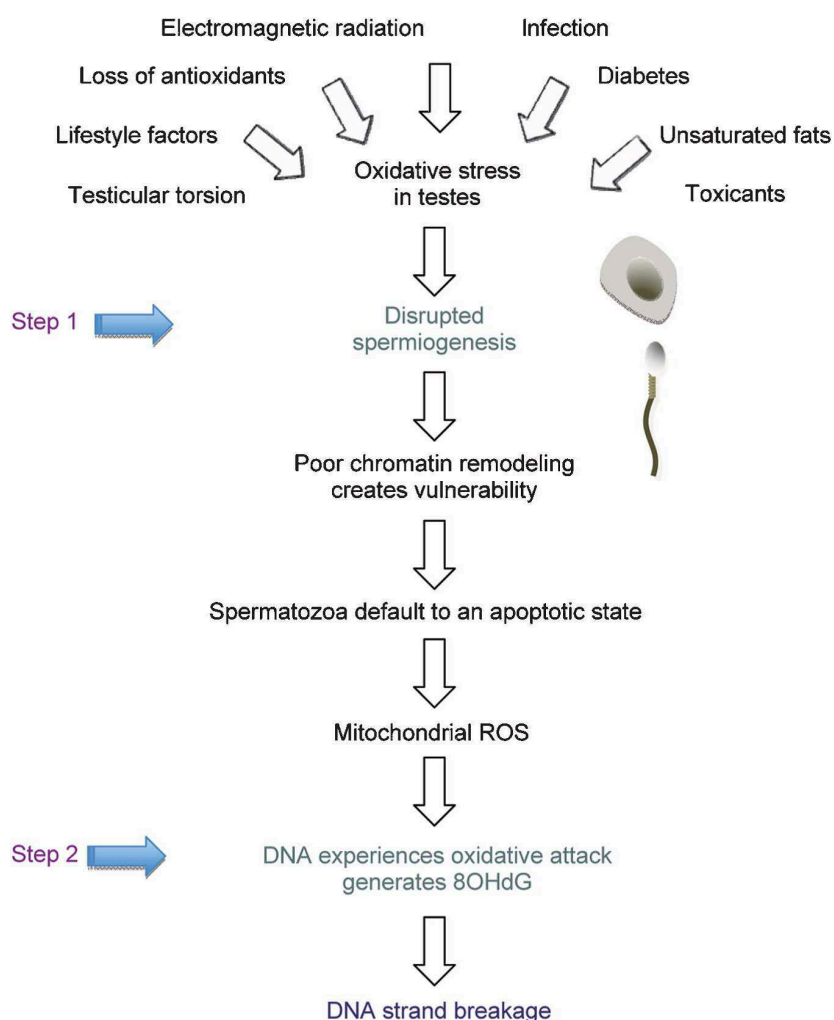


Figure 16 – Deux étapes de la production des dommages de l'ADN spermatique (selon Aitken et Koppers. 2011, Aitken *et al.* 2013).

En effet, la défense par les antioxydants de la voie intrinsèque des spermatozoïdes

est très faible parce que leur cytoplasme où se trouvent des enzymes antioxydantes, est peu important. La source majeure des antioxydants vient du liquide séminal (Zini *et al.* 2009). Il est démontré que les antioxydants totaux dans le sperme sont corrélés négativement avec les dommages oxydatifs et la capacité de fécondation (Madfouz *et al.* 2009).

2.3. Apoptose

L'homéostasie cellulaire est régulée par non seulement le développement et la différenciation des cellules mais également par la mort cellulaire programmée appelée "apoptose". L'apoptose est indispensable lors d'une spermatogenèse fonctionnelle dans le testicule. Dans le testicule, les cellules germinales se multiplient *via* des séries de mitoses avant la différenciation pour former les spermatozoïdes matures. Cette expansion clonale est excessive, il faut avoir un mécanisme afin d'harmoniser le nombre des cellules germinales avec la capacité des cellules de Sertoli qui régulent la prolifération et la différenciation des cellules germinales. Par conséquent, environ 50-70% de cellules germinales subissent l'apoptose aux différents stades de la spermatogenèse (Billig *et al.* 1995).

En fait, le facteur impliqué dans l'apoptose lors de la spermatogenèse est une protéine membranaire, Fas, un facteur tumoral. Cette protéine est liée avec Fas ligant (FasL) ou l'anticorps anti-Fas afin de déclencher l'apoptose. Le système Fas-FasL joue un rôle important dans l'élimination des cellules germinales apoptotiques dans le testicule humain (Pentikäinen *et al.* 1999). Les cellules de Sertoli expriment des FasL et signalent la mort des cellules germinales Fas+ en respectant le nombre des cellules germinales qu'elles peuvent supporter (Lee *et al.* 1997). Pourtant, l'existence d'une population de spermatozoïdes éjaculés présentant des marqueurs apoptotiques peut être expliquée par l'hypothèse de "l'apoptose abortive". En fait, les cellules de la lignée germinales marquées Fas+ doivent être éliminées par l'apoptose pendant la spermatogenèse. Mais il est possible que certaines d'entre elles aient échappé à ce processus et complété leur maturation jusqu'aux spermatozoïdes en gardant les signes apoptotiques acquis par leurs précurseurs (Sakkas *et al.* 1999b, Sakkas *et al.* 2002) (Figure 17).

D'ailleurs, dans les dernières étapes de la spermiogenèse, l'apoptose sert non seulement en tant que mécanisme de la mort cellulaire programmée, mais en tant que moyen pour faciliter le remodelage cytoplasmique qui se produit pendant les

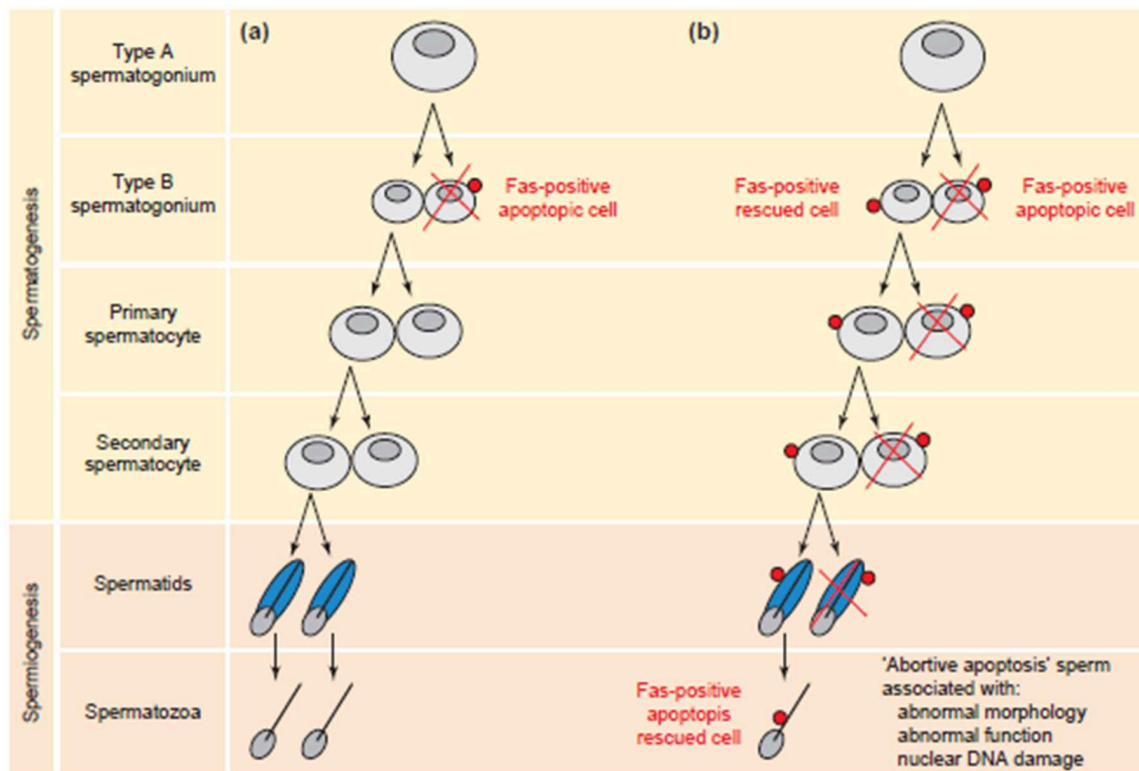


Figure 17 – Rôle de Fas pendant la spermatogenèse chez l’homme avec des paramètres spermatozoaires normaux (a) et anormaux (oligozoospermie, asthénozoospermie et tératozoospermie) (b) (adapté de Sakkas *et al.* 1999b).

étapes finales de la maturation du spermatozoïde (Sakkas *et al.* 2010). De plus, les spermatides présentent plusieurs signatures histologiques et moléculaires de l’apoptose. Le cytoplasme des spermatides au cours de la maturation est collecté et éliminé sous forme de corps résiduels. Ces derniers expriment des caspases apoptotiques et contiennent des protéines liées à la régulation de la mort cellulaire comme FLIP, Fas, p53, c-Jun (Blanco-Rodriguez et Martinez-Garcia. 1999). Ces observations expliquent probablement la capacité des cellules de Sertoli à reconnaître et phagocyter les corps résiduels (El-Domyati *et al.* 2009). Bien que les spermatozoïdes matures ne contiennent plus de corps résiduels, ils conservent du cytoplasme. L’apoptose abortive pourrait être liée au défaut de remodelage du cytoplasme lors de la spermatogenèse (Sakkas *et al.* 2002).

D’ailleurs, d’autres intervenants de la voie apoptotique sont des caspases enzymatiques. Les caspases 8 et 9 sont activées via Fas-Fas ligand dans la membrane interne de la mitochondrie. Ils transmettent un signal à leur effecteur comme la caspase 3 ce qui active les DNases résultant en la dégradation de l’ADN spermatozoaire et

l'apoptose. La corrélation entre le taux de la fragmentation de l'ADN et les caspases apoptotiques (caspases 3, 8, 9) a été démontrée dans l'éjaculat des hommes infertiles suggérant que l'apoptose serait un phénomène dépendant des caspases (Brugnon *et al.* 2010).

2.4. Autres facteurs

Il est évident que le cancer et le traitement du cancer affectent négativement la fertilité masculine. Les agents alkylants ainsi que les radiations anticancéreuses peuvent induire des cassures de l'ADN simple brin (Spermon *et al.* 2006, Smit *et al.* 2010, O'Flaherty *et al.* 2012, Bujan *et al.* 2013). En fait, la spermatogenèse est réduite par le traitement. Les spermatogonies sont affectées par les agents cytotoxiques en induisant des dommages de l'ADN. Ces dommages peuvent être réparés pendant la mitose. Pourtant le fait qu'il existe une augmentation de spermatozoïdes avec un ADN fragmenté supporte l'hypothèse d'une population des cellules germinales avec un ADN fragmenté (Morris. 2002).

Les toxiques environnementaux comme les pesticides, la pollution de l'air, les métaux lourds... affectent aussi l'intégrité de la chromatine spermatique (Perry. 2008, Sakkas *et al.* 2010, Barratt *et al.* 2010).

3. Evaluation de la fragmentation de l'ADN dans les gamètes mâles

Différentes techniques ont été développées afin d'évaluer les dommages dans la chromatine spermatique. Ces méthodes sont capables de détecter directement ou indirectement les cassures de l'ADN spermatique.

3.1. Test au bleu d'aniline

Cette méthode a été décrite par Terquem et Dadoune en 1983 (Terquem et Dadoune. 1983). Elle est basée sur le fait que le bleu d'aniline a une forte affinité pour les résidus lysines des histones nucléaires. La persistance des histones dans le noyau spermatique indique une protamination incomplète de la chromatine spermatique. Les noyaux riches en histones des spermatozoïdes immatures prennent plus le bleu d'aniline tandis que les noyaux riches en protamines des spermatozoïdes matures ne sont pas colorés.

Cette technique permet donc d'évaluer le degré de la compaction ou maturation de la chromatine spermatique.

3.2. Test CMA3 (Chromomycine A3)

La chromomycine A3 est un fluorochrome spécifique pour les séquences riches en G-C et se lie avec l'ADN aux mêmes sites que les protamines. Ainsi l'intensité du CMA3 indique le degré de la protamination (Shamsi *et al.* 2011).

3.3. Test de comètes

Le test de comètes (aussi appelé Single Cell Gel Electrophoresis Assay) est une technique d'électrophorèse sur microgel d'agarose permettant de détecter et quantifier la détérioration de l'ADN dans des spermatozoïdes individualisés. Les cassures simples ou doubles brins peuvent être détectées ainsi que les sites de réparation incomplets.

Cette technique est mise au point en 1984 par Ostling et Johanson sur une lignée cellulaire de lymphome de souris (Ostling et Johanson. 1984) et optimisée sur les lymphocytes humains par Singh *et al* en 1988 (Singh *et al.* 1988). L'équipe de Singh a modifié avec succès cette technique pour l'adapter aux spermatozoïdes (Singh *et al.* 1989). L'ADN intact apparaît comme une sphère, au contraire, l'ADN cassé s'étire proportionnellement au nombre de cassures et forme l'aspect d'une comète (d'où le nom de la technique).

3.4. Test SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay)

Le test SCSA est basé sur le fait qu'un tampon acide (pH=1,2) ou la chaleur peut dénaturer l'ADN au niveau des sites de cassures simple ou double brin, tandis que l'ADN double brin normal reste intact. Ensuite, la chromatine spermatique est colorée avec de l'acridine orange qui va colorer de manière différentielle l'ADN double et simple brin grâce à ses propriétés métachromatiques. Sous l'excitation de la lumière bleue en cytométrie en flux, l'ADN intact (double brin) émet une fluorescence verte, tandis que l'ADN cassé (simple brin) émet une fluorescence rouge. Le calcul du DFI (DNA Fragmentation Index) se base sur le ratio de la fluorescence rouge sur la fluorescence totale. Il permet d'évaluer le taux de l'ADN dénaturé (Evenson *et al.* 1980, Evenson *et al.* 1999).

3.5. Test à l'acridine orange

Le test à l'acridine orange est introduit comme un test SCSA simplifié en utilisant un microscope à fluorescence (Tejada *et al.* 1984). Le nombre des spermatozoïdes émettant une fluorescence rouge indique le taux des spermatozoïdes avec un ADN simple brin, c'est-à-dire l'estimation du nombre de spermatozoïdes avec un ADN fragmenté.

3.6. Test SCD (Sperm Chromatin Dispersion)

Le test SCD a été utilisé pour la première fois en 2003 par l'équipe de Fernandez (Fernandez *et al.* 2003). Le SCD est basé sur le test halo pour détecter les dommages de l'ADN (Roti Roti et Wright. 1987). En fait, les spermatozoïdes sont traités par une solution acide puis par un tampon de lyse. Les spermatozoïdes avec un ADN fragmenté ont un petit ou aucun halo, à l'inverse des spermatozoïdes avec un ADN intact.

3.7. Test TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labelling)

Cette technique a été développée, pour les cellules somatiques, par Garvieli *et al.* en 1992 et appliquée pour la première fois sur les spermatozoïdes par l'équipe de Gorczyca un an plus tard (Gorczyca *et al.* 1993). Le principe de ce test est basé sur la présence des extrémités 3'-OH libres lorsque l'ADN est fragmenté (Figure 18). Une enzyme TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) qui est capable d'ajouter des UTP à ces extrémités 3'-OH, est ajoutée. Ces UTP sont couplés à la digoxygénine qui va être capturée par les anticorps anti-digoxygénine. Ces derniers sont couplés à un fluorochrome qui permet l'observation au microscope à fluorescence.

La fragmentation de l'ADN spermatique détectée par TUNEL est associée à la morphologie anormale des spermatozoïdes (Mehdi *et al.* 2009). Un taux élevé de la fragmentation de l'ADN spermatique semble être associé à la diminution des résultats en FIV (Frydman *et al.* 2008). La fragmentation de l'ADN spermatique évaluée par la technique TUNEL paraît être un bon indicateur de la fertilité masculine (Sergerie *et al.* 2005).

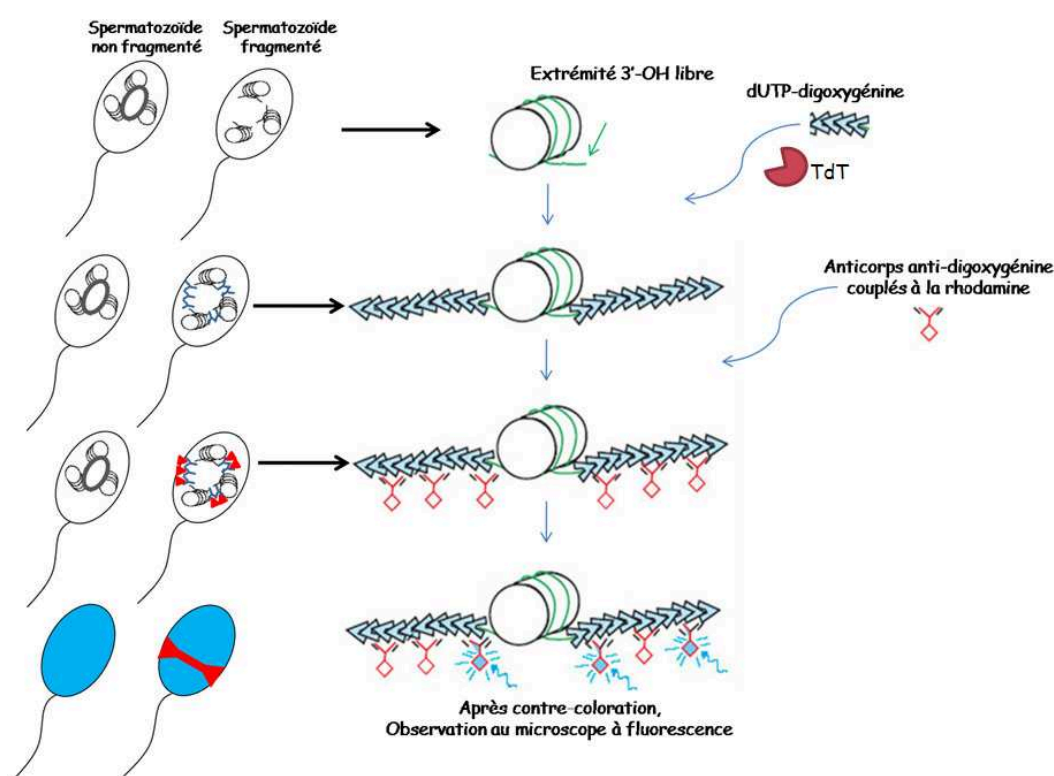


Figure 18 – Principes de la technique TUNEL sur les spermatozoïdes.

4. Fragmentation de l'ADN spermatique et infertilité

Le taux de fragmentation est supérieur chez les patients infertiles par rapport à des témoins fertiles (Saleh *et al.* 2002, Zini *et al.* 2005, Sharma *et al.* 2010). Parmi les hommes infertiles, il n'y a pas de différence significative entre le DFI de ceux ayant des paramètres spermatiques normaux et ceux avec des paramètres anormaux. Ceci suggère donc que l'analyse de la fragmentation de l'ADN spermatique révèle des causes cachées chez les hommes infertiles, présentant une infertilité idiopathique, et ce même avec des paramètres spermatiques normaux (Saleh *et al.* 2002). En outre, Zini et ses collègues ont utilisé le test à l'acridine orange et le test TUNEL afin d'évaluer le taux de l'ADN dénaturé et de l'ADN fragmenté dans les spermatozoïdes des hommes infertiles par rapport aux hommes fertiles. Ils ont trouvé que les résultats de ces deux méthodes sont bien corrélés et que le taux de spermatozoïdes avec un ADN dénaturé et un ADN fragmenté est de 25% et 28%, respectivement chez les hommes infertiles, tandis que chez les hommes fertiles, ces taux sont de 10% et 13%, respectivement. Ils ont remarqué également que chez les hommes infertiles un taux de l'ADN fragmenté > 30% est corrélé avec une mauvaise qualité embryonnaire et un risque d'avortement spontané (Zini *et al.* 2001, Zini *et al.* 2005). En plus, un taux élevé de fragmentation de l'ADN a été

rapporté dans les spermatozoïdes d'hommes dont les conjointes avaient une histoire de fausses couches à répétition (Carell *et al.* 2003, Brahem *et al.* 2011).

Les dommages de l'ADN spermatique peuvent augmenter le risque d'échec d'implantation, le taux de fausses couches, le taux de malformations congénitales voire le risque de cancer chez l'enfant (Cho *et al.* 2003, Lewis and Aitken. 2005). En fait, un spermatozoïde avec un ADN fragmenté peut féconder un ovocyte mature, mais le développement embryonnaire est lié au taux de la fragmentation de l'ADN. Les dommages de l'ADN spermatique pourraient être réparés par l'ovocyte après la fécondation si ces dommages ne dépassent pas la capacité de réparation de l'ovocyte ($< 8\%$) (Ahmadi et Ng. 1999). Selon le niveau de fragmentation de l'ADN spermatique, trois situations peuvent se présenter : dans quelques cas, la machinerie de réparation de l'ovocyte est insuffisante pour réparer les dommages, il n'y aura pas implantation ou l'embryon ne se développera pas. Dans d'autres cas, l'ovocyte répare la totalité des dommages de l'ADN spermatique avant la première division cellulaire du zygote et un embryon normal est généré. Dans la situation la plus grave, une délétion ou une mutation peut être introduite à cause de la réparation partielle effectuée par l'ovocyte, ceci provoque la formation d'un embryon anormal (Fernandez-Gonzalez *et al.* 2008). Il est démontré que 80% des aberrations chromosomiques *de novo* chez l'homme sont d'origine paternelle (Tomar *et al.* 1984). Si les dommages de l'ADN spermatiques impliquent les oncogènes, il pourrait augmenter le risque de cancer pour sa progéniture. L'intégrité de l'ADN spermatique a donc des implications diagnostiques et pronostiques chez les couples ayant des fausses couches à répétition (Kumar *et al.* 2012).

Chez 122 couples présentant une infertilité inexplicée, diagnostiqués par des méthodes conventionnelles, l'équipe d'Oleszczuk a montré qu'un quart des cas présentent des dommages de l'ADN avec un DFI $\geq 20\%$ évalué par le test SCSA (Oleszczuk *et al.* 2012). En plus, parmi 126 hommes infertiles ayant des paramètres spermatiques normaux, 15% présentent une DFI $\geq 20\%$ et 5% présentent une DFI $\geq 30\%$ (Erenpreiss *et al.* 2008). Dans l'étude d'Avendano *et al.*, quand le pourcentage des spermatozoïdes normaux ayant un ADN fragmenté est $\leq 17,6\%$, la probabilité d'une grossesse est 3,5 fois plus élevée lors d'une ICSI (Avendano *et al.* 2010).

En outre, l'évaluation de l'intégrité de l'ADN spermatique permet de prédire la chance d'une conception naturelle (Giwerzman *et al.* 2010). Quand le DFI est supérieur à 20%, la probabilité de conception *in vivo* est diminuée et quand le DFI est supérieur à 30%, l'ICSI devrait être proposée aux couples au lieu d'une FIV (Bungum *et al.* 2007). Il semble que l'ICSI peut être plus efficace pour les hommes avec un taux de la

fragmentation de l'ADN spermatique élevé (Zini *et al.* 2008).

C. Analyse de l'intégrité de l'ADN spermatique et de l'équipement chromosomique chez les hommes infertiles

Vu leur rôle dans la reproduction, plusieurs études analysent l'intégrité de l'ADN spermatique et l'équipement chromosomique dans les spermatozoïdes chez les hommes infertiles afin de mieux comprendre l'étiologie et de personnaliser le traitement. La fragmentation de l'ADN spermatique et le taux d'aneuploïdies dans les gamètes sont plus élevés chez les hommes infertiles présentant une tératozoospermie par rapport aux hommes fertiles (Brahem *et al.* 2010, Brahem *et al.* 2011, Perrin *et al.* 2011, Tang *et al.* 2010). Tandis que Brahem *et al.* ont démontré une forte corrélation entre le taux de fragmentation de l'ADN spermatique et le taux d'aneuploïdies chez les patients porteurs d'une tératozoospermie isolée, aucune corrélation n'a été trouvée entre ces deux aspects chez les patients ayant une tératozoospermie sévère dans l'étude de Perrin *et al.* (Brahem *et al.* 2010, Perrin *et al.* 2011). Plus intéressant, Tang et ses collaborateurs ont observé que le taux de fragmentation de l'ADN et les anomalies chromosomiques sont corrélés avec le type d'anomalie morphologique spécifique des spermatozoïdes (Tang *et al.* 2010).

La relation entre le degré de la maturité nucléaire des spermatozoïdes détectée par le test au bleu d'aniline et le taux d'aneuploïdies a été notamment mise en évidence dans l'étude de Morel *et al.* Les auteurs ont suggéré que l'anomalie de la ségrégation méiotique pourrait perturber la transition des nucléoprotéines résultant en la persistance des histones dans la chromatine spermatique (Morel *et al.* 1998). Plus tard, la même observation a été démontrée en analysant le degré de la maturité nucléaire et les anomalies chromosomiques dans chaque gamète (Ovari *et al.* 2010).

En combinant la détection des cassures de l'ADN par le test SCD et l'analyse de l'équipement chromosomique par la FISH sur un même gamète, l'équipe de Muriel a réussi à démontrer que le taux d'aneuploïdies était 4,6 fois plus élevé dans les spermatozoïdes avec un ADN fragmenté que dans ceux dont l'ADN est intact (Muriel *et al.* 2007). Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que les aneuploïdies pourraient conduire à la fragmentation de l'ADN pendant la maturation des spermatozoïdes. En

fait, le mécanisme de surveillance génétique peut détecter les anomalies génétiques dans les gamètes et peut déclencher un processus ressemblant à l'apoptose *via* des nucléases endogènes qui créent des cassures dans l'ADN spermatique pendant la spermiogenèse. Cela peut entraîner des gamètes immatures et incapables de féconder (Rodriguez *et al.* 2005).

Quant aux patients porteurs d'une anomalie chromosomique de structure, très peu d'études analysent la corrélation entre la fragmentation de l'ADN et l'équipement chromosomique dans les gamètes. Dans l'étude de Perrin *et al.*, les auteurs ont étudié 37 patients porteurs d'une anomalie de structure (21 translocations réciproques équilibrées, 7 translocations robertsoniennes et 9 inversions péricentriques). Ils ont trouvé que le taux de fragmentation de l'ADN spermatique et le taux des gamètes chromosomiquement déséquilibrés sont significativement plus élevés chez les patients que chez les témoins. Pourtant, aucune corrélation entre la fragmentation de l'ADN spermatique et le taux des gamètes chromosomiquement déséquilibrés n'a été démontrée (Perrin *et al.* 2009). En analysant des spermatozoïdes de 7 hommes porteurs d'une translocation robertsonienne, l'équipe de Brugnon a remarqué une augmentation du taux de gamètes avec un ADN fragmenté et présentant des caspases apoptotiques ainsi qu'une augmentation du taux de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés chez les patients par rapport aux témoins. Plus intéressant encore, une corrélation entre le taux de fragmentation de l'ADN et la présence des caspases 3, 8, 9 dans les spermatozoïdes a été trouvée (Brugnon *et al.* 2010).

D. Exposé des objectifs

La fragmentation de l'ADN spermatique et l'équipement chromosomique dans les gamètes sont deux paramètres associés à la fertilité masculine. Dans cette étude, nous évaluerons le taux de la fragmentation de l'ADN spermatique et le taux des gamètes chromosomiquement déséquilibrés chez les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique constitutionnelle de nombre ou de structure.

Chez les hommes porteurs d'une anomalie de nombre, comme le syndrome de Klinefelter 47,XXY, ou le caryotype 47,XYY ou les mosaïques gonosomiques, l'analyse de l'équipement chromosomique montre une augmentation des aneuploïdies (Rives *et al.* 2003, Rives *et al.* 2005, Templado *et al.* 2013). Pourtant aucune étude n'évalue le

taux de fragmentation de l'ADN dans les gamètes chez ces hommes. Dans le cadre de ces travaux, nous voulons analyser l'intégrité de la chromatine spermatique ainsi que l'équipement chromosomique dans les spermatozoïdes des hommes porteurs d'une mosaïque gonosomique.

Quant aux hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure, deux équipes ont analysé la fragmentation de l'ADN et l'équipement chromosomique dans les gamètes (Perrin *et al.* 2009, Brugnon *et al.* 2010). Bien que l'augmentation des gamètes chromosomiquement déséquilibrés et des gamètes avec un ADN fragmenté ait été décrite, aucune corrélation entre ces deux paramètres n'a été démontrée. En plus, la fragmentation de l'ADN spermatique est indépendante des paramètres spermatiques ainsi que de l'âge du patient. Par contre, l'étude de Brugnon a montré que la fragmentation de l'ADN détectée par la technique TUNEL est bien corrélée avec les caspases apoptotiques 3, 8, 9 (Brugnon *et al.* 2010). Néanmoins, à l'exception de 4 hommes étudiés par Perrin *et al.* (Perrin *et al.* 2011), ces études sont réalisées sur l'éjaculat total. Nous ne savons donc pas si les gamètes chromosomiquement déséquilibrés ont un ADN plus fragmenté que ceux dont l'équipement chromosomique sont normaux ou équilibrés. C'est la raison pour laquelle nous allons utiliser le protocole développé au laboratoire pour analyser ces deux aspects sur un même gamète des patients porteurs d'une anomalie chromosomique de structure.

SECTION **2** Patients et Méthodes

A. Patients

Les patients infertiles porteurs d'une anomalie chromosomique de nombre ou de structure sont recrutés pour les différentes études dans ces travaux. Un prélèvement de sang et un recueil de sperme chez les patients sont nécessaires afin de réaliser les techniques de cytogénétique conventionnelle et moléculaire décrites ci-dessous.

B. Méthodes

1. Cytogénétique conventionnelle

C'est la technique de première intention, à partir du sang, pour établir la formule du caryotype de chaque patient à la recherche d'une anomalie chromosomique constitutionnelle. Les cellules sanguines sont mises en culture dans un milieu nutritif supplémenté en sérum de veau fœtal décomplémenté, en L-glutamine, en pénicilline, en streptomycine pour éviter la contamination par les bactéries et en phytohémagglutinine qui va stimuler spécifiquement les lymphocytes T. Une synchronisation par FudR/Thymidine permet d'obtenir des cellules en prométaphase. Un choc hypotonique, en gonflant les cellules, permet d'avoir une bonne dispersion chromosomique. Ensuite, les cellules sont préfixées et fixées par du Carnoy (3 volume de méthanol : 1 volume d'acide acétique) pour pouvoir conserver leurs structures les plus proches de l'état vivant. Puis, le culot cellulaire est étalé sur une lame dégraissée pour une bonne préparation chromosomique. Les lames sont placées dans une solution saline (solution d'Earle) à 87°C suivi d'un passage rapide sous l'eau froide pour bloquer la dénaturation thermique. Ensuite, les lames sont colorées par du Giemsa à 2%. Les bandes obtenues sont des bandes R. La lecture des lames se fait à l'aide du microscope optique Zeiss-Axiophot (Zeiss, Le Pecq, France) qui est couplé à une caméra et un logiciel de classement des chromosomes (Ikaros, MetaSystems, Altlussheim,

Allemagne). Seize à vingt-cinq métaphases sont analysées pour chaque patient. Le caryotype est établi selon les recommandations de la nomenclature internationale (ISCN, 2013).

2. Evaluation de la fragmentation de l'ADN spermatique

Lorsque l'ADN des gamètes est fragmenté, des extrémités 3'-OH sont libérées. Le principe de la technique TUNEL est d'utiliser une enzyme, la Terminal deoxynucleotidyl Transférase (TdT), capable d'ajouter des nucléotides à ces extrémités 3'-OH d'ADN libre. Les nucléotides sont couplés à de la digoxygénine. Nous ajoutons des anticorps, couplés à un fluorochrome, dirigés contre la digoxygénine. Le fluorochrome utilisé est la rhodamine (fluorescence rouge). Une contre-coloration de l'ADN avec du DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) (fluorescence bleue) permet de visualiser l'ADN des gamètes.

Le frottis des spermatozoïdes est fixé par du Carnoy. Pour perméabiliser la membrane des gamètes, le frottis est ensuite mis dans un bain de SSC 2X / 0,4%NP40 pendant 30 minutes à 37°C. Puis, le frottis est plongé simultanément dans des bains d'éthanol de 70% / 90% / 100% pendant 3 minutes chacun.

Sur chaque lame, 50µl du tampon de stabilisation sont déposés et la lame est couverte par une lamelle souple pendant 30 secondes à température ambiante. Cette étape permet d'équilibrer le pH et d'hydrater la préparation. Après avoir enlevé la lamelle, un mélange contenant un tampon de réaction et une enzyme TdT, sont déposés sur la lame et couverts par une lamelle souple. Puis, la lame est incubée pendant une heure dans une chambre noire, humide, à 37°C. Cette étape permet d'incorporer les nucléotides dont certains sont couplés à la digoxygénine, sur l'extrémité 3'-OH d'ADN libre. La lame est ensuite agitée pendant 15 secondes dans un tampon de lavage puis incubée dans ce même bain pendant 10 minutes. Cette étape a pour but d'arrêter la réaction enzymatique. La lame est lavée par deux bains successifs de PBS 1X pendant 1 min 30 chacun. La révélation est faite en déposant un mélange constitué d'anticorps anti-digoxygénine couplés à la rhodamine. La lame est couverte par une lamelle souple et incubée dans une chambre noire pendant 30 minutes à 37°C. Les lavages dans deux bains de PBS 1X pendant 4 minutes chacun sont réalisés puis les lames sont séchées à l'air libre. L'ADN est enfin contre-coloré par l'ajout de DAPI et la lame est couverte par une lamelle en verre.

La lame est ensuite analysée avec un microscope à épifluorescence. Une analyse de

500 spermatozoïdes est faite pour chaque patient. Les spermatozoïdes sont considérés comme non fragmentés s'il n'y a que la présence d'une fluorescence bleue, ou comme fragmentés si une fluorescence rouge partielle ou totale est émise. L'analyse est de type binaire.

3. Analyse d'équipement chromosomique dans les gamètes

Le principe de la FISH repose sur les propriétés d'hybridation de l'ADN selon la complémentarité entre les bases nucléotidiques.

3.1. Préparation des sondes

Une sonde est une séquence d'ADN couplée à un fluorochrome qui est complémentaire d'une séquence spécifique du chromosome étudié. Il existe des sondes commerciales et des sondes BACs (Bacterial Artificial Chromosome) dites "maison".

3.1.1 Sondes commerciales

Les sondes commerciales sont prêtes à l'emploi. Elles sont déjà marquées directement par un fluorochrome. Il est nécessaire simplement de diluer les sondes avant de les utiliser. Nous avons utilisé des sondes centromériques (spécifiques des régions α -satellites d'un chromosome donné), des sondes séquences uniques (spécifiques d'une région chromosomique de quelques kilobases) et des sondes subtélomériques (spécifiques de l'extrémité du bras court ou du bras long d'un chromosome donné) en fonction des anomalies que les patients portent.

En effet, l'analyse de la ségrégation méiotique dans les spermatozoïdes nécessite la fabrication de sondes BACs complémentaires des régions d'intérêt lorsqu'il n'existe pas de sondes commerciales adaptées aux besoins.

3.1.2 Sondes BACs (Bacterial Artificial Chromosome)

Le BAC est un plasmide ADN circulaire dans lequel un fragment d'ADN du génome humain a été inséré. Le plasmide d'intérêt contenant un gène de résistance à un antibiotique est ensuite intégré dans des bactéries. Une sonde BAC est une sonde fabriquée à partir d'une séquence d'ADN connue insérée dans un vecteur de clonage

bactérien. Les sondes BACs ont été choisies selon leur localisation chromosomique (en fonction du réarrangement à étudier) ou la séquence d'un gène d'intérêt.

- **Culture cellulaire**

Des bactéries *Escherichia Coli* sont transformées avec des plasmides recombinants ayant intégré la sonde. Le BAC souhaité est mis en pré-culture dans 2ml de milieu Luria Bertani Chloramphénicol (LBC) une nuit à l'étuve à 37°C. Les cultures sont toujours réalisées dans du LBC afin de maintenir une pression de sélection pour que le plasmide ne soit pas perdu par la bactérie. Le BAC porte un gène de résistance au chloramphénicol qui va coder une enzyme détruisant l'antibiotique du milieu. Le lendemain, une dilution au 100^{ème} est réalisée à partir du tube de pré-culture, puis 30µl de cette dilution sont déposés dans une boîte de Pétri contenant du LBC et de l'agar. Ces boîtes, entourées de papier aluminium, sont déposées à l'étuve à 37°C pendant une nuit. Une colonie est prélevée et ensemencée dans 5ml de LBC puis mise à l'étuve à 37°C. Prendre une seule colonie permet d'avoir un clone unique et évite des recombinaisons entre plusieurs clones. Ensuite, 1ml de cette culture est déposé dans 2x25ml de LBC. Ces tubes sont mis à l'étuve à 37°C sous agitation pour la nuit. A partir des tubes de 50ml de culture, des glycérols stocks sont réalisés. Pour cela, un volume de glycérol et un volume de milieu LBC sont ajoutés à 1ml de culture. Ce microtube est, par la suite, stocké à -80°C. Les 50ml de culture sont centrifugés 25 minutes à 2700g à 4°C. Après l'élimination du surnageant, les culots sont stockés au congélateur si l'extraction n'est pas réalisée le jour même.

- **Extraction d'ADN**

Le milieu de culture est d'abord éliminé par centrifugation. Le culot bactérien est ensuite resuspendu dans 0,8ml de GTE 1X / Lysozyme (Glucose Tris EDTA : ethylene diamine tetraacetic acid), vortexé et incubé 15 minutes dans la glace. Le glucose permet de maintenir une bonne osmolarité, l'EDTA chélate les cations métalliques divalents (majoritairement le calcium et le magnésium), ce qui déstabilise la membrane bactérienne et inactive les DNases, le Tris stabilise le pH à 8,0 et le lysozyme dégrade les constituants de la paroi bactérienne. Puis 1,6ml de SDS 1% / NaOH 0,2N sont ajoutés en agitant délicatement à la main. Le SDS (sodium dodecylsulfate) est un détergent qui dénature les protéines et les précipite, le NaOH dénature les acides nucléiques. Après avoir laissé 5 minutes au maximum dans la glace, 1,2ml d'acétate de potassium 3M sont ajoutés. Il

neutralise le pH à 5,5 qui permet aux brins d'ADN de se ré-apparier de façon complémentaire. De plus, le potassium précipite le SDS ainsi que les protéines et les lipides. L'ADN et l'ARN se trouvent dans la solution aqueuse. La suspension est déposée 15 minutes dans la glace, puis centrifugée 25 minutes à 800g à 4°C. Le surnageant est filtré grâce aux papiers "Kimberly-Clark", 1,8ml d'Isopropanol sont ajoutés dans le filtrat pour précipiter les acides nucléiques. Après au moins 15 minutes d'incubation dans la glace, une centrifugation de 15 minutes à 800g à 4°C est réalisée. Le culot est remis en suspension en ajoutant 0,5ml de TE 1X (Tris HCL + EDTA). L'ajout de 0,5ml de Chlorure de Lithium permet de précipiter les ARN. Puis, les tubes Falcon[®] sont vortexés et déposés 15 minutes dans la glace avant d'être centrifugés 15 minutes à 800g à 4°C.

Le surnageant est récupéré et 3ml d'éthanol absolu sont ajoutés afin de précipiter l'ADN. Après 35 minutes à -80°C et une centrifugation de 25 minutes à 800g à 4°C, le surnageant est éliminé. Le culot est resuspendu dans 300 μ l de TE 1X puis 7 μ l de RNase A à 10 mg/ml sont ajoutés pour éliminer complètement les ARN restants. L'ensemble est incubé au moins une heure au bain-marie à 37°C. Après incubation, 8 μ l de Protéinase K à 10 mg/ml sont ajoutés pour éliminer toutes les protéines persistantes. Les tubes sont incubés une nuit au bain marie à 37°C.

Les tubes sont repris le lendemain en ajoutant 400 μ l de Phénol-Chloroforme sous la hotte pour purifier l'ADN extrait. En effet, le phénol attire tout ce qui est organique (protéine, lipide) et le chloroforme permet d'extraire le phénol. L'extraction suit une étape de centrifugation de 10 minutes à 14000g à température ambiante. Deux phases sont obtenues, la phase supérieure aqueuse contient de l'ADN qui est prélevée et transférée dans un nouveau tube.

Ensuite, l'ADN est précipité par l'ajout de 100 μ l d'acétate d'ammonium 7,5M et 600 μ l d'éthanol absolu. Les tubes sont placés pendant 30 minutes à -80°C suivis d'une centrifugation de 15 minutes à 14000g à température ambiante. Après avoir enlevé le surnageant, 500 μ l d'éthanol à 70° sont ajoutés sans remise en suspension. Une centrifugation de 10 minutes à 14000g à température ambiante est réalisée suivie d'une élimination du surnageant pour purifier l'ADN. Le culot est séché et remis en suspension en ajoutant 50 à 100 μ l de TE 1X selon la taille. Le TE 1X contient de l'EDTA qui inactive les DNases pour protéger l'ADN extrait. L'ADN obtenu est dosé et sa pureté évaluée grâce à la mesure de l'absorption de la lumière à 260nm et 280nm.

- **Marquage par Nick translation**

Le marquage permet d'obtenir les sondes d'ADN fluorescentes à partir de l'ADN extrait des bactéries. L'enzyme DNase I coupe un brin d'ADN de façon aléatoire pour ouvrir une brèche dans la structure primaire d'un des deux brins d'un fragment d'ADN. La DNA polymérase I synthétise un nouveau brin d'ADN à partir de l'extrémité 3'OH terminale d'un côté de la brèche ainsi créée. Simultanément l'activité 5'3' exonucléase de la DNA polymérase I hydrolyse les nucléotides du côté 5'-phosphate de la même brèche. Il en résulte un déplacement de la brèche le long de l'ADN avec un remplacement des nucléotides du brin coupé dont un nucléotide est couplé à un fluorochrome (Figure 19).

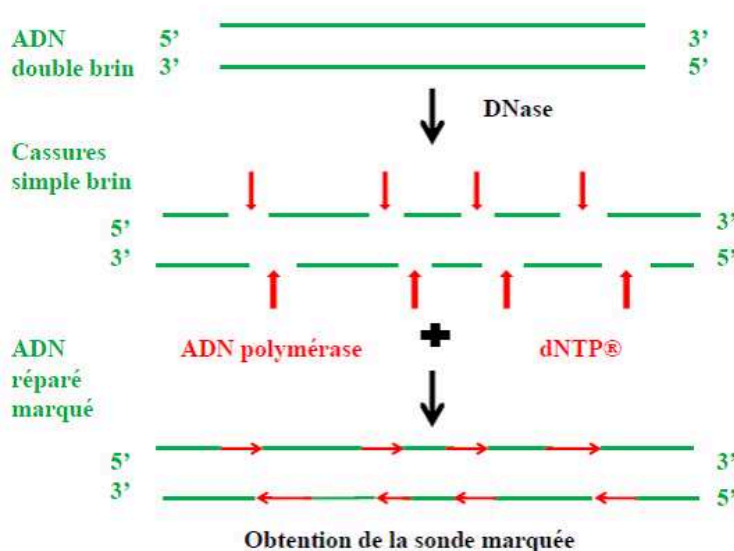


Figure 19 – Principes du marquage par Nick translation

Les BACs marqués en rouge ou en vert sont réalisés à l'aide du kit Abbott (Rungis, France). Un mélange est préparé, contenant $1\mu\text{l}$ d'ADN, $0,7\mu\text{l}$ de dUTP (nucléotide couplé à un fluorochrome) à 1 mmol , $1,25\mu\text{l}$ de dTTP à $0,3\text{ mmol}$, $2,5\mu\text{l}$ du mélange ($1\mu\text{l}$ de dATP, $1\mu\text{l}$ de dCTP, $1\mu\text{l}$ de dGTP), $1,2\mu\text{l}$ du tampon, $1,8\mu\text{l}$ d'enzymes et $3,5\mu\text{l}$ d'eau distillé pour obtenir un volume final de $10\mu\text{l}$. Le mélange est vortexé et incubé la nuit à 15°C . La réaction est stoppée le lendemain dans le bain marie à 72°C pendant 10 minutes puis dans la glace pendant 10 minutes.

Le BAC marqué est gardé au congélateur jusqu'à l'hybridation sur l'ADN spermatique. Une étape de précipitation afin de concentrer les sondes est nécessaire avant d'hybrider.

- **Précipitation des sondes**

Dans un micro-tube, nous mettons 4 μ l d'eau stérile, 5 μ l de chaque BAC, 1 μ l de cot-1 DNA qui est un réactif qui va bloquer les séquences d'ADN répétées et ainsi éviter les hybridations non spécifiques des sondes. Ensuite 1 μ l d'acétate de sodium 3M est ajouté pour mieux précipiter les sondes et 30 μ l d'alcool absolu sont ajoutés. L'ensemble est vortexé légèrement avant d'être laissé 20 minutes dans la glace. Ensuite, le micro-tube est centrifugé pendant 30 minutes à 16 000g, à 4°C. Le surnageant est enlevé et remplacé par 5 μ l de tampon LSI (locus specific identifier), puis vortexé avant utilisation.

3.1.3 Pools de BACs

Les spermatozoïdes sont plus petits que les lymphocytes et leur ADN est plus compacté. Généralement, l'hybridation d'un seul BAC ne permet pas d'obtenir un spot fluorescent suffisamment intense et grand pour une analyse aisée et des résultats fiables. Il est nécessaire d'utiliser un pool de BACs contigus. Il s'agit de plusieurs BACs qui vont s'hybrider le long d'un locus d'ADN d'intérêt. Cela permet d'avoir une zone hybridée bien visible pour être analysée.

Nous avons utilisé les sondes commerciales en plus des pools de BACs pour hybrider sur les lames de nos patients.

3.2. Principes de FISH sur sperme

Les spermatozoïdes sont fixés par du Carnoy sur une lame dégraissée. Ensuite, la chromatine spermatique est décondensée par une solution de NaOH 1N permettant de gonfler les têtes spermatiques et donc faciliter l'accès aux sondes sur l'ADN du patient.

Une étape de prétraitement par des détergents est nécessaire afin de perméabiliser les membranes et des passages par des bains d'alcool de titre croissant permettent de déshydrater les lames. Une fois les sondes prêtes, elles sont déposées sur la lame du patient, laquelle se trouve sur le ThermoBrite[®] (Abbott), une plaque chauffante programmable où les sondes et ADN du patient sont dénaturés simultanément par la chaleur (Figure 20).

La lame est placée dans une étuve humide à 37°C pendant une nuit permettant l'hybridation des sondes sur l'ADN spermatique. Le lendemain, un lavage, par des détergents pour éliminer les sondes non spécifiques, est nécessaire. Ensuite, le matériel

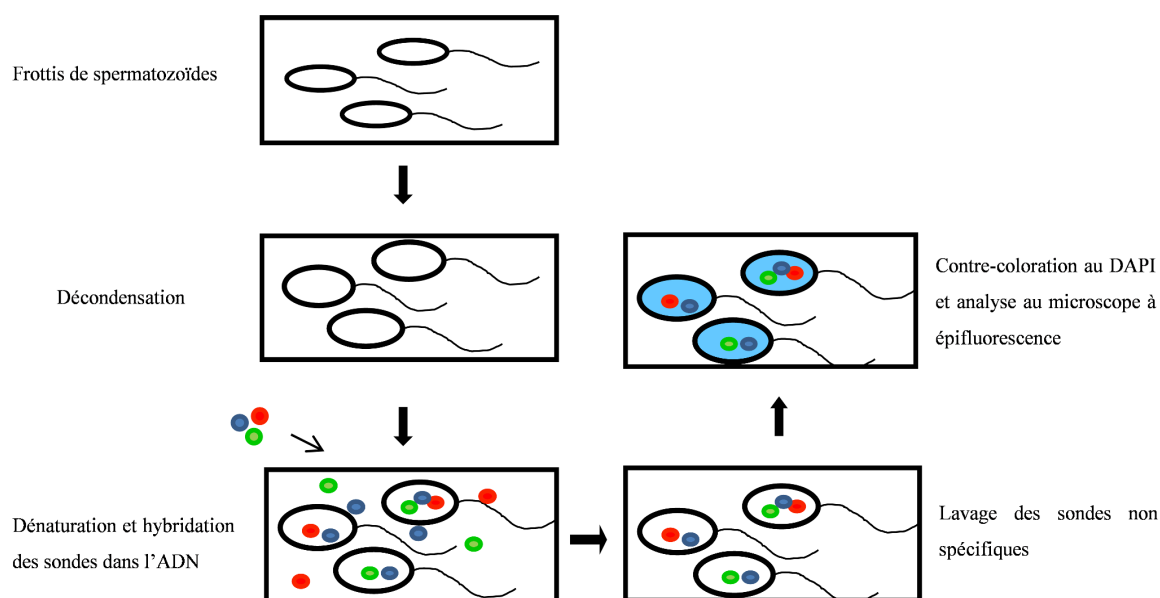


Figure 20 – Principales étapes de la FISH sur les spermatozoïdes

est contre-coloré au DAPI avant d'être analysé au microscope à épifluorescence couplé à une caméra permettant une analyse aisée.

4. Protocole développé afin de combiner l'équipement chromosomique du gamète et son ADN

Nous étudions la fragmentation de l'ADN spermatique et les déséquilibres chromosomiques au sein des mêmes gamètes et donc sur une même lame de spermatozoïdes. Le but de notre travail est de savoir si les gamètes chromosomiquement déséquilibrés sont plus fragmentés que ceux dont l'équipement chromosomique est normal ou équilibré. La stratégie mise en place pour cette étude est décrite dans la figure ci-dessous.

Après avoir étalé les spermatozoïdes et les avoir fixés par du Carnoy, nous réalisons la technique TUNEL sur le frottis.

Nous établissons ensuite une galerie de photos des gamètes présents sur la lame grâce au logiciel Metafer (MetaSystems, Altlussheim, Germany) qui a la capacité d'enregistrer les coordonnées X, Y, Z dans le repère cartésien tridimensionnel.

Puis, nous analysons au microscope les gamètes un par un et notifions sur chaque photo si le gamète est fragmenté ou non.

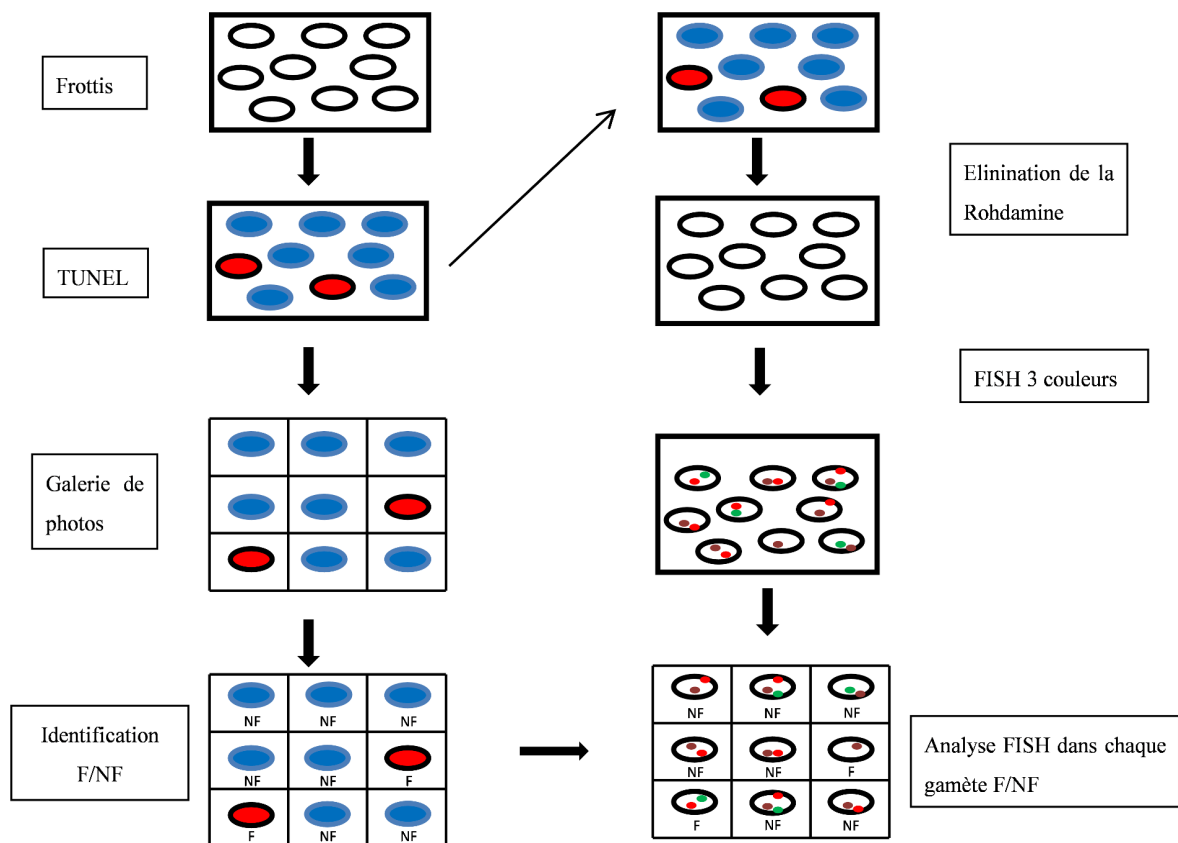


Figure 21 – Stratégie employée pour analyser l'équipement chromosomique en combinant avec son ADN dans chaque gamète. La fragmentation de l'ADN est étudiée par la technique TUNEL (à gauche) puis l'équipement chromosomique dans les gamètes est analysé par FISH (à droite) sur le même frottis d'un patient. F : ADN fragmenté et NF : ADN non fragmenté.

Une fois la lame analysée, nous éliminons la rhodamine afin de pouvoir réaliser la technique de FISH sur la même lame. Cette élimination suit nécessairement les étapes suivantes :

Après avoir enlevé la lamelle, les gamètes sont refixés dans du Carnoy pendant une heure. Le lavage est fait dans du PBS 1X pendant 30 minutes puis la lame est plongée dans du SSC 2X pendant 30 minutes. La rhodamine est éliminée par un bain de SSC 0,4X / 0,3% NP40 à 72°C pendant 20 minutes. Ensuite, la lame est lavée dans un bain de SSC 2X / 0,1% NP40 à température ambiante dans 5 minutes. Les têtes des spermatozoïdes sont décondensées dans un bain de NaOH 1N pendant une minute, puis la lame est lavée dans du SSC 2X (pH = 7,2) pendant 10 minutes. La lame est déshydratée par passage dans des bains d'alcool à concentration progressive 70% / 90% / 100% pendant 3 minutes chacun.

Nous réalisons ensuite la technique de FISH sans réaliser le bain correspondant à l'étape de perméabilisation membranaire qui ne s'avère plus nécessaire. Après avoir contre-coloré les noyaux, cette lame est à nouveau analysée au microscope à fluorescence. La galerie de photos correspondant à l'analyse TUNEL est reprise afin de lier l'équipement chromosomique de chaque gamète à l'état de son ADN fragmenté ou non.

SECTION 3 --- Travaux réalisés

A. Réarrangement chromosomique complexe dans l'infertilité masculine : un cas rapporté et revue de la littérature

Résultats et discussion

Il s'agit d'un couple venant consulter pour une infertilité primaire de deux ans. L'examen chez la femme est normal. Par contre, une azoospermie a été remarquée chez son mari. La cytogénétique conventionnelle et moléculaire (FISH) est réalisée afin de déterminer son caryotype. Il a été montré un réarrangement chromosomique complexe impliquant les chromosomes 1, 5 et 15 avec 4 points de cassure et une insertion d'une partie du bras long du chromosome 15. Ce réarrangement correspond au type IV selon la classification proposée par Madan (2012). Le même réarrangement a été trouvé chez la mère et le frère du patient confirmant l'origine familiale de ce réarrangement.

Nous avons considéré dans cette étude le CCR comme un réarrangement structural qui implique au moins trois chromosomes avec trois points de cassure ou plus (Mandan. 2013). Cette anomalie est très rare, environ 250 cas ont été décrits dans la littérature y compris des CCR équilibrés et déséquilibrés (Pellestor *et al.* 2011). Seulement 44 hommes, phénotypiquement normaux et présentant un CCR, ont consulté pour des troubles de la reproduction. Ils ont eu des perturbations de la spermatogenèse résultant en une azoospermie ou une oligozoospermie dans 61,4% des cas (27/44 patients). Dans 38,6% des cas, les CCRs sont identifiés à cause de fausses couches à répétition chez la femme ou des naissances d'enfants malformés.

La configuration adoptée au stade pachytène lors de la méiose dépend de la structure du CCR et du nombre de points de cassure. Pour les translocations "three-way" ou "four-way", les chromosomes impliqués dans le réarrangement forment une configuration en hexavalent ou en octavalent au stade pachytène de la méiose I, permettant un synapsis complet des segments homologues. Ces translocations

produisent, par conséquent, une large variété de gamètes chromosomiquement déséquilibrés (Cifuentes *et al.* 1998, Loup *et al.* 2010, Pellestor *et al.* 2011). Plus le réarrangement est complexe, plus des gamètes chromosomiquement déséquilibrés sont retrouvés chez les porteurs. De plus, les points de contrôle du stade pachytène sont capables de détecter les défauts de synapsis chromosomique ou de recombinaison méiotique résultant en l'arrêt de la spermatogenèse au stade pachytène et à l'apoptose de la majorité des spermatocytes (Hann *et al.* 2011). Il a été montré que l'infertilité associée au CCR est la conséquence de l'arrêt de la spermatogenèse à cause de la configuration méiotique complexe (Lespinasse *et al.* 2004). Aucune délétion du chromosome Y n'a été retrouvée chez notre patient. Il est donc vraisemblable que l'azoospermie de notre patient soit due à l'arrêt méiotique. Malheureusement, nous n'avons pas pu étudier les tissus testiculaires pour confirmer notre hypothèse et mieux comprendre le mécanisme.

Le réarrangement chromosomique peut affecter la gamétogenèse différemment chez l'homme et chez la femme. Chez les femmes, la gamétogenèse semble elle-même s'adapter à l'apparition des réarrangements chromosomiques et les points de contrôle pendant la méiose ne sont pas sévères (Steuerwald. 2005, Kurahashi *et al.* 2009). Ainsi une anomalie chromosomique peut passer le contrôle facilement et l'ovogenèse peut être complétée en produisant des gamètes chromosomiquement anormaux. Par contre, la méiose est plus sensible aux perturbations lors de la spermatogenèse. La présence d'un réarrangement chromosomique peut altérer l'appariement chromosomique pendant la prophase de la méiose I et faciliter l'association avec le bivalent X-Y provoquant l'arrêt de la spermatogenèse (Hunt and Hassold. 2002). Cela résulte souvent en une stérilité ou une hypofertilité chez les hommes porteurs d'un CCR. Dans la famille étudiée, la mère est porteuse d'un CCR transmis à ses deux fils. Mais ce réarrangement provoque une infertilité chez son fils.

L'analyse de l'équipement chromosomique dans les spermatozoïdes des hommes porteurs d'un CCR dans quelques études montre que la majorité des gamètes sont chromosomiquement déséquilibrés (entre 73% et 86,5%) (Cifuentes *et al.* 1998, Lih *et al.* 2002, Loop *et al.* 2010). De plus, le taux d'embryons chromosomiquement déséquilibrés est élevé lors du diagnostic génétique pré-implantatoire chez les porteurs de CCR (Escudero *et al.* 2008, Lim *et al.* 2008). Pour ces raisons, l'utilisation de l'ICSI peut transmettre un CCR aux générations suivantes. Il est donc très important qu'un conseil génétique soit mis en place pour un patient porteur d'un CCR. L'insémination artificielle avec des spermatozoïdes de donneur devrait être proposée aux hommes

porteurs d'un CCR, vu que la probabilité d'avoir un enfant normal est faible en raison de la prévalence des gamètes déséquilibrés (Siffroi *et al.* 1997).

ORIGINAL ARTICLE

Balanced complex chromosome rearrangement in male infertility: case report and literature reviewM. H. Nguyen^{1,2}, F. Morel^{1,2,3}, P. Pennamen^{1,3}, P. Parent⁴, N. Douet-Guilbert^{1,2,3}, M. J. Le Bris³, A. Basinko³, S. Roche⁵, M. De Braekeleer^{1,2,3} & A. Perrin^{1,2,3}

1 Laboratoire d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France;

2 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1078, Brest, France;

3 Service de Cytogénétique, Cytologie et Biologie de la Reproduction, Hôpital Morvan, CHRU Brest, Brest, France;

4 Département de Pédiatrie et de Génétique Médicale, Hôpital Morvan, CHRU Brest, Brest, France;

5 Service de Gynécologie Obstétrique – Médecine de la Reproduction, Hôpital Morvan, CHRU Brest, Brest, France

Keywords

Azoospermia—complex chromosome rearrangement—male infertility—meiotic segregation

Correspondence

Prof. Marc De Braekeleer, Laboratoire de Cytogénétique, Hôpital Morvan, Bâtiment 5bis, CHRU Brest, 2, avenue Foch, F-29609 Brest Cedex, France.

Tel.: +33 (0)2 98 22 36 94;

Fax: +33 (0)2 98 22 39 61;

E-mail: marc.debraekeleer@univ-brest.fr

Accepted: December 22, 2013

doi: 10.1111/and.12245

Summary

Complex chromosome rearrangements (CCRs) are structural rearrangements involving at least three chromosomes and three or more chromosome breakpoints. Generally, balanced CCR carriers have a normal phenotype but they are at a higher reproductive risk. Azoospermia was discovered in the male partner of a couple with primary infertility. Conventional cytogenetics identified a CCR refined by fluorescent *in situ* hybridisation. The CCR involved three chromosomes, four breakpoints and an insertion. A literature search identified 43 phenotypically normal males referred for reproductive problems presenting a CCR. More males were ascertained because of spermatogenesis failure or disturbances than because of repeated abortions and/or birth of a malformed child. Male carriers of CCR produce a high frequency of chromosomally abnormal spermatozoa due to the aberrant segregation of the rearranged chromosomes. The number of chromosomes and breakpoints involved in the rearrangement, the position of breakpoints, the relative size of the resultant chromosomes and the presence or absence of recombination inside the paired-rearranged segments are presumed to affect the fertility of the carrier. Testicular biopsy should not be performed in males with azoospermia. Intracytoplasmic sperm injection should not be proposed as a procedure for treating the infertility of CCR male carriers as a successful result is unlikely.

Introduction

Complex chromosome rearrangements (CCRs) are structural rearrangements involving at least three chromosomes and three or more chromosome breakpoints. CCRs can be balanced or unbalanced, *de novo* or familial (Pai *et al.*, 1980; Kleczkowska *et al.*, 1982).

Generally, balanced CCR carriers have a normal phenotype but they are at a higher reproductive risk. Usually, in phenotypically normal individuals, CCR is identified because of reproductive problems or after the birth of a child with congenital malformations. The majority of the CCR cases are reported in females ascertained through repeated spontaneous abortions (RA) or the birth of a malformed child (MCA) (Madan, 2012). A CCR can

also be diagnosed in males during investigation for spermatogenesis failure or disturbances. They can have a reduced fertility, manifesting as azoospermia or oligoasthenoteratospermia. They can also produce chromosomally unbalanced spermatozoa, resulting in repeated spontaneous abortions and/or aneuploid liveborn children with multiple congenital abnormalities (Kleczkowska *et al.*, 1982; Pellestor *et al.*, 2011a; Madan, 2012).

Over the last 15 years, several classifications have been proposed for the CCRs. Kousseff *et al.* (1987) proposed a classification based on the number of breakpoints. They distinguished type I CCRs with four or fewer breakpoints and type II CCRs with more than four breakpoints. Kausch *et al.* (1988) classified the CCRs according to their meiotic consequences. The first category included

M. H. Nguyen *et al.*

CCR and male infertility

those represented by the coincidental association of two or more independent translocations. In the second category, the number of chromosomes and breakpoints involved were equal (one breakpoint per chromosome), which led to the formation of a meiotic multivalent. The third category included CCRs with more breakpoints than chromosomes, with additional insertions or inversions. Gardner and Sutherland (1996) proposed a classification based on the number of breakpoints and type of rearrangement. The first group consisted in three-way exchanges with three breaks in three chromosomes involved, the second group in double two-way exchanges with a coincidence of two separate reciprocal translocations and the third in exceptional CCRs with multiple breaks and complicated rearrangements.

Based on pachytene diagram drawings, Madan *et al.* (1997) proposed a classification for CCRs with more breakpoints than involved chromosomes. The first category included simple three-way translocations with an additional pericentric inversion in one of the chromosomes, the second a translocation between two chromosomes and insertion of a segment into a third chromosome. In the third category, one chromosome was made up of segments from all three or four chromosomes involved. Madan (2012) refined its classification, recognising four types of CCRs. Type I CCRs included simple three- or four-way translocations while types II to IV were equivalent to the categories described in 1997.

Recently, we identified and characterised by conventional and molecular cytogenetics a CCR in a male patient with azoospermia. He is the subject of this report, which also includes a literature review on CCR in male infertility.

Patients and methods

Patients

An unrelated couple (24-year-old female, 25-year-old male) presented with a 2-year history of primary infertility. Medical history of both spouses was unremarkable. The female medical check-up was normal, but azoospermia was discovered in the male partner. Further genetic investigations were then proposed. Given the results obtained, a familial cytogenetic study was undertaken.

Methods

Chromosome analysis was carried out on phytohaemagglutinin-stimulated peripheral lymphocytes cultured for 72 h. Chromosomes were harvested according to standard procedures, and the R-banded karyotypes were described

according to the recommendations of the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2013). Twenty-five metaphases were analysed and five karyotyped.

Fluorescent *in situ* hybridisation (FISH) analyses were carried out using commercially available probes: whole chromosome paints of chromosomes 1 (XCP1, MetaSystems, Altussheim, Germany), 5 (WCP5, Kreatech, Amsterdam, The Netherlands) and 15 (XCP15, MetaSystems) and a TelVysion 15q subtelomeric probe (WI-5214, Abbott, Rungis, France). Bacterial artificial chromosome (BAC) clones identified through the Human Genome Browser Database of the Genome Bioinformatics Group at the University of California at Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/>) and ordered from Children's Hospital Oakland Research Institute in California (<http://bacpac.chori.org/>) were also hybridised on metaphases to better refine the regions of interest. They were RP11-343L14 (located in band 1p13.1), RP11-97C18 (band 1p21.1), RP11-258O17 (band 5q14.3), RP11-933G10 (band 5q15), RP11-235H11 (band 15q25.1) and RP11-679C6 (band 15q25.3). The hybridisation procedure and image analysis have been described elsewhere (Basinko *et al.*, 2008).

Molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions was performed by multiplex PCR using the STS probes proposed by Simoni *et al.* (1999).

Results

A normal 46,XX karyotype was found in the female whereas the male karyotype showed a complex chromosomal rearrangement involving chromosomes 1, 5 and 15. It was written as 46,XY,der(1)(5qter->5q14.3::15q21->15q26::1p13->1qter),der(5)(5pter->5q14.3::1p13->1pter),der(15)(pter->q21::q26->qter) (Fig. 1).

Sequential FISH analyses confirmed the results obtained by conventional cytogenetics (Fig. 2a). They showed insertion of material of chromosome 15 between material of both chromosomes 5 (including RP11-933G10) and 1 (including RP11-343L14) on the derivative chromosome 1. The 15q subtelomeric probe (WI-5214) remained on the derivative chromosome 15, which had an interstitial deletion that removed BAC clones RP11-235H11 and RP11-679C6, and these two clones having been inserted in the derivative chromosome 1. The derivative chromosome 5, which retained BAC clone RP11-258O17 (in band 5q14.3), showed material from the short arm of chromosome 1 (including RP11-97C18) on its long arm. Therefore, FISH results could be written as ish der(1)(wcp5+,RP11-933G10+,wcp15+,RP11-679C6+,RP11-235H11+,wcp1+,RP11-97C18-,RP11-343L14+),der(5)(wcp5+,RP11-258O17+,RP11-933G10-,RP11-97C18+,wcp1+),der(15)(wcp15+,RP11-235H11-,RP11-679C6-,WI-5214+).

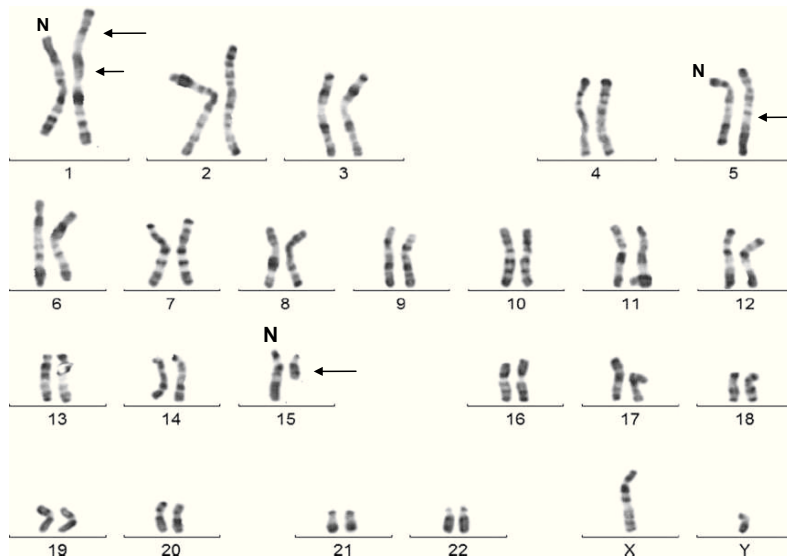


Fig. 1 R-banded karyotype showing the complex chromosomal rearrangement involving chromosomes 1, 5 and 15. Chromosome 1 in green, chromosome 5 in blue and chromosome 15 in red.

No microdeletion of the Y-chromosome was identified in the proband. The familial study showed that the mother carried the same CCR which was also transmitted to the proband's brother.

Discussion

The occurrence of CCRs in the general population is extremely rare, with some 250 cases, either balanced or unbalanced, reported thus far (Pellestor *et al.*, 2011a; Madan, 2012). Furthermore, the several classifications proposed highlight the difficulty in covering the wide range of structural rearrangements. In this review on the relation between CCRs and male infertility, we considered as CCR

a structural rearrangement that involved at least three chromosomes and three or more chromosome breakpoints, which is now commonly accepted as definition of CCR (Madan, 2013). Therefore, we excluded patients presenting with double reciprocal translocations, as these translocations behave in a separate manner during meiosis.

The patient reported here has a complex rearrangement involving three chromosomes (chromosomes 1, 5 and 15) and four breakpoints (1p13, 5q14.3, 15q21 and 15q26): one of derivative chromosomes contains material from all three chromosomes, including an insertion of part of the long arm of chromosome 15. Therefore, according to the classification proposed by Madan (2012), this patient belongs to type IV, the more highly complex category.

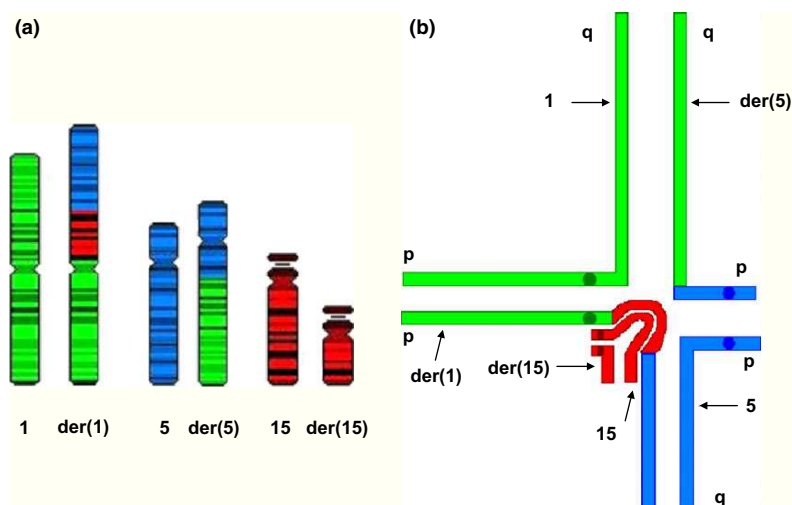


Fig. 2 (a) Schematic diagram showing the structure of the chromosomes involved in the complex chromosomal rearrangement. (b) Putative whole chromosome pairing at pachytene at meiosis I by the complex chromosomal rearrangement. Chromosome 1 material in green, chromosome 5 material in blue and chromosome 15 material in red. The derivative chromosome 1 [der(1)] is composed of material from chromosome 1 (in green), chromosome 15 (in red) and chromosome 5 (in blue).

M. H. Nguyen *et al.*

CCR and male infertility

Table 1 Characteristics of males referred for reproductive problems with a CCR

References	Spermo	RA/MCA	Karyotype	Nr C	Nr BP	Nr ins
Group A – conventional cytogenetics only						
Sills <i>et al.</i> (2005)	AZO		46,XY,t(9;13;14)(p22;q21.2;p13)	3	3	0
Mahjoubi & Razazian (2012)	AZO		47, XXY,t(1;3;5)(p22;q29;q22)	3	3	0
Joseph & Thomas (1982)	AZO		46,XY,der(11)(11pter->11q22),der(12)(12pter->12q13::11q22->11qter),der(21)(21qter->21p11:12q13->12qter)	3	3	0
Rodriguez <i>et al.</i> (1985)	AZO		46,XY,t(5;1;10;12)(5qter->5p13::12q24->12qter;1pter->1q42::5p13->5pter;10pter->10q24::1q42->1qter;12pter->12q24::10q24->10qter)	4	4	0
Salahshourifar <i>et al.</i> (2006)	AZO		46,XY,t(3;16;8)(p26;q13;q21.2)	3	3	0
Lee <i>et al.</i> (2006)	AZO		46,XY,t(9,13,21)(p22,q22,p11)	3	3	0
Salahshourifar <i>et al.</i> (2009)	OAT		46,XY,t(1;22;4)(p22.3;q11.1;q31.1)	3	3	0
Johannisson <i>et al.</i> (1988)	AT	MCA	46,XY,t(9;12;13)(q22;q22;q32)	3	3	0
Chandley <i>et al.</i> (1975)	SUBfertil		46,XY,t(4;7;15)(q24;q22;q24)	3	3	0
Saadallah & Hulten (1985)	Normal	RA	46,XY,t(2;4;9)(p13;q25;p12)	3	3	0
Bourrouillou <i>et al.</i> (1983)	NA	MCA	46,XY,t(9;10;18)(p24;q24;q21)	3	3	0
Fuster <i>et al.</i> (1997)	NA	RA	46,XY,t(2;11;22)(q13;q23;q11,2)	3	3	0
Gorski <i>et al.</i> (1988)	NA	RA	46,XY,t(3;4;6)(3pter->3q13::6q13->6qter)(4pter->4q33::3q25->3qter)(6qter->6p13::3q12->3q25::4q33->4qter)	3	5	1
Schwanitz <i>et al.</i> (1978)	NA	MCA	46,XY,t(6;10;13)(p23;q11;q14)	3	3	0
Schmidt & Passarge (1988)	NA	MCA	46,XY,t(1;12)(p22.1;q22),ins(7;1)(q11.2;q32q42.1)	3	5	1
Group B – conventional cytogenetics & FISH						
Bartels <i>et al.</i> (2007)	AZO		46,XY,der(1)(1pter->1q31.3::9q13->9qter),der(3)(9pter->9p21.3::3p14->3q12::14q13->14qter),der(9)(3pter->3p24::3q24->3q12::3p24->3p14::9p21.3->9q13::1q31.1->1qter),der(14)(14pter->14q13::3q24->3qter)	4	8	1
Yakut <i>et al.</i> (2013)	AZO		46,XY,t(1;10)(q43q44;q21q26.1),ins(14;4)(q31.3;q23q33)	4	7	2
Coco <i>et al.</i> (2004)	AZO		46,Xder(Y)(Ypter->Yq11.23::12q21.2->12qter),der(12)(12pter->12p11.2::12q21.2->12p11.2::15q13->15qter),der(15)(15pter->15q13::Yq11.23->Yqter)	3	4	1
Kim <i>et al.</i> (2011)	AZO		46,XY,der(3)(14pter::3q10->3qter),der(14)(3pter->3p11.1::14q21->14p11::14q21->14qter)	3	4	1
Kim <i>et al.</i> (2011)	AZO		46,XY,der(1)(9qter->9q22::1p32->1qter),der(4)(1pter->1p32::13q32->13q14::4p14->4qter),der(9)(9pter->9q22::4p14->4pter),der(13)(13pter->13q14::13q32->13qter)	4	5	1
Kim <i>et al.</i> (2011)	AZO		46,XY,t(2;19;22)(q11.2;p13.2;p11.2)	3	3	0
Kim <i>et al.</i> (2011)	AZO		46,XY,der(3)(3pter->3p23::3q25.3->3p11.1::6q27->6qter),der(6)(6pter->6q27::16q24->16qter),der(12)(12pter->12q24.3::3q25.3->3qter),der(16)(16pter->16q24::3p11.1->3p23::12q24.3->12qter)	4	6	2
Ours	AZO		46,XY,der(1)(5qter->5q14.3::15q21->15q26::1p13->1qter),der(5)(5pter->5q14.3::1p13->1pter),der(15)(pter->q21::q26->qter)	3	4	1
Joly-Helas <i>et al.</i> (2007)	CRYPTO		46,XY or 46,XX,ish t(1;4)(q42;q32),ins(1;11)(q41;q23q24),ins(4;11)(q23;q14q23)	3	7	
Siffroi <i>et al.</i> (1997)	CRYPTO		46,XY,der(7)t(7;13)(p14;q21),der(9)t(9;13)(p11.2;p21),der(13)t(7;13)(q14;q21)t(9;13)(9p11.2;p21)	3	4	0
Lebbar <i>et al.</i> (2008)	OAT		46,XY,der(9)t(9;12)(q32;p13),der(12)(14qter->14q32::12p13->12q13::9q32->9qter),der(14)t(12;14)(q13;q32.2)/46,XY	3	4	1
Lebbar <i>et al.</i> (2008)	OAT		46,XY,der(2)(12pter->12p13.1::2p12.1->2qter),der(4)ins(4;2)(p15.1;p23.3-p13.3),der(12)(2pter->2p24::12p12.3->12qter)/46,XY	3	5?	1
Kirkpatrick & Ma (2012)	OAT		46,XY,der(1)(1qter->1p35.1::10q26.13->10qter),der(2)(2pter->2q21.3::1p35.1->1pter),der(10)(10pter->10q11.23::10q24.33->10q26.13::10q24.33->10q11.23::2q21.3->2qter)	3	5	1

(Continued)

CCR and male infertility

M. H. Nguyen *et al.*

Table 1 (Continued)

References	Spermo	RA/MCA	Karyotype	Nr C	Nr BP	Nr ins
Kim <i>et al.</i> (2011)	OAT		46,XY,t(2;7;4)(q31;q34;q33)	3	3	0
Loup <i>et al.</i> (2010)	OA		46,XY,t(1;19;13)(1qter->1p31::13q31->13qter;19pter->19q13.2::1p31->1pter; 13pter->13q31::19q13.2->19qter)	3	3	0
Takeshita <i>et al.</i> (2007)	O		46,XY,der(1)(1qter->1p13.3::9q22.1->9qter),der(6)(6pter->6q15::7p13.3->7p31.2::14q31->14qter),der(9)(9pter->9q22.1::6q15->6qter),der(14)(14pter->14q31::1p31.2->1pter)	4	5	1
Ergul <i>et al.</i> (2009)	O	RA	46,XY,der(2)(2qter->2p25.1::13q13->13q22::18q12.3->18qter), der(13)(13pter->13q13::2p25->2pter),der(18)(18pter->18q12.3::13q22->13qter)	3	4	1
Pellestor <i>et al.</i> (2011b)	O	RA	46,XY,t(5;13;14)(q23;q21;q31)(5pter->5q23::14q31->14qter;13pter->13q21::5q23->5qter; 14pter->14q31::13q21->13qter)	3	3	0
Grasshoff <i>et al.</i> (2003)	NA	MCA	46,XY,der(4)(4pter->4q27::10q11.2->10qter),der(10)(10pter->10q11.2::14q24.1->14q13::4q28->4qter),der(14)(14pter->14q13::4q28->4q27::14q24.1->14qter)	3	5	2
Farra <i>et al.</i> (2011)	NA	RA	46,XY,(der16)(16pter->16q12::13q14.2->13q14.1::5q13->5qter),der(5)(5pter->5q11.2::13q14.2->13qter),der(13)(13pter->14.1::16q12->14qter)	3	4	1
Cai <i>et al.</i> (2001)	NA	RA	46,XY,t(7;9)(q22;p24),ins(8;7)(q21.2;q22q32)	3	4	1
Gruchy <i>et al.</i> (2010)	NA	MCA	46,XX,der(2)(2pter->2q37.2::6p22.2->6p22.1->6p12.3::2q37.2->2qter), der(6)(6pter->6p22.2::18q21.32->18q21.32::6p12.3->6qter),der(18)(18pter->18q21.32::6p22.2->6p21.1::6p12.3->6p12.3::18q21.32->18qter)	3	8	5
Basinko <i>et al.</i> (2010)	NA	RA	46,XY,t(2;3;18)(3pter->3p24::2p22->2qter;18qter->18q23::2 p2 74->2 p 22::3p24->3qter; 18pter->18q23::2p274->2pter)	3	4	1
Rothlisberger <i>et al.</i> (1999)	NA	MCA	46,XY,t(6;7;18;21)(6pter->6q22::6q25->6qter;7pter->7q21.3::21q21.3->21qter; 7qter->7q32.1::18p11.21->18q21.3::7q31.3->7q32.1::6q22->6q25::18q21.3->18qter; 21pter->21q21.3::7q21.3->7q31.3::18p11.21->18pter)	4	8	4
Patsalis <i>et al.</i> (2004)	NA	RA/MCA	46,XY,t(6;7;10)(q16.2;q34;q26.1)	3	3	0
Lim <i>et al.</i> (2008)	NA	RA	46,XY,t(5;13;8)(q21.2;q14.3;q24.3)	3	3	0
Karadeniz <i>et al.</i> (2008)	NA	RA	46,XY,t(1;4;2)(p31.1;q31.3;q24.3)	3	3	0
Roland <i>et al.</i> (1993)	NA	MCA	46,XY,t(6;15)(q16;q21),ins(3;6)(q12;q14q16)	3	4	1
Wagstaff & Hemann (1995)	NA	RA/MCA	46,XY,t(3;9)(p11;p23),ins(8;9)(q23;p23)	3	4	1

Spermo, spermogram; RA, recurrent abortion; MCA, multiple congenital abnormalities; Nr C, number of chromosomes involved; Nr BP, number of breakpoints; Nr ins, number of insertions/inversions; AZO, azoospermia; OAT, oligoasthenoteratozoospermia; AT, asthenozoospermia; OA, oligoasthenozoospermia; O, oligozoospermia; CRYPTO, cryptozoospermia; SUBfertil, subfertility (not defined); NA, not available.

Through a literature review, we could identify 43 phenotypically normal males referred for reproductive problems presenting a CCR (Table 1). They were divided in two groups based on the type of cytogenetic investigations (conventional with or without FISH) performed to characterise the CCR. Indeed, several workers have shown that precise characterisation of CCRs is not possible by classic banding cytogenetics but requires molecular methods such as FISH with locus-specific probes or BAC clones to identify the exact breakpoints (Gibson *et al.*, 1997; Cai *et al.*, 2001; Gribble *et al.*, 2005).

Nine of the 15 males in group A (60%) had spermatogenesis failure or disturbances, the other six (40%) having

been identified because of repeated abortions or the birth of a malformed child (Table 1). Eighteen of the 29 males in group B (62.1%) had azoospermia or oligozoospermia, the other eleven (37.9%) having been identified because of RA and/or MCA (Table 1). No difference was found in the probability of identifying a three- or four-way translocation versus a more complex rearrangement when subdividing males according to the type of ascertainment (spermatogenesis failure or disturbances versus RA/MCA).

Still, the consequences at the pachytene stage differ according to the structure of CCRs. In three- or four-way translocations, the chromosome pairs involved in

M. H. Nguyen *et al.*

CCR and male infertility

the rearrangement adopt a hexavalent or octavalent configuration at meiosis I, allowing the full synapsis of homologous segments (Saadallah & Hulten, 1985; Johannisson *et al.*, 1988; Cifuentes *et al.*, 1998; Loup *et al.*, 2010; Pellestor *et al.*, 2011b). As a consequence, these three- or four-way translocations lead to the production of a large variety of chromosomal imbalances (Cifuentes *et al.*, 1998; Loup *et al.*, 2010; Pellestor *et al.*, 2011b). The pachytene configuration is much more complex when the CCRs include one or more insertions and/or inversions, as shown in the patient reported here (Fig. 2b). Hexavalent formation is the most probable meiotic configuration, as found by several authors who performed meiotic analyses. However, other configurations where a tetravalent [involving chromosome 1/der(1) and chromosome 5/der(5)] and a bivalent [chromosome 15/der(15)] are possible, but, in these cases, pairing will not be complete.

As the number of breakpoints is higher than the number of chromosomes in these CCRs, recombination will occur. The longer the inserted/inverted segment, the more likely it will happen. Therefore, these CCRs give rise to an even greater range of chromosomally abnormal spermatozoa (Coco *et al.*, 2004; Basinko *et al.*, 2010; Kirkpatrick & Ma, 2012). It has been hypothesised that the infertility associated with CCRs is the result of spermatogenic arrest that occurs as a result of the complex meiotic configurations during meiosis (Lespinasse *et al.*, 2004). As no microdeletion of the Y-chromosome was identified, it is likely that the azoospermia observed in our patient was the result of meiotic arrest.

Indeed, the majority of males with a CCR was ascertained through spermatogenesis failure or disturbances (27/44 men – 61.4%), while in females, the reason for referral was RA and/or MCA (Madan, 2012). In fact, meiosis is a complex process controlled by different checkpoints (Roeder & Bailis, 2000; Eaker *et al.*, 2001), but males and females respond differently to meiotic disturbances (Hunt & Hassold, 2002). When an abnormality occurs during spermatogenesis, meiosis is generally stopped and apoptosis ensues, causing azoospermia or oligozoospermia (Paoloni-Giacobino *et al.*, 2000). When it happens during oogenesis, meiosis is generally pursued, leading to the formation of aneuploid gametes. However, the CCR can also be passed on to the next generation, as it was the case in this family.

In conclusion, the complexity of CCRs requires molecular cytogenetic analyses to be performed in all suspected cases. Male carriers of CCR produce a high frequency of chromosomally abnormal spermatozoa due to the aberrant segregation of the rearranged chromosomes during meiosis. The number of chromosomes and breakpoints involved in the rearrangement, the position of

breakpoints, the relative size of the resultant chromosomes and the presence or absence of recombination inside the paired-rearranged segments are presumed to affect the fertility of the carrier. Therefore, genetic counselling is very difficult. Testicular biopsy should not be performed in males with azoospermia. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) should not be proposed as a procedure for treating the infertility of CCR male carriers as a successful result is unlikely (Siffroi *et al.*, 1997).

References

- Bartels I, Starke H, Argyriou L, Sauter SM, Zoll B, Liehr T (2007) An exceptional complex chromosomal rearrangement (CCR) with eight breakpoints involving four chromosomes (1;3;9;14) in an azoospermic male with normal phenotype. *Eur J Med Genet* 50:133–138.
- Basinko A, Douet-Guilbert N, Parent P, Blondin G, Mingam M, Monot F, Morel F, Le Bris MJ, De Braekeleer M (2008) Familial interstitial deletion of the short arm of chromosome 4 (p15.33-p16.3) characterised by molecular cytogenetic analysis. *Am J Med Genet* 146:899–903.
- Basinko A, Perrin A, Nguyen HA, Morel F, Le Bris MJ, Saliou AH, Collet M, Parent P, Benec C, Quemener S, Ferec C, Douet-Guilbert N, De Braekeleer M (2010) Balanced transmission of a paternal complex chromosomal rearrangement involving chromosomes 2, 3 and 18. *Am J Med Genet* 152:2646–2650.
- Bourrouillou G, Rolland M, Colombies P (1983) [Secondary 18q2 due to a paternal double translocation]. *J Genet Hum* 31:243–249.
- Cai T, Yu P, Tagle DA, Lu D, Chen Y, Xia J (2001) A de novo complex chromosomal rearrangement with a translocation 7;9 and 8q insertion in a male carrier with no infertility. *Hum Reprod* 16:59–62.
- Chandley AC, Edmond P, Christie S, Gowans L, Fletcher J, Frackiewicz A, Newton M (1975) Cytogenetics and infertility in man. I. Karyotype and seminal analysis: results of a five-year survey of men attending a subfertility clinic. *Ann Hum Genet* 39:231–254.
- Cifuentes P, Navarro J, Miguez L, Egozcue J, Benet J (1998) Sperm segregation analysis of a complex chromosome rearrangements, 2;22;11, by whole chromosome painting. *Cytogenet Cell Genet* 82:204–209.
- Coco R, Rahn MI, Garcia Estanga P, Antonioli G, Solari AJ (2004) A constitutional complex chromosome rearrangement involving meiotic arrest in an azoospermic male. *Hum Reprod* 19:2784–2790.
- Eaker S, Pyle A, Cobb J, Handel MA (2001) Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. *J Cell Sci* 114:2953–2965.
- Ergul E, Liehr T, Mrasek K, Sazci A (2009) A de novo complex chromosome rearrangement involving three

- chromosomes (2, 13, and 18) in an oligospermic male. *Fertil Steril* 92:391.
- Farra C, Singer S, Dufke A, Ashkar H, Monsef C, Awwad J (2011) De novo exceptional complex chromosomal rearrangement in a healthy fertile male: case report and review of the literature. *Fertil Steril* 96:1160–1164.
- Fuster C, Miguez L, Miro R, Rigola MA, Perez A, Egozcue J (1997) Familial complex chromosome rearrangement ascertained by *in situ* hybridisation. *J Med Genet* 34:164–166.
- Gardner RJM, Sutherland GR (1996) Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling. Oxford University Press, New York, pp 182–190.
- Gibson LH, McGrath J, Yang-Feng TL (1997) A complex chromosome rearrangement with at least five breakpoints studied by fluorescence *in situ* hybridization. *Am J Med Genet* 68:417–420.
- Gorski JL, Kistenmacher ML, Punnett HH, Zackai EH, Emanuel BS (1988) Reproductive risks for carriers of complex chromosome rearrangements: analysis of 25 families. *Am J Med Genet* 29:247–261.
- Grasshoff U, Singer S, Liehr T, Starke H, Fode B, Schoning M, Dufke A (2003) A complex chromosomal rearrangement with a translocation 4;10;14 in a fertile male carrier: ascertainment through an offspring with partial trisomy 14q13→q24.1 and partial monosomy 4q27→q28. *Cytogenet Genome Res* 103:17–23.
- Gribble SM, Prigmore E, Burford DC, Porter KM, Ng BL, Douglas EJ, Fiegler H, Carr P, Kalaitzopoulos D, Clegg S, Sandstrom R, Temple IK, Youings SA, Thomas NS, Dennis NR, Jacobs PA, Crolla JA, Carter NP (2005) The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. *J Med Genet* 42:8–16.
- Gruchy N, Barreau M, Kessler K, Gourdiere D, Leporrier N (2010) A paternally transmitted complex chromosomal rearrangement (CCR) involving chromosomes 2, 6, and 18 includes eight breakpoints and five insertional translocations (ITs) through three generations. *Am J Med Genet A* 152A:185–190.
- Hunt PA, Hassold TJ (2002) Sex matters in meiosis. *Science* 296:2181–2183.
- ISCN (2013) An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Karger, Basel.
- Johannisson R, Lohrs U, Passarge E (1988) Pachytene analysis in males heterozygous for a familial translocation (9;12;13) (q22; q22; q32) ascertained through a child with partial trisomy 9. *Cytogenet Cell Genet* 47:160–166.
- Joly-Helas G, de La Rochebrochard C, Mousset-Simeon N, Moirrot H, Tiercin C, Romana SP, Le Caignec C, Clavier B, Mace B, Rives N (2007) Complex chromosomal rearrangement and intracytoplasmic sperm injection: a case report. *Hum Reprod* 22:1292–1297.
- Joseph A, Thomas IM (1982) A complex rearrangement involving three autosomes in a phenotypically normal male presenting with sterility. *J Med Genet* 19:375–377.
- Karadeniz N, Mrasek K, Weise A (2008) Further delineation of complex chromosomal rearrangements in fertile male using multicolor banding. *Mol Cytogenet* 1:17.
- Kausch K, Haaf T, Kohler J, Schmid M (1988) Complex chromosomal rearrangement in a woman with multiple miscarriages. *Am J Med Genet* 31:415–420.
- Kim JW, Chang EM, Song SH, Park SH, Yoon TK, Shim SH (2011) Complex chromosomal rearrangements in infertile males: complexity of rearrangement affects spermatogenesis. *Fertil Steril* 95:349–352, 352.
- Kirkpatrick G, Ma S (2012) Meiotic segregation and interchromosomal effects in a rare (1:2:10) complex chromosomal rearrangement. *J Assist Reprod Genet* 29:77–81.
- Kleczkowska A, Fryns JP, Van den Berghe H (1982) Complex chromosomal rearrangements (CCR) and their genetic consequences. *J Genet Hum* 30:199–214.
- Kousseff BG, Nichols P, Essig YP, Miller K, Weiss A, Tedesco TA (1987) Complex chromosome rearrangements and congenital anomalies. *Am J Med Genet* 26:771–782.
- Lebbar A, Callier P, Baverel F, Marle N, Patrat C, Le Tessier D, Mugneret F, Dupont JM (2008) Two cases of mosaicism for complex chromosome rearrangements (CCRM) associated with secondary infertility. *Am J Med Genet A* 146A:2651–2656.
- Lee IW, Su MT, Hsu CC, Lin YH, Chen PY, Kuo PL (2006) Constitutional complex chromosomal rearrangements in azoospermic men—case report and literature review. *Urology* 68:1343–1348.
- Lepinasse J, Rethore MO, North MO, Bovier-Lapierre M, Lundsteen C, Fert-Ferrer S, Bugge M, Kirchoff M (2004) Balanced complex chromosomal rearrangements (BCCR) with at least three chromosomes and three or more breakpoints: report of three new cases. *Ann Genet* 47:315–324.
- Lim CK, Cho JW, Kim JY, Kang IS, Shim SH, Jun JH (2008) A healthy live birth after successful preimplantation genetic diagnosis for carriers of complex chromosome rearrangements. *Fertil Steril* 90:1680–1684.
- Loup V, Bernicot I, Janssens P, Hedon B, Hamamah S, Pellestor F, Anahory T (2010) Combined FISH and PRINS sperm analysis of complex chromosome rearrangement t (1;19;13): an approach facilitating PGD. *Mol Hum Reprod* 16:111–116.
- Madan K (2012) Balanced complex chromosome rearrangements: reproductive aspects. A review. *Am J Med Genet A* 158A:947–963.
- Madan K (2013) What is a complex chromosome rearrangement? *Am J Med Genet A* 161A:1181–1184.
- Madan K, Nieuwint AW, van Bever Y (1997) Recombination in a balanced complex translocation of a mother leading to a balanced reciprocal translocation in the child. Review of 60 cases of balanced complex translocations. *Hum Genet* 99:806–815.
- Mahjoubi F, Razazian F (2012) Constitutional complex chromosomal rearrangements in a Klinefelter patient: case

- report and review of literature. *J Assist Reprod Genet* 29:437–441.
- Pai GS, Thomas GH, Mahoney W, Migeon BR (1980) Complex chromosome rearrangements. Report of a new case and literature review. *Clin Genet* 18:436–444.
- Paoloni-Giacobino A, Kern I, Rumpel Y, Djelati R, Morris MA, Dahoun SP (2000) Familial t(6;21)(p21.1;p13) translocation associated with male-only sterility. *Clin Genet* 58:324–328.
- Patsalis PC, Evangelidou P, Charalambous S, Sismani C (2004) Fluorescence *in situ* hybridization characterization of apparently balanced translocation reveals cryptic complex chromosomal rearrangements with unexpected level of complexity. *Eur J Hum Genet* 12:647–653.
- Pellestor F, Anahory T, Lefort G, Puechberty J, Liehr T, Hedon B, Sarda P (2011a) Complex chromosomal rearrangements: origin and meiotic behavior. *Hum Reprod Update* 17:476–494.
- Pellestor F, Puechberty J, Weise A, Lefort G, Anahory T, Liehr T, Sarda P (2011b) Meiotic segregation of complex reciprocal translocations: direct analysis of the spermatozoa of a t(5;13;14) carrier. *Fertil Steril* 95:2433.e17–22.
- Rodriguez MT, Martin MJ, Abrisqueta JA (1985) A complex balanced rearrangement involving four chromosomes in an azoospermic man. *J Med Genet* 22:66–67.
- Roeder GS, Bailis JM (2000) The pachytene checkpoint. *Trends Genet* 16:395–403.
- Roland B, Lowry RB, Cox DM, Ferreira P, Lin CC (1993) Familial complex chromosomal rearrangement resulting in duplication/deletion of 6q14 to 6q16. *Clin Genet* 43:117–121.
- Rothlisberger B, Kotzot D, Brecevic L, Koehler M, Balmer D, Binkert F, Schinzel A (1999) Recombinant balanced and unbalanced translocations as a consequence of a balanced complex chromosomal rearrangement involving eight breakpoints in four chromosomes. *Eur J Hum Genet* 7: 873–883.
- Saadallah N, Hulten M (1985) A complex three breakpoint translocation involving chromosomes 2, 4, and 9 identified by meiotic investigations of a human male ascertained for subfertility. *Hum Genet* 71:312–320.
- Salahshourifar I, Gilani MAS, Vosough A, Tavakolzadeh T, Tahsili M, Mansori Z, Karimi H, Totonchi M, Gourabi H (2006) De novo complex chromosomal rearrangement of 46, XY, t(3;16;8)(p26;q13;q21.2) in a non-obstructive azoospermic male. *J Appl Genet* 47:93–94.
- Salahshourifar I, Shahrokhshahi N, Tavakolzadeh T, Beheshti Z, Gourabi H (2009) Complex chromosomal rearrangement involving chromosomes 1, 4 and 22 in an infertile male: case report and literature review. *J Appl Genet* 50:69–72.
- Schmidt A, Passarge E (1988) A complex familial translocation with a five-break rearrangement involving three chromosomes. *Clin Genet* 34(Suppl):415.
- Schwanitz G, Schmid P, Berthold HJ, Grosse KP (1978) Partial trisomy 13 with clinical signs of Patau syndrome, resulting from a complex paternal rearrangement of chromosomes 6, 10 and 13. *Ann Génét* 21:100–103.
- Siffroi JP, Benzacken B, Straub B, Le BC, North MO, Curotti G, Bellec V, Alvarez S, Dadoune JP (1997) Assisted reproductive technology and complex chromosomal rearrangements: the limits of ICSI. *Mol Hum Reprod* 3:847–851.
- Sills ES, Kim JJ, Witt MA, Palermo GD (2005) Non-obstructive azoospermia and maturation arrest with complex translocation 46, XY t(9;13;14)(p22;q21.2;p13) is consistent with the Luciani-Guo hypothesis of latent aberrant autosomal regions and infertility. *Cell Chromosome* 4:2.
- Simoni M, Bakker E, Eurlings MC, Matthijs G, Moro E, Muller CR, Vogt PH (1999) Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. *Int J Androl* 22:292–299.
- Takeshita N, Katagiri Y, Shibui Y, Kitamura M, Fukuda Y, Morita M (2007) Reproductive genetic counseling in patients with complex chromosomal rearrangement. *Fertil Steril* 88:S240–S241.
- Wagstaff J, Hemann M (1995) A familial “balanced” 3;9 translocation with cryptic 8q insertion leading to deletion and duplication of 9p23 loci in siblings. *Am J Hum Genet* 56:302–309.
- Yakut S, Cetin Z, Clark OA, Usta MF, Berker S, Luleci G (2013) Exceptional complex chromosomal rearrangement and microdeletions at the 4q22.3q23 and 14q31.1q31.3 regions in a patient with azoospermia. *Gene* 512:157–160.

B. Etude de la ségrégation méiotique chez les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure

1. Chapitre : Etude de la ségrégation méiotique dans les gamètes mâles chez les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure

Résumé

Le développement de la FISH permet d'analyser la ségrégation méiotique sur un grand nombre de spermatozoïdes par rapport à la fécondation hétérospécifique avec l'ovocyte d'hamster. Le laboratoire de Cytogénétique et Biologie de la Reproduction de Brest est devenu un centre de référence en France pour les études de la ségrégation méiotique dans les spermatozoïdes. Dans ce travail, nous reportons nos résultats des études de la ségrégation méiotique dans les spermatozoïdes chez les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure en utilisant la technique de FISH.

Chez les patients porteurs d'une translocation robertsonienne, la fréquence de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés varie de 8,78% à 30,13% tandis que cela est trouvée de 9,03% à 65,8% chez les patients porteurs d'une translocation réciproque équilibrée. Le profil similaire de la ségrégation pour la même translocation (études intrafamiliales et intraindividuelles) par rapport à la diversité d'autres translocations confirme que le risque de déséquilibres méiotiques dépend de la nature des chromosomes impliqués dans le réarrangement (la taille des bras, la position du centromère, . . .), la position des points de cassure et le nombre de crossing-over sur les segments impliqués dans la translocation.

Chez les patients porteurs d'une inversion péricentrique, le taux des gamètes chromosomiquement déséquilibrés varie de 0% à 39,06%. Il dépend du nombre de crossing-over sur la région inversée et de la taille relative du segment inversé par rapport au chromosome entier.

Le taux des spermatozoïdes chromosomiquement anormaux est considéré comme un facteur prédictif lors de la FIV ou ICSI, l'étude de FISH devrait être intégrée dans l'exploration génétique de l'infertilité masculine afin de personnaliser le conseil génétique.

Chapter

MEIOTIC SEGREGATION STUDIES IN SPERMATOOZOA OF MALES CARRYING A STRUCTURAL CHROMOSOME ABNORMALITY

***Minh Huong Nguyen*^{1,2}, *Frédéric Morel*^{1,2,3},
Nathalie Douet-Guilbert^{1,2,3}, *Audrey Basinko*³,
*Marie-Josée Le Bris*³, *Marc De Braekeleer*^{1,2,3*}
and Aurore Perrin^{1,2,3}**

¹Laboratoire d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France

²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1078, Brest, France

³Service de Cytogénétique et Biologie de la Reproduction, Hôpital Morvan, CHRU Brest, Brest, France

ABSTRACT

Since 1990, the development of fluorescent *in situ* hybridization (FISH) has allowed analyzing a much greater number of spermatozoa than before when the analysis of meiotic segregation relied on heterospecific fertilization in zona-free hamster eggs.

Over the last 10 years, the laboratory of Cytogenetics and Reproductive Biology of the University Hospital in Brest has become a referral center in France for meiotic segregation studies in spermatozoa. We report here our results on meiotic segregation performed in spermatozoa of males carrying a structural or numerical chromosome abnormality using fluorescence *in situ* hybridization.

The frequency of unbalanced spermatozoa of carriers of a robertsonian translocation varies from 8.78 to 30.13% while it is included between 9.03% and 65.8% in balanced reciprocal translocation carriers. The similar segregation profiles for a same translocation

* Corresponding author: Pr. Marc De Braekeleer; Laboratoire de Cytogénétique; Hôpital Morvan, Bâtiment 5bis, CHRU Brest, 2, avenue Foch, F-29609 Brest cedex, France. Phone: 33 (0)2 98 22 36 94; Fax:+ 33 (0)2 98 22 39 61; E-mail: marc.debraekeleer@univ-brest.fr.

(intrafamilial or intraindividual studies) compared with those divergent of other translocations confirm that the risk of meiotic imbalances is dependent upon the nature of the chromosomes involved in the rearrangement (size of the arms, centromere position, etc.), the breakpoints positions and the number of crossing-over on the segments involved in the translocation. In pericentric inversions, the rate of unbalanced spermatozoa varies from 0% to 39.06%; it is influenced by the probability of crossing-over in the inverted segment and the relative size of the inverted segment.

As the frequency of chromosomally abnormal spermatozoa has a predictive value on the outcome of *in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection, FISH studies should be integrated in the genetic exploration of infertile men with a structural chromosome abnormality to give them a personalized risk assessment.

INTRODUCTION

In industrialized countries, 15 to 20% of couples have fertility problems. The causes of infertility are variable, being of male origin in one third of the couples, female in another third and mixed in the remaining third.

Many factors are known to influence spermatogenesis, making the causes of male infertility difficult to evaluate. Male infertility has been associated with several genetic and non-genetic conditions, including chromosomal abnormalities, Y chromosome microdeletions, cystic fibrosis, hypogonadotropic hypogonadism, undescended testes, anatomical abnormalities of the genital tract, varicocele, etc. [1,2]. Chromosomal aberration is perhaps the factor best known to interfere with gametogenesis [3]. Some aberrations are inherited while others arise *de novo* in the sperm-producing cells. In the infertile male population, there is a 2 to 20-times higher probability of having a structural chromosomal abnormality than in the general population [3,4]. Generally, these men have a normal phenotype but they can have sperm abnormalities.

The study of the chromosomal equipment of spermatozoa was greatly facilitated with the development of fluorescent *in situ* hybridization in the early 1990s (FISH) [5]. Although a few studies were performed before 1990, they relied on heterospecific fertilization in zona-free hamster eggs or *in situ* hybridization with isotopic probes followed by autoradiography [6,7].

Over the last 10 years, the laboratory of Cytogenetics and Reproductive Biology of the University Hospital in Brest has become a referral center in France for meiotic segregation studies in spermatozoa. We report here our results on meiotic segregation performed in spermatozoa of males carrying a structural chromosome abnormality (translocation and inversion) using fluorescent *in situ* hybridization.

METHODOLOGY

Sperm samples were washed in PBS and 20 μ l of sperm were dropped and fixed on a slide with Carnoy's solution (methanol/acetic acid: 3v/1v). The sperm nuclei were partially decandensed for 2 min with a solution of NaOH (1 mol/l), then washed in 2 x SSC for 10 min. Slides were stored at -20°C until use.

Selection of the probes to be used to analyze the meiotic segregation was based on the karyotype obtained from peripheral blood lymphocytes. Two types of probes, commercial and home-made, were used. Commercially available probes included chromosome enumeration probes (CEP), subtelomeric specific probes and locus-specific identifier (LSI) probes. All these probes were used according to the suggested manufacturers' protocols. When no commercial probe was available, we relied on Bacterial Artificial Chromosome (BAC) clones.

We identified the BAC clones of interest through the human genome browser database of the genome bioinformatics group at the University of California at Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/>). They were then ordered by Internet on the site of the Children's Hospital Oakland Research Institute in Oakland, California (<http://bacpac.chori.org/>). When received, bacterial cultures were prepared from a single colony picked from a selective plate in the presence of chloramphenicol. Plasmids were obtained from bacterial cultures grown in the presence of chloramphenicol (10mg/L). After having lysed bacteria using SDS1%/NaOH 0.2N, DNA was purified from RNA, proteins and other cellular contaminants. Probes were then labelled by nick translation in Spectrum Orange, Spectrum Green or Aqua (Nick Translation Kit, Abbott, Rungis, France) [8]. Usually, 3 overlapping BAC clones were used to increase the signal intensity.

The hybridization procedure and analysis have been previously described [9]. Briefly, before hybridization, the sperm DNA slides were immersed in a jar of 2 x SSC/0.4%NP40 solution for 30 min at 37°C and then passed through an ethanol series of growing concentration (70, 90 and 100%) and allowed to air dry. The denaturation was performed simultaneously on spermatozoa and probes for 1 min at 70°C. The slides were incubated overnight in a dark humidified chamber at 37°C. They were washed for 45 s in 0.4 x SSC/0.3% NP40 at 72°C and 20 s in 2 x SSC/0.1% NP40 at room temperature. Finally, they were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenyl-indole (DAPI).

The slides were analyzed using a Zeiss Axioplan microscope (Zeiss, Le Pecq, France). Subsequent image acquisition was performed using a CCD camera with Isis (In situ imaging system) (MetaSystems, Altlusheim, Germany).

MEIOTIC SEGREGATION OF ROBERTSONIAN TRANSLOCATIONS

Robertsonian translocations result in the formation of a derived chromosome composed of the long arms of 2 acrocentric chromosomes (pair numbers 13, 14, 15, 21 and 22) and subsequent loss of their short arms. This loss is without phenotypic consequence for the carrier because the short arm of the acrocentrics contains only nucleolar organizer (NOR) genes present in a large amount in the genome. As a consequence of this fusion, a carrier of a Robertsonian translocation has only 45 chromosomes.

For a carrier of a Robertsonian translocation, in spermatocytes I, during meiosis I, a trivalent is formed between the derivative chromosome composed of the long arms of 2 acrocentric chromosomes and both normal acrocentric chromosomes of the same pairs. The majority of gametes have normal or balanced chromosomes due to the alternate mode (the translocated chromosomes segregate in one spermatocyte II and their normal homologues in another spermatocyte II).

Nine men with a robertsonian translocation, five carriers of a rob(13;14)(q10;q10), one of a rob(13;15)(q10;q10) and three of a rob(14;21)(q10;q10) were studied in our laboratory (Table 1). The frequencies of spermatozoa with a normal or balanced chromosomal equipment due to the alternate mode ranged from 69.88% to 91.22%.

Table 1. Meiotic segregation in Robertsonian translocation carriers studied by FISH in decondensed spermatozoa

Translocation	Nr	Mode of segregation		Diploid or 3:0	Ambiguous	References
		Alternate	Adjacent			
		Normal or balanced				
rob(13;14)(q10;q10)	1707	78.38	20.86	0.76	0	[18,19]
rob(13;14)(q10;q10)	1754	91.22	7.69	0.80	0.29	[18,19]
rob(13;14)(q10;q10)	1846	86.67	12.73	0.38	0.22	[18,19]
rob(13;14)(q10;q10)	2377	69.88	22.34	6.86	0.93	[20]
rob(13;14)(q10;q10)	2070	82.99	11.84	2.46	2.70	NP
rob(13;15)(q10;q10)	1015	85.70	13.50	0.50	0.30	NP
rob(14;21)(q10;q10)	1631	84.92	14.47	0.61	0	[18,19]
rob(14;21)(q10;q10)	1212	88.53	7.18	0.83	3.46	NP
rob(14;21)(q10;q10)	2091	90.72	7.99	1.15	0.14	NP

NP: unpublished results.

Nr: number of spermatozoa analyzed.

Our results corroborate the observations made by other authors who found a majority (60% to 93%) of sperm cells with normal or balanced chromosomal equipment [4,10,11]. These studies also found that the frequencies of unbalanced spermatozoa, resulting from the adjacent mode of segregation, were included between 9% and 23.3% for the 45,XY,rob(13;14)(q10;q10) carriers and between 7% and 27.8% for those with a 45,XY,rob(14;21)(q10;q10) karyotype [12,13]. Interindividual variability was also demonstrated for different robertsonian translocations involving a same chromosomal pair in our series.

MEIOTIC SEGREGATION OF RECIPROCAL TRANSLOCATIONS

Balanced reciprocal translocations do not change the amount of chromosomal material, but only the order, which explains why carriers have usually a normal phenotype. In most of the cases, these translocations involve the exchange of chromosome material between arms of 2 heterologous chromosomes but more complex rearrangements involving 3 chromosomes or more are known.

For a carrier of a balanced reciprocal translocation, in spermatocytes I, during meiosis I, a quadrivalent is formed between the translocated chromosomes and their normal homologues. Among the 5 modes of segregation, the sole segregation mode allowing the production of chromosomally normal or balanced gametes is the alternate mode.

Thirty-four men with a reciprocal translocation were studied in our laboratory (Table 2). The frequency of spermatozoa with normal or balanced chromosomal equipment due to the alternate mode was highly variable, ranging from 34.20% to 90.97%.

Meiotic Segregation in Spermatozoa

Table 2. Meiotic segregation in reciprocal translocation carriers studied by FISH in decondensed spermatozoa

Translocation	Nr	Mode of segregation			Diploidy			References
		Alternate	Adjacent		3 : 1	4 : 0	Other*	
			Normal or balanced	I				
t(X;18)(q11;p11.1)	447	54.36	8.28	5.14	22.37	2.01	7.83	[21]
t(X;2)(p21;p25.3)	440	37.95	21.59	20.67	17.95	0.91	0.91	[22]
t(1;17)(q31;p12)	2036	49.12	34.43	8.50	7.32	0.29	0.34	[18,19]
t(8;18)(p22;q21)	1141	48.38	29.45	16.32	5.34	0.09	0.44	[18,19]
t(4;5)(p15;q12)	1062	45.57	25.71	19.21	8.10	0.47	0.94	[18,19]
t(7;22)(q32;q12)	2619	41.73	35.66	12.99	7.94	0.19	1.49	[18,19]
t(10;15)(p14;q26)	2733	43.36	37.29	10.58	8.34	0.10	0.33	[18,19]
t(3;13)(q27;q11)	546	34.43	22.71	22.34	16.31	0.36	3.85	[18,19]
t(6;10)(p21;q26)	2150	38.56	35.44	15.54	9.30	0.56	0.60	[18,19]
t(3;8)(q22;q23)	1788	34.40	35.85	14.99	13.86	0.17	0.73	[18,19]
t(4;6)(q34;q16.1)	583	39.62	40.14	7.54	12.16	0.51	0.00	[18,19]
t(13;17)(q22;q23)	3082	47.30	40.04	7.15	4.89	0.39	0.23	[18,19]
t(7;8)(p12;p22)	2507	45.43	28.24	16.39	8.06	0.36	1.52	[18,19]
t(17;19)(q21;p13.3)	2504	40.93	25.28	15.74	17.41	0.24	0.40	[18,19]
t(6;8)(q27;q24.1)	2532	43.48	40.88	5.25	9.09	0.51	0.79	NP
t(7;15)(p15.1;q13)	1333	38.94	29.03	13.95	13.43	2.70	1.95	NP
t(13;15)(q31;q26.2)	2399	38.60	38.02	11.67	11.34	0.13	0.25	[20]
t(13;17)(p13;p12)	1157	63.01	29.65	1.73	3.98	0.86	0.78	NP
t(1;9)(q43;p23)	1046	42.83	39.20	7.37	9.93	0.10	0.57	NP
t(15;16)(p10;q10)	2322	47.03	7.19	2.84	42.33	0.39	0.22	[20]
t(5;21)(p14;q22)	1084	62.27	30.63	1.01	4.25	0.74	1.10	NP
t(8;9)(q23;p22)	602	35.55	27.08	12.12	24.25	1.00	0.00	NP
t(4;9)(p13;q22)	1547	38.72	23.85	21.65	14.16	0.65	0.97	NP
t(5;7)(q13.1;q34)	2150	38.37	29.53	12.37	14.16	5.44	0.51	NP
t(1;21)(p33;q22)	2296	57.05	31.09	3.88	5.23	1.31	1.44	NP
t(9;18)(q21.3;p11.2)	2516	47.34	30.69	14.26	4.49	1.35	1.87	NP
t(11;13)(q22.1;q21.2)	1996	40.73	39.48	9.82	8.72	0.10	1.15	NP
t(2;9)(p24;p21)	1000	34.20	18.50	33.70	10.40	0.00	3.20	NP
t(1;22)(p11;p11.2)	1024	45.61	22.75	21.29	8.89	1.17	0.29	NP
t(2;15)(p13;q15)	490	47.76	0.61	12.86	35.71	0.82	2.24	NP
t(7;8)(q11.21;cen) (a)	10023	62.84	17.61	12.80	6.47	0.28	0.00	[15]
t(7;8)(q11.21;cen) (b)	34527	56.70	25.10	11.10	7.06	0.04	0.00	[15]
t(9;22)(q21;q11.12) (c)	2573	54.68	27.09	11.39	6.02	0.58	0.23	[9]
t(9;22)(q21;q11.12) (d)	1551	57.90	25.21	9.34	6.58	0.64	0.32	[9]
-14,der(18)t(14;18)(q11;p11.3) (c)	981	87.26	9.08		1.83		1.83	[14]
-14,der(18)t(14;18)(q11;p11.3) (d)	144	90.97	6.95		0.00		2.08	[14]

NP: unpublished results.

Nr: number of spermatozoa analyzed.

- (a) younger brother
- (b) older brother
- (c) sample 1
- (d) sample 2

It should be noted that this latter result, close to that observed among robertsonian translocation carriers, was obtained in a man carrier of a “particular” translocation. Indeed,

this male had a 45,XY,-14,der(18)t(14;18)(q11;p11.3) karyotype. This translocation resulted in the formation of a metacentric chromosome composed of the whole chromosome 18 and the long arm of chromosome 14, with loss of the short arm of chromosome 14, leading to a karyotype with only 45 chromosomes. Thus, the results of meiotic segregation in spermatozoa of this carrier can probably be explained by the formation of trivalent in cis configuration during meiosis I between the derivative chromosome and the normal chromosomes 14 and 18, as in Robertsonian translocation carriers. Therefore, the configuration adopted at pachytene strongly determines the segregation mode that will be preferentially followed during anaphase I [14].

Among the modes of segregation generating spermatozoa with unbalanced chromosomal equipment, adjacent I was the preferential mode, followed by adjacent II and 3:1 for most of the patients.

Important variations in the rate of imbalances have been observed in sperm of carriers of a reciprocal translocation. It was therefore interesting to study whether the meiotic segregation was a random process. This question was addressed by studying variations in sequential semen samples of a same man or by studying segregation among brothers.

We analyzed two semen samples from two carriers of a different translocation [9,14]. No intraindividual variations in the chromosomally unbalanced spermatozoa frequencies were found between the sperm samples. We also analyzed the meiotic segregation of a t(7;8)(q11.21;cen) balanced reciprocal translocation in two brothers [15]. For both brothers, the unbalanced spermatozoa resulted from adjacent 1, adjacent 2, and 3:1 segregation in decreasing frequencies and similar proportions.

The similar profiles of meiotic segregation for a same translocation, compared with those very divergent of the other cases of studied translocations, confirm that the risks of meiotic imbalances vary primarily according to the nature of the chromosomes involved in the rearrangement (size of the arms, centromere position), the breakpoint position and the distribution and number of chiasmata.

Our results corroborate the observations made by other authors who showed that the majority of unbalanced spermatozoa resulted from adjacent I or adjacent II segregation. However, for some balanced reciprocal translocation carriers, most of the unbalanced gametes resulted from the 3:1 mode. The frequencies of unbalanced spermatozoa of carriers of a balanced reciprocal translocation reported in the literature varied from 19% to more than 80%, which is in agreement with our results [4,11,16].

MEIOTIC SEGREGATION OF PERICENTRIC INVERSIONS

Inversions are the result of 2 breaks within a same chromosome followed by 180° rotation and reunion of the inverted segment. Inversions with both breaks in the same arm are called paracentric inversions, whereas those with breaks on both sides of the centromere are called pericentric inversions.

For a carrier of an inversion, in spermatocytes I, during meiosis I, the pairing of the normal and inverted chromosomes requires the formation of an inversion loop.

Eight men with a pericentric inversion were studied in our laboratory (Table 3). The frequencies of spermatozoa with recombinant chromosomes varied from 0% for the

Meiotic Segregation in Spermatozoa

7

inv(2)(p11q13) to 39.06% for the inv(8)(p12q24.1). A significant difference in the frequencies of the recombinant products was found among the eight pericentric inversion carriers ($p < 0.001$) and also between the three men with a pericentric inversion of chromosome 8 ($p < 0.001$). The proportions of the two types of recombinant products (dup q/del p or del q/dup p) were not statistically different from the expected 1:1 ratio ($p > 0.05$).

The meiotic segregation of a limited number of pericentric inversions was analyzed by FISH. Segregation results indicate a great heterogeneity in the percentage of unbalanced gametes, from 0 to 37.38% [11,17].

Table 3. Meiotic segregation of pericentric inversions studied by FISH

	Nr spermatozoa	Size inversion (in %)	Non recombinants	Recombinants		Others	References
				dup(p)/del(q)	dup(q)/del(p)		
inv(1)(p36.3q43)	69	95	68.12	11.59	18.84	1.45	[23]
inv(2)(p11q13)	702	10	99.43	0	0	0.57	[23]
inv(3)(p21q27)	2505	69	64.63	14.65	15.57	5.15	NP
inv(8)(p12q21)	3402	31	97	1.00	0.44	1.56	[23,24]
inv(8)(p12q24.1)	2601	61	60.94	19.99	17.72	1.35	[23,24]
inv(8)(p23q24)	2045	80	61.03	20.00	17.70	1.27	[24]
inv(12)(p11q23)	5051	51	91.41	3.98	3.52	1.09	[23]
inv(20)(p12.3q13.33)	625	84	80.00	9.92	8.32	1.76	[23]

NP: unpublished results.

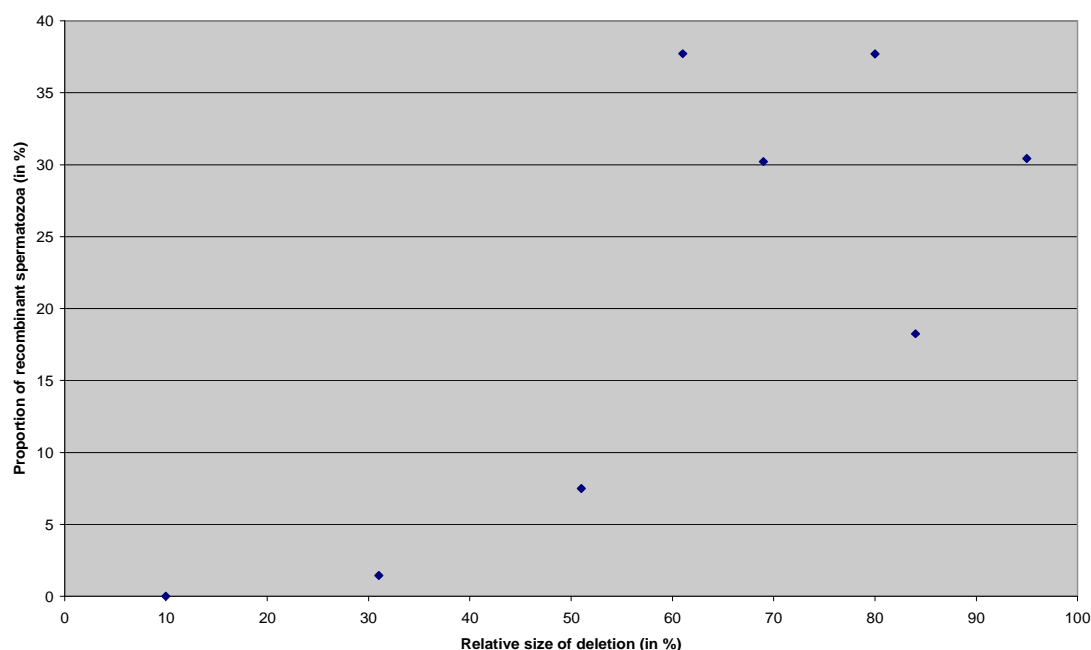


Figure 1. Graph plotting the proportion of recombinant spermatozoa according to the relative size of pericentric inversion in eight patients.

8 Minh Huong Nguyen, Frédéric Morel, Nathalie Douet-Guilbert et al.

Crossing-over can occur within the inverted chromosomal segment. The probability of such event is affected by the chromosome and the region involved, the length of the inverted segment and the breakpoint location. It was postulated that a significant proportion of unbalanced spermatozoa was produced when the inversion represented at least 50% of the chromosome length and had a minimum size of 100Mb [17].

We plotted the frequency of recombinant spermatozoa of the eight patients according to the relative size of the inversion calculated as the length of the inversion over that of the whole chromosome (expressed in percentage). A significant correlation was found ($R=0.77$, $p<0.001$). A high level of spermatozoa with recombinant chromosomes, inducing a high risk of aneuploidy of recombination in the offspring was produced when the inverted segment was $>50\%$ of the chromosome length, independently of the size of the inverted segment (Figure 1).

CONCLUSION

The study of meiotic segregation in males carrying a structural chromosomal rearrangement is of utmost interest to understand the processes of fetal chromosomal structural abnormalities. Indeed, if a spermatozoon with unbalanced chromosomal equipment has the same capacity of fertilization of a balanced spermatozoon, the highest the production of unbalanced spermatozoa, the highest the risk of producing a chromosomally unbalanced zygote, resulting in a lack of implantation or a spontaneous abortion or the birth of a child with malformations and/or mental retardation.

Furthermore, the study of meiotic segregation allows a “personalized” risk assessment of unbalanced chromosomal aberrations during genetic counseling. Indeed, a couple whom the man has a majority of normal or balanced gametes and a low risk of unbalanced viable fetus could be orientated in an ICSI program more easily than couples in the opposite situation. In this case, pre-implantation genetic diagnosis (PGD), method allowing the identification of a genetic abnormality in an embryo obtained by in vitro fertilization before its transfer in utero, could also be discussed with these couples. Finally, it could also be discussed of having recourse to donor sperm or adoption.

Of course, whether following a natural conception or ICSI, antenatal diagnosis has to be proposed to those couples in whom the male partner (as well as the female) is carrying a structural chromosomal rearrangement.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank all the physicians and medical biologists who referred patients' samples to our laboratory. Some samples were provided by GERMETHEQUE biobank (France). This study was supported, in part, by a grant from the ‘Agence de Biomédecine’, France.

REFERENCES

- [1] Diemer, T. & Desjardins, C. (1999) Developmental and genetic disorders in spermatogenesis. *Hum Reprod Update*, 5, 120-140.
- [2] Huynh, T., Mollard, R. & Trounson, A. (2002) Selected genetic factors associated with male infertility. *Hum Reprod Update*, 8, 183-198.
- [3] De Braekeleer, M. & Dao, T. N. (1991) Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod*, 6, 245-250.
- [4] Morel, F., Douet-Guilbert, N., Le Bris, M. J., Herry, A., Amice, V., Amice, J. & De Braekeleer, M. (2004) Meiotic segregation of translocations during male gametogenesis. *Int J Androl*, 27, 200-212.
- [5] Guttenbach, M. & Schmid, M. (1990) Determination of Y chromosome aneuploidy in human sperm nuclei by nonradioactive in situ hybridization. *Am J Hum Genet*, 46, 553-558.
- [6] Martin, R. H. (1983) A detailed method for obtaining preparations of human sperm chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*, 25, 252-256.
- [7] Joseph, A. M., Gosden, J. R. & Chandley, A. C. (1984) Estimation of aneuploidy levels in human spermatozoa using chromosome specific probes and in situ hybridisation. *Hum Genet*, 66, 234-238.
- [8] Douet-Guilbert, N., Basinko, A., Morel, F., Le Bris, M. J., Ugo, V., Morice, P., Berthou, C. & De Braekeleer, M. (2008) Chromosome 20 deletions in myelodysplastic syndromes and Philadelphia-chromosome-negative myeloproliferative disorders: characterization by molecular cytogenetics of commonly deleted and retained regions. *Annals of Hematology*, 87, 537-544.
- [9] Morel, F., Douet-Guilbert, N., Le Bris, M. J., Herry, A., Marchetti, C., Lefebvre, V., Delobel, B., Amice, V., Amice, J. & De Braekeleer, M. (2004) Lack of intraindividual variation of unbalanced spermatozoa frequencies from a 46,XY,t(9;22)(q21;q11.2) carrier: Case report. *Hum Reprod*, 19, 2227-2230.
- [10] Moradkhani, K., Puechberty, J., Bhatt, S., Lespinasse, J., Vago, P., Lefort, G., Sarda, P., Hamamah, S. & Pellestor, F. (2006) Rare Robertsonian translocations and meiotic behaviour: sperm FISH analysis of t(13;15) and t(14;15) translocations: a case report. *Hum Reprod*, 21, 3193-3198.
- [11] Morel F, Douet-Guilbert N, Perrin A, Le Bris MJ, Amice V, Amice J, De Braekeleer M Chromosomal abnormalities in spermatozoa. In: De Braekeleer M, editor. Cytogenetics and Infertility. Trivandrum (India): *Transworld Research Network*, 2006. p. 53-112.
- [12] Anton, E., Blanco, J., Egozcue, J. & Vidal, F. (2004) Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10). *Hum Reprod*, 19, 1345-1351.
- [13] Frydman, N., Romana, S., Le Lorc'h, M., Vekemans, M., Frydman, R. & Tachdjian, G. (2001) Assisting reproduction of infertile men carrying a Robertsonian translocation. *Hum Reprod*, 16, 2274-2277.
- [14] Perrin, A., Douet-Guilbert, N., Laudier, B., Couet, M. L., Guerif, F., Royere, D., Le Bris, M. J., De Braekeleer, M. & Morel, F. (2007) Meiotic segregation in spermatozoa of a 45,XY,-14,der(18)t(14;18)(q11;p11.3) translocation carrier: A Case Report. *Hum Reprod*, 22, 729-732.

10 Minh Huong Nguyen, Frédéric Morel, Nathalie Douet-Guilbert et al.

- [15] Morel, F., Douet-Guilbert, N., Roux, C., Tripogney, C., Le Bris, M. J., De Braekeleer, M. & Bresson, J. L. (2004) Meiotic segregation of a t(7;8)(q11.21;cen) translocation in two carrier brothers. *Fertil Steril*, 81, 682-685.
- [16] Benet, J., Oliver-Bonet, M., Cifuentes, P., Templado, C. & Navarro, J. (2005) Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review. *Cytogenet Genome Res*, 111, 281-290.
- [17] Anton, E., Blanco, J., Egozcue, J. & Vidal, F. (2005) Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review. *Cytogenet Genome Res*, 111, 297-304.
- [18] Perrin, A., Morel, F., Douet-Guilbert, N., Le Bris, M. J., Amice, V., Amice, J. & De Braekeleer, M. (2008) Meiotic segregation of structural chromosomal abnormalities using fluorescent *in situ* hybridization. *Research Advances in Human Reproduction*, 1, 11-22.
- [19] Perrin, A., Morel, F., Douet-Guilbert, N., Le Bris, M. J., Amice, J., Amice, V. & De, B. M. (2010) A study of meiotic segregation of chromosomes in spermatozoa of translocation carriers using fluorescent *in situ* hybridisation. *Andrologia*, 42, 27-34.
- [20] Perrin, A., Nguyen, M. H., Bujan, L., Vialard, F., Amice, V., Gueganic, N., Douet-Guilbert, N., De, B. M. & Morel, F. (2013) DNA fragmentation is higher in spermatozoa with chromosomally unbalanced content in men with a structural chromosomal rearrangement. *Andrology*, 1, 632-638.
- [21] Perrin, A., Douet-Guilbert, N., Le Bris, M. J., Keromnes, G., Langlois, M. L., Bqarrière, P., Amice, J., Amice, V., De Braekeleer, M. & Morel, F. (2008) Segregation of chromosomes in sperm of a t(X;18)(q11;p11.1) carrier inherited from his mother: Case report. *Hum Reprod*, 23, 227-230.
- [22] Perrin, A., Vialard, F., Douet-Guilbert, N., Gomes, D. M., Guthauser, B., De Braekeleer, M., Selva, J. & Morel, F. (2009) Meiotic segregation of X-autosome translocation in two carriers and implications for assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*, 18, 850-855.
- [23] Morel, F., Laudier, B., Guerif, F., Couet, M. L., Royere, D., Roux, C., Bresson, J. L., Amice, V., De Braekeleer, M. & Douet-Guilbert, N. (2007) Meiotic segregation analysis in spermatozoa of pericentric inversion carriers using fluorescence *in situ* hybridization. *Hum Reprod*, 22, 136-141.
- [24] Caer, E., Perrin, A., Douet-Guilbert, N., Amice, V., De Braekeleer, M. & Morel, F. (2008) Different mechanisms of meiotic segregation in spermatozoa from three carriers of a pericentric inversion of chromosome 8. *Fertil Steril*, 89, 1637-1640.

RR

2. Article : Caractérisation et ségrégation méiotique d'un marqueur chromosomique surnuméraire dans les spermatozoïdes d'hommes infertiles : cas rapporté et revue de la littérature

Résumé

Les marqueurs chromosomiques surnuméraires (MCS) sont définis comme des chromosomes additionnels de structure anormale dont la composition ne peut être déterminée par les techniques de cytogénétique conventionnelle (ISCN 2009). Les MCS sont retrouvés chez 0,014% - 0,072% des individus phénotypiquement normaux (Blennow *et al.* 1994), 0,14% d'hommes infertiles, ce qui est six fois plus fréquent en comparaison avec la population des nouveau-nés (0,023%) (De Braekeleer *et al.* 2006). Parmi les hommes infertiles, les MCS sont retrouvés plus fréquemment chez les hommes oligozoospermiques (0,2%) que chez les hommes azoospermiques (0,04%) (De Braekeleer *et al.* 2006). Dans la majorité des cas, les MCS ont pour origine les chromosomes 14 ou 15 (Manvelyan *et al.* 2008).

Un couple est venu consulter après quatre ans d'infertilité primaire. L'examen chez la femme est normal. Chez son mari, une oligoasthénozoospermie sévère a été remarquée. Le caryotype sur les lymphocytes utilisant les bandes R a montré un MCS dans les 16 métaphases analysées. Le MCS est identifié par la FISH et le caryotype du patient est le suivant : 47,XY,+mar.ish der(22)(pI90.22+ ?+,D14Z1/D22Z1+,D13Z1-,RP11-701M12-,D15Z4-). La même anomalie a été retrouvée chez son père.

Un total de 1008 spermatozoïdes sont analysés en utilisant la FISH afin d'étudier l'équipement chromosomique. La fréquence des spermatozoïdes déséquilibrés (contenant un chromosome 22 et le MCS) est de 15,6%. Le taux de disomie des chromosomes 13 et 21 est significativement plus élevé chez le patient en comparaison avec les témoins.

Le MCS peut provoquer un phénotype anormal chez le porteur s'il contient de l'euchromatine. Dans le cas de notre patient, l'analyse par le CGH-array montre que le MCS ne contient ni euchromatine, ni variation du nombre de copies. Le MCS est composé par les régions centrique et péricentrique et le bras court du chromosome 22. En fait, le bras court des chromosomes acrocentriques ne possède normalement que

des gènes NOR (Nucleolus organizer region) codant des ARN ribosomiaux. Le gain du matériel chromosomique concernant le bras court des chromosomes acrocentriques n'affecte pas le phénotype du porteur.

La présence d'un MCS peut affecter le synapsis lors du stade pachytène de la méiose (Jaafar *et al.* 1994, Wang *et al.* 2009). La défaillance de l'appariement des chromosomes homologues lors de la méiose a été considérée comme la cause de l'arrêt de la gamétogenèse avec des réarrangements chromosomiques équilibrés ou déséquilibrés (Miklos. 1974). Cela peut expliquer l'oligozoospermie et l'asthénozoospermie chez notre patient. Pourtant, l'infertilité chez un porteur d'un MCS pourrait être multifactorielle et pas uniquement liée à la présence d'un MCS (Liehr *et al.* 2006). De plus, dans une même famille, pour les porteurs d'une même anomalie, certains ont des troubles de fertilité tandis que d'autres n'en n'ont pas (Eggermann *et al.* 2002, Oracova *et al.* 2009, Guediche *et al.* 2012). Le même MCS a été retrouvé chez le père de notre patient qui a deux enfants.

Dans la littérature, la ségrégation méiotique a été analysée par la technique FISH chez seulement 9 patients porteurs d'un MCS. L'étude de Martin *et al.* a été réalisée par la fécondation des spermatozoïdes du patient avec l'ovocyte de hamster doré. Ils ont montré que la fréquence des gamètes contenant le MCS chez les deux patients n'est pas différente de la théorie (50%) (Martin *et al.* 1986). Le même pourcentage a été retrouvé par une autre équipe en analysant des noyaux spermatiques par la technique FISH (Mennicke *et al.* 1997). Pourtant, d'autres études montrent un taux de gamètes présentant un MCS variant de 6,2% à 37% (Wiland *et al.* 2005, Cotter *et al.* 2000, Paetzold *et al.* 2006, Oracova *et al.* 2009, Guediche *et al.* 2012). Dans notre étude, 15,6% des spermatozoïdes présentent le MCS, ce qui est beaucoup plus faible que la distribution théorique. Notre résultat pourrait être expliqué par la présence de mosaïque dans les cellules germinales ou un mécanisme d'élimination du MCS pendant la méiose.

Martin *et al.* ont suggéré un effet inter-chromosomique chez les porteurs d'un MCS à cause d'une augmentation du taux d'aneuploïdie pour les chromosomes 18, 21, 22, X et Y dans les gamètes (Martin *et al.* 1986). Plus récemment, Guediche *et al.* ont remarqué une élévation de la disomie des chromosomes X, Y et 18 dans les spermatozoïdes d'un patient présentant un MCS. Ils ont suggéré que la présence d'un MCS est associée avec l'infertilité chez ce patient en induisant un effet inter-chromosomique (Guediche *et al.* 2012). Par contre, aucune augmentation du risque d'avoir une conception trisomique ou une fausse couche n'a été mise en évidence pour les porteurs d'un MCS (Steinbach and

Djalali. 1983). De plus, Cotter *et al* ont montré que la fréquence de disomie 18 n'est significativement pas plus élevée chez un patient porteur d'un MCS (15) que les témoins normaux (Cotter *et al.* 2000). Dans cette étude, nous avons trouvé une augmentation modérée de la fréquence de disomie des chromosomes 13 et 21. Néanmoins, l'analyse a été faite sur seulement 223 spermatozoïdes. Ainsi, l'interprétation des résultats devrait être prudente. De plus, le taux des gamètes aneuploïdes pour les autosomes est plus élevé chez les patients avec un caryotype normal présentant une oligozoospermie, une oligoasthénozoospermie ou une oligoasthénotératozoospermie que chez les témoins fertiles (Rives. 2005, Mihar. 2005, Perrin *et al.* 2011). La présence d'un MCS non euchromatique chez notre patient devrait avoir un rôle dans son infertilité en association avec d'autres facteurs. L'ICSI a été proposée pour le couple et la naissance d'un enfant sans malformation a été rapportée.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

European Journal of Medical Genetics

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmg>

Short clinical report

Characterization and meiotic segregation of a supernumerary marker chromosome in sperm of infertile males: Case report and literature review

Aurore Perrin^{a,b,1}, Ming Huong Nguyen^{a,1}, Bruno Delobel^c, Nadia Guéganic^a, Audrey Basinko^{a,b}, Marie-Josée Le Bris^b, Nathalie Douet-Guilbert^{a,b}, Marc De Braekeleer^{a,b,*}, Frédéric Morel^{a,b}

^aLaboratoire d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, INSERM U1078, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France

^bService de Cytogénétique, Cytologie et Biologie de la Reproduction, Hôpital Morvan, CHRU Brest

^cCentre de Génétique Chromosomique, Hôpital Saint-Vincent de Paul, Lille, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 March 2012

Accepted 11 September 2012

Available online 20 September 2012

Keywords:

Supernumerary marker chromosome

FISH

Spermatozoa

Meiotic segregation

ICSI

ABSTRACT

This couple presented with a 4-year history of primary infertility. The male partner was found to have oligoasthenozoospermia. A supernumerary marker chromosome (SMC) was found. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) analyses showed that the SMC was a heterochromatic dicentric marker derived from chromosome 22. Further FISH procedures showed the rate of unbalanced spermatozoa containing one chromosome 22 and the SMC to be 15.6%. Due to the low risk of fetal chromosomal imbalance linked to the paternal SMC and the risk of miscarriage linked to the amniocentesis, the couple declined prenatal diagnosis. A healthy newborn baby was obtained after ICSI.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Supernumerary marker chromosomes (SMCs) are defined as extra-structurally abnormal chromosomes that cannot be unambiguously identified or characterized by conventional banding cytogenetics [1].

SMCs derive from all chromosomes but they are mainly made of heterochromatic material. Generally these supernumerary heterochromatic marker chromosomes are without phenotypic consequence for the carrier but male carriers have often fertility problems due to various degrees of oligoasthenoteratozoospermia or even azoospermia. A SMC is seen in 0.14% of the infertile males, which is six times higher than the frequency reported in newborn studies (0.023%). Moreover, the probability of finding a SMC is higher among oligozoospermic than azoospermic men (0.2% vs 0.04%) [2,3].

Since the emergence of intracytoplasmic sperm injection (ICSI), we may question on the risk of transmitting the SMC and producing

unbalanced offspring after ICSI with a spermatozoon from a man carrying a SMC. In the literature, the meiotic segregation in only 9 men carrying a SMC was studied by heterospecific fecundation or FISH [4–10]. Moreover, the influence of SMC on the missegregation of other chromosomes, phenomenon called interchromosomal effect, is controversial [4,6,10].

The aims of this study were to characterize a supernumerary marker chromosome in an infertile male and to analyze its meiotic segregation in sperm by multicolor fluorescent *in situ* hybridization. To our knowledge, we report here the first meiotic segregation analysis in a male carrying a SMC derived from chromosome 22.

2. Clinical report

An unrelated couple (30-year old female, 36-year old male) presented with a 4-year history of primary infertility. The female partner reported no health problems, she had three brothers and there was no familial antecedent. The male partner had one brother. There had no reproductive or obstetrical problems in the proband's family (no abortion, no assisted medical procreation, etc.) (Fig. 1). The male partner was found to have a severe oligozoospermia (sperm count = 0.3 million/ml) and asthenozoospermia (grade a + b sperm motility = 30%).

* Corresponding author. Laboratoire de Cytogénétique, U1078, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidentale, 22, avenue Camille Desmoulins, CS 93837, F-29238 Brest cedex 3, France. Tel.: +33 (0) 298 01 64 76; fax: +33 (0)298 22 39 61.

E-mail address: marc.debraekeleer@univ-brest.fr (M. De Braekeleer).

¹ Both authors contributed equally to the study.

744

A. Perrin et al. / European Journal of Medical Genetics 55 (2012) 743–746

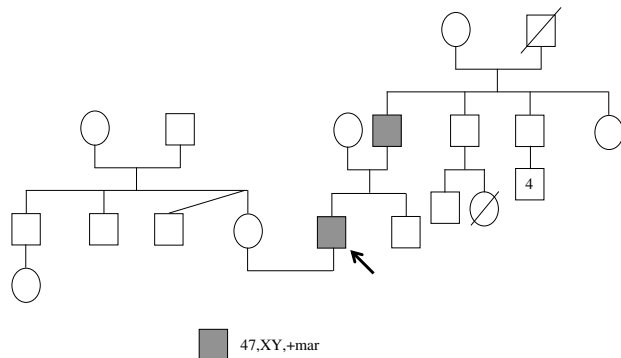


Fig. 1. Pedigree of the carrier of the SMC. The proband and his father had the same chromosomal abnormality (47,XY,+mar).

3. Material and methods

3.1. Cytogenetic analysis

Karyotyping of the male peripheral blood lymphocytes using R banding showed a SMC in all 16 metaphases analyzed. The marker was bisatellized and smaller than the size of a chromosome 20. His karyotype was 47,XY,+mar (Fig. 2A).

Array-based comparative genomic hybridization (array-CGH) using 60 K oligonucleotide microarray (Agilent Technologies, Santa Clara, California) was performed on the peripheral blood lymphocytes. Array-CGH experiments were performed following standard and manufacturer's recommendations [11].

A complementary FISH analysis using, on the one hand, CEP14/22 (D14Z1 and D22Z1, AmpliTech, Compiègne, France), CEP13/21 (D13Z1/D21Z1, AmpliTech), CEP15 (D15Z4, Abbott, Rungis, France) and, on the other hand, bacterial artificial chromosome (BAC) clones RP11-14J7 (region 14q11.2), RP11-701M12 (region 22q11)

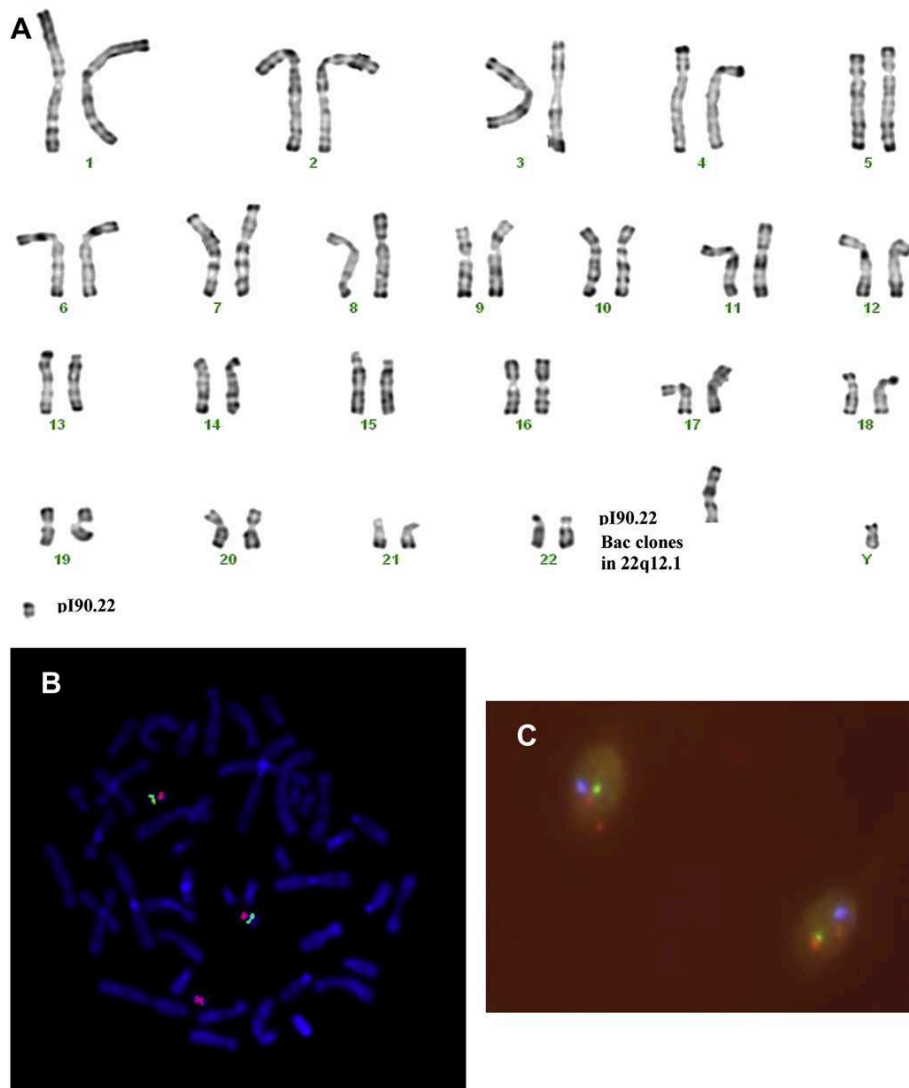


Fig. 2. (A) R banding karyotype showing a 47,XY,+mar constitution and localization of the probes used to analyze the meiotic segregation. (B) FISH on lymphocytes with plasmid pI90.22 (orange) and BACs pool on 22q12.1 (green). (C) FISH on sperm nuclei with plasmid pI90.22 (orange), BACs pool on 22q12.1 (green) and D9Z1 (aqua).

and plasmid p190.22 (region 22p11.1) allowed the accurate characterization of the SMC.

Cytogenetic analysis of the proband's parents showed the presence of SMC in all metaphase lymphocytes of his father.

3.2. Analysis of the meiotic segregation

Triple FISH was carried out using a pool of BAC clones (RP11-344P23, RP11-148I3, RP11-168G11 and RP11-1080E17) localized in 22q12.1 (spectrum green), plasmid p190.22 (spectrum orange) and the specific alphoid probe of chromosome 9 as control (probe D9Z, spectrum aqua, Abbott, Rungis, France). Plasmid p190.22 and BAC clones localized in 22q12.1 were used to differentiate the normal chromosome 22 (one orange signal and one green signal) and SMC (one orange signal).

The sperm sample of the patient was analyzed in dual FISH 13-21 (LSI 13q14, spectrum green and LSI 21q22, spectrum orange, Kreatech, Strasbourg, France). Fertile men served as control subjects. The characteristics of the controls were described in previously published reports [12].

Detailed procedures for sperm preparation and FISH have been previously described [13]. Sperm nuclei were analyzed using strict selection criteria. Spermatozoa presenting one green signal, one orange and one blue (aqua) were considered as normal (Table 1). Spermatozoa presenting one green signal, two orange and one blue were considered as carrying the SMC (24,X/Y,+mar). Spermatozoa presenting two green signals, two orange and one blue were considered as disomic for chromosome 22. Spermatozoa presenting two green signals, two orange and two blue were considered as diploid. Prior to this study, the patient was informed of the investigations and gave his consent.

4. Results

4.1. Cytogenetic analysis

Following FISH analyses, the SMC was identified as a heterochromatic dicentric marker derived from chromosome 22 (Fig. 2B). The karyotype was rewritten as: 47,XY,+mar.ish der(22)(p190.22+?,D14Z1/D22Z1+,D13Z1/D21Z1-,RP11-14J7-,RP11-701M12-,D15Z4-).

Array-CGH found no euchromatin in the SMC and no copy number variation (CNV).

4.2. Analysis of meiotic segregation

A total of 1008 spermatozoa were analyzed using triple FISH (Fig. 2C and Table 1). The frequency of unbalanced spermatozoa showing one chromosome 22 and SMC was 15.6%. The disomy rate for chromosome 22 was 0.2%. In dual FISH 13-21, a total of 223 spermatozoa were analyzed. Disomy rates for chromosome 13 and 21 were 0.45% for each chromosome. Significant increases in disomies 13 and 21 were found compared with the controls (0.45% vs 0.14% for disomies 13 and 0.45% vs 0.15% for disomies 21).

Table 1
Results of the meiotic segregation of the SMC.

Fluorescent combination	Chromosomal equipment	%
GOA	9/22	80.7
GOOA	9/22/+mar	15.6
GGOOA	9/22/+22	0.2
GGOOAA	9/22/+9/+22	1
Others ^a		2.5

G: Green; O: Orange; A: Aqua.

^a Others includes nullisomies, ambiguous signals and hybridization failures [18].

5. Discussion

To our knowledge, we reported here the first meiotic segregation analysis of SMC derived from chromosome 22 in spermatozoa of an infertile man with a severe oligozoospermia and asthenozoospermia. He had a normal phenotype because, as shown by molecular cytogenetics, the SMC was composed of the centric and pericentric regions and the short arm of chromosome 22, with no euchromatin. This gain is without consequence for the carrier because the short arms of the acrocentrics only contain nucleolar organizer (NOR) genes.

Nevertheless, the association between SMC and sexual vesicle could lead to gametogenic arrest and produce severe spermatogenic impairment, explaining his severe oligozoospermia and asthenozoospermia [14]. However, it seems that hypo fecundity due to SMC is multifactorial. Indeed, inside the same family, some men carrier of the abnormality can have hypo fecundity problem, and others not [9,10]. Besides, this SMC was found in our patient's father who had two children.

Analysis of chromosomal equipment in spermatozoa of nine men with SMC following *in vitro* fertilization of golden hamster eggs with human sperm [4] or FISH [5–10] has been reported in the literature. Martin et al. (1986) found, in two fertile males, that the frequency of spermatozoa with the marker chromosome was not significantly different from 50% [4]. Similarly, Mennicke et al. (1997) found the marker in approximately 50% of spermatozoa in a male carrying a supernumerary marker of chromosome 15 [5]. Four other studies on meiotic segregation of SMC derived from chromosome 15 showed a lower proportion (from 6% to 37%) of spermatozoa with the marker [6,8–10]. Wiland et al. (2005) found 8.25% of spermatozoa with the marker in the sperm of a male having a mosaicism for an extra derivative chromosome 20 (46,XY[96]/47,XY,+der(20)[4]) [7].

A theoretical meiotic distribution of SMC in 47,XY,+mar spermatogonia leads to an identical number of normal spermatozoa and spermatozoa with SMC. In this study, the rate of spermatozoa with SMC (15.6%) is much lower than expected from the theoretical meiotic distribution. The low rate of spermatozoa with SMC can be explained by the presence of a 46, XY/47,XY,+mar germinal mosaicism or by a putative mechanism leading to the elimination of SMC before or during meiosis in the majority of the germinal cells.

Martin et al. (1986) reported an increase in sex chromosome aneuploidy and monosomy of chromosomes 18, 21 and 22 in sperm of a SMC carrier in favor of ICE [4]. More recently, Guediche et al. (2012) found a significant increase in the frequencies of spermatozoa with disomy X, Y and 18 in sperm of a SMC carrier presenting infertility with oligoasthenoteratozoospermia and postulated that the presence of SMC was associated with infertility in inducing ICE [10]. On the contrary, Cotter et al. (2000) found no increase in disomy 18, excluding ICE for this chromosome [6]. In the present study, we found a moderate increase in the frequency of autosomal disomy for chromosomes 13 and 21. Our results indicate that there may be a higher potential risk of conceptus with a numerical autosomal abnormality, affecting specific autosomes, among the offspring of patients with SMC than in the general population. However, this result has to be taken with caution as only 223 sperm nuclei could be analyzed given the small number of retrieved spermatozoa. Several studies have showed an increased frequency of autosomal aneuploidy in the spermatozoa of males with a normal karyotype and oligozoospermia or oligoasthenozoospermia or oligoasthenoteratozoospermia [15–17]. The potential risks linked to the interference of this SMC with other chromosomes seem therefore very low.

From a practical point of view, the presence of this SMC is not an argument against indication for ICSI. Given that a parent carried a constitutional chromosomal abnormality, antenatal diagnosis

was proposed to the couple. However, due to the low risk of fetal chromosomal imbalance linked to the paternal SMC on one hand, and the risk of miscarriage linked to the amniocentesis on the other hand, the couple declined prenatal diagnosis. A healthy newborn baby with no malformations was obtained after ICSI.

Acknowledgments

This research was supported by the Agence de la Biomédecine, Saint-Denis la Plaine, France. Plasmid pI90.22 was given by Marc LE LORCH, Service d'Histologie-Embryologie et Cytogénétique, Groupe Hospitalier Necker-Enfants Malades.

References

- [1] ISCN:(2009), An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, S. Karger, Basel, 2009.
- [2] M. De Braekeleer, T.N. Dao, Cytogenetic studies in male infertility: a review, *Human Reproduction* 6 (1991) 245–250.
- [3] M. De Braekeleer, A. Perrin, F. Morel, Chromosomal abnormalities in male infertility, in: M. De Braekeleer (Ed.), *Cytogenetics and Infertility*, Transworld Research Network, Trivandrum (India), 2006, pp. 27–52.
- [4] R.H. Martin, K.A. Hildebrand, J. Yamamoto, D. Peterson, A.W. Rademaker, P. Taylor, C.C. Lin, The meiotic segregation of human sperm chromosomes in two men with accessory marker chromosomes, *American Journal of Medical Genetics* 25 (1986) 381–388.
- [5] K. Mennicke, P. Diercks, H. Schlieker, M. Bals-Pratsch, H.S. Al, K. Diedrich, E. Schwinger, Molecular cytogenetic diagnostics in sperm, *International Journal of Andrology* 20 (3) (1997) 11–19.
- [6] P.D. Cotter, E. Ko, S.K. Larabell, A.W. Rademaker, R.H. Martin, Segregation of a supernumerary del(15) marker chromosome in sperm, *Clinical Genetics* 58 (2000) 488–492.
- [7] E. Wiland, M. Jarmumz, M. Kurpisz, Segregation of the marker chromosome der(20) in the sperm of a male with karyotype 46, XY[961/47, XY+mar[4], *Medical Science Monitor* 11 (2005) CS9–15.
- [8] U. Paetzold, G. Schwanz, R. Schubert, K. van der Ven, M. Montag, Sperm analyses, genetic counselling and therapy in an infertile carrier of a supernumerary marker chromosome 15, *Advances in Medical Sciences* 51 (2006) 31–35.
- [9] E. Oracova, P. Musilova, O. Kopečna, R. Rybar, M. Vozdova, K. Vesela, J. Rubes, Sperm and embryo analysis in a carrier of supernumerary inv dup(15) marker chromosome, *Journal of Andrology* 30 (2009) 233–239.
- [10] N. Guediche, L. Tosca, T.A. Kara, C. Bas, L. Lecerf, J. Young, A. Briand-Suleau, B. Tou, J. Bouligand, S. Brisset, M. Misrahi, A. Guiochon-Mantel, et al., Array comparative genomic hybridization analysis of small supernumerary marker chromosomes in human infertility, *Reproductive Biomedicine Online* 24 (2012) 72–82.
- [11] A. Basinko, A. Perrin, H.A. Nguyen, F. Morel, M.J. Le Bris, A.H. Saliou, M. Collet, P. Parent, C. Benech, S. Quemener, C. Ferec, N. Douet-Guilbert, et al., Balanced transmission of a paternal complex chromosomal rearrangement involving chromosomes 2, 3 and 18, *American Journal of Medical Genetics* 152 (2010) 2646–2650.
- [12] N. Douet-Guilbert, M.J. Le Bris, V. Amice, C. Marchetti, B. Delobel, J. Amice, M. De Braekeleer, F. Morel, Interchromosomal effect in sperm of males with translocations: report of 6 cases and review of the literature, *International Journal of Andrology* 28 (2005) 372–379.
- [13] F. Morel, N. Douet-Guilbert, M.J. Le Bris, A. Herry, C. Marchetti, V. Lefebvre, B. Delobel, V. Amice, J. Amice, M. De Braekeleer, Lack of intraindividual variation of unbalanced spermatozoa frequencies from a 46, XY, t(9;22)(q21;q11.2) carrier: case report, *Human Reproduction* 19 (2004) 2227–2230.
- [14] H. Jaafar, O. Gabriel-Robez, F. Vignon, E. Flori, Y. Rumpler, Supernumerary chromosomes and spermatogenesis in a human male carrier, *Human Genetics* 94 (1994) 74–76.
- [15] N. Rives, Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: asthenozoospermia, *Cytogenetic and Genome Research* 111 (2005) 358–362.
- [16] N. Miharu, Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: oligozoospermia, *Cytogenetic and Genome Research* 111 (2005) 347–351.
- [17] A. Perrin, N. Louanjli, Z. Ziane, T. Louanjli, C. Le Roy, N. Guéganic, V. Amice, M. De Braekeleer, F. Morel, Study of aneuploidy and DNA fragmentation in gametes of patients with severe teratozoospermia, *Reproductive Biomedicine Online* 22 (2011) 148–154.
- [18] E. Caer, A. Perrin, N. Douet-Guilbert, V. Amice, M. De Braekeleer, F. Morel, Different mechanisms of meiotic segregation in spermatozoa from three carriers of a pericentric inversion of chromosome 8, *Fertility and Sterility* 89 (2008) 1637–1640.

C. Etude de la fragmentation de l'ADN spermatique et de la ségrégation méiotique dans les gamètes mâles

1. Article : Etude de la fragmentation de l'ADN spermatique et de la ségrégation méiotique dans les gamètes d'hommes porteurs d'une mosaïque gonosomique

Résultats et discussion

Les anomalies chromosomiques sont un des facteurs bien connus comme étant responsables de l'infertilité masculine. Les anomalies de nombre des chromosomes sexuels les plus fréquentes chez l'homme sont XXY et XYY. Les hommes présentant un caryotype XXY (syndrome de Klinefelter) ont souvent une perturbation de la spermatogenèse qui provoque ensuite une oligozoospermie sévère ou une azoospermie (Morel *et al.* 2000). Au contraire, la majorité des hommes porteurs d'un caryotype XYY homogène ou en mosaïque est fertile. Pourtant l'étude de la ségrégation méiotique dans les spermatozoïdes de ces hommes montre une augmentation modérée du taux des anomalies gonosomiques (Morel *et al.* 1999, Rives *et al.* 2003, 2005, Wong *et al.* 2008). Ainsi, ces hommes ont un risque élevé de transmettre l'aneuploïdie à leurs descendances.

Les patients ayant un caryotype 45,X/46,XY peuvent être phénotypiquement masculin ou féminin. Les hommes porteurs d'une mosaïque X0 sont souvent infertiles à cause des paramètres spermatiques anormaux (Newberg *et al.* 1998, Alhalabi *et al.* 2013). Grâce aux techniques d'AMP, ces hommes peuvent en bénéficier afin de devenir père. L'analyse de leurs spermatozoïdes permet d'évaluer le risque de transmettre des anomalies de nombre des chromosomes sexuels à l'embryon. Malheureusement, il n'existe dans la littérature que trois études menées sur l'analyse du taux d'aneuploïdie chez les hommes ayant la lignée cellulaire 45,X (Dale *et al.* 2002, Giltay *et al.* 2000, Newberg *et al.* 1998).

Dans notre étude, le taux des gamètes aneuploïdes et le taux de la fragmentation de l'ADN spermatique ont été évalués sur trois hommes porteurs d'une mosaïque gonosomique ayant la lignée 45,X. Le caryotype est 45,X/47,XYY ; 45,X/46,XY/47,XYY et 45,X/46,XY correspondant au patient P1, P2 et P3,

respectivement. L'équipement chromosomique a été analysé par la technique FISH et la fragmentation de l'ADN spermatique a été évaluée par la technique TUNEL.

Parmi les spermatozoïdes avec une aneuploïdie gonosomique, nous avons constaté qu'environ 67% (P1) et 89% (P2) étaient disomiques XY. Ces spermatozoïdes sont probablement issus des lignées germinales XYY. Toutefois, pour le patient P2, la non-disjonction des cellules germinales de la lignée XY peut être considérée. En effet, le trivalent XYY peut être la seule configuration qui pourrait échapper au point de contrôle du stade pachytène grâce à la saturation des sites d'appariement (Miklos. 1974). Les cellules qui réussirent à échapper à la dégradation peuvent résulter en des spermatozoïdes 24,XY et 24,YY (Wong *et al.* 2008). Pourtant, nous n'avons observé aucun spermatozoïde 24,YY chez nos deux patients. De plus, Dale *et al.* ont déterminé le taux d'aneuploïdie gonosomique chez un patient porteur d'un caryotype 45,X/47,XYY (15%/85%) ayant une oligoasthénospermie. Ils ont trouvé 0,09% des spermatozoïdes 24,XY mais aucun spermatozoïde 24,YY (Dale *et al.* 2002). Il est suggéré que les spermatides YY n'ont pas pu passer le point de contrôle et ont été éliminés au cours de la spermatogenèse (Milazzo *et al.* 2006). Cela pourrait expliquer l'oligozoospermie présentée chez le patient 45,X/47,XYY.

Pour le patient P3 45,X/46,XY, le taux d'aneuploïdies gonosomiques et de diploïdies est plus élevé par rapport au groupe témoin mais la différence n'est pas statistiquement significative. La fréquence des gamètes aneuploïdes chez notre patient est plus faible par rapport à celle montrée dans la littérature (Newberg *et al.* 1998, Giltay *et al.* 2000). Les spermatozoïdes 24,XY et 24,YY peuvent dériver des cellules germinales 46,XY avec une non-disjonction pendant la méiose I (Templado *et al.* 2013). Cette perturbation peut être expliquée par le fait que la mosaïque pourrait provoquer un environnement testiculaire anormal et des altérations biochimiques.

Les fausses couches spontanées à répétition et la diminution du taux de naissances sont liés à une augmentation du taux de fragmentation de l'ADN spermatique (Carell *et al.* 2003, Frydman *et al.* 2008). Dans cette étude, le taux de fragmentation de l'ADN spermatique chez nos trois patients est légèrement plus élevé en comparaison avec le groupe témoin mais la différence n'est pas significative. En fait, un taux élevé de la fragmentation de l'ADN spermatique a été identifié chez des hommes porteurs d'une anomalie de structure (Perrin *et al.* 2009) ou chez des hommes infertiles ayant un caryotype normal mais des paramètres spermatiques anormaux (Brahem *et al.* 2012, Tang *et al.* 2010).

La comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature s'avère difficile à cause du taux différent de cellules anormales pour chaque patient. De plus, la proportion des lignées cellulaires anormales peut varier d'un tissu à l'autre chez un même patient. Les patients P2 et P3 ont un spermogramme normal et ont eu des enfants naturellement tandis que le patient P1 a une oligoasthénospermie sévère. Malheureusement nous n'avons pas pu étudier la mosaïque dans le tissu testiculaire chez nos trois patients.

En conclusion, nous avons trouvé une proportion légèrement plus élevée des aneuploïdies des chromosomes sexuels et autosomiques ainsi qu'un taux de fragmentation de l'ADN spermatique chez les trois patients porteurs d'une mosaïque gonosomique. Pourtant, cette augmentation est rencontrée souvent chez les hommes infertiles ayant un caryotype normal. Les hommes porteurs d'une mosaïque gonosomique qui n'ont pas pu être père naturellement, peuvent bénéficier d'une prise en charge en AMP. Un diagnostic prénatal pourra être envisagé pour ces couples.

ORIGINAL ARTICLE

A study of aneuploidy and DNA fragmentation in spermatozoa of three men with sex chromosome mosaicism including a 45,X cell line

MINH HUONG NGUYEN^{1,2}, FREDERIC MOREL^{1,2,3}, LOUIS BUJAN^{4,5},
PASCALE MAY-PANLOUP⁶, MARC DE BRAEKELEER^{1,2,3} & AURORE PERRIN^{1,2,3}

¹Laboratoire d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France, ²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1078, Brest, France, ³Service de Cytogénétique et Biologie de la Reproduction, Hôpital Morvan, CHRU Brest, Brest, France, ⁴Research Group on Human Fertility EA3694, Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France, ⁵CECOS Midi-Pyrénées and GERMETHEQUE biobank, Groupe d'activité de médecine de la reproduction, CHU Paule de Viguier, Toulouse, France, and ⁶Laboratoire de biologie de la reproduction, CHU Angers, Angers, France

Abstract

Meiotic segregation of mosaic males with a 45,X cell line has been little examined. In this study, we evaluated the risk of aneuploid gametes using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and DNA fragmentation in ejaculated spermatozoa of three men with sex chromosome mosaicism including a 45,X cell line. Triple- and dual-color FISH were performed. Sperm DNA fragmentation was detected using the TUNEL assay. A significantly increased frequency of XY disomic spermatozoa was observed for patients (P)1 and P2. A significant increase in diploidy and autosomal aneuploidy was found in P2 and P3, respectively. The rate of DNA fragmentation was not different from that observed in a control group. Data from the literature are scarce (only 3 cases reported), making comparison of the present data difficult, especially as the frequencies of the cell lines comprising the mosaicism differed between patients. Furthermore, the proportion of the different cell lines can differ from one tissue to another in the same patient. Whether the relative levels of the several cell lines present in the mosaicism can influence the rate of aneuploid spermatozoa remains unknown.

Keywords: Sex chromosome mosaicism, meiotic segregation, DNA fragmentation, aneuploidy

Introduction

In industrialized countries, infertility affects about 15–20% of couples. The causes of infertility are variable, being of male origin in one-third of the couples, female in another third, and mixed in the remaining third. Many factors, including chromosomal abnormalities, are known to influence spermatogenesis and be responsible for male infertility. The presence of a chromosomal abnormality (structural or numerical) can interfere with normal spermatogenesis resulting in oligo and/or terato and/or asthenozoospermia, even azoospermia.

In humans, the most common chromosomal abnormality is aneuploidy, sex chromosome aneuploidy being more frequent than autosomal aneuploidy in neonates (Templado et al., 2013). The most frequent numerical sex chromosome anomalies in men are XXY and XYY.

Other types of numerical sex chromosome anomalies are rare. They include males with a XYY chromosomal constitution and those with a 45,X/46,XY karyotype.

The majority of mosaic and non-mosaic 47,XYY males are fertile. However, studies performed in spermatozoa using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in XYY males revealed a moderate increased rate of gonosomal abnormalities (Morel et al., 1999; Rives et al., 2003, 2005; Wong et al., 2008) and those with this condition might be at a higher risk of passing on a chromosomal aneuploidy to their offspring.

Patients with a 45,X/46,XY karyotype can be phenotypically male or female. Males with X0 mosaicism are often infertile due to abnormal sperm parameters (Alhalabi et al., 2013; Newberg et al., 1998). As these males could benefit from assisted reproductive

Correspondence: Pr. Marc De Braekeleer, Laboratoire de Cytogénétique, Hôpital Morvan, Bâtiment 5bis, CHRU Brest, 2, avenue Foch, F-29609 Brest cedex, France. Tel: + 33 (0)2 98 22 36 94. Fax: + 33 (0)2 98 22 39 61. E-mail: marc.debraekeleer@univ-brest.fr

(Received 4 April 2014; revised 19 June 2014; accepted 3 July 2014)

technologies (ARTs), the analysis of spermatozoa is required to assess the risk of transmitting numerical sex chromosome abnormalities to the embryo. However, data on aneuploidy in the literature are rare and concern only three mosaic males with a 45,X cell line (Dale et al., 2002; Giltay et al., 2000; Newberg et al., 1998).

In this study, we evaluated the risk of aneuploid gametes and DNA fragmentation in ejaculated spermatozoa from three men with sex chromosome mosaicism, and in a 45,X cell line.

Materials and methods

Patients and sperm characteristics

Patient P1 was referred to a medical geneticist when he was 15 years old for asymmetric lower limbs, short stature, and obesity. Cytogenetic analysis on peripheral blood lymphocytes revealed a 45,X constitution in 16% of the metaphases and a 47,XYX constitution in the remaining 84%. The same mosaicism was found in fibroblasts. At the age of 17 years, because of concern of a possible infertility, a semen analysis was performed. It revealed a severe oligoasthenoteratozoospermia with 2 million spermatozoa/mL in a volume of 0.5 mL and 15% motility. Sperm cryopreservation was done.

Patient P2, a phenotypically normal male who had previously fathered a daughter, volunteered as a semen donor. Cytogenetic analysis on peripheral blood lymphocytes revealed three different cell lines: 45,X in 20% of the metaphases, 46,XY in 70%, and 47,XYX in the remaining 10%. Sperm count was 225 million/mL in a volume of 3.5 mL, with 45% normal motility and 24% normal morphology.

Patient P3, a phenotypically normal male who had previously fathered 3 daughters, volunteered to become a semen donor. Cytogenetic analysis on peripheral blood lymphocytes showed a 45,X/46,XY karyotype (67%/33%). Sperm analysis showed teratozoospermia with 53 million spermatozoa/mL in a volume of 6.3 mL, with 35% motility and 9% normal morphology.

Four fertile men with normal karyotype and normal sperm parameters served as control subjects for the aneuploidy study and twenty-four for the DNA fragmentation analysis. All participants gave their informed consent.

Sperm preparation

Sperm were collected by masturbation after 3–7 days of sexual abstinence. Each sample was washed first in phosphate-buffered saline (PBS) and then centrifuged. The pellets were fixed on a slide with Carnoy's solution (methanol:acetic acid; 3:1, vol:vol). Sperm nuclei were decondensed in 1 M NaOH solution and then washed in 2x saline sodium citrate (SSC).

Probes

Triple-color FISH using alpha-satellite centromeric probes specific for chromosomes X (DXZ1, spectrum

green, Abbott, Rungis, France), Y (LSI SRY, spectrum orange, Abbott), and 8 (CEP8, spectrum aqua, Abbott) for patient P1, or 18 (CEP18, spectrum aqua, Abbott) for patients P2 and P3 was performed. In this experiment, centromeric probes for chromosome 8 or 18 were used as a quality control of hybridization and to distinguish diploidy from disomies. Dual-color FISH using 13q14/21q22 (spectrum green/spectrum orange, respectively, Kreatech, Strasbourg, France) was also performed. Because of cross-hybridization between centromeres of acrocentric chromosomes, locus-specific identifier (LSI) probes need to be used to give the rate of disomies 13 and 21.

FISH procedure

Sperm slides were immersed in a jar of 2xSSC/0.4% NP40 solution and dehydrated by passage through an ethanol series of increasing concentration (70°/90°/98°). Denaturation was performed both on sperm nuclei and probes for 1 minute at 70°C. Hybridization was carried out overnight at 37°C. After incubation, the slides were washed in 0.4xSSC/0.3% NP40 for 45 seconds at 72°C then in 2xSSC/0.1% NP40 at room temperature for 30 s. Slides were dehydrated in ethanol series, air-dried in dark, counterstained with 4', 6-diamino-2-phenylindole (DAPI), and observed using a Zeiss Axioplan microscope (Zeiss, Le Pecq, France).

Sperm DNA fragmentation analysis using TUNEL assay

Sperm DNA fragmentation was detected by the ApopTag Red Kit (MP Biomedicals, Illkirch, France) according to the manufacturer's recommendations. The procedure has been described elsewhere (Perrin et al., 2009). Briefly, after immersion in a jar containing a 2xSSC/0.4% NP40 solution and dehydration, the slides were covered by equilibration buffer for 30 seconds. Then a mix of reaction buffer and terminal deoxynucleotidyl transferase was added to the slides allowing DNA elongation. They were incubated in a dark moist chamber at 37°C for 1 h. After having stopped the enzyme reaction, the slides were washed twice in PBS, and the DNA elongation was revealed by incubating the cells with anti-digoxigenin antibody coupled to rhodamine for 30 min in a dark moist chamber at 37°C. The slides were washed twice in PBS and air-dried. They were counterstained with DAPI and observed using a Zeiss Axioplan microscope. The spermatozoa with fragmented DNA had partial or total red-colored nuclei, and those with intact DNA were blue. A total of 500 sperm heads were analyzed for each patient and only spermatozoa with a flagellum were counted.

Statistical analysis

Chi-square tests were performed to compare the frequency of each hybridization pattern obtained between patients and controls. A value of $p < 0.05$ was considered to be significant.

98 M. H. Nguyen et al.

Results

Analysis of aneuploidy

A total of 27069 and 24409 sperm nuclei were scored in triple FISH and dual FISH, respectively (Table I).

The incidences of gonosomal and autosomal aneuploidy for patient P1 were 0.45% and 0.58%, respectively; these values were not significantly increased compared with those for controls. Nevertheless, a highly significant number of XY disomic and diploid spermatozoa were observed (0.3% vs 0.08% and 0.74% vs 0.3%).

For patient P2, the rate of gonosomal aneuploidy was higher, although not statistically significantly ($p = 0.06$), than in the controls. This increase was due to a high frequency of XY disomic spermatozoa ($p < 0.001$). A significant increase in autosomal aneuploidy, due to a high rate of disomy 21 spermatozoa, was also observed.

For patient P3, no significant difference was observed in the rate of gonosomal or autosomal aneuploidy, nor diploidy compared with controls.

Analysis of sperm DNA fragmentation

The rate of spermatozoa with fragmented DNA was 1.6%, 2.7%, and 2.6% for patients P1, P2, and P3, respectively. These proportions were not statistically different from that observed in a control group ($1.2\% \pm 0.95$).

Discussion

In this study, the rates of sex chromosome aneuploidy and DNA fragmentation were investigated in spermatozoa of three men with rare gonosomal mosaicism. There are several previous reports on the rate of aneuploidy in spermatozoa from homogeneous 47,XYY or mosaic 46,XY/47,XYY males (Blanco et al., 2001; Giltay et al., 2000; Morel et al., 1999; Rives et al., 2003, 2005; Wong et al., 2008), but only three studies have analyzed the frequency of aneuploidy in mosaic X/XY or X/XYY

patients (Dale et al., 2002; Giltay et al., 2000; Newberg et al., 1998).

About 67% and 89% of spermatozoa presenting a gonosomal aneuploidy in patients P1 and P2, respectively, were XY disomics. These spermatozoa were probably initiated in XYY germ cells, although, in patient 2, non-disjunction of XY germ cells cannot be excluded. The XYY trivalent was suggested to be the sole configuration that could escape the pachytene checkpoint, due to saturation of pairing sites (Miklos, 1974), therefore resulting in 24,XY or 24,YY sperm (Wong et al., 2008). However, no 24,YY spermatozoon was found in our two patients. Dale et al. (2002) determined the rate of sex chromosome aneuploidy in a 45,X/47,XYY (15%/85%) patient presenting with primary infertility and oligoasthenozoospermia. Using triple FISH, they found 0.09% of sperm nuclei to be 24,XY, but none to be 24,YY.

During spermatogenesis, primary spermatocytes undergo meiosis to form haploid spermatids. In our studied patients, a high proportion of these cells with gonosomal aneuploidy would therefore have been expected. Our data and those from Dale et al. (2002) strongly suggest that sex chromosome aneuploidy in spermatids causes these cells to be selected for destruction (Odorisio et al., 1998). The data also suggest that YY spermatids could have been eliminated during spermiogenesis (Milazzo et al., 2006). This might explain why patients with 45,X/47,XYY presented with oligozoospermia.

Mosaic 45,X/46,XY individuals are often infertile and present with a spectrum of phenotypes ranging from almost normal male to Turner syndrome female (Newberg et al., 1998). The rates of gonosomal aneuploidy and diploidy in spermatozoa of patient P3 were higher, although not statistically significantly, than those of the control group. Spermatozoa with a 24,XY or 24,YY constitution could have originated from non-disjunction in the 46,XY germ cell line during meiosis I (Templado et al., 2013). Meiotic segregation using triple FISH was reported in two males presenting with primary infertility and oligoasthenoteratozoospermia.

Table I. Aneuploidy levels in sperm assessed by triple and dual FISH.

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Controls
Karyotype	45,X(16%)/47,XYY(84%)	45,X(20%)/46,XY(70%)/47,XYY(10%)	45,X(67%)/46,XY(33%)	46,XY
Three-color FISH				
No. of sperm scored	1348	2204	2643	20874
Total sex aneuploidy (%)	0.45	0.46	0.42	0.24
XY disomy (%)	0.3*	0.41***	0.19	0.08
XX disomy (%)	0.15	0.05	0.15	0.09
YY disomy (%)	0	0	0.08	0.07
Two-color FISH				
No. of sperm scored	1216	2124	2333	18736
Total aneuploidy	0.58	0.94***	0.25	0.29
Disomy 13	0.33	0.28	0.04	0.14
Disomy 21	0.25	0.66***	0.21	0.15
Diploidy	0.74**	0.53	0.42	0.34

* $p < 0.05$ (versus controls).

** $p < 0.01$ (versus controls).

*** $p < 0.001$ (versus controls).

Newberg et al. (1998) found significantly higher frequencies of gonosomal (1.92% vs 0.70%) and chromosome 18 (0.89% vs 0.28%) disomy sperm from a male with a 45,X(10%)/46,XY(90%) karyotype compared with those observed from a fertile control. Giltay et al. (2000) found a slightly increased rate of gonosomal aneuploidy in a male with a 45,X(39%)/46,XY(61%) karyotype compared with those observed in three normospermic donors (2.2% vs 0.8–1.9%).

The rate of sperm DNA fragmentation was not different between patients with a rare sex chromosome mosaicism and the control group. In fact, an elevated proportion of gametes with fragmented DNA had previously been found in males carrying a structural chromosomal abnormality (Perrin et al., 2009) and in infertile men with a normal karyotype and abnormal sperm parameters (Brahem et al., 2012; Tang et al., 2010). It should be noted that two men in the present series had already fathered naturally.

The comparison of our results with those from the literature is difficult because the frequencies of the cell lines composing the mosaicism differed between patients. Furthermore, the proportion of the different cell lines can be different from one tissue to another in the same patient. A limitation of the study is the lack of testicular tissue analysis, which would permit the true rate of mosaicism in germinal tissue to be identified definitively but to obtain such tissue would have been ethically unacceptable in these situations. Whether the relative levels of the several cell lines present in the mosaics could influence the rate of aneuploid spermatozoa therefore remains unknown (Lim et al., 1999).

Mosaicism presents a challenge for patients undergoing fertility treatment with assisted reproductive technology. Indeed, the theoretical risk for transmitting aneuploidies to the offspring is high if the mosaicism extends to the reproductive system; however, there are no data available. Nevertheless, the slightly elevated frequencies of aneuploidy of sex chromosomes and/or autosomes observed in sperm suggest that those patients who cannot father naturally may be at a very limited increased risk of producing aneuploid offspring. Such patients should not be refused fertility treatment, but should be provided with genetic counseling and be advised about prenatal diagnosis.

Acknowledgements

Some samples were provided by GERMETHEQUE biobank (France).

Declaration of interest: The authors report no declarations of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- Alhalabi, M., Kenj, M., Monem, F., Mahayri, Z., Abou Alchamat, G., & Madania, A. (2013). High prevalence of genetic abnormalities in Middle Eastern patients with idiopathic non-obstructive azoospermia. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30, 799–805.
- Blanco, J., Egozcue, J., & Vidal, F. (2001). Meiotic behaviour of the sex chromosomes in three patients with sex chromosome anomalies (47,XXY, mosaic 46,XY/47,XXY and 47,XYY) assessed by fluorescence in-situ hybridization. *Human Reproduction*, 16, 887–892.
- Brahem, S., Mehdi, M., Elghezal, H., & Saad, A. (2012). Study of aneuploidy rate and sperm DNA fragmentation in large-headed, multiple-tailed spermatozoa. *Andrologia*, 44, 130–135.
- Dale, B., Wilding, M., De Matteo, L., & Zullo, F. (2002). Absence of sperm sex chromosome aneuploidies in an X0/XYY man. *Fertility and Sterility*, 78, 634–636.
- Giltay, J.C., van Golde, R.J., & Kastrop, P.M. (2000). Analysis of spermatozoa from seven ICSI males with constitutional sex chromosomal abnormalities by fluorescent in situ hybridization. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 17, 151–155.
- Lim, A.S., Fong, Y., & Yu, S.L. (1999). Analysis of the sex chromosome constitution of sperm in men with a 47,XYY mosaic karyotype by fluorescence in situ hybridization. *Fertility and Sterility*, 72, 121–123.
- Miklos, G.L. (1974). Sex-chromosome pairing and male fertility. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 13, 558–577.
- Milazzo, J.P., Rives, N., Mousset-Simeon, N., & Mace, B. (2006). Chromosome constitution and apoptosis of immature germ cells present in sperm of two 47,XYY infertile males. *Human Reproduction*, 21, 1749–1758.
- Morel, F., Roux, C., & Bresson, J.L. (1999). Sex chromosome aneuploidies in sperm of 47,XYY men. *Archives of Andrology*, 43, 27–36.
- Newberg, M.T., Francisco, R.G., Pang, M.G., Brugo, S., Doncel, G.F., Acosta, A.A., et al. (1998). Cytogenetics of somatic cells and sperm from a 46,XY/45,X mosaic male with moderate oligoasthenoteratozoospermia. *Fertility and Sterility*, 69, 146–148.
- Odoriso, T., Rodriguez, T.A., Evans, E.P., Clarke, A.R., & Burgoyne, P.S. (1998). The meiotic checkpoint monitoring synapsis eliminates spermatocytes via p53-independent apoptosis. *Nature Genetics*, 18, 257–261.
- Perrin, A., Caer, E., Oliver-Bonet, M., Navarro, J., Benet, J., Amice, V., et al. (2009). DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality. *Fertility and Sterility*, 92, 583–589.
- Rives, N., Milazzo, J.P., Miraux, L., North, M.O., Sibert, L., & Mace, B. (2005). From spermatocytes to spermatozoa in an infertile XYY male. *International Journal of Andrology*, 28, 304–310.
- Rives, N., Simeon, N., Milazzo, J.P., Barthelemy, C., & Mace, B. (2003). Meiotic segregation of sex chromosomes in mosaic and non-mosaic XYY males: case reports and review of the literature. *International Journal of Andrology*, 26, 242–249.
- Tang, S.S., Gao, H., Zhao, Y., & Ma, S. (2010). Aneuploidy and DNA fragmentation in morphologically abnormal sperm. *International Journal of Andrology*, 33, e163–e179.
- Templado, C., Uroz, L., & Estop, A. (2013). New insights on the origin and relevance of aneuploidy in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*, 19, 634–643.
- Wong, E.C., Ferguson, K.A., Chow, V., & Ma, S. (2008). Sperm aneuploidy and meiotic sex chromosome configurations in an infertile XYY male. *Human Reproduction*, 23, 374–378.

2. Article : Etude de la fragmentation de l'ADN spermatique et de la ségrégation méiotique dans les gamètes mâles chez les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure

Résultats et discussion

La fragmentation de l'ADN spermatique et l'équipement chromosomique dans chaque gamète sont étudiés grâce à la combinaison de deux techniques TUNEL et FISH chez les 11 patients porteurs d'une anomalie chromosomique de structure, dont 7 patients porteurs d'une translocation réciproque équilibrée, 3 patients porteurs d'une translocation robertsonienne et 1 patient porteur d'une inversion du chromosome 3.

Nos résultats indiquent que les gamètes chromosomiquement déséquilibrés ont un ADN plus fragmenté que ceux dont l'équipement chromosomique est normal ou équilibré. De plus, nous avons trouvé que la répartition des gamètes avec un ADN fragmenté ne se fait pas au hasard mais selon le mode de ségrégation méiotique. En effet, chez les trois patients ayant une translocation robertsonienne (P8, P9, P10), plus de gamètes avec un ADN fragmenté se sont retrouvés dans le mode de ségrégation méiotique adjacent. Pour les 7 patients porteurs d'une translocation réciproque équilibrée, les spermatozoïdes présentant un ADN fragmenté sont issus préférentiellement du mode de ségrégation méiotique 3:1 chez 5 patients (P1, P3, P4, P5 et P7) et du mode de ségrégation méiotique adjacent 1 chez le patient P2. Chez patient P6, il y a significativement plus de spermatozoïdes avec un ADN fragmenté dans le mode de ségrégation méiotique adjacent 1 et 3:1.

Nos résultats concernant le taux de gamètes chromosomiquement déséquilibrés sont en accord avec ceux obtenus dans la littérature (Roux *et al.* 2005, Morel *et al.* 2007, Caer *et al.* 2008, Perrin *et al.* 2009). Le taux de fragmentation de l'ADN spermatique chez les 11 patients est significativement plus élevé que chez les témoins, ce résultat est similaire à ceux obtenus dans des études précédentes (Perrin *et al.* 2009, Brugnon *et al.* 2006, 2009).

La fragmentation de l'ADN spermatique et l'équipement chromosomique déséquilibré dans les gamètes affectent négativement la fertilité masculine (Tempest and Griffin. 2004, Barratt *et al.* 2010). L'association de ces deux paramètres a été décrite chez les patients ayant une anomalie chromosomique de structure (Perrin

et al. 2009), chez les patients globozoospermiques (Brahem *et al.* 2011), chez les patients dont la conjointe a eu des fausses couches à répétition (Carrell *et al.* 2003). L'analyse de la fragmentation de l'ADN spermatique et l'équipement chromosomique dans ces études a été faite sur l'éjaculat total ce qui ne permet pas de savoir si les gamètes chromosomiquement déséquilibrés possèdent un ADN plus fragmenté que ceux dont l'équipement chromosomique est normal ou équilibré. La combinaison de deux techniques, le TUNEL et la FISH, nous permet d'évaluer l'équipement chromosomique dans chaque gamète et de le lier avec l'intégrité de son ADN.

Les spermatozoïdes immatures ayant une rétention du cytoplasme ont de 1,5 à 4 fois plus d'anomalies chromosomiques que les spermatozoïdes matures (Kovanci *et al.* 2001). En plus, les spermatozoïdes immatures possèdent un taux de la fragmentation de l'ADN plus élevé que les spermatozoïdes matures (Ollero *et al.* 2001, Fernandez *et al.* 2003). Il est probable que les aneuploïdies et la fragmentation de l'ADN se trouvent préférentiellement dans les spermatozoïdes immatures. Il est suggéré une relation entre ces deux paramètres (Carrell *et al.* 2003, Liu *et al.* 2004).

Une corrélation positive entre l'aneuploïdie et la fragmentation de l'ADN a été mise en évidence chez les patients infertiles ayant des paramètres spermatiques normaux (Enciso *et al.* 2013) ou ayant des paramètres spermatiques anormaux (Muriel *et al.* 2007). Au contraire, d'autres équipes n'ont pas corroboré ces résultats (Balasuriya *et al.* 2011, Bronet *et al.* 2012). En fait, le test SCD-FISH, permettant d'évaluer l'équipement chromosomique et la fragmentation de l'ADN spermatique sur le même spermatozoïde, est utilisé dans deux études et donne des résultats tout à fait différents (Balasuriya *et al.* 2011, Enciso *et al.* 2013). Tandis que l'équipe d'Enciso a trouvé une corrélation entre ces deux paramètres, l'équipe de Balasuriya ne l'a pas mise en évidence. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les chromosomes étudiés sont plus nombreux dans l'étude d'Enciso (7 chromosomes : X, Y, 13, 16, 18, 21 et 22) que dans l'étude de Balasuriya (3 chromosomes : X, Y et 18) (Balasuriya *et al.* 2011, Enciso *et al.* 2013). Récemment, l'équipe de Bronet a étudié des patients ayant des fausses couches récurrentes ou des échecs d'implantation lors d'une FIV. Ils n'ont trouvé aucune corrélation entre la fragmentation de l'ADN et l'aneuploïdie dans les embryons et dans les spermatozoïdes (Bronet *et al.* 2012). Néanmoins, les spermatozoïdes de mauvaise qualité ont été exclus dans cette étude (Bronet *et al.* 2012). Les critères de sélection des patients pourraient introduire un biais dans l'interprétation des résultats obtenus. Ainsi, il est recommandé de comparer les études avec attention.

La spermatogenèse est un processus complexe où les cellules germinales diploïdes

doivent subir différentes étapes de division et de différenciation pour devenir des spermatozoïdes haploïdes. Pendant ce processus, il est inévitable d'avoir des détériorations de l'intégrité de l'ADN spermatique surtout pendant le remodelage de la chromatine lors de la spermiogenèse. Ces dommages peuvent être réparés par le système de réparation dans les spermatozoïdes. Pourtant, il est possible d'avoir un nombre de spermatozoïdes éjaculés présentant des fragmentations de l'ADN. L'origine de ces dommages est expliquée selon trois théories majeures à savoir la protamination, les SOR et l'apoptose (Sakkas *et al.* 1999, Aoki *et al.* 2005, Aitken et Kopper. 2011).

La première théorie de l'origine de la fragmentation de l'ADN concerne le remodelage de la chromatine spermatique lors de la spermiogenèse. Dans la dernière étape de la production des gamètes mâles, la chromatine spermatique subit des modifications très importantes afin de bien protéger le génome paternel. Les nucléo-histones sont remplacées par les nucléo-protamines permettant une compaction de l'ADN spermatique. Pendant ce processus, les cassures créées par les endonucléases sont nécessaires afin de faciliter le remplacement des histones par des protéines de transition et finalement par des protamines (Leduc *et al.* 2008a). Si la réparation des cassures n'est pas complète ou incorrecte, ils persistent dans les spermatozoïdes matures un ADN fragmenté. De plus, le remplacement pendant la compaction de la chromatine spermatique est fait grâce à deux types de protamine : P1 et P2. Le ratio de P1:P2 est normalement à 1:1. Si ce ratio est altéré, l'ADN est moins compacté et donc moins protégé (Aoki *et al.* 2005). Les spermatozoïdes ayant un ADN moins compacté ont une susceptibilité accrue aux attaques post-testiculaires.

La deuxième théorie concerne les SOR qui sont produits par les leucocytes et les spermatozoïdes eux-mêmes. Le stress oxydatif peut attaquer l'ADN spermatique en provoquant des cassures simple et double brins (Aitken *et al.* 2009). Les antioxydants intrinsèques des spermatozoïdes sont très limités à cause du manque de cytoplasme. La source des antioxydants vient majoritairement du liquide séminal (Zini *et al.* 2009). Si les antioxydants dans le liquide séminal sont insuffisants, la chromatine spermatique peut être altérée par l'attaque des SOR. Le traitement par des antioxydants complémentaires peut améliorer l'intégrité de l'ADN spermatique (Greco *et al.* 2005) mais peut provoquer une décondensation de la chromatine spermatique (Menezo *et al.* 2007). L'utilisation des antioxydants doit être réalisée à bon escient.

La troisième théorie se concentre sur l'apoptose. La mort cellulaire programmée est un processus important pendant la spermatogenèse permettant l'harmonisation du nombre des cellules germinales selon la capacité des cellules de Sertoli. De plus, il existe

un mécanisme du point de contrôle de la méiose I. Les cellules ayant des anomalies chromosomiques devraient être remarquées et éliminées par apoptose. Par contre, la présence des spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés dans l'éjaculat indique que l'apoptose induite par le mécanisme du point de contrôle n'élimine pas complètement les cellules germinales présentant des anomalies chromosomiques (Eaker *et al.* 2001). L'apoptose se caractérise par la réduction de mobilité des cellules, la présence des marqueurs apoptotiques à la surface des cellules, l'externalisation de la phosphatidylsérine, l'altération du potentiel de la membrane mitochondriale et la fragmentation de l'ADN. De plus, une corrélation entre la présence des caspases apoptotiques et la fragmentation de l'ADN a été démontrée et suggère que l'apoptose est dépendante des caspases (Brugnon *et al.* 2010).

Notre étude et celle de Brugnon *et al.* sont les premières analysant l'équipement chromosomique et l'ADN spermatique chez les patients porteurs d'une anomalie chromosomique de structure (Brugnon *et al.* 2010). Nous avons montré que les gamètes chromosomiquement déséquilibrés ont un ADN plus fragmenté que ceux dont l'équipement chromosomique est normal ou équilibré. Nos résultats sont en accord avec d'autres études (Muriel *et al.* 2007, Brugnon *et al.* 2010, Enciso *et al.* 2013). En fait, pendant la spermatogenèse, le point de contrôle méiotique possède un rôle très important dans la régulation de la formation gamétique. Ce mécanisme permet d'éliminer les gamètes génétiquement anormaux par l'induction de l'apoptose qui résulte en des cassures de l'ADN spermatique (Sakkas *et al.* 1999a, Eaker *et al.* 2001). La présence des gamètes chromosomiquement déséquilibrés ayant un ADN fragmenté dans l'éjaculat peut être expliquée par le fait que ces gamètes sont "marqués" pour être éliminés par apoptose au cours de la spermatogenèse. Pourtant, certains d'entre eux échappent à la mort cellulaire programmée et par conséquent, sont présents dans l'éjaculat avec un ADN fragmenté. L'apoptose est donc initiée mais le processus ne va pas à son terme, d'où le nom d'"apoptose abortive" (Sakkas *et al.* 1999a). Cette hypothèse est supportée par la présence des marqueurs apoptotiques à la surface des spermatozoïdes éjaculés (Sakkas *et al.* 2002, Brugnon *et al.* 2006, Soleimani *et al.* 2010). Tandis que certaines études indiquent une corrélation entre les caspases apoptotiques et la fragmentation de l'ADN (Brugnon *et al.* 2006, 2010), d'autres montrent que les marqueurs apoptotiques ne sont pas toujours corrélés avec la fragmentation de l'ADN spermatique (Sakkas *et al.* 2002, Moustafa *et al.* 2004). La discordance entre les marqueurs apoptotiques et la fragmentation de l'ADN suggère que la fragmentation de l'ADN *via* l'apoptose dans les spermatozoïdes pourrait être créée par des mécanismes

différents que ceux observés dans les cellules somatiques (Muriel *et al.* 2007) et que la présence des signes apoptotiques est chronologiquement décalée. En fait, la réduction du potentiel de la membrane mitochondriale apparaît plus tôt que l'externalisation de la phosphatidylsérine. De plus, la caspase 3 peut aboutir à la fragmentation de l'ADN par l'activation des désoxyribonucléases (Kim *et al.* 2001). Les cellules germinales "marquées" possédant les stigmates apoptotiques seraient toujours viables et pourraient subir alors toutes les étapes de la spermatogenèse pour aboutir à des spermatozoïdes vivants et féconds, mais gardant les signes apoptotiques acquis par leurs précurseurs. Ce processus d'apoptose abortive pourrait être secondaire à un manque de synchronisation entre l'engagement dans les voies apoptotiques et la spermatogenèse (Marchetti et Marchetti. 2009).

Il faut être très prudent lors de l'interprétation concernant la relation entre des caspases apoptotiques et l'apoptose. Chez le rat, la machinerie apoptotique sert également à éliminer le cytoplasme en excès des spermatides, connu sous le nom de corps résiduels, et qui sont phagocytés par les cellules de Sertoli (Blanco-Rodriguez et Martinez-Garcia. 1999). En effet, la rétention du cytoplasme dans les spermatozoïdes est associée à la présence de marqueurs apoptotiques (Sakkas *et al.* 2002). Cela est également compatible avec la constatation que les spermatozoïdes immatures présentent un niveau élevé de caspases, un faible potentiel mitochondrial (Paasch *et al.* 2003), une augmentation de fragmentation de l'ADN (Moustafa *et al.* 2004). D'ailleurs, la chaleur, la cryoconservation, le peroxyde d'hydrogène pourraient induire la fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes (Muratori *et al.* 2003, Lozano *et al.* 2009, Zribi *et al.* 2010). Ces conditions induisent des SOR qui vont attaquer la mitochondrie spermatique en induisant l'apoptose avec une baisse de mobilité des spermatozoïdes, l'externalisation de la phosphatidylsérine, l'activation des caspases apoptotiques et la fragmentation de l'ADN spermatique (Aitken et Koppers. 2010).

Dans notre étude, certains des spermatozoïdes chromosomiquement normaux ou équilibrés pour les chromosomes étudiés possèdent également un ADN fragmenté. Cela se trouve également dans d'autres études (Muriel *et al.* 2007, Enciso *et al.* 2013). Il est possible que certains d'entre eux soient chromosomiquement déséquilibrés pour des chromosomes autres que ceux étudiés. Bien qu'un spermatozoïde avec un ADN fragmenté puisse féconder un ovocyte, le développement embryonnaire serait compromis car la capacité d'un ovocyte à réparer les dommages de l'ADN spermatique est limitée. Cela pourrait provoquer un échec de la décondensation de la chromatine spermatique (Sakkas *et al.* 1996) ou résulter en un arrêt des divisions cellulaires

pendant le développement précoce de l'embryon (Henkel *et al.* 2004). En fait, les spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés qui sont repérés par le point de contrôle lors de la méiose mais qui ont échappé à l'apoptose pendant la spermatogenèse, présentent des marqueurs apoptotiques, telle que la fragmentation de l'ADN. La persistance, dans l'éjaculat, de gamètes avec un ADN fragmenté est associée à la perte pré ou post-implantatoire de l'embryon, évitant ainsi le développement d'un fœtus avec des anomalies génétiques (Muriel *et al.* 2007). Cela est concordant avec le fait que les fausses couches récurrentes sont associées à un taux augmenté de gamètes avec un ADN fragmenté et aneuploïdes (Carrell *et al.* 2003a, b). D'autre part, un nombre de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés avec un ADN intact a également été observé. Il est possible que la machinerie de contrôle ait échoué dans la détection des anomalies chromosomiques de ces gamètes. Ces spermatozoïdes avec un ADN intact sont capables de féconder et permettent le développement embryonnaire. Ils augmentent donc la possibilité d'avoir un fœtus chromosomiquement déséquilibré. Ainsi, d'après Muriel *et al.*, l'analyse de l'équipement chromosomique dans les spermatozoïdes avec un ADN non fragmenté peut donner plus d'informations sur le véritable risque d'avoir une anomalie chromosomique chez le fœtus (Muriel *et al.* 2007).

Les techniques d'AMP permettent aux hommes ayant de mauvais paramètres spermatiques d'être père. L'ICSI serait le traitement le plus efficace pour les couples dont les conjoints ont un taux de fragmentation de l'ADN spermatique élevé (Zini *et al.* 2008). Cette méthode peut permettre à un spermatozoïde anormal de passer les barrières naturelles qui normalement l'empêchent de féconder ou d'arriver jusqu'à l'ovocyte. Nos résultats montrent bien que chez les hommes présentant une anomalie chromosomique de structure, le taux de gamètes chromosomiquement déséquilibrés est bien corrélé avec un ADN fragmenté. Il est donc recommandé aux couples infertiles traités par l'ICSI dont les conjoints ont une anomalie chromosomique de structure de réaliser un diagnostic pré-implantatoire afin d'éviter le transfert d'un embryon chromosomiquement anormal.

ORIGINAL ARTICLE

Correspondence:

Marc De Braekeleer, Laboratoire de
Cytogénétique, Hôpital Morvan, Bâtiment 5bis,
CHRU Brest, 2, avenue Foch, Brest Cedex F-29609,
France. E-mail: marc.debraekeleer@univ-brest.fr

^aBoth authors equally contributed to this study

Keywords:

apoptosis, chromosomal structural abnormality,
DNA fragmentation, male infertility, meiotic
segregation

Received: 2-Mar-2013

Revised: 22-Apr-2013

Accepted: 22-Apr-2013

doi: 10.1111/j.2047-2927.2013.00100.x

DNA fragmentation is higher in spermatozoa with chromosomally unbalanced content in men with a structural chromosomal rearrangement

^{1,2,3,a}A. Perrin, ^{1,2,a}M. H. Nguyen, ^{4,5}L. Bujan, ^{6,7}F. Vialard, ³V. Amice,
^{1,2}N. Guéganic, ^{1,2,3}N. Douet-Guilbert, ^{1,2,3}M. De Braekeleer and
^{1,2,3}F. Morel

¹Laboratoire d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidentale, Brest, ²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1078, Brest, ³Service de Cytogénétique, Cytologie et Biologie de la Reproduction, Hôpital Morvan, CHRU Brest, Brest, ⁴Research Group on Human Fertility EA3694, Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, ⁵CECOS Midi-Pyrénées and GERMETHEQUE biobank, Groupe d'activité de médecine de la reproduction, CHU Paule de Viguier, Toulouse, ⁶Service d'Histologie-Embryologie-Cytogénétique, Biologie de la Reproduction et Génétique Médicale, CHI Poissy-Saint-Germain, Poissy, and ⁷EA2493, Université Versailles St Quentin en Yvelines, Versailles, France

SUMMARY

It has been previously shown that men with chromosomal structural abnormality had a higher rate of sperm DNA fragmentation. We studied 11 male carriers of a chromosomal structural abnormality (seven with a balanced reciprocal translocation, three with a Robertsonian translocation, one with a pericentric inversion) to determine whether spermatozoa with unbalanced chromosomes were more likely to have fragmented DNA. A sequential method combining analysis of DNA fragmentation using the TUNEL assay followed by analysis of meiotic segregation by fluorescent in situ hybridization was performed on the same spermatozoa. A statistically significant higher number of spermatozoa with unbalanced chromosomal content were found to have fragmented DNA for each man. The rate of spermatozoa with DNA fragmentation was higher than the rate of those without fragmented DNA in particular modes of segregation. Our findings provide a better understanding of the mechanisms involved in male infertility ascribable to chromosomal structural abnormality.

INTRODUCTION

Many factors are known to explain male infertility and to influence spermatogenesis. Chromosomal abnormalities are perhaps the factor best known to interfere with gametogenesis. Indeed, Robertsonian and reciprocal translocations are found in 0.7 and 0.5% of the men investigated for infertility respectively. Pericentric and paracentric inversions are seen in 0.16% of those men (Vincent *et al.*, 2002; De Braekeleer *et al.*, 2006).

Men carrying these abnormalities have a normal phenotype generally, but they can produce a significant percentage of chromosomally unbalanced gametes. For reciprocal translocation carriers, the alternate segregation mode produces chromosomally normal or balanced gametes and the others segregation modes, that is adjacent 1, adjacent 2, 3 : 1 and 4 : 0 produce chromosomally unbalanced gametes (Morel *et al.*, 2006). For Robertsonian translocation carriers, the alternate segregation

mode produces chromosomally normal or balanced gametes and the other segregation modes, that is adjacent and 3 : 0, produce chromosomally unbalanced gametes (Morel *et al.*, 2006). For inversion carriers, recombinant spermatozoa with both duplicated and deficient chromosome segments including the regions distal to the inversion can be produced (Morel *et al.*, 2006).

Although the infertility of the male carrier of a chromosomal structural abnormality could be explained by the meiotic segregation of the rearrangement and/or poor quality semen (Morel *et al.*, 2006), it cannot be excluded that aberration of the apoptotic process, as evidenced by DNA fragmentation, also participates in the infertility. Indeed, Brugnol *et al.* (2006) found significantly higher rates of apoptotic markers in ejaculated spermatozoa among chromosomal translocation carriers than among sperm donors.

We showed, in a previously published study, that the DNA fragmentation rate depended solely on the presence of a chromosomal structural abnormality, and, therefore, that a chromosomal structural abnormality predicted DNA fragmentation (Perrin *et al.*, 2009). In a subsequent study, Brugnon *et al.* (2010) found higher numbers of spermatozoa showing apoptosis and immaturity features in seven oligoasthenozoospermic Robertsonian translocation carriers than in fertile donors.

However, no statistically significant correlation was found between the DNA fragmentation rate and the frequency of spermatozoa with chromosomally unbalanced content. Indeed, these studies were performed on whole ejaculated spermatozoa and the question remained to as whether, in those men carrying a structural chromosome rearrangement, DNA fragmentation was higher in chromosomally unbalanced spermatozoa than in those having a normal or balanced chromosomal content. In a preliminary study based on three men with a reciprocal translocation and one with a Robertsonian translocation, we showed that there was a 2–5 times higher proportion of spermatozoa with unbalanced chromosomal content and fragmented DNA than among those with normal/balanced content. Unexpectedly, we also found a non-random distribution with more gametes with DNA fragmentation when these arose from a particular segregation mode (Perrin *et al.*, 2011).

In this study, using a sequential methodology, we analysed the DNA fragmentation and the meiotic segregation on the same spermatozoa of 11 men carrying a chromosomal structural abnormality. We wanted to determine, in a first step, whether spermatozoa with unbalanced chromosomes were more likely to have fragmented DNA and, in a second step, whether DNA fragmentation was dependent upon the mode of segregation.

MATERIALS AND METHODS

Patients and sperm parameters

Eleven male carriers of a chromosomal structural abnormality were included in the study. There were seven men with a balanced reciprocal translocation, three with a Robertsonian translocation and one with pericentric inversion (Table 1).

Sperm concentration and motility were evaluated according to the World Health Organization recommendations; sperm morphology was evaluated using strict criteria (David *et al.*, 1975; World Health Organization, 1999) (Table 1).

Before the study, all 11 men were informed of the investigations and they gave their consent.

Sequential DNA fragmentation-meiotic segregation analysis

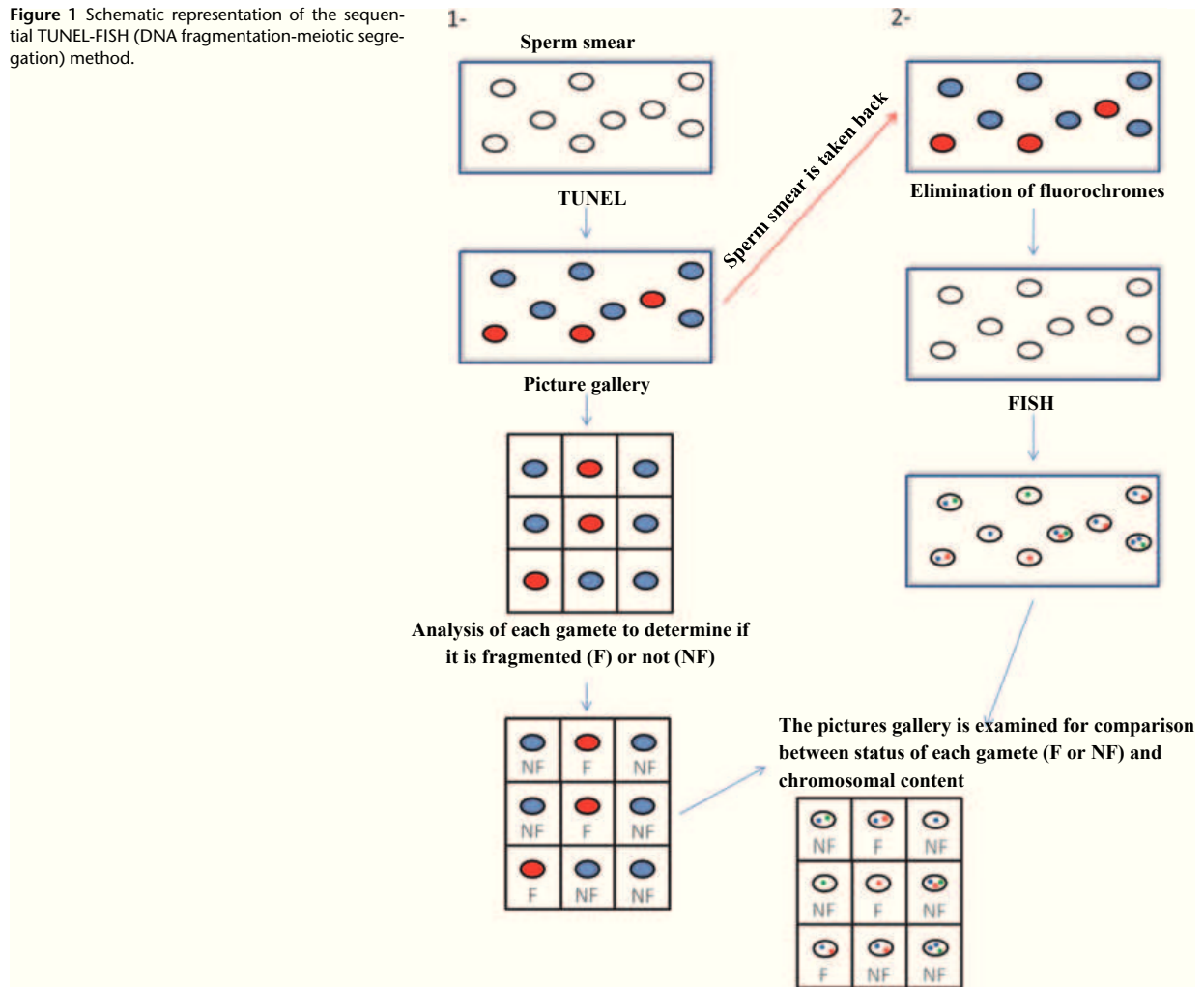
After having been spread on a slide, spermatozoa were fixed with Carnoy solution (Fig. 1). The TUNEL assay was then performed. The DNA fragmentation in spermatozoa was detected by the ApopTag Red Kit (MP Biomedicals, Illkirch, France), as previously described (Perrin *et al.*, 2009). Briefly, 50 μ L equilibration buffer was put on the slide for 30 sec at room temperature. Then 55 μ L mix 1 (38.5 μ L reaction buffer + 16.5 μ L terminal deoxyribonucleotidyl transferase) were added. The slide, covered with a lamella, was incubated in a dark humidified chamber at 37 °C for 1 h. It was then shaken for 15 sec in mix 2 (1.5 mL stop/wash buffer + 48.5 mL H₂O) before being incubated for 10 min in the same mix at room temperature and washed for 1 min 30 sec with 1 \times phosphate buffered saline (PBS). A quantity of 43 μ L of mix 3 (22.5 μ L blocking solution + 20.5 μ L antidigoxigenin rhodamine) was added to the slide, which was covered with a lamella. Incubation was

Table 1 Karyotype, spermiogram, rates of chromosomally unbalanced and of DNA fragmentation in whole ejaculated spermatozoa and rate of DNA fragmentation by chromosomal content in spermatozoa of the 11 patients with a chromosomal structural abnormality

Patients	Karyotype	Spermiogram	Number of spermatozoa	Whole ejaculated sperm Rate of chromosomally unbalanced spermatozoa (%)	Rate of DNA fragmentation (%)	Same spermatozoa Chromosomal content	DNA fragmentation (%)	<i>p</i> values
Reciprocal translocations								
P1	46,XY,t(6;8)(q27;q24.1)*	N	2 189	59.0	3.2	Normal/balanced	1.0	0.0001
						Unbalanced	4.6	
P2	46,XY,t(7;8)(p12;p22)*	OAT	3 445	55.6	4.7	Normal/balanced	2.9	0.0001
						Unbalanced	6.2	
P3	46,XY,t(7;15)(p15.1;q13)	OAT	2 562	60.1	8.7	Normal/balanced	0.6	0.0001
						Unbalanced	12.5	
P4	46;XY,t(13;15)(q31;q26.2)*	AT	2 399	61.4	6.3	Normal/balanced	4.3	0.001
						Unbalanced	7.6	
P5	46,XY,t(13;17)(p13;p12)	O	2 390	45.6	12.6	Normal/balanced	3.3	0.0001
						Unbalanced	20.4	
P6	46,XY,t(1;9)(q43;p23)	OA	2 541	59.6	24.8	Normal/balanced	12.7	0.0001
						Unbalanced	33.0	
P7	46,XY,t(15;16)(p10;q10)	A	2 322	53.0	6.8	Normal/balanced	0.8	0.0001
						Unbalanced	12.2	
Robertsonian translocations								
P8	45,XY,rob(13;14)(q10;q10)*	OAT	2 377	30.1	8.3	Normal/balanced	6.7	0.0001
						Unbalanced	12.2	
P9	45,XY,rob(14;21)(q10;q10)	T	2 271	26.8	8.4	Normal/balanced	6.8	0.0001
						Unbalanced	13.4	
P10	45,XY,rob(13;15)(q10;q10)	OA	2 304	27.2	12.9	Normal/balanced	8.2	0.0001
						Unbalanced	28.5	
Pericentric inversion								
P11	46,XY,inv(3)(p26.1q28)	OAT	2 505	31.9	10.7	Normal/inverted	9.3	0.014
						Unbalanced	12.5	

N: normal, O: oligozoospermia, OA: oligoasthenozoospermia, T: teratospermia, AT: asthenoteratozoospermia, OAT: oligoasthenoteratozoospermia.*Previously published in Perrin *et al.* (2011).

Figure 1 Schematic representation of the sequential TUNEL-FISH (DNA fragmentation-meiotic segregation) method.



performed for 30 min in a dark humidified chamber at 37 °C. The slide was washed twice for 4 min in 1× PBS. It was air-dried and counterstained with 4,6-diamidino-2-phenolindol (DAPI). A spermatozoon was considered to contain either normal (blue nuclear fluorescence) or fragmented (partial or total red fluorescence) DNA. Each spermatozoon was photographed using a Zeiss Axioplan Microscope (Zeiss, Le Pecq, France) and kept in a 'picture gallery' using the Metafer software (Metasystems, Altussheim, Germany) which allowed the X, Y and Z coordinates to be registered. Each sperm head was assigned a fragmented or non-fragmented tag.

Once the slide was fully analysed, rhodamine had to be eliminated to perform the fluorescent in situ hybridization (FISH) technique. Several steps were necessary:

- 1 Sperm heads were fixed again in Carnoy solution for 1 h
- 2 Slide was washed in 1× PBS for 30 min, and then put in 2× SSC for 30 min
- 3 Slide was put in 0.4× SSC/0.3% NP40 for 20 min at 72 °C to eliminate the rhodamine
- 4 Slide was washed in 2× SSC/0.1% NP40 at room temperature for 5 min

5 Slide was immersed in NaOH 1 N at room temperature for 1 min to decondense the chromatin

6 Slide was washed in 2× SSC at pH 7.2 for 10 min

7 Slide was passed through an ethanol series of growing concentration (70/90/100%).

Meiotic segregation was then analysed by FISH with an appropriate cocktail of probes according to the chromosomal breakpoints (Supplemental Table 1). The hybridization techniques have been previously published (Morel *et al.*, 2007; Perrin *et al.*, 2009). Following counterstaining with DAPI, the slide was again analysed. The chromosomal content in spermatozoa was determined according to the combination of fluorescent spots exhibited. Acquisition was performed using a CCD camera with in situ imaging system (ISIS) (Metasystems). The 'picture gallery' created during the TUNEL assay is then used to assign the chromosomal content to each fragmented and non-fragmented spermatozoon. Examples are given in Fig. 2.

Statistical analyses

An independent chi-square test was used to compare the numbers of spermatozoa with DNA fragmentation among

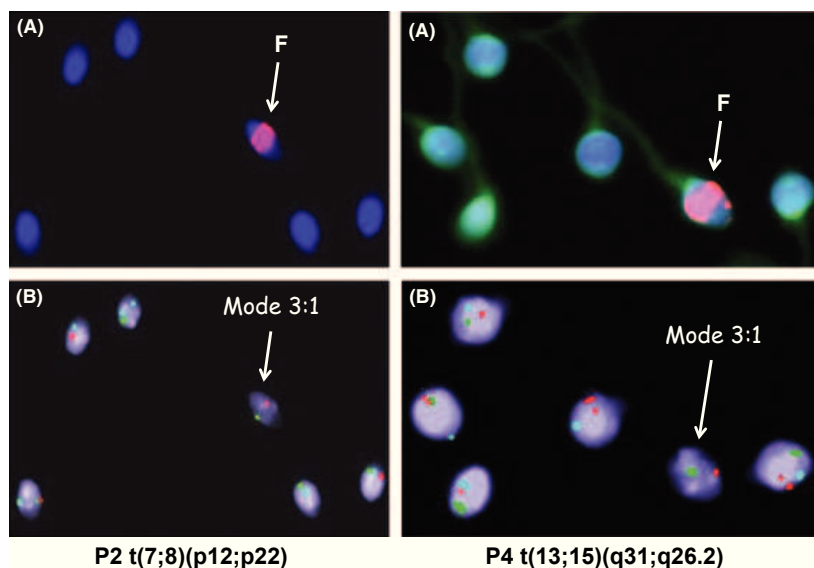


Figure 2 Spermatozoa of patient P2 carrying a $t(7;8)(p12;p22)$ after TUNEL (A) and FISH (B) analysis. Spermatozoa of patient P4 carrying a $t(13;15)(q31;q26.2)$ after TUNEL (A) and FISH (B) analysis.

chromosomally unbalanced spermatozoa and those having a normal or balanced chromosomal content. The significant level was set at $p < 0.05$.

A Z-test was used to compare the rate of spermatozoa within specified modes of meiotic segregation among those with or without DNA fragmentation. This test assumed that there was no difference (null hypothesis) between both proportions. The null hypothesis was rejected if the Z-test reached the single critical value of 1.96 for 5% two-tailed analysis.

RESULTS

A total of 27 305 spermatozoa were analyzed by the sequential TUNEL-FISH method, ranging from 2 189 spermatozoa for patient P1–3445 spermatozoa for patient P2 (Table 1). A statistically significant higher number of spermatozoa with unbalanced chromosomal content were found to have fragmented DNA for each male carrier (Table 1 and Supplemental Table 2).

Furthermore, for all male carriers of a translocation but one, a significant difference was found between the rate of spermatozoa with and without DNA fragmentation in particular modes of segregation (Fig. 3 and Supplemental Table 2).

For the seven male carriers of a reciprocal translocation, more DNA fragmented spermatozoa than non-fragmented cells were identified in the 3 : 1 mode in five patients (P1, P3, P4, P5 and P7) and in the adjacent 1 mode in one patient (P2). Patient P6 presented more DNA fragmented spermatozoa in two modes of segregation (adjacent 1 and 3 : 1).

For the three male carriers of a Robertsonian translocation (P8, P9 and P10), more DNA fragmented spermatozoa than non-fragmented cells were identified in the adjacent mode (Fig. 3).

DISCUSSION

We report here a study in which spermatozoa with chromosomally unbalanced content arising from a structural chromosomal rearrangement were shown to be more likely to have fragmented DNA. Furthermore, DNA fragmentation appeared to

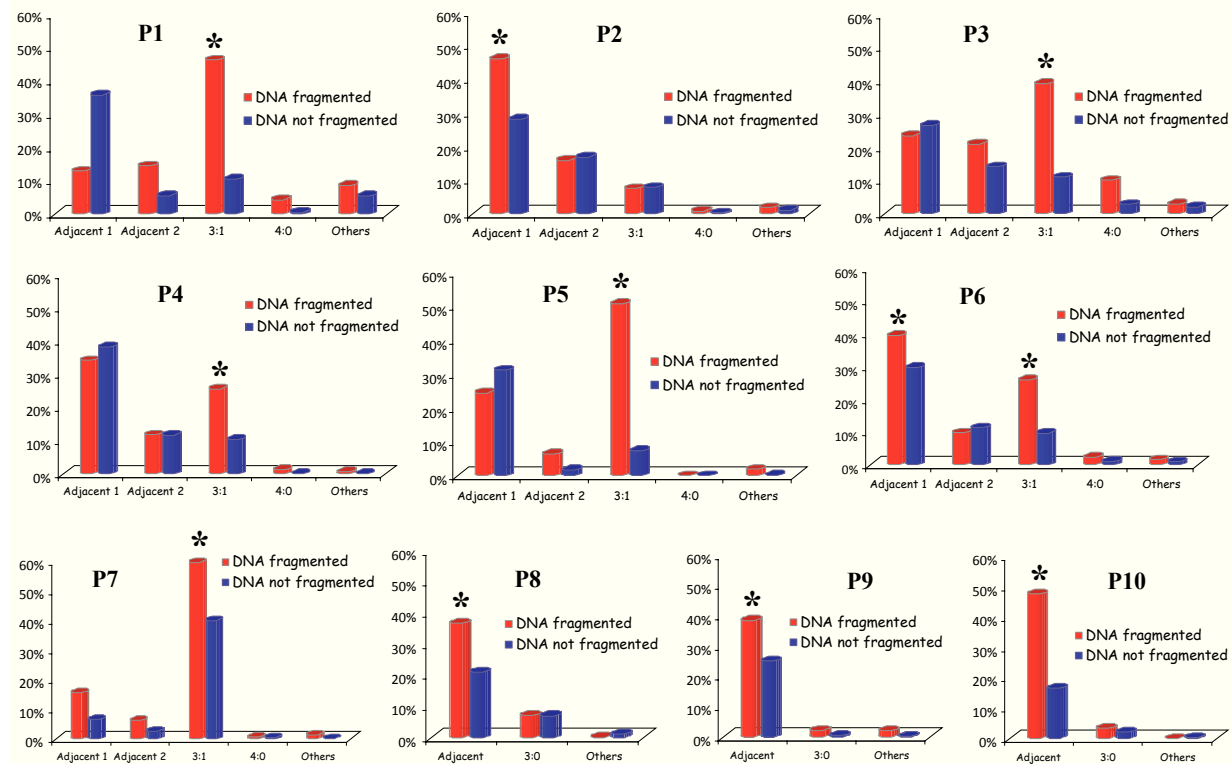
be dependent upon the mode of segregation in reciprocal or Robertsonian translocations. Adjacent-1 and 3 : 1 modes were more likely to be associated with high DNA fragmentation. However, because the other modes of segregation were rarer, a lack of statistical power could not be eliminated to explain these results. Some of the results (4 of 11 patients, Table 1) reported here were already published in a review article (Perrin *et al.*, 2011). The results obtained here on more patients thus confirm our previously published results.

In this study, rates of gametes with chromosomally unbalanced content were similar with those found in the literature (Table 1) (Anton *et al.*, 2004; Morel *et al.*, 2004, 2007; Benet *et al.*, 2005; Roux *et al.*, 2005; Caer *et al.*, 2008; Perrin *et al.*, 2009). The rate of DNA fragmentation was found to be higher in ejaculated spermatozoa among the 11 carriers of a chromosomal structural abnormality than among fertile men with normal karyotype and spermiogram, thus confirming previously published results (Table 1) (Brugnon *et al.*, 2006, 2010; Perrin *et al.*, 2009).

Spermatogenesis is a complex process involving mitotic and meiotic divisions leading to germ cell proliferation and differentiation of spermatogonia into mature spermatozoa. During this process of rapid expansion, breaks in the chromatin can occur, which are normally repaired in the majority of gametes. However, a more or less high number of spermatozoa with fragmented DNA can persist in the ejaculate. Three hypotheses have been proposed to explain these DNA damages (Sakkas *et al.*, 1999a; Sergerie *et al.*, 2005; Ozmen *et al.*, 2007).

The first hypothesis relates DNA compaction and remodelling (Sakkas *et al.*, 2002). During the final post meiotic phases of spermatogenesis, histones are progressively replaced by protamines. This process involves not only endogenous DNA nicks but for the most part DNA double-stranded breaks in elongating spermatids and is necessary for sperm chromatin condensation and high compaction of the genome (McPherson & Longo, 1993; Braun, 2001; Aoki & Carrell, 2003; Laberge & Boissonneault, 2005; Leduc *et al.*, 2008). Therefore, ejaculated spermatozoa with

Figure 3 Distribution of the spermatozoa with and without DNA fragmentation according to the mode of segregation in 10 men carrying a structural chromosomal rearrangement. * $p < 0.05$ 'others' includes ambiguous signals and hybridization failures.



DNA fragmentation could result from failure of spermatozoa to mature normally.

The second hypothesis relates to oxidative stress. Reactive oxygen species (ROS) have been shown to affect the integrity of sperm chromatin and to cause high frequencies of DNA single and double-strand breaks. Furthermore, chromatin condensation during epididymal maturation could be important in establishing the resistance of sperm cells to the genotoxic effects of reactive oxygen species. The result is increased DNA damage and sperm DNA fragmentation (Irvine *et al.*, 2000; Bennetts & Aitken, 2005).

The third hypothesis relates to the role of apoptosis during spermatogenesis. This programmed cell death is necessary to maintain the equilibrium between the number of germ cells and Sertoli cells, preventing overproliferation of germ cells (Dunkel *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997; Sinha Hikim & Swerdloff, 1999). Apoptosis has also been proposed to play a role in the selective depletion of abnormal spermatozoa, although its role is not fully understood. Studying male mice heterozygous for Robertsonian centric fusion chromosomal translocation, Eaker *et al.* (2001) suggested the presence of a checkpoint process which identified aberrant meiosis and allowed for an increased apoptosis expression in spermatocyte I. However, the presence of chromosomally unbalanced spermatozoa suggested that the checkpoint mechanism did not efficiently eliminate all germ cells with chromosomal abnormalities.

DNA fragmentation in human spermatozoa could be a consequence of apoptosis activation (Gorczyca *et al.*, 1994). Brugnion *et al.* (2006), using the annexin V binding assay, found an

increased proportion of spermatozoa with externalized phosphatidylserine among patients with chromosomal translocation than in a control group, signing plasma membrane alterations, an early event in apoptosis (Vermes *et al.*, 1995; van Engeland *et al.*, 1998; Brugnion *et al.*, 2006). In a subsequent study on Robertsonian translocation carrier patients, Brugnion *et al.* (2010) found a strong positive correlation between the DNA fragmentation rate and activated caspase-3, caspase-8 or caspase-9 rates. The role of caspase enzyme family as mediator of apoptosis is well-known (Earnshaw *et al.*, 1999). More particularly, caspase-3 specifically induces internucleosomal DNA fragmentation in somatic cells, which can be detected by the TUNEL technique (Enari *et al.*, 1998).

Therefore, it has been proposed that some of the spermatozoa with fragmented DNA could have initiated apoptosis but subsequently escaped it, a phenomenon called 'abortive apoptosis' (Sakkas *et al.*, 1999b, 2003; Brugnion *et al.*, 2010). However, this hypothesis has been challenged by other investigators. Apoptotic markers could reflect poor functional activity or anomalies of terminal differentiation of spermatozoa rather than being an index of apoptosis (Muratori *et al.*, 2000; Marchetti & Marchetti, 2005). Sakkas *et al.* (2002) found that DNA fragmentation was not always concomitant with the expression of apoptotic markers such as Fas, p53 and Bcl-x; they proposed that the presence of DNA damage was not directly linked to an apoptotic process occurring in spermatozoa, but ascribable to problems in the nuclear remodelling process. Indeed, histone replacement by protamines is not a random event. Hammoud *et al.* (2009) found

that about 4% of the genome was retained in nucleosomes enriched at clusters of imprinted genes, miRNAs and HOX genes, as well as promoters of developmental transcription and signaling factors of importance in embryo development. Furthermore, spermatozoa with a chromosomally unbalanced content could have the capability of producing high levels of ROS and be more susceptible to DNA damage caused by oxidative stress, leading to DNA fragmentation. Indeed, a high negative impact on sperm DNA could be generated by the formation of compounds such as 8-oxo-7,8-dihydroxyguanosine, possibly responsible for DNA fragmentation and mutagenic effects (Lopes *et al.*, 1998; Menezo *et al.*, 2007). H₂O₂ could also induce apoptotic events such as caspase-3 and -9 activation and phosphatidylserine externalization (Bejarano *et al.*, 2008).

Our results and those obtained by Brugnon *et al.* (2006, 2010) could also be explained by abortive apoptosis. Gametes with a chromosomally unbalanced content could have been tagged, between the spermatocyte and spermatid stages, as having to be eliminated by apoptosis, but the process was not completed. However, we have to be cautious in the interpretation of the apoptotic markers found in ejaculated spermatozoa because they do not necessarily mean death by apoptosis. DNA fragmentation could witness an incomplete maturation during spermiogenesis.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a grant from the 'Agence de Biomédecine', France. Some samples were provided by GERME-THEQUE biobank (France).

REFERENCES

- Anton E, Blanco J, Egozcue J & Vidal F. (2004) Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10). *Hum Reprod* 19, 1345–1351.
- Aoki VW & Carrell DT. (2003) Human protamines and the developing spermatid: their structure, function, expression and relationship with male infertility. *Asian J Androl* 5, 315–324.
- Bejarano I, Lozano GM, Ortiz A, Garcia JF, Paredes SD, Rodriguez AB *et al.* (2008) Caspase 3 activation in human spermatozoa in response to hydrogen peroxide and progesterone. *Fertil Steril* 90, 1340–1347.
- Benet J, Oliver-Bonet M, Cifuentes P, Templado C & Navarro J. (2005) Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review. *Cytogenet Genome Res* 111, 281–290.
- Bennetts LE & Aitken RJ. (2005) A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 71, 77–87.
- Braun RE. (2001) Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Genet* 28, 10–12.
- Brugnon F, Van Assche E, Verheyen G, Sion B, Boucher D, Pouly JL *et al.* (2006) Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. *Hum Reprod* 21, 685–693.
- Brugnon F, Janny L, Communal Y, Darcha C, Szczepaniak C, Pellestor F *et al.* (2010) Apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm from Robertsonian translocation carrier patients. *Hum Reprod* 25, 1631–1642.
- Caer E, Perrin A, Douet-Guilbert N, Amice V, De Braekeleer M & Morel F. (2008) Differing mechanisms of meiotic segregation in spermatozoa from three carriers of a pericentric inversion of chromosome 8. *Fertil Steril* 89, 1637–1640.
- David G, Bisson JP, Czyglick F, Jouannet P & Gernigon C. (1975) Anomalies morphologiques des spermatozoïdes humains. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 4, 17–36.
- De Braekeleer M, Perrin A & Morel F. (2006) Chromosomal abnormalities in male infertility. In: *Cytogenetics and Infertility*. (ed M De Braekeleer), pp. 27–52. Transworld Research Network, Trivandrum, India.
- Dunkel L, Hirvonen V & Erkkila K. (1997) Clinical aspects of male germ cell apoptosis during testis development and spermatogenesis. *Cell Death Differ* 4, 171–179.
- Eaker S, Pyle A, Cobb J & Handel MA. (2001) Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. *J Cell Sci* 114, 2953–2965.
- Earnshaw WC, Martins LM & Kaufmann SH. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68, 383–424.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A & Nagata S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43–50.
- van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B & Reutelingsperger CP. (1998) Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31, 1–9.
- Gorczyca W, Tuziak T, Kram A, Melamed MR & Darzynkiewicz Z. (1994) Detection of apoptosis-associated DNA strand breaks in fine-needle aspiration biopsies by in situ end labeling of fragmented DNA. *Cytometry* 15, 169–175.
- Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT & Cairns BR. (2009) Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 460, 473–478.
- Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA & Aitken RJ. (2000) DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 21, 33–44.
- Laberge RM & Boissonneault G. (2005) On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biol Reprod* 73, 289–296.
- Leduc F, Maquennehan V, Nkoma GB & Boissonneault G. (2008) DNA damage response during chromatin remodeling in elongating spermatids of mice. *Biol Reprod* 78, 324–332.
- Lee J, Richburg JH, Younkin SC & Boekelheide K. (1997) The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* 138, 2081–2088.
- Lopes S, Jurisicova A, Sun JG & Casper RF. (1998) Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 13, 896–900.
- Marchetti C & Marchetti P. (2005) Detection of apoptotic markers in human ejaculated spermatozoa as new methods in human reproductive biology. *Gynecol Obstet Fertil* 33, 669–677.
- McPherson S & Longo FJ. (1993) Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur J Histochem* 37, 109–128.
- Menezo YJ, Hazout A, Panteix G, Robert F, Rollet J, Cohen-Bacrie P *et al.* (2007) Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reprod Biomed Online* 14, 418–421.
- Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Herry A, Amice V, Amice J *et al.* (2004) Meiotic segregation of translocations during male gametogenesis. *Int J Androl* 27, 200–212.
- Morel F, Douet-Guilbert N, Perrin A, Le BM, Amice V, Amice J *et al.* (2006) Chromosomal abnormalities in spermatozoa. In: *Cytogenetics and Infertility*. (ed M De Braekeleer), pp. 53–112. Transworld Research Network, Trivandrum, India.
- Morel F, Laudier B, Guerif F, Couet ML, Royer D, Roux C *et al.* (2007) Meiotic segregation analysis in spermatozoa of pericentric inversion carriers using fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 22, 136–141.
- Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E *et al.* (2000) Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl* 21, 903–912.
- Ozmen B, Koutlaki N, Youssry M, Diedrich K & Al-Hasani S. (2007) DNA damage of human spermatozoa in assisted reproduction: origins, diagnosis, impacts and safety. *Reprod Biomed Online* 14, 384–395.

- Perrin A, Caer E, Oliver-Bonet M, Navarro J, Benet J, Amice V *et al.* (2009) DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality. *Fertil Steril* 92, 583–589.
- Perrin A, Basinko A, Douet-Guilbert N, Guéganic N, Le Bris MJ, Amice V *et al.* (2011) Aneuploidy and DNA fragmentation in sperm of carriers of a constitutional chromosomal abnormality. *Cytogenet Genome Res* 133, 100–106.
- Roux C, Tripogney C, Morel F, Joanne C, Fellmann F, Clavequin MC *et al.* (2005) Segregation of chromosomes in sperm of Robertsonian translocations carriers. *Cytogenet Genome Res* 111, 291–296.
- Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG & Bianchi U. (1999a) Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 4, 31–37.
- Sakkas D, Mariethoz E & St John JC. (1999b) Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* 251, 350–355.
- Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N & Bizzaro D. (2002) Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 66, 1061–1067.
- Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N & Manicardi GC. (2003) Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 7, 428–432.
- Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F & Bleau G. (2005) Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 20, 3446–3451.
- Sinha Hikim AP & Swerdloff RS. (1999) Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 4, 38–47.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H & Reutelingsperger C. (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184, 39–51.
- Vincent MC, Daudin M, De Mas P, Massat G, Mieusset R, Pontonnier F *et al.* (2002) Cytogenetic investigations of infertile men with low sperm counts: a 25-year experience. *J Androl* 23, 18–22.
- World Health Organization (1999) *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction*. Cambridge University Press, New York.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Karyotype and mix of probes used for FISH analyses.

Table S2. Number of analyzed spermatozoa with and without DNA fragmentation by modes of segregation for each patient.

Deuxième partie

Expression de la signature
génétique dans les spermatozoïdes :
mise au point de l'étude du
transcriptome dans les
spermatozoïdes et premiers
résultats

SECTION 1 Introduction

A. Facteurs génétiques et infertilité masculine

Les anomalies génétiques sont responsables de 15% à 30% des cas d'infertilité masculine et comprennent les aberrations chromosomiques et les mutations géniques (Ferlin *et al.* 2007). Les facteurs génétiques contribuant à l'infertilité concernent les différents processus physiologiques comme l'homéostasie hormonale, la spermatogenèse et la qualité du sperme. La compréhension génétique de l'échec de la reproduction est essentielle pour gérer convenablement un couple infertile (O'Flynn O'Brien *et al.* 2010). La spermatogenèse est un processus complexe comprenant trois phases principales : la mitose, la méiose et la spermiogenèse. La régulation de la spermatogenèse dépend de la coopération de plusieurs gènes qui sont exprimés aux différentes phases où les cellules germinales prolifèrent et se différencient aboutissant à la production des spermatozoïdes matures. Il est suggéré que l'infertilité masculine inexplicée pourrait être partiellement causée par des mutations ou autres altérations génétiques impliquées dans la spermatogenèse (Stouffs *et al.* 2009).

1. Gènes liés aux chromosomes sexuels impliqués dans l'infertilité masculine

1.1. Gènes liés au chromosome X

Il est estimé que 1098 gènes sont localisés sur le chromosome X humain et que 10% d'entre eux sont exprimés dans le tissu testiculaire ou dans les cancers (Ross *et al.* 2005). A cause d'une seule copie des gènes situés sur l'X chez l'homme, les mutations délétères et les épi-mutations associées à ces gènes peuvent provoquer des changements physiologiques chez le porteur. Il est donc possible que les gènes liés à l'X exprimés pendant la spermatogenèse soient de bons candidats, pouvant avoir un rôle dans l'infertilité masculine. Plusieurs gènes identifiés sur le chromosome X ont un rôle dans la prolifération des spermatogonies et la méiose et également la différenciation

(Blanco-Arias *et al.* 2002, Yang *et al.* 2008, Pan *et al.* 2009). Plus particulièrement, les gènes homéobox (*Rhox*) liés à l'X exprimés sélectivement dans l'appareil reproductif féminin et masculin ont des rôles importants dans la gamétogenèse chez les souris (Geserick *et al.* 2002, Maclean *et al.* 2005). En effet, une perturbation du gène *Rhox5* peut augmenter l'apoptose des cellules germinales et réduire la production des spermatozoïdes, la mobilité spermatique et la fertilité (Maclean *et al.* 2005). Dans une étude récente, le degré de méthylation des gènes *Rhox* est plus élevé chez les patients ayant un sperme anormal par rapport à ceux présentant un sperme normal. Plus intéressant, les auteurs ont remarqué que le degré de méthylation des gènes *Rhox* était significativement associé avec les trois paramètres spermatiques : la numération, la mobilité et la morphologie (Richardson *et al.* 2014). En fait, les gènes *Rhox* codent des facteurs de transcription qui sont fortement exprimés dans le testicule et ces gènes régulent d'autres gènes impliqués dans la spermatogenèse (Maclean *et al.* 2005, Hu *et al.* 2008, Hu *et al.* 2010). Il est possible que la méthylation altérée des gènes *Rhox* réduise leur expression, qui, à leur tour, vont perturber la régulation normale des gènes cibles en aval et donc affecter négativement la fertilité (Richardson *et al.* 2014).

1.2. Gènes liés au chromosome Y

Le chromosome Y contient des gènes déterminants pour le sexe masculin. Il a été mis en évidence une association entre des délétions du bras long du chromosome Y et l'azoospermie (Tiepolo and Zuffardi. 1976), impliquant un rôle des gènes situés sur le bras long du chromosome Y dans la spermatogenèse. En effet, la prévalence des micro-délétions du chromosome Y est de 4% chez les patients oligozoospermiques et 11% chez les hommes azoospermiques (Foresta *et al.* 2001). La région sur le chromosome Y est désignée AZF pour "AZoospermia Factor". Cette région Yq possède trois loci AZF : AZFa, AZFb, AZFc contenant des gènes impliqués dans le développement et la maintenance des cellules germinales masculines (Vogt *et al.* 1996) (Figure 22). Une délétion dans chaque région AZF est associée à un phénotype d'infertilité plus ou moins spécifique. La délétion totale de la région AZFa est toujours associée à l'absence complète de cellules germinales dans les tubules testiculaires (SCOS - Sertoli Cell Only Syndrome) (Foresta *et al.* 2000, Kamp *et al.* 2001). La délétion complète de la région AZFb provoque l'arrêt de la maturation au stade des spermatocytes (Vogt *et al.* 1996). Contrairement au phénotype azoospermique lors de la délétion d'AZFa ou d'AZFb, la délétion de la région AZFc cause un phénotype variable allant d'une oligozoospermie sévère jusqu'à l'azoospermie avec une variation d'histologie

testiculaire de l'hypospermatogénèse à l'arrêt méiotique ou le syndrome SCOS (Ferlin *et al.* 2006). Les gènes localisés dans ces régions ont des rôles différents durant la spermatogénèse (Navarro-Costa *et al.* 2010a, O'Flynn O'Brien *et al.* 2010). Ainsi, le dysfonctionnement de ces gènes est lié à des altérations de la spermatogénèse (Gatta *et al.* 2010, Navarro-Costa *et al.* 2010b, Kumari *et al.* 2012).

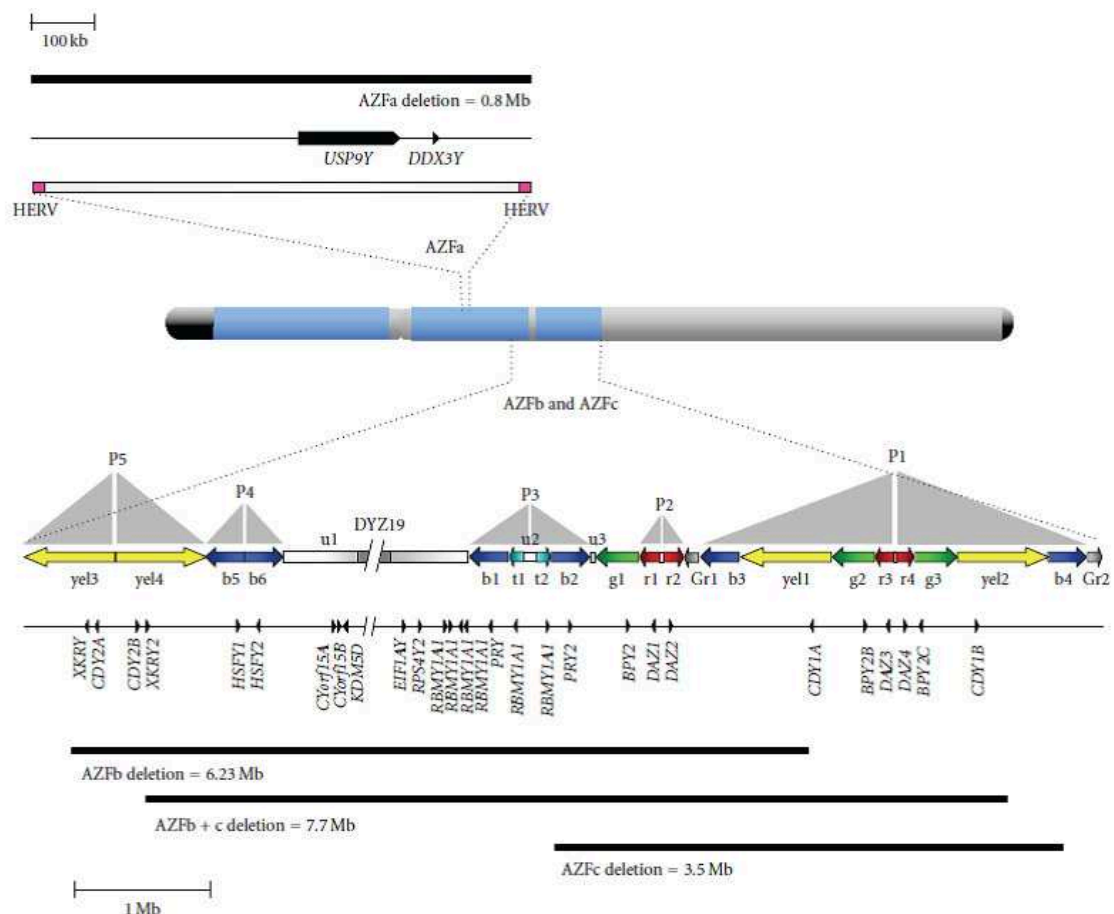


Figure 22 – Gènes situés sur les régions AZF du bras long du chromosome Y (Navarro-Costa *et al.* 2010a)

2. Gènes liés aux chromosomes autosomiques impliqués dans l'infertilité masculine

Plusieurs gènes autosomiques jouent un rôle dans l'infertilité masculine. Des patients infertiles ayant des spermatozoïdes macrocéphales, multiflagellés ont été rapportés pour la première fois en 1977 (Nistal *et al.* 1977). Depuis, plusieurs équipes ont étudié l'étiologie afin de mieux comprendre la cause et mécanisme de l'infertilité chez ces hommes. Ils ont trouvé que la mutation homozygote du gène *Aurora Kinase C* -

AURKC (c.144delC) était présente chez tous les patients ayant un taux élevé de spermatozoïdes macrocéphales (Dieterich *et al.* 2007, Dieterich *et al.* 2009, Khelifa *et al.* 2011, Eloualid *et al.* 2014). Le gène *AURKC* se situe sur le bras long du chromosome 19 (19q13.43). Il code les protéines sérine/thréonine kinases qui sont impliquées dans la ségrégation méiotique et la division cellulaire pendant la méiose (cytodiérèse) (Tang *et al.* 2006). La mutation de ce gène entraîne un dysfonctionnement de la protéine codée provoquant un blocage de la division cellulaire. Les spermatides maintiennent une grande taille lors du passage à la spermiogenèse aboutissant à l’allongement de la tête, la réduction du cytoplasme, l’acquisition de quelques flagelles et la possession d’un équipement chromosomique tétraploïde (Dieterich *et al.* 2009).

La globozoospermie est un type rare de tératozoospermie (< 0,1% chez les patients infertiles), caractérisée par des spermatozoïdes avec une tête ronde dépourvue d’acrosome (Dam *et al.* 2007). L’acrosome est une structure produite lors de la spermiogenèse qui a un rôle très important dans la fécondation parce qu’il contient non seulement des enzymes permettant la pénétration du spermatozoïde dans l’ovule lors de la fécondation mais intervient également dans l’activation ovocytaire. Les spermatozoïdes dépourvus d’acrosome sont incapables de pénétrer dans l’ovule. Ainsi, les hommes globozoospermiques sont infertiles. Quelques gènes sont identifiés pour être responsables de cette anomalie. Des travaux ont montré que la mutation du gène *SPATA16* (situé sur le chromosome 3q26.32), qui a un rôle important dans la formation de l’acrosome (Lu *et al.* 2006), est présente chez les trois patients infertiles globozoospermiques (Dam *et al.* 2007). Plus tard, le gène *PICK1* a été suggéré comme étant responsable de la globozoospermie chez l’homme car dans le modèle souris “knock-out” de ce gène, les auteurs ont observé le même phénotype de spermatozoïdes avec une globozoospermie chez l’homme (Xiao *et al.* 2009). Cette hypothèse a été mise en évidence en précisant la responsabilité de la mutation (G198A) dans l’exon 13 du gène *PICK1* dans l’étiologie d’une globozoospermie chez un patient infertile (Liu *et al.* 2010). Récemment, la délétion du gène *DPY19L2* a été retrouvée chez des patients globozoospermiques en utilisant le SNP array (Koscinski *et al.* 2011). Ce gène est exprimé de façon prédominante dans le testicule et a une implication potentielle dans la polarisation cellulaire (Honigberg *et al.* 2000). En effet, les spermatozoïdes sont des cellules très polarisées et ce processus est initié dans les spermatides rondes au début de la spermiogenèse. Ainsi, plusieurs gènes sont impliqués dans la formation des spermatozoïdes, le dysfonctionnement de ces gènes provoque le même phénotype globozoospermique chez les porteurs.

La protéine CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) est largement exprimée dans les cellules épithéliales d'un grand nombre d'organes dans le corps humain, y compris les voies respiratoires, l'appareil digestif et l'appareil reproductif. Les mutations du gène *CFTR* provoquent la mucoviscidose caractérisée par l'infection et l'inflammation du poumon, la dysfonction pancréatique et l'infertilité. En effet, presque tous les patients atteints de la mucoviscidose sont infertiles à cause d'une absence bilatérale congénitale des canaux déférents (CBAVD-Congenital bilateral absence of vas deferens) (revue dans Cuppens et Cassiman. 2004, Chen *et al.* 2012). La CBAVD est une forme d'azoospermie obstructive dans laquelle le lien entre l'épididyme et le canal éjaculateur est coupé. A part dans les cas de CBAVD, des mutations du gène *CFTR* ont été trouvées dans des cas d'azoospermie non-obstructive, d'oligozoospermie, d'asthénozoospermie et de tératozoospermie (Stupia *et al.* 2005, Schulz *et al.* 2006, Tamburino *et al.* 2008, Tomaiuolo *et al.* 2011). Ces observations suggèrent que le CFTR est impliqué dans différents processus importants pour la fertilité masculine.

B. Signature génétique paternelle dans les spermatozoïdes

Les spermatozoïdes éjaculés sont considérés comme des cellules hyper-différenciées qui ne servent qu'à livrer le génome haploïde paternel dans l'ovocyte. En effet, pendant la condensation et l'élongation, la machinerie transcriptionnelle est arrêtée et le cytoplasme des spermatides rondes est essentiellement éliminé par les cellules de Sertoli. Les spermatozoïdes matures sont considérés comme inactifs d'un point de vue transcription et traduction. Pourtant, récemment, l'identification d'ARN codants et non codants dans les spermatozoïdes ouvre une grande discussion sur leur rôle dans la fertilité masculine (Krawetz. 2005).

1. Présence des ARN dans les spermatozoïdes

Les molécules ARN sont premièrement visualisées dans le noyau des spermatozoïdes chez le rat et chez l'homme par l'utilisation des ARNases couplées à des billes d'or et la quantité d'ARN a été évaluée à environ 100fg/spermatozoïde (Pessot *et al.* 1989). Des résultats similaires sont obtenus chez l'homme et le singe (Dadoune *et al.* 1991). Ces observations sont confirmées grâce à l'identification de petits ARN nucléaires dans

les spermatozoïdes épидидymaires de rat et leur localisation dans le noyau spermatique en utilisant l'hybridation *in situ* (Concha *et al.* 1993). Chez l'homme, les ARN sont localisés principalement dans la tête des spermatozoïdes (Dadoune *et al.* 2005) ou dans la pièce intermédiaire (Kumar *et al.* 1993).

Le premier ARN messager identifié par la RT-PCR et l'hybridation *in situ* dans les spermatozoïdes humains matures était *c-myc* codant un proto-oncogène (Kumar *et al.* 1993). Ensuite, la présence d'une population d'ARN complexes dans les spermatozoïdes humains éjaculés a été mise en évidence dans d'autres études (Miller *et al.* 1994, Rohwedder *et al.* 1996, Miller *et al.* 1999). Les auteurs ont suggéré que les ARNm dans les spermatozoïdes étaient probablement les restes d'ARNm stockés à partir des gènes transcrits après la méiose. Pourtant, ces expériences ne peuvent pas exclure la possibilité que les ARN observés soient dérivés du cytoplasme résiduel ou d'autres cellules contaminantes. Grâce à la découverte de la présence d'ARN dans les spermatozoïdes, la recherche sur la signature génétique paternelle a été creusée dans plusieurs laboratoires indépendants par l'utilisation de la RT-PCR, de l'hybridation *in situ*, du microarray (Miller *et al.* 1994, Wykes *et al.* 1997, Ostermeier *et al.* 2002). Cette fois ci, toute contamination possible a été écartée par une préparation du sperme dépourvue du cytoplasme résiduel, de mitochondries résiduelles et des cellules somatiques contaminées. La présence des ARN dans des préparations de sperme humain de bonne qualité a été réaffirmée dans une étude utilisant la RT-PCR, l'hybridation *in situ*, le microarray (Dadoune *et al.* 2005).

Le profil d'expression complet des gènes dans les spermatozoïdes d'hommes normaux fertiles a été décrit dans une étude en 2002 (Ostermeier *et al.* 2002). Les transcrits sont impliqués dans différents processus biologiques. Les auteurs ont montré que la préservation des ARN tout au long de la spermiogenèse n'est pas un événement aléatoire et que les ARN paternels ont un rôle important dans le développement humain (Ostermeier *et al.* 2002). Plus tard, plusieurs équipes ont focalisé leurs travaux sur l'analyse de la signature génétique dans les gamètes mâles de différentes populations (Platts *et al.* 2007, Montjean *et al.* 2012, Jodar *et al.* 2012, Bonache *et al.* 2012, Metzler-Guillemain *et al.* 2015). Ces études ont permis d'éclairer les mécanismes sous-jacents de l'infertilité masculine et d'identifier des facteurs génétiques masculins conduisant à un succès d'un point de vue de la fécondation. Récemment, un nombre de transcrits codants et non codants a été identifié dans les spermatozoïdes matures par le micro-array ou par le séquençage d'ARN (Krawetz *et al.* 2011, Abu-Halima *et al.* 2013, Sandler *et al.* 2013). L'existence d'une population complexe d'ARN dans les

spermatozoïdes éjaculés a été mise en évidence mais leur rôle n'est pas complètement élucidé.

2. Méthodes de détection des ARN dans les spermatozoïdes

Depuis la découverte des ARN dans les spermatozoïdes humains, plusieurs méthodes spécifiques sont employées afin d'isoler et d'identifier les ARN spermatiques. Dans un premier temps, la plupart des méthodes sont basées sur la détection d'une série de transcrits spécifiques par RT-PCR. Après l'extraction d'ARN à partir des spermatozoïdes éjaculés, les ADN complémentaires (ADNc) sont synthétisés spécifiquement pour les ARN messagers. Ensuite, l'amplification des ADNc est effectuée par PCR en utilisant des amorces courtes de 10 nucléotides. Les produits de PCR sont déposés sur un gel de séquençage. Par cette méthode, Miller et ses collaborateurs ont détecté l'existence des ARNm dans les spermatozoïdes (Miller *et al.* 1994, Miller *et al.* 1999). L'expression globale des gènes dans une cellule pourrait être analysée par RT-PCR à partir des ARN messagers (Dadoune *et al.* 2004). Pourtant, la sensibilité de la RT-PCR pose des questions sur l'origine et la signification des transcrits détectés. En effet, malgré la préparation des spermatozoïdes après la capacitation ou la lyse osmotique, les ARN extraits des spermatozoïdes éjaculés contiennent des ARN de cellules somatiques qui "contaminent" donc le pool d'ARN obtenus. Ainsi, il est nécessaire d'effectuer une vérification des résultats grâce à la RT-PCR et à l'hybridation *in situ* pour affirmer l'origine spermatique des transcrits détectés par RT-PCR (Wykes *et al.* 1997, Siffroi and Dadoune. 2001). Par cette technique, les auteurs ont montré que les ARN spermatiques sont localisés entièrement dans la région de la tête (Wykes *et al.* 1997, Siffroi and Dadoune. 2001, Dadoune *et al.* 2005). De plus, les ARN spermatiques sont une partie structurale de la matrice nucléaire (Miller *et al.* 2005). Par contre, quelques résultats par hybridation *in situ* indiquent que les ARN spermatiques se situent dans la pièce intermédiaire où se localisent les mitochondries (Kumar *et al.* 1993, Shah *et al.* 2005).

Plus tard, la technologie de microarray a été employée afin d'analyser rapidement un grand nombre de transcrits exprimés dans le testicule et dans les spermatozoïdes chez les hommes normaux fertiles (Ostermeier *et al.* 2002). En effet, la puce à ARN contient des sondes oligonucléotidiques qui sont fixées sur une localisation (spot) précise et se lient aux fragments d'ARNm complémentaires dans les échantillons. Elle permet d'identifier l'expression de chaque ARNm en mesurant son intensité fluorescente et

sa localisation sur la puce. Cette technique est largement utilisée afin de comparer l'expression des gènes entre les groupes d'hommes infertiles et fertiles. Plusieurs chercheurs ont identifié des gènes qui sont différemment exprimés dans ces groupes ; ils ont donc un rôle dans l'étiologie des perturbations des paramètres spermatiques (Platts *et al.* 2007, Montjean *et al.* 2012, Jodar *et al.* 2012). Les auteurs ont suggéré qu'il existe un profil transcriptomique différent entre les spermatozoïdes parvenant à une grossesse clinique ou non *via* différentes techniques d'AMP (Garcia-Herrero *et al.* 2010a, Garcia-Herrero *et al.* 2010b, Garcia-Herrero *et al.* 2011). Plus récemment, le séquençage de l'ARN a fourni une image plus complète de la population des transcrits spermatiques permettant l'identification, la quantification et la caractérisation des ARN connus et inconnus, codants ou non codants (Krawetz *et al.* 2011, Sandler *et al.* 2013, Jodar *et al.* 2013). Le développement rapide des méthodes étudiant le transcriptome dans les gamètes mâles a détaillé la présence spécifique d'une grande variété de transcrits dans ces cellules. Ces transcrits ont un rôle important dans la compréhension du mécanisme de l'infertilité masculine et ils pourraient être des facteurs prédictifs du succès ou de l'échec lors d'une AMP.

3. Fonctions des ARN spermatiques

La spermatogenèse est fortement régulée par des processus transcriptionnels, traductionnels et post-traductionnels. La transcription continue depuis les stades initiaux de la spermiogenèse jusqu'au développement des spermatides rondes. Ces transcrits qui sont indispensables pour la transformation en spermatozoïde, sont protégés et maintenus sous forme des ribonucléoprotéines (RNP) (Kleene KC. 2003). En même temps, la majorité du cytoplasme avec les ARN est éliminée sous forme de corps résiduel et phagocytée par les cellules de Sertoli (Cooper. 2005). Le noyau spermatique est compacté par le remplacement de la plupart des histones par des protamines. Ces cellules sont transcriptionnellement et traductionnellement inactives vu l'absence des ARN ribosomiques intacts (Johnson *et al.* 2011). L'évidence de la présence des ARN dans les spermatozoïdes éjaculés pose une question sur le rôle de ces transcrits. Ont-ils des rôles biologiques ou représentent-ils simplement le reste des événements transcriptionnels précédents lors de la spermatogenèse et de la spermiogenèse ? Autrement dit, le spermatozoïde joue-t-il un rôle comme un vecteur passif pour transférer le génome paternel dans le futur embryon ou bien participe-t-il activement dans la synthèse de la protéine en fournissant des transcrits spécifiques et

essentiels ? (Dadoune *et al.* 2004).

La comparaison entre l'expression des gènes dans les spermatozoïdes éjaculés d'hommes normaux fertiles et ceux dans le testicule a été faite par le microarray en 2002. En fait, Ostermeier *et al.* ont étudié et comparé l'expression des gènes dans un pool de 19 testicules avec celle d'un pool de spermatozoïdes éjaculés de 9 individus et avec celle des spermatozoïdes d'un seul individu. Les auteurs ont montré que tous les transcrits détectés dans les spermatozoïdes sont également retrouvés dans le testicule (Figure 23). Ils ont suggéré que l'utilisation des ARN spermatiques permet d'étudier l'expression des gènes pendant la spermatogenèse (Ostermeier *et al.* 2002). Cette étude était la première description du profil complet du transcriptome dans les spermatozoïdes.

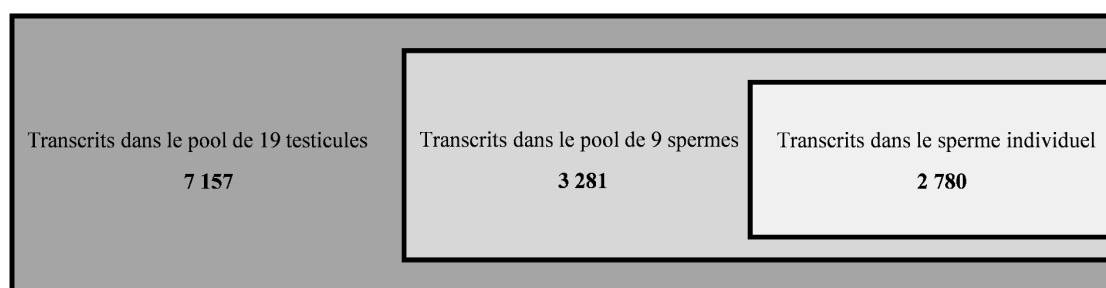


Figure 23 – Population d'ARNm présente dans le testicule, le pool des spermes et le sperme individuel selon les résultats obtenus par Ostermeier *et al.* 2002.

L'origine des ARNm dans les spermatozoïdes reste encore discutable. Il est vraisemblable que les ARNm dans les spermatozoïdes matures sont la conséquence du processus sur-transcriptionnel dans le génome des spermatides. La surexpression du génome des spermatides pourrait être expliquée par l'équilibration post-méiotique des gènes haploïdes exprimés dans les spermatides (Miller. 1997). D'autres explications de la présence des transcrits dans les spermatozoïdes matures ont été proposées. En fait, la chromatine spermatique est condensée par la protamination lors de la spermiogenèse. Pourtant, il persiste jusqu'à 15% de l'ADN spermatique qui sont liés à des histones. Ces régions chromatiniennes ont été caractérisées par l'augmentation de la sensibilité à la DNase I et par la fixation avec la matrice nucléaire (Kramer and Krawetz. 1997). En effet, les loci des gènes *PRM1* *PRM2* *TNP2* et *β -ACTIN* sont associés à la matrice nucléaire (Kramer and Krawetz. 1997) et leurs transcrits sont retrouvés dans les spermatozoïdes matures (Wykes *et al.* 1997). Par contre, le locus du gène *β -GLOBIN* est insensible à la DNase I et indépendant de la matrice nucléaire et ses ARNm sont absents des spermatozoïdes éjaculés (Kramer and Krawetz. 1997). Plus récemment, il a été démontré que les gènes soumis à empreinte, les gènes *HOX* et les facteurs de

signalisation sont localisés dans les régions riches en histones (Hammoud *et al.* 2009). Il est suggéré que les régions d'ADN spermatique liées aux histones pourraient représenter des sites transcriptionnels actifs fournissant des transcrits spécifiques dans l'ovocyte fécondé avant l'activation du génome zygotique (Dadoune *et al.* 2004). D'autres auteurs pensaient que cette structure pouvait servir de matrice pour faciliter le remplacement des protamines par des histones lors de la formation de pronucléi paternel après la fécondation (Kramer et Krawetz. 1997). Quelle que soit l'origine des transcrits spermatiques, leurs rôles restent encore en discussion (Figure 24).

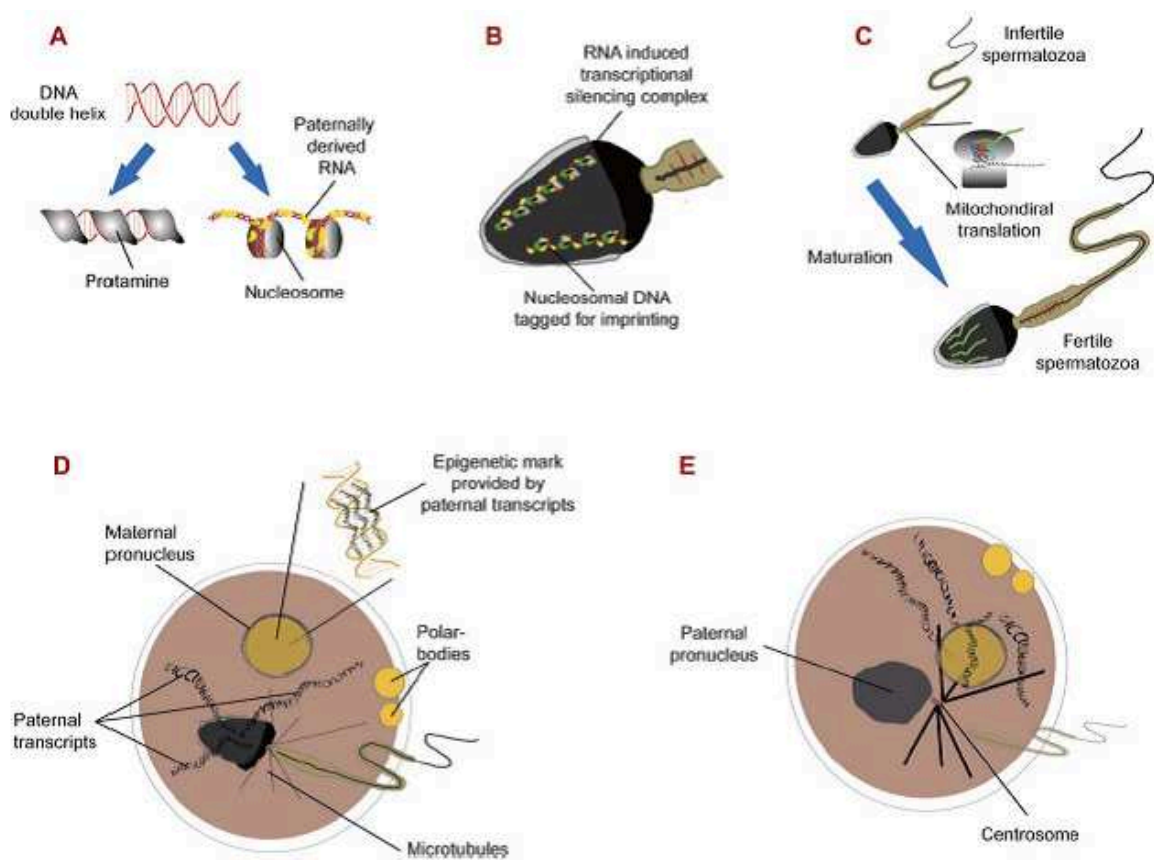


Figure 24 – Rôles possibles des ARN spermatiques. A : Rôle dans le remodelage de la chromatine. B : Rôle dans l'épigénétique. C : Rôle dans la maturation des spermatozoïdes. D : Rôle dans la maintenance développementale du zygote. E : Rôle dans la structuration spatiale embryonnaire. (Selon Miller et Ostermeier. 2006)

3.1. Implication des ARN spermatiques dans le remodelage de la chromatine

Les ARN spermatiques pourraient jouer un rôle dans le remodelage de la chromatine spermatique. En effet, la sensibilité à la DNase seule ne permet pas d'impliquer

une conformation de chromatine plus ouverte (Wykes et Krawetz, 2003). Les ARNm spermatiques peuvent faciliter l'échappement des séquences liées aux histones du remplacement par des protamines. Cela permet aux séquences riches en histones une configuration et de mettre en place des limites entre l'ADN lié aux protamines et celui lié aux histones. Normalement les ARN sont exportés du noyau mais dans les spermatozoïdes, ils sont détournés afin de jouer un rôle structural dans la stabilisation des gènes potentiels (Miller *et al.* 2005) (Figure 25). Cette hypothèse peut expliquer la présence des ARN spermatiques et des histones à la périphérie nucléaire (Wykes *et al.* 1997, Pittoggi *et al.* 1999) et suggère que les régions riches en histones sont associées plus près de l'enveloppe nucléaire que celles riches en protamines. L'importance de l'intégrité de la matrice nucléaire spermatique pour le succès de la fécondation a été démontrée chez les souris (Ward *et al.* 1999, 2000). L'hypothèse que les ARN spermatiques pourraient faire partie de la matrice nucléaire (Miller *et al.* 2005), a été affirmée dans l'étude de Lalancette *et al.* (Lalancette *et al.* 2008).

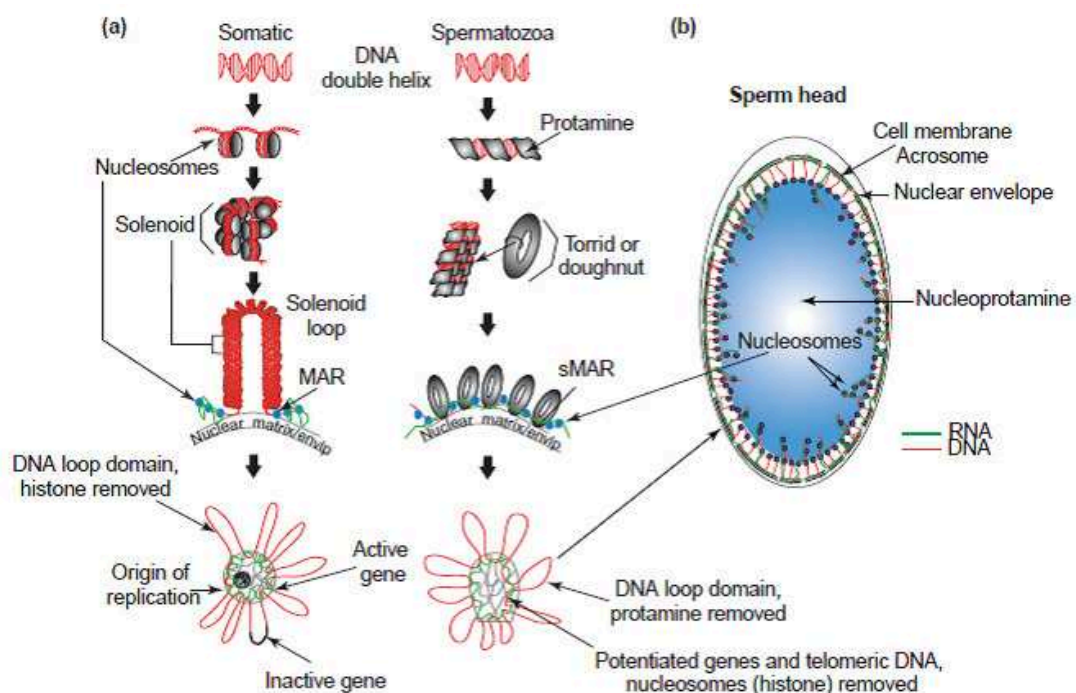


Figure 25 – Relation entre l'ADN, l'ARN et la matrice nucléaire dans les spermatozoïdes. (a) Comparaison entre la structuration de l'ADN dans les cellules somatiques (à gauche) et dans les spermatozoïdes (à droite). (b) Répartition de l'ADN, l'ARN et la matrice nucléaire. (Selon Miller *et al.* 2005).

3.2. Traduction *de novo* des ARN spermatiques

Comme mentionné précédemment, en l'absence des ARN ribosomiques intacts et du cytoplasme, les spermatozoïdes sont incapables de traduire ses ARNm en protéines. Par contre, la traduction dans les spermatozoïdes a été démontrée pendant la capacitation (Gur and Breitbart. 2006). Les auteurs ont montré que les spermatozoïdes lors de la capacitation sont capables d'incorporer [³⁵S] méthionine, [³⁵S] cystéine et BODYPI-lysine-tRNA dans la synthèse des nouveaux polypeptides. Cela a été visualisé par autoradiographie et microscope à épifluorescence. Cette incorporation est inhibée complètement par les inhibiteurs de la traduction mitochondriale comme le D-chloramphénicol mais pas par les inhibiteurs de la traduction cytoplasmique comme la cycloheximide. L'inhibition de la synthèse de protéines par le traitement au D-chloramphénicol diminue significativement la mobilité, la capacitation des spermatozoïdes ainsi que le taux de fécondation *in vitro*. Les auteurs ont émis l'hypothèse sur la traduction des ARNm par les ribosomes 55S mitochondriaux pendant la capacitation. Ces protéines sont essentielles pour l'étape finale de la maturation des spermatozoïdes conduisant au succès de la fécondation (Gur and Breitbart. 2006). Cette observation a été supportée par la disparition partielle ou complète des transcrits *C-MYC* après la capacitation (Lambard *et al.* 2004). *C-MYC* est le premier transcrit identifié dans les spermatozoïdes humains (Kumar *et al.* 1993). La protéine C-MYC pourrait jouer un rôle dans la capacitation et/ou la réaction acromosomale et la fécondation (Kumar *et al.* 1993). En fait, l'expression des gènes *C-MYC* et *PRM2* n'était pas différente entre les fractions de spermatozoïdes plus ou moins mobiles. Après 4h de capacitation, l'expression du gène *PRM2* était constante, tandis que l'expression de *C-MYC* était fortement diminuée voire absente (Lambard *et al.* 2004). Pourtant, il est possible que la diminution de *C-MYC* soit due à sa demi-vie courte ou bien à la transcription inverse qui sert à transformer les ARNm en ADNc (Lambard *et al.* 2004). De plus, les transcrits *C-MYC* restent approximativement identiques à ceux avant la capacitation si les spermatozoïdes sont incubés avec la cycloheximide qui bloque la biosynthèse des protéines (Carreau *et al.* 2007).

3.3. Incorporation des ADN, ARN étrangers et l'activité reverse transcriptase dans les spermatozoïdes

Il a été mis en évidence des activités ADN polymérase dans les spermatozoïdes humains (Witkin and Bendich. 1977). Les ARN polymérase actives ont été également

observées dans les spermatozoïdes éjaculés (Fuster *et al.* 1977). Vu l'absence du besoin des activités ADN ou ARN polymérase dans les spermatozoïdes matures, il a été supposé que ces enzymes pourraient jouer un rôle dans la fécondation et/ou l'embryogenèse (Kramer and Krawetz. 1997). Pourtant, la production des animaux transgéniques par le SMGT (Sperm-mediated gene transfer) (Spadafora. 2008) a fourni de nouveaux aperçus pour la capacité transcriptionnelle des spermatozoïdes. Cette méthode permet de mettre en évidence que les molécules d'ARN et d'ADN exogènes sont inter-convertibles *de novo* par les spermatozoïdes grâce au rôle central de la transcription inverse (RT) identifiée dans les spermatozoïdes (Witkin and Bendich. 1997). En effet, la RT est identifiée comme étant associée à la matrice nucléaire spermatique par l'utilisation des anticorps anti RT (Giordano *et al.* 2000). Les spermatozoïdes matures sont incubés avec les molécules d'ARN exogènes, la RT endogène spermatique peut les rétro-transcrire en ADN complémentaire (ADNc) qui peut être transféré dans l'ovocyte pendant la fécondation *in vitro* (Giordano *et al.* 2000). De plus, il a été montré que le processus RT-dépendant est également déclenché quand les spermatozoïdes sont incubés avec les molécules d'ADN exogènes (Pittoggi *et al.* 2006). Ainsi, les auteurs ont proposé un modèle figurant le rôle de la RT dans les spermatozoïdes (Figure 26) (Spadafora. 2008).

Les molécules d'ARN ou d'ADN exogènes peuvent se lier avec les protéines DBP (DNA-binding protein) localisées sur la membrane plasmique spermatique et sont internalisées dans le noyau spermatique, près de la matrice nucléaire. Les ARN polymérase endogènes dans les spermatozoïdes vont transcrire les ADN exogènes en ARN. Ensuite, ces molécules d'ARN sont capturées par la machinerie de la RT (représentée par l'ovale marron), épissées puis reverse-transcrites en ADNc. Quant aux ARN exogènes internalisés dans les spermatozoïdes, ils sont directement reverse-transcrits en ADNc. Ces nouveaux ADNc synthétisés qui sont extra-chromosomaux, sont d'une part stockés dans la tête des spermatozoïdes et d'autre part libérés dans le milieu d'incubation (Pittoggi *et al.* 2006). La chromatine spermatique est très condensée grâce à la protamination, pourtant une partie est liée aux histones en formant des nucléosomes qui sont encore accessibles pour les molécules étrangères. Les ADNc extra-chromosomiques s'intègrent dans la matrice nucléaire au niveau des nucléosomes permettant d'une part de renforcer la structure nucléaire et d'autre part de préserver ces ADNc jusqu'à la délivrance dans l'ovocyte. Le fait que les spermatozoïdes peuvent intégrer des molécules d'ADN et d'ARN exogènes, les convertir en ADNc, les transférer dans l'ovocyte et la détection des produits de ces

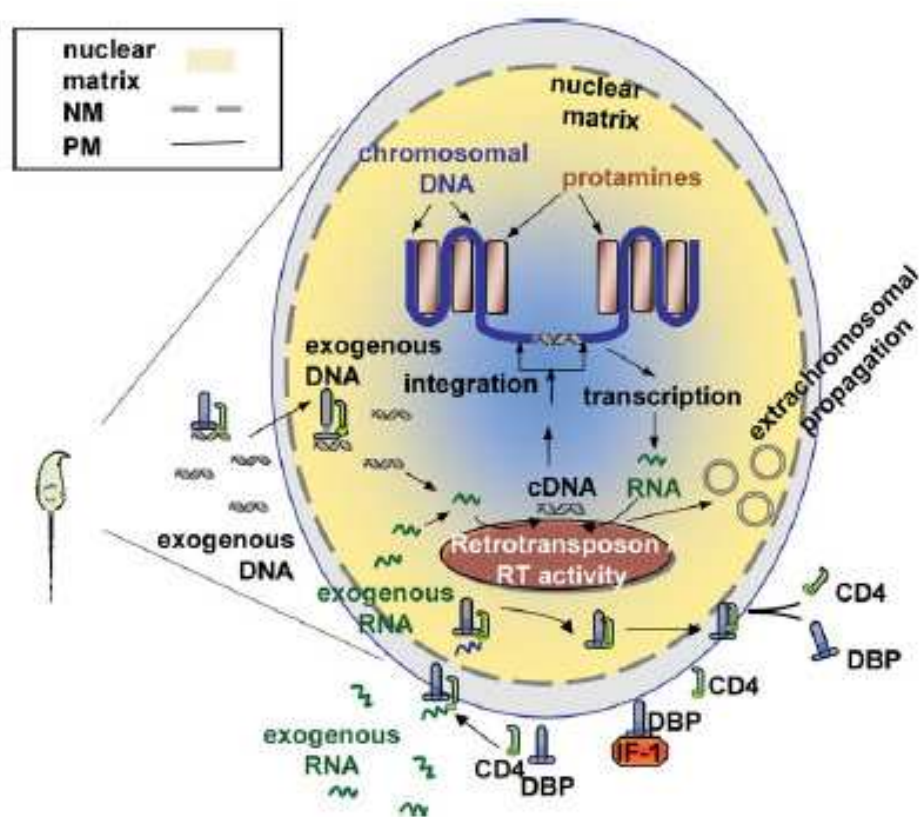


Figure 26 – Modèle pour la reverse transcriptase dans les spermatozoïdes (selon Spadafora. 2008)

ADNc dans l'embryon suggère que les ARN fournis par le spermatozoïde participent au développement précoce de l'embryon (Boerke *et al.* 2007).

3.4. Effets épigénétiques des ARN sur l'embryon

Si la plupart des gènes des mammifères sont exprimés de façon bi-allélique, certaines régions chromosomiques portent des gènes dont l'expression est mono-allélique et dépend de l'origine parentale. Ces gènes sont marqués par une empreinte parentale qui détermine leur expression différentielle aussi bien au cours du développement embryonnaire que pendant la vie adulte (Gabory and Dandolo. 2005). Une carte complète des onze régions chromosomiques non équivalentes selon leur origine maternelle ou paternelle a été établie. Ces régions contiennent des gènes impliqués dans la croissance, le comportement ou la viabilité de la souris (Cattanach *et al.* 2004). Il est

possible que certains gènes essentiels pour le développement, ne soient exprimés qu'à partir d'un seul chromosome, maternel ou paternel, et soient soumis à une empreinte parentale.

C'est le cas du gène *IGF2* (*Insulin-like growth factor2*). En effet, si la mutation nulle du gène *IGF2* est transmise par la femelle, les descendants sont de taille normale ; en revanche, si la mutation nulle est transmise par le mâle, les souriceaux obtenus sont 40% plus petits (Gabory and Dandolo. 2005). Cette observation peut être expliquée par le fait que le gène *IGF2* ne s'exprime qu'à partir de l'allèle d'origine paternelle. Ce gène est soumis à empreinte au cours de la spermatogenèse. La naissance d'une souris gynogénétique normale a montré l'évidence contre l'exigence absolue des ARN paternels (Kono *et al.* 2004). Dans cette étude, les zygotes et la progéniture viable ont été produits à partir des ovocytes reconstruits contenant deux génomes haploïdes maternels. Ce résultat a été obtenu par inactivation du gène *H19* dans le noyau de l'ovocyte donneur. Ainsi, par l'augmentation des activités du gène *IGF2* dans les embryons parthénogénétiques en même temps avec l'expression mono-allélique du gène *H19*, les auteurs ont montré qu'il est possible d'obtenir une souris adulte viable à partir des deux génomes maternels (Kono *et al.* 2004). Certains supposent que seulement l'équilibre correct des marques épigénétiques parentales dans les gynogénotes est suffisant pour rendre le développement possible. Pourtant, le taux très faible de succès dans la production des souris parthénogénétiques (0,3%) aussi bien qu'un nombre élevé d'animaux morts à la naissance (80%) ont suggéré que le développement est détérioré par les profils d'expression altérés de plusieurs gènes dans les gynogénotes (Krawetz. 2005). Vu que le rôle structural proposé pour les ARN spermatiques dans le remodelage de la chromatine est essentiel pour la maintenance des empreintes paternelles (Miller *et al.* 2005), la faible efficacité de ces procédures peut être due à l'absence des ARN spermatiques dans les gynogénotes (Dadoune. 2009).

De nombreux transcrits non codants impliqués dans les processus post-fécondation et/ou dans l'établissement des empreintes dans l'embryon précoce ont été identifiés dans les spermatozoïdes éjaculés (Ostermeier *et al.* 2005, Krawetz *et al.* 2011, Sandler *et al.* 2013). Les petits ARN sont capables de moduler l'expression des gènes. En effet, l'expression incontrôlable du gène *IGF2* favorise la croissance excessive du fœtus. Il est donc indispensable d'avoir un mécanisme permettant de réguler l'expression des gènes *IGF2* et *IGF2R* (*IGF2 receptor*) afin d'assurer le développement optimal de chaque fœtus (Krawetz. 2005). L'étude des miARN (microARN) dans le testicule et les spermatozoïdes humains a identifié un miARN dont la séquence est complémentaire

avec celle du gène *IGF2R* (Ostermeier *et al.* 2005). Ce miARN peut moduler la traduction du gène *IGF2R*, il peut donc réguler la réponse du gène *IGF2* par la modulation d'expression des récepteurs (Krawetz. 2005). Un autre miARN identifié dans les spermatozoïdes, l'anti-sens du gène Dickkopf2 (*DKK2*), joue peut-être un rôle dans le développement précoce de l'embryon. En fait, la protéine DKK2 peut inhiber la voie de signalisation "wingless" (WNT) (Mao and Niehrs. 2003), qui est impliquée dans la structuration morphogénétique. Ainsi, le silence de ce gène modulé par son ARN anti-sens peut assurer le fonctionnement de la voie WNT (Ostermeier *et al.* 2005). Les spermatozoïdes possèdent donc des transcrits impliqués dans l'épigénétique qui peuvent affecter le phénotype du fœtus.

3.5. Rôles des ARN spermatiques dans le développement embryonnaire

3.5.1 Composition du spermatozoïde délivré dans l'ovocyte lors de la fécondation

Il est évident que le spermatozoïde entier est libéré dans l'ovocyte lors de la fécondation (Sutovsky and Schatten. 2000). Les structures du spermatozoïde sont désassemblées. Contrairement à la mitochondrie et au flagelle spermatique qui sont effectivement dégradés dans l'ovocyte (Sutovsky *et al.* 1999), certaines structures spermatiques sont exigées pour le développement embryonnaire. En effet, le centrosome contient une paire de centrioles, associés aux protéines, qui forment un centre organisateur des microtubules de la cellule. La dernière structure est responsable de la ségrégation des chromosomes pendant la division cellulaire. Le centriole distal et des protéines associées sont éliminés au stade de spermatides lors de la spermatogenèse, tandis que l'ovocyte perd ses deux centrioles mais conserve les protéines essentielles pour la fonction du centrosome dans l'embryon (Palermo *et al.* 1994, Schatten. 1994). Après la fécondation, le centriole dérivé du spermatozoïde va se doubler et recruter les protéines centrosomales afin de former le centrosome embryonnaire fonctionnel (Manandhar *et al.* 2005). De plus, la protéine phospholipase C ζ (PLC ζ), un facteur d'activation ovocytaire par le déclenchement de la réponse oscillatoire du calcium, est retrouvée dans les spermatozoïdes (Krawetz. 2005). Cette protéine spécifique des spermatozoïdes située dans la thèque péri-nucléaire est responsable de l'activation du développement embryonnaire (Saunders *et al.* 2007). D'autres protéines comme la STAT4 (Signal transducer and activator of transcription 4), la protéine PT32 (32-kD perinuclear theca) qui sont impliquées dans le développement précoce zygotique sont

délivrées par le spermatozoïde (Krawetz. 2005).

La petite quantité d'ARN par rapport à la quantité beaucoup plus importante dans l'ovocyte (Boerke *et al.* 2007) fait penser que les transcrits spermatiques sont le reste des dernières activités transcriptionnelles dans les spermatides et que leurs rôles après la fécondation est minimal. Par contre, il est présumé que les ARN spermatiques parmi d'autres facteurs cytosoliques peuvent affecter potentiellement le développement embryonnaire (Cummins. 2001). Ensuite, cette hypothèse a été confirmée dans l'étude d'Ostermeier *et al.* En fait, ils ont identifié 6 transcrits spécifiques des spermatozoïdes qui sont délivrés dans l'ovocyte lors de la fécondation en utilisant la fécondation hétérospécifique d'un spermatozoïde humain avec un ovocyte de hamster doré. Plus intéressant, ces transcrits ne sont pas retrouvés dans l'ovocyte non fécondé suggérant les contributions paternelles importantes (Ostermeier *et al.* 2004). La famille des transcrits codant pour les protamines a été dégradée rapidement suivant l'entrée dans l'ovocyte, tandis que d'autres transcrits ont existé jusqu'à l'activation du génome embryonnaire (Krawetz. 2005). Ces observations permettent de confirmer que les spermatozoïdes contiennent des transcrits spécifiques qui sont délivrés dans l'ovocyte lors de la fécondation et que ces transcrits ont un rôle important dans le développement précoce du zygote.

3.5.2 ARNs spermatiques et développement embryonnaire

Parmi les transcrits spermatiques caractérisés par le microarray, avec un possible rôle dans le développement précoce (Ostermeier *et al.* 2002), six transcrits candidats sont présents dans le spermatozoïde et non détectés dans l'ovocyte non fécondé (Ostermeier *et al.* 2004). Ce sont la clustérine (sulfated glycoprotein-2 ou SGP-2), *AKAP4* (A kinase anchoring protein 4), *PRM2* (protamine-2), *HSBP1* (Heat shock binding protein 1), *FOXG1B* (Forck head box G1B), et *WNT5A* (wingless-type MMTV integration site family, member 5 A). Ces transcrits ont un rôle très important dans les processus biologiques comme la fécondation et le développement précoce de l'embryon suggérant la contribution génétique paternelle indiscutable dans le développement du zygote (Ostermeier *et al.* 2004). Parmi les 6 transcrits, les auteurs ont trouvé que la clustérine et la protamine-2 sont détectées consécutivement dans les spermatozoïdes, dans les zygotes respectivement à 30 minutes et à 3 heures après la fécondation, mais ne sont pas détectés dans les ovocytes de hamster doré (Ostermeier *et al.* 2004).

En fait, la clustérine a été impliquée dans quelques processus biologiques comme

la maturation des spermatozoïdes, le transport lipidique, le recyclage membranaire, l'interaction cellulaire, la stabilisation du stress protéique, et la promotion ou l'inhibition de l'apoptose (Trogakos and Gonos. 2002). Elle est une des protéines épидидymaires majeures sécrétoires et est présente en grande quantité dans le liquide séminal. Elle possède un rôle important dans la maturation des spermatozoïdes et dans l'interaction du spermatozoïde et de la zone pellucide de l'ovocyte lors de la fécondation (Moura *et al.* 2007). Par contre, le transcrit codant cette protéine est préférentiellement exprimé dans l'épididyme et dans la prostate (Dacheux *et al.* 2006), suggérant la possibilité que l'ARNm d'origine des cellules épithéliales épидидymaires peut être intégré dans les spermatozoïdes pendant le transit épидидymaire (Boerke *et al.* 2007). Vu les rôles possibles de la clustérine, il peut être important dans le développement précoce du zygote mais pas dans l'ovocyte (Ostermeier *et al.* 2004).

Au contraire, la protamine-2 qui sert à la condensation de la chromatine spermatique est dégradée rapidement après la fécondation (Avenida *et al.* 2009). La dégradation de ce transcrit a pour but d'éviter sa traduction car, dans l'embryon, il est nécessaire de remplacer les protamines du génome paternel par des histones. Ce processus permet de réactiver le génome paternel conduisant à la formation du génome zygotique. En effet, d'autres transcrits spécifiques des spermatides sont également dégradés rapidement afin de prévenir la production des protéines ectopiques contribuant à l'arrêt développemental qui est fréquemment lié à la ROSI (Round spermatid injection) (Hayashi *et al.* 2003).

Il est donc évident que les transcrits retenus dans le spermatozoïde n'ont pas tous une fonction dans l'embryogenèse précoce mais certains, parmi eux, sont fonctionnels et nécessaires (Lalancette *et al.* 2008). En effet, la protéine PLC ζ est délivrée dans l'ovocyte lors de la fécondation. Cette protéine est impliquée dans l'initiation et la maintenance de l'oscillation du calcium qui est très importante pour le succès de la fécondation et du développement embryonnaire. Mais vu la durée de la réponse oscillatoire du calcium nécessaire et le fait que la plupart des protéines spermatiques sont éliminées rapidement, les oscillations ultérieures peuvent être assurées par la traduction *de novo* des transcrits délivrés par le spermatozoïde. Il est évident que les ARNm de PLC ζ ont été observés dans les spermatozoïdes (Krawetz. 2005). Un autre transcrit détecté dans les spermatozoïdes est l'ARNm codant pour l'AKAP4, une protéine impliquée potentiellement dans les cascades de signalisation permettant l'activation ovocytaire après la fécondation. Pendant la différenciation des spermatides, la production de cette protéine s'avère importante car elle régule la mobilité des

spermatozoïdes dans des conditions de fécondation (Miki *et al.* 2002). L'AKAP4 est impliquée également dans les processus de signalisation cellulaire (Appert-Collin *et al.* 2006). La traduction des ARNm retrouvés dans les spermatozoïdes après la fécondation devrait être indispensable pour le développement embryonnaire. Le transcrite *FOXG1B* qui est important pour la structuration précoce embryonnaire (Murphy *et al.* 1994), et *WNT5A* impliqué dans la différenciation cellulaire associée à la structuration morphologique (Moon *et al.* 1997) sont délivrés également dans l'ovocyte. D'autres ARN spermatiques codant quelques facteurs transcriptionnels et molécules de signalisation ont été détectés. Particulièrement dans ce groupe de transcrits *STAT4* peut moduler la transcription à partir du pronucléus mâle et la cycline B1 est le régulateur essentiel du passage de la phase G2 à la mitose du cycle cellulaire (Siffroi and Dadoune. 2001). D'autres transcrits spermatiques sont transférés dans l'ovocyte et leur présence est encore détectée 24h après la fécondation. C'est le cas de deux ARNm spermatiques : *PSGI* et *HLA-E*. En fait, la PSGI est une protéine majeure du placenta qui pourrait jouer un rôle crucial dans le soutien de la gestation précoce et la protection du fœtus contre le système immunitaire maternel. La protéine HLA-E (Human major histocompatibility complex class I, alpha chain E) permet d'éviter la surveillance des cellules NK (Natural killer) maternelles. De plus, ces deux transcrits sont plus exprimés dans les spermatozoïdes d'hommes fertiles en comparaison avec ceux d'hommes infertiles. Ces observations permettent de penser que ces deux transcrits spermatiques sont délivrés dans l'ovocyte et jouent un rôle dans le développement embryonnaire précoce et/ou l'implantation (Avendano *et al.* 2009).

Ainsi, une petite quantité d'ARNm spermatiques intacts et stables peut être transférée dans l'ovocyte fécondé. Un certain nombre de ces transcrits sera dégradé par l'ovocyte mais quelques uns persistent au moins lors de l'activation du génome embryonnaire. Ces ARNm pourraient se traduire en protéines impliquées dans la réponse au stress, l'embryogenèse, la morphogenèse et l'implantation (Boerke *et al.* 2007).

4. Applications pratiques des ARN spermatiques

Les transcrits présents dans les spermatozoïdes matures sont également retrouvés dans le testicule (Ostermeier *et al.* 2002). Ils sont une réplique des gènes qui sont à l'état actif dans les spermatozoïdes et sont par conséquent le reflet des événements intervenus lors de la spermatogenèse. L'étude du transcriptome dans les gamètes mâles permet de

comprendre les facteurs génétiques impliqués tout au long du processus de formation des spermatozoïdes en évitant la biopsie invasive (Krawetz. 2005). La comparaison de l'expression des gènes par l'étude du transcriptome dans les spermatozoïdes entre des hommes fertiles et des hommes infertiles présentant des paramètres spermatiques anormaux permet de mieux comprendre l'étiologie de l'infertilité due à des facteurs génétiques (Platts *et al.* 2007, Jodar *et al.* 2012, Montjean *et al.* 2012). Ainsi, les ARN spermatiques peuvent être potentiellement utilisés comme un outil diagnostique de l'infertilité masculine (Krawetz. 2005).

D'ailleurs, les spermatozoïdes possèdent des transcrits spécifiques et indispensables pour le développement précoce du zygote qui ne sont pas présents dans l'ovocyte non fécondé affirmant le rôle important d'un certain nombre d'ARN spermatiques après la fécondation (Ostermeier *et al.* 2004). De plus, plusieurs études ont identifié différents profils d'expression des gènes entre les hommes infertiles dont la conjointe réussit ou non une grossesse après différentes méthodes d'AMP (Garcia-Herrero *et al.* 2010a, 2010b, 2011). Les auteurs ont déterminé la signature génétique des échantillons avec succès pour chaque traitement. Les résultats obtenus permettent d'identifier des facteurs prédictifs selon chaque méthode d'AMP proposée lors du traitement de l'infertilité masculine (Garrido *et al.* 2013).

C. Infertilité masculine et étude du transcriptome dans les gamètes

L'étude du transcriptome dans les gamètes mâle permet d'une part de comprendre les facteurs génétiques impliqués dans l'étiologie de l'infertilité qui pourraient servir comme un outil diagnostique et d'autre part de déterminer le profil génétique prédictif pour une grossesse qui peut servir à adapter au mieux la prise en charge des couples infertiles.

Le microarray est une méthode puissante permettant d'étudier un grand nombre de gènes sur une seule expérience. Plusieurs équipes ont utilisé cette technique afin d'identifier le profil d'expression des gènes dans les spermatozoïdes humains. La comparaison du profil d'expression des gènes entre des témoins et des patients infertiles présentant ou non des perturbations d'au moins un des paramètres spermatiques permet d'identifier les différences. Les résultats obtenus peuvent servir à diagnostiquer l'infertilité masculine.

1. Signature génétique de la spermatogenèse

1.1. Gènes spécifiques selon le stade de la spermatogenèse

La spermatogenèse est un processus complexe qui peut être divisé en trois phases principales : la mitose, la méiose et la post-méiose. Il y a différents gènes impliqués dans chaque phase afin de la réguler. Plusieurs études sont menées afin de trouver des gènes importants impliqués dans les étapes particulières de la spermatogenèse en comparant un groupe d'hommes fertiles avec un groupe de patients infertiles caractérisés par la détérioration spermatogénétique à différents niveaux (Waclawska and Kurpisz. 2012). Ainsi, les gènes qui sont essentiels pour déterminer la phase définitive de la spermatogenèse, sont identifiés. En fait, Fox *et al.* ont distingué les groupes de gènes dont l'expression a varié entre le groupe contrôle maintenant complètement la spermatogenèse et le groupe de patients avec l'arrêt de la maturation des cellules germinales ou avec l'absence complète de ces cellules (Fox *et al.* 2003). Au niveau de la préméiose et la méiose, les gènes de la famille *DAZ* et *TSPY1*, qui sont impliqués dans la division cellulaire, sont fortement exprimés ; tandis que, pendant la postméiose d'autres gènes ont une expression augmentée comme : *PRM2*, *TNP1*, *SYNJ2*, et *ZPBP* qui sont principalement responsables de la formation de la tête spermatique et de la fonction normale des spermatozoïdes (Fox *et al.* 2003). Dans une autre étude, les gènes importants pour la préméiose et la post-méiose sont déterminés et leurs rôles impliqués dans la spermatogenèse sont également examinés pour des groupes de patients bien caractérisés (Feig *et al.* 2007). En effet, pour les hommes présentant un arrêt de maturation au stade préméiotique, les gènes impliqués dans la mitose, le cycle cellulaire comme *NF-Y*, *IDE*, *RAN* sont fortement exprimés. Les gènes connectés avec l'activation des kinases, l'organisation du cytosquelette et la transduction du signal sont préférentiellement exprimés au stade postméiotique. Les gènes associés à l'apoptose, l'ubiquitination et le métabolisme glycérophospholipidique sont essentiellement exprimés dans la phase de la transformation des spermatides en spermatozoïdes (Feig *et al.* 2007). Chez les patients présentant une microdélétion d'AZFc, les gènes impliqués dans le stade post-méiotique comme : *ODF1*, *TNP1*, *PRM2* sont sous-exprimés. Ces gènes sont essentiels pour la formation correcte des spermatozoïdes, ainsi la sous-expression des ces gènes provoque l'absence des cellules postméiotiques chez les patients suggérant leur rôle important et spécifique à ce stade de la spermatogenèse (Gatta *et al.* 2010). Ces études nécessitent une biopsie testiculaire afin de mettre en évidence les gènes spécifiques pour chaque étape de la spermatogenèse.

1.2. Profil d'expression des gènes dans les spermatozoïdes matures

Le fait qu'un nombre de transcrits présents dans les spermatozoïdes éjaculés sont également retrouvés dans le testicule par le microarray (Ostermeier *et al.* 2002) et que les spermatozoïdes sont transcriptionnellement inactifs a ouvert un large accès pour étudier la signature génétique pendant la spermatogenèse sans obliger la réalisation d'une biopsie invasive. Grâce à cette découverte, plusieurs équipes ont étudié par le microarray l'expression des gènes entre un groupe d'hommes fertiles et un groupe de patients infertiles dans différentes conditions. Ces études qui seront détaillées ci-dessous, permettent de comprendre les facteurs génétiques impliqués pendant la spermatogenèse qui provoquent les perturbations de qualité et/ou de quantité du sperme chez les hommes infertiles. Elles permettent également d'étudier l'expression différentielle des gènes dans les spermatozoïdes lors de la présence des produits génotoxiques.

1.2.1 Transcriptome dans les spermatozoïdes d'hommes fertiles et de patients présentant une infertile idiopathique

Une étude du transcriptome dans les spermatozoïdes a comparé l'expression des gènes entre un groupe de témoins fertiles et un groupe de patients infertiles en sachant qu'il n'y a pas de différences au niveau des paramètres spermatiques entre ces deux groupes (Garrido *et al.* 2009). Les auteurs ont montré que chez les hommes infertiles, très peu de gènes ($n=3$) sont surexprimés tandis que la majorité des gènes ($n=136$) sont sous-exprimés. Ces résultats suggèrent que l'échec de la fécondation chez les patients infertiles présentant une spermatogenèse normale peut être dû au manque des facteurs impliqués dans la fonction correcte des spermatozoïdes. En effet, les gènes associés au développement spermatique, la maturation des spermatides et la gamétogenèse, sont sous-exprimés chez les hommes infertiles. Ainsi, quelques voies biochimiques et fonctionnelles sont altérées. Il existe donc des facteurs moléculaires de l'infertilité dans les spermatozoïdes qui sont indépendants de la capacité du testicule pour la production des spermatozoïdes vu que tous les échantillons spermatiques possèdent des paramètres spermatiques similaires (Garrido *et al.* 2009). Plus récemment, l'étude de Bonache *et al.* a montré qu'environ 59% des donneurs subfertiles effectivement détectés par l'étude du transcriptome des spermatozoïdes sont, à tort, classés comme fertiles par l'analyse des paramètres spermatiques (Bonache *et al.* 2012). Les facteurs génétiques peuvent donc être responsables de certains cas d'infertilité masculine idiopathique sans aucun

retentissement sur les paramètres spermatiques classiquement analysés lors d'un bilan.

1.2.2 Transcriptome dans les spermatozoïdes d'hommes fertiles et de patients infertiles présentant une anomalie de la qualité ou quantité du sperme

La comparaison de l'expression des gènes dans les spermatozoïdes éjaculés entre les témoins fertiles (n=17) et les patients présentant une tératozoospermie (n=14) a été faite par l'équipe de Platts *et al.* Un nombre de 439 transcrits a été montré différemment exprimé dans les deux groupes. Le manque des transcrits associés aux spermatocytes et spermatides chez les patients tératozoospermiques indique que le défaut se fait à un stade tardif de la spermatogenèse. Ces transcrits codent principalement les protéines qui sont associées au protéasome. En fait, dans le processus de différenciation des cellules germinales, la voie ubiquitine-protéasome est indispensable, permettant la synthèse et la dégradation des protéines. La distribution des protéasomes dans la cellule reflète la distribution des ubiquitines. De plus, les protéasomes peuvent être présents à la proximité des sites de la structuration cellulaire comme la pièce intermédiaire des spermatozoïdes (Wojcik *et al.* 2000) et autour de l'acrosome. Ainsi, la diminution des ARNm protéasomiques peut inhiber la morphogenèse en empêchant le positionnement de l'acrosome, la condensation nucléaire et la maturation de la pièce intermédiaire et du flagelle spermatique. L'analyse du transcriptome dans les spermatozoïdes des patients tératozoospermiques permet de déterminer d'une part la perturbation se produisant à partir du stade pachytène des spermatocytes et d'autre part l'origine de ces perturbations dans la morphogenèse des spermatozoïdes. Il est évident que les transcrits impliqués dans la voie ubiquitine-protéasome sont sous-exprimés chez les patients tératozoospermiques (Platts *et al.* 2007).

La diminution de la mobilité des spermatozoïdes est une des causes majeures associées à l'infertilité masculine. Plusieurs études ont rapporté une réduction des transcrits spermatiques associés à la mobilité chez les patients asthénozoospermiques. Plus particulièrement, une diminution significative des transcrits comme *HILS1* (Histone H1 like protein), *TNP1* (Transition protein 1), *TNP2* (Transition protein 2), *PRM1* (Protamine 1), *PRM2* (Protamine 2), *ROPPORIN* a été remarquée dans quelques études utilisant la qRT-PCR (Jedrzejczak *et al.* 2007, Kempisty *et al.* 2007, Chen *et al.* 2011). En fait, les transcrits *HILS1*, *TNP1*, *TNP2*, *PRM1*, *PRM2* sont liés au remodelage de la chromatine spermatique; un défaut de ce processus peut

induire une anomalie de la condensation chromatinienne entraînant une augmentation de la fragmentation de l'ADN. Plus récemment, Jodar *et al* ont étudié l'expression des gènes dans les spermatozoïdes chez les patients infertiles asthénozoospermiques en comparaison avec celle des témoins fertiles par le microarray. Ils ont montré une sous-expression de certains gènes impliqués dans la mobilité des spermatozoïdes chez les patients asthénozoospermiques par rapport aux témoins fertiles comme *ANXA2*, *BRD2*, *OAZ3*, *PRM1*, *PRM2* (Jodar *et al.* 2012). La protéine ANXA2 (Annexin A2) liée au calcium est retrouvée dans l'acrosome et le flagelle des spermatozoïdes. Elle peut être impliquée dans différents événements dépendant du calcium comme la motilité des flagelles, la réaction acrosomiale et la fécondation (Feinberg *et al.* 1991). Les souris mâles knock-out d'*OAZ3* sont infertiles et la mobilité de leurs spermatozoïdes est altérée (Tokuhiro *et al.* 2009). La protéine bromodomaine 2 peut être impliquée dans le remodelage de la chromatine pendant la spermatogenèse (Umehara *et al.* 2010). Le rôle des protamines dans l'infertilité masculine est évident. Ainsi, une sous-expression d'ARNm de ces transcrits dans les spermatozoïdes des patients asthénozoospermiques apparaît donc logique (Jodar *et al.* 2012).

L'oligozoospermie est une déficience quantitative retrouvée fréquemment dans l'infertilité masculine. En analysant l'expression des gènes dans les spermatozoïdes entre un groupe témoin fertile et un groupe de patients infertiles présentant une oligozoospermie (n=8), les auteurs ont détecté 157 gènes qui sont sous- ou surexprimés chez les patients. Les transcrits impliqués dans les processus biologiques et les fonctions moléculaires sont sérieusement perturbés chez les hommes oligozoospermiques (Montjean *et al.* 2012). Environ 83% des transcrits sont sous-exprimés chez les patients infertiles. Plusieurs transcrits sont impliqués dans la spermatogenèse, la motilité spermatique et le processus anti-apoptotique comme : *PRM2*, *SPZ1*, *SPATA4*, *CREM*. Il a été montré que la réduction de l'expression des transcrits *PRM2* conduit à une asthénozoospermie (Kempisty *et al.* 2007) et probablement à l'échec de la spermatogenèse (Imken *et al.* 2009). Ainsi le *PRM2* est 25 fois sous-exprimé chez les patients oligozoospermiques (Montjean *et al.* 2012). De plus, une diminution importante de l'expression d'un nombre de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (*NIPBL*) et la régulation du stress oxydatif (*PARK7*) a été observée chez les patients. Seulement 17% des transcrits sont surexprimés chez les hommes infertiles. Plus intéressant, les auteurs ont montré que les transcrits codant les composants de la voie ubiquitine-protéasome et la voie de biosynthèse de la purine sont dramatiquement perturbés (Montjean *et al.* 2012). En effet, le rôle de la voie ubiquitine-protéasome

dans la formation surtout dans la maturation des spermatozoïdes est essentiel. La perturbation de cette voie peut entraîner une tératozoospermie (Platts *et al.* 2007). De plus, l'ARNm *UBE2B* (*Ubiquitin-conjugating enzyme 2B*), codant une protéine ubiquitinique, joue un rôle essentiel dans la voie ubiquitine-protéasome. Le défaut de ce transcrit est associé à l'oligozoospermie (Yatsenko *et al.* 2013).

1.2.3 Transcriptome dans les spermatozoïdes d'hommes fumeurs et non fumeurs

La fumée de cigarette est considérée comme un facteur de risque pour l'infertilité masculine car elle contient une concentration élevée de radicaux libres et peut produire des substances oxygénées réactives dans le corps humain. De plus, les spermatozoïdes humains sont sujets aux dommages oxydatifs provoqués par le tabac à cause des acides gras non saturés dans leur membrane. Par contre les mécanismes d'altérations de la spermatogenèse causées par le tabac restent encore inconnus. Le profil d'expression d'ARNm dans les spermatozoïdes matures peut refléter la réaction testiculaire à l'exposition des génotoxines. Par le microarray, Linschooten *et al.* ont comparé l'expression de gènes dans les spermatozoïdes éjaculés entre les hommes fumeurs et les hommes non-fumeurs. Ils ont remarqué qu'environ 200 transcrits sont exprimés différemment entre ces deux groupes. En fait, les gènes anti-apoptotiques sont surexprimés suggérant que l'apoptose est inhibée chez les fumeurs tandis qu'un nombre de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN spermatique et la réponse au stress oxydatif est sous-exprimé (Linchoosten *et al.* 2009). Plus récemment, une étude a montré que des gènes codant des facteurs impliqués dans le processus apoptotique pendant la spermatogenèse, comme *BAX* et *HNRNPL*, sont sous-exprimés dans les spermatozoïdes des hommes fumeurs (Metzler-Guillemain *et al.* 2015). Les résultats obtenus dans ces deux études supportent l'hypothèse que le tabagisme affecte le processus apoptotique des cellules germinales (Linchoosten *et al.* 2009, Metzler-Guillemain *et al.* 2015). De plus, le tabagisme est fortement associé aux anomalies dans la transition histone-protamine et à l'expression altérée d'ARNm de protamines dans les spermatozoïdes humains (Yu *et al.* 2014). Il a été montré que les hommes fumeurs ont un risque élevé pour plusieurs anomalies du sperme comme la mobilité réduite, la fragmentation de l'ADN spermatique et les anomalies chromosomiques (DeMarini. 2004). Il est supposé que les cellules germinales endommagées chez les fumeurs ne pourraient pas être éliminées par l'apoptose au cours de la spermatogenèse (Linchoosten *et al.* 2009). Plus important, il y a plusieurs

corrélations afin de lier le tabagisme paternel à un risque élevé de cancers pédiatriques dans sa descendance, suggérant que le tabagisme provoque des mutations dans les cellules germinales chez l'homme (Secretan *et al.* 2009).

2. Facteurs génétiques et méthodes d'AMP

Comme mentionné précédemment, les ARNm dans les spermatozoïdes jouent un rôle important dans le développement précoce de l'embryon et/ou l'implantation. Ainsi, les ARNm spermatiques peuvent être un marqueur de qualité de fécondation des spermatozoïdes et un paramètre prédisant les résultats de l'IIU avec des spermatozoïdes de donneurs (Bonache *et al.* 2012). L'expression de gènes chez les 68 donneurs normozoospermiques dont le sperme est employé pour l'IIU est étudiée par le microarray. Les donneurs sont divisés en trois groupes selon le taux de grossesse obtenu après l'IIU : le groupe 1 avec le taux de grossesse de 0% à 15,7%, le groupe 2 de 15,71% à 23%, le groupe 3 de 23,01% à 45%. La différence d'expression des gènes a été particulièrement remarquée entre le groupe 1 et le groupe 3. Les auteurs ont identifié des gènes dont l'expression est fortement corrélée avec le taux de grossesse et le taux de fausse couche. Très intéressant, ils ont déterminé le statut de fertilité du sperme des donneurs pour l'IIU basé sur l'expression de 4 gènes avec 90% de sensibilité et 97% de spécificité. La validation de ces résultats montre que la sensibilité et la spécificité sont un peu plus faibles mais encore de bonne performance : 71,4% et 77,8%, respectivement. La signature génétique dans les spermatozoïdes en complément de l'analyse des paramètres spermatiques permet une meilleure prédiction de la fécondité du sperme et par conséquent, une amélioration du taux de grossesse des méthodes d'AMP (Bonache *et al.* 2012).

L'étude du transcriptome dans les spermatozoïdes éjaculés a montré des expressions différentes de certains transcrits chez les patients infertiles par rapport aux témoins fertiles. Toutefois, les différentes expressions sont disparues après la technique swim-up qui permet de récupérer les spermatozoïdes les plus mobiles avec, en principe, une concentration de gamètes ayant une morphologie normale (Garcia-Herrero *et al.* 2010a). Si les spermatozoïdes, ayant une bonne morphologie et une mobilité élevée, partagent le même profil d'expression génétique, cela pourrait expliquer les résultats de microarray obtenus après le swim-up et confirmer l'efficacité de la préparation pour obtenir des spermatozoïdes de bonne qualité (Garcia-Herrero *et al.* 2010a). Il a été suggéré que les spermatozoïdes avec ou sans succès reproductif présentent des profils transcriptomiques

différents et que les conditions moléculaires requises pour les spermatozoïdes pour obtenir une grossesse résultant en un bébé en bonne santé ne sont pas les mêmes pour toutes les techniques d'AMP (Garrido *et al.* 2013). En fait, la machinerie moléculaire exigée par les spermatozoïdes dépend de la technique d'AMP employée. Par exemple, dans le cas d'IUI, le spermatozoïde qui réussit à pénétrer dans l'ovocyte est celui qui est capable de compléter sa mission, tandis que lors de l'ICSI, l'interaction spermatozoïde/ovocyte est éliminée. C'est pour cela que les profils d'expression des gènes sont déterminés différemment selon la technique d'AMP envisagée en fonction de la grossesse obtenue ou non (Garcia-Herrero *et al.* 2010b, 2011a, 2011b).

Les auteurs ont déterminé par le microarray la signature génétique permettant le succès pour les échantillons selon chaque traitement. De plus, le profil d'expression des gènes dans les spermatozoïdes avec succès/échec reproductif varie selon la technique utilisée (Figure 27). L'analyse du transcriptome dans les spermatozoïdes permet de choisir la méthode d'AMP la plus efficace lors du traitement de l'infertilité masculine (Garrido *et al.* 2013).

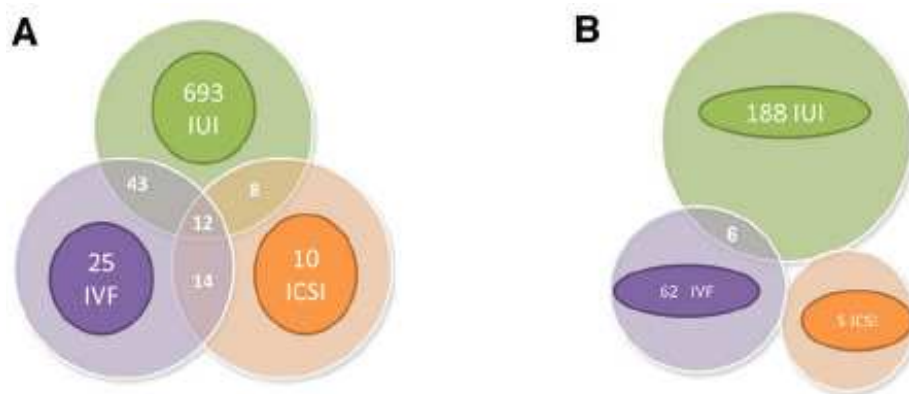


Figure 27 – Gènes surexprimés dans les échantillons (A) parvenus à une grossesse parmi les différentes techniques et (B) non parvenus à une grossesse parmi les différentes techniques (Selon Garrido *et al.* 2013).

D. Exposé des objectifs

La présence des ARNm dans les spermatozoïdes matures a été mise en évidence depuis des années (Ostermeier *et al.* 2002). La transcription est inactive dans ces cellules à cause de l'absence des ribosomes et du cytoplasme. Ainsi, les ARNm spermatiques permettent de comprendre les événements passés pendant la spermatogenèse. L'étude du transcriptome dans les gamètes évite la biopsie invasive et d'autres procédures

intrusives afin d'évaluer la spermatogenèse et/ou d'isoler la population représentative d'ARN des cellules germinales mâles (Krawetz. 2005). Cette étude peut aider à mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de l'infertilité masculine liée aux anomalies révélées par le spermogramme, le spermocytogramme, la FISH et la technique TUNEL.

Il est évident que certains ARN spermatiques ont un rôle essentiel dans le développement embryonnaire précoce et/ou l'implantation (Ostermeier *et al.* 2004, Avendano *et al.* 2009). En étudiant le transcriptome dans les spermatozoïdes matures, certains gènes sont identifiés comme des facteurs prédictifs pour l'obtention d'une grossesse selon la technique d'AMP utilisée (Garcia-Herrero *et al.* 2010b, 2011a, 2011b, Bonache *et al.* 2012). Cela permet d'adapter au mieux la prise en charge de l'infertilité masculine.

L'étude du transcriptome dans les gamètes mâles paraît très intéressante permettant des avancées fondamentales et également cliniques. Pour une analyse efficace, les ARNm spermatiques devraient être le plus représentatifs possibles. L'isolement des ARN spermatiques s'avère difficile. D'abord, le sperme contient non seulement des spermatozoïdes mais également d'autres cellules somatiques comme les leucocytes, les cellules germinales et épithéliales en sachant que les cellules somatiques contiennent une quantité d'ARN 200 fois plus grande que les spermatozoïdes (Jodar *et al.* 2013). Il est indispensable d'introduire une étape de purification permettant d'éliminer complètement les cellules somatiques contaminantes et de garder le plus possible de spermatozoïdes. Ensuite, les spermatozoïdes possèdent une très faible quantité d'ARN (10-100fg/spermatozoïde - 1fg = 10^{-15} g) (Pessot *et al.* 1989, Goodrich *et al.* 2013) exigeant un protocole d'extraction d'ARN optimale afin de maximiser le rendement. Enfin, l'absence des marqueurs d'ARN ribosomiques (ARNr) entrave l'évaluation de la qualité des ARN spermatiques.

Certaines méthodes de purification des spermatozoïdes à partir du sperme ont été décrites dans la littérature. Les unes utilisent la lyse des cellules somatiques par une solution hypotonique (Goodrich *et al.* 2007, Linchoosten *et al.* 2009) tandis que les autres utilisent le gradient de densités discontinues (Chen *et al.* 2011, Cappallo-Obermann *et al.* 2011). Dans certaines études, les spermatozoïdes sont purifiés par une combinaison des deux méthodes, soit le gradient et la lyse (Jodar *et al.* 2012) soit le gradient et le swim-up (Montjean *et al.* 2012). Pourtant aucune étude n'a mentionné le taux de perte en spermatozoïdes après les méthodes de purification effectuées. La question se pose : les spermatozoïdes obtenus sont-ils représentatifs de l'éjaculat initial ?

La quantité minimale d'ARN dans les spermatozoïdes exige une méthode d'extraction efficace permettant de récupérer le maximum d'ARN de bonne qualité. Trois techniques d'extraction d'ARN spermatique ont été utilisées dans la littérature comme : le Trizol (Life Technologies) ou le kit Qiagen ou encore Macherey-Nagel (Montjean *et al.* 2012, Jordar *et al.* 2012, Bonache *et al.* 2012). Laquelle de ces méthodes est-elle la meilleure pour extraire les ARN des spermatozoïdes ?

Plusieurs méthodes de vérification de la qualité des ARN spermatiques ont été développées. Pour certains, une simple observation au microscope pourrait être efficace pour vérifier la présence des cellules somatiques (Garcia-Herrero *et al.* 2011a, 2011b). Pour d'autres, la détection de la présence des cellules somatiques a été réalisée en utilisant la RT-PCR pour amplifier les amorces spécifiques de ces cellules (Bonache *et al.* 2012, Montjean *et al.* 2012). Enfin, deux équipes ont considéré l'absence des unités 18S et 28S ribosomales comme un critère de la pureté des ARN spermatiques par la révélation au Bioanalyzer 2100 (Goodrich *et al.* 2013, Jodar *et al.* 2012). Y a-t'il une concordance entre ces méthodes ?

Plusieurs méthodes ont été employées dans l'étude du transcriptome des spermatozoïdes afin d'obtenir un profil d'expression représentatif d'une population. Pourtant il n'existe pas de consensus entre elles. Dans cette étude, nous nous intéressons à répondre aux questions ci-dessus. Vu l'importance de l'étude du transcriptome dans les spermatozoïdes humains, nous voulons mettre au point cette étude au sein du laboratoire de Cytogénétique de Brest et évaluer sa faisabilité et sa fiabilité. Dans un premier temps, les méthodes de purification, d'extraction et d'évaluation de la qualité de l'ARN des spermatozoïdes à partir du sperme frais et congelé seront testées. Dans un deuxième temps, la meilleure condition sera employée sur des échantillons d'hommes présentant un spermogramme normal afin d'établir un groupe témoin. Quelques études préliminaires comparant les profils transcriptomiques seront aussi effectuées.

SECTION 2 Matériels et Méthodes

A. Matériels

Des échantillons de sperme d'hommes venant consulter au laboratoire de biologie de la reproduction du CHRU de Brest pour des problèmes de fertilité dont le spermogramme est normal sont recrutés dans nos études. Du sperme est récupéré par masturbation après 2 à 5 jours d'abstinence sexuelle. Après le bilan spermatique, une partie du sperme est cryoconservé dans du milieu Sperm Freezing Medium (Irvine Scientific, Paris, France), une partie du sperme frais est utilisée pour tester différentes méthodes de purification. Les patients inclus dans nos études sont informés. Certains ont donné leur consentement pour l'utilisation de leur sperme dans un but de recherche après aboutissement du projet du couple. D'autres ont donné leur consentement pour utiliser la partie restante du prélèvement après l'analyse du spermogramme et spermocytogramme.

Les tests sont réalisés sur du sperme frais et du sperme congelé afin d'évaluer la faisabilité et la fiabilité de l'étude du transcriptome dans différentes conditions de conservation du sperme.

B. Méthodes

1. Purification des spermatozoïdes à partir du sperme

Comme mentionné précédemment, le sperme contient non seulement des spermatozoïdes mais également des cellules somatiques comme les leucocytes, les cellules épithéliales et les cellules germinales. Ces cellules possèdent une quantité d'ARN 200 fois plus grande que celle des spermatozoïdes (Jodar *et al.* 2013). Il est donc important d'éliminer toutes ces cellules du sperme afin d'obtenir un échantillon spermatique pur. Nous avons testé différentes méthodes de purification comme le swim-up, la lyse des cellules somatiques ainsi que le gradient de densités

discontinues avec du sperme frais et du sperme congelé. L'objectif de ces étapes est d'établir une méthode de purification des spermatozoïdes à partir du sperme éjaculé permettant d'éliminer complètement les cellules somatiques en gardant le plus possible de spermatozoïdes. L'efficacité de chaque méthode est évaluée par un comptage sur cellule de Malassez qui permet de calculer le pourcentage de perte en spermatozoïdes et de vérifier l'absence des cellules somatiques. Pour cela, un comptage est réalisé avant (C1) et après (C2) chaque technique et la perte est calculée selon la formule suivante :

$$\% \text{ perte} = 100 - \frac{C2}{C1} \times 100$$

1.1. Purification des spermatozoïdes à partir du sperme frais

1.1.1 Le swim-up

Le swim-up ou la migration ascendante est une technique de préparation du sperme utilisée pour sélectionner les spermatozoïdes les meilleurs avant insémination intra-utérine. Cette technique est basée sur le fait que les spermatozoïdes normaux sont mobiles et peuvent migrer vers le haut d'un liquide nutritif à l'exclusion des bactéries, du plasma séminal, des cellules somatiques et d'autres spermatozoïdes anormaux et/ou peu mobiles (Figure 28).

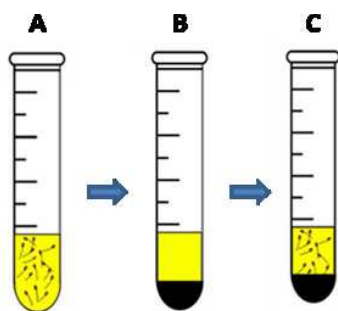


Figure 28 – Principes du swim-up : (A) Ajout de BM1 sur le sperme, (B) Obtention d'un culot de cellules par centrifugation et (C) Incubation à 37°

Dans le but de récupérer exclusivement des spermatozoïdes à partir du sperme frais, nous réalisons cette méthode sur 5 échantillons de sperme. Après élimination du liquide séminal par un lavage dans du PBS 1X, le culot cellulaire est mélangé à 1500 μ l du BM1 (Ellios Biotek, France), une centrifugation de 530 g pendant 10 minutes permet d'obtenir un culot cellulaire. Le tube est incubé à l'étuve à 37°C, les spermatozoïdes ont tendance à monter à la surface (plus riche en oxygène). Après 30 minutes à une

heure, nous prélevons “le nuage” formé par des spermatozoïdes.

1.1.2 Lyse des cellules somatiques

La solution de lyse des cellules somatiques (SCLB-Somatic Cells Lysis Buffer) est une solution hypotonique composée de 0,1% SDS (Sodium dodécylsulfate) (Euromedex, France) et 0,5% Triton X-100 (Euromedex, France) (Goodrich *et al.* 2007).). Brièvement, un lavage par du PBS 1X permet d'éliminer le liquide séminal. Les cellules sont mises en suspension avec cette solution puis le tube est mis dans la glace pendant 30 minutes. L'absence de cellules somatiques est vérifiée au microscope. La lyse peut être répétée jusqu'à l'absence des cellules somatiques. Les spermatozoïdes sont récupérés après une centrifugation à 400g pendant 10 minutes.

1.1.3 Gradient de densités discontinues

Le gradient de densités discontinues permet de séparer les cellules en différentes couches selon leur taille et leur poids moléculaire. Les spermatozoïdes plus denses que les cellules somatiques vont se retrouver dans le culot. Nous testons le gradient 80%-40% et le gradient 90%-47,5% en variant la vitesse de centrifugation. Le gradient 40% ou 47,5% (1ml) est déposé délicatement sur le gradient 80% ou 90%. Pour le gradient de densités discontinues 80%-40%, les vitesses de centrifugation à 500g et à 900g sont respectivement utilisées et pour le gradient de densités discontinues 90%-47,5%, les vitesses de centrifugation à 900g et à 1000g sont testées. Le sperme est liquéfié pendant 30 minutes à température ambiante, puis déposé doucement à la surface du gradient 40% ou 47,5%. Une centrifugation permet de séparer les cellules en différentes couches (Figure 29). Le liquide séminal, le gradient 40% (ou 47,5%) ainsi que l'anneau de cellules somatiques (dans l'interphase du gradient 80%-40% ou 90%-47,5%) sont prélevés complètement. Le culot de spermatozoïdes et un peu de gradient 80% (ou 90%) sont récupérés. La numération est déterminée au microscope.

1.1.4 Association du gradient de densités discontinues et de la lyse des cellules somatiques

La combinaison du gradient de densités discontinues et de la lyse est employée car une seule méthode ne permet pas d'éliminer toutes les cellules somatiques. Après le gradient 80%-40% ou 90%-47,5%, les spermatozoïdes récupérés sont mis en contact

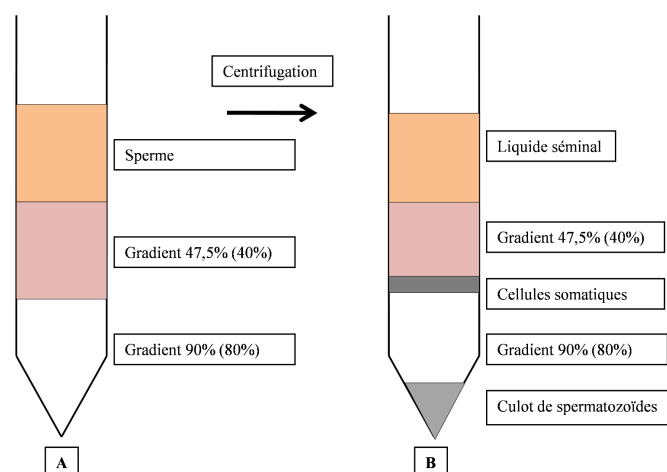


Figure 29 – Schéma des différentes couches cellulaires après un gradient de densités discontinues. A : Différents composants du gradient de densités discontinues. B : Différentes couches cellulaires obtenues après la centrifugation.

avec la solution de lyse. L'ensemble est incubé dans la glace pendant 20 minutes. Le culot de spermatozoïdes est obtenu après une centrifugation à 500g pendant 10 minutes (Figure 30)

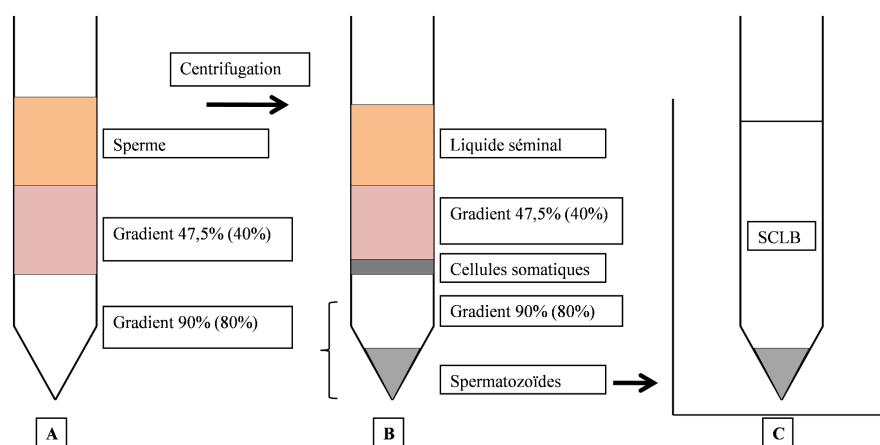


Figure 30 – Schéma de la purification en utilisant le gradient de densités discontinues et la lyse. A, B : Différentes couches cellulaires obtenues après la centrifugation. C : Les spermatozoïdes incubés dans la solution de lyse

1.2. Purification des spermatozoïdes à partir du sperme congelé

Nous avons travaillé également avec du sperme congelé. D'une part, du sperme frais n'est pas toujours disponible pour la recherche, d'autre part, notre étude en aval se focalisera sur une pathologie spécifique ce qui demande une collection de sperme dans

le cadre de collaborations nationales et cette forme de conditionnement sera utilisée.

Les paillettes sont décongelées doucement à température ambiante 30 minutes à l'abri de la lumière. Un lavage par du PBS 1X est effectué afin d'éliminer la solution de congélation. Le culot est repris dans 800 μ l de PBS 1X permettant un comptage et les techniques en aval.

1.2.1 Lyse des cellules somatiques

La même solution de lyse des cellules somatiques contenant 0,1% SDS et 0,5% Triton X-100 est utilisée dans cette expérience. Nous testons différents temps d'incubation dans la glace et différents modes d'agitation. Différents temps d'incubation de 5 à 30 minutes sont appliqués. Deux modes d'agitation sont testés : le mode manuel et le mode

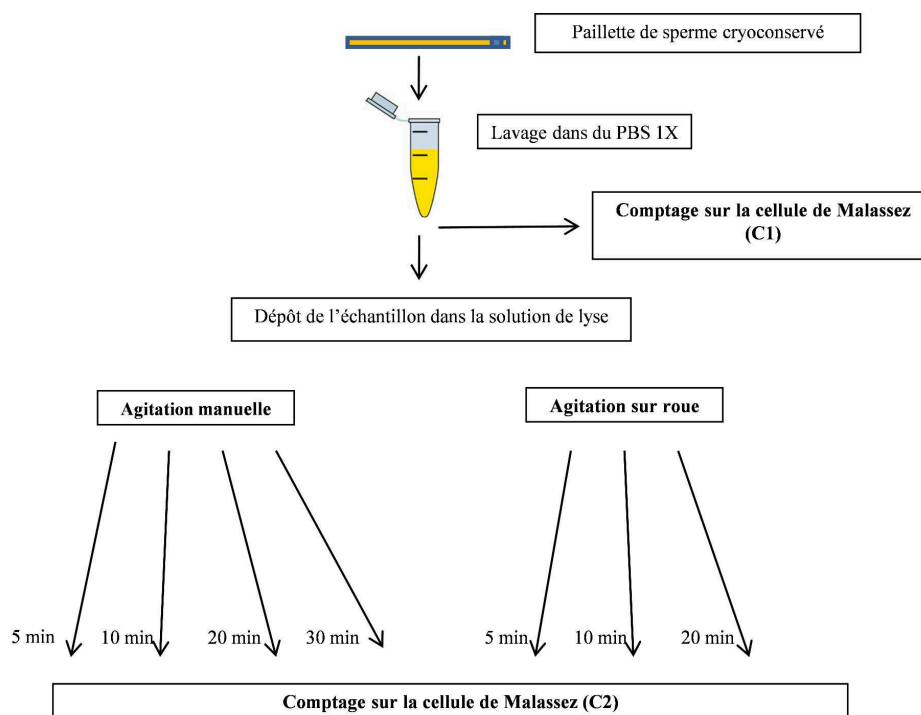


Figure 31 – Schéma de l'organisation de l'optimisation de la lyse sur du sperme congelé.

sur roue. Dans le cas du mode d'agitation manuel, le tube contenant la solution de lyse et les spermatozoïdes incubés dans la glace est retourné manuellement toutes les 2 à 3 minutes. En revanche le mode d'agitation sur roue permet une agitation continue dans la chambre froide. Les spermatozoïdes sont ensuite récupérés grâce à une centrifugation

à 400g pendant 10 minutes (Figure 31). Nous testons ces différentes conditions de lyse des cellules somatiques sur 5 échantillons de sperme congelés.

1.2.2 Gradient de densités discontinues

Selon les résultats obtenus lors de l'expérience sur du sperme frais, nous utilisons le gradient de densités discontinues d'Isolate[®] 90%-47,5% (Irvine Scientific, Paris, France) avec une centrifugation fixée à 20 minutes. Par contre, la vitesse de centrifugation varie de 500g à 1200g (Figure 32). Les différentes couches cellulaires sont obtenues selon la figure 33. Le PBS est retrouvé en surface, puis l'anneau des cellules somatiques et le gradient 47,5%. Un anneau des spermatozoïdes est situé à l'interphase du gradient 47,5% et 90%. Un culot des spermatozoïdes est également formé au fond du tube. Nous prélevons le PBS et le premier anneau des cellules somatiques. L'anneau des spermatozoïdes et le culot sont mis en suspension avant le comptage sur la cellule de Malassez. Cinq échantillons sont utilisés afin d'optimiser le gradient de densités discontinues.

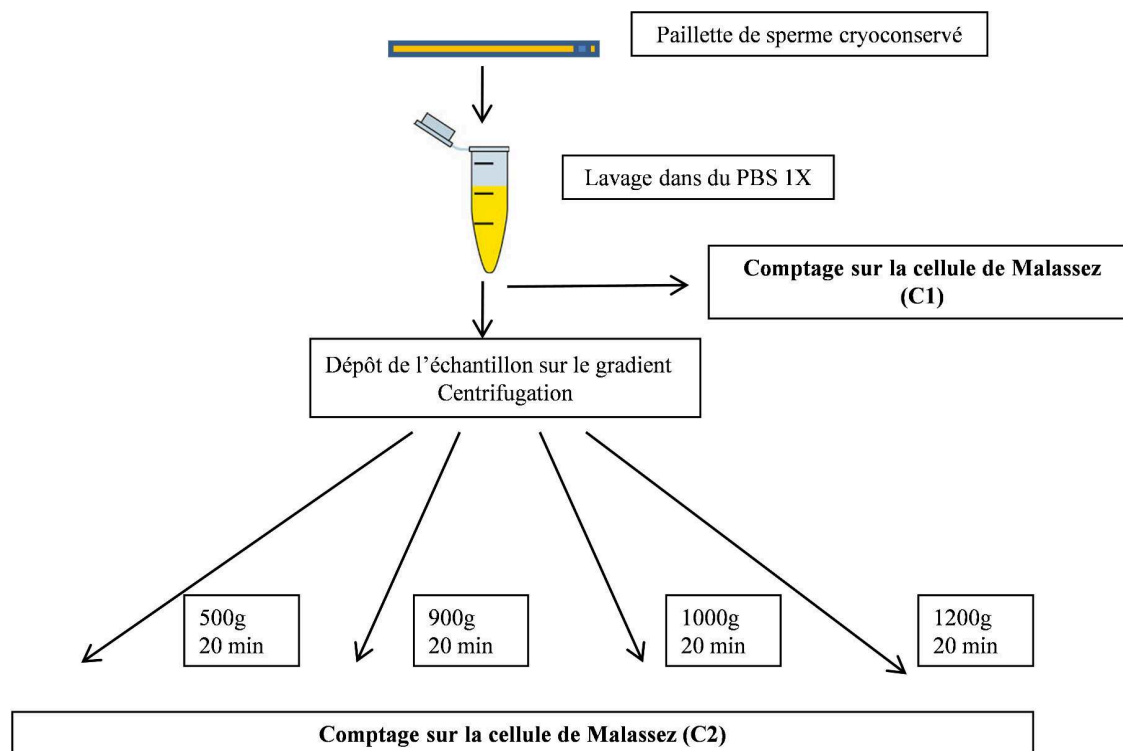


Figure 32 – Schéma de l'organisation de l'optimisation du gradient de densités discontinues sur du sperme congelé

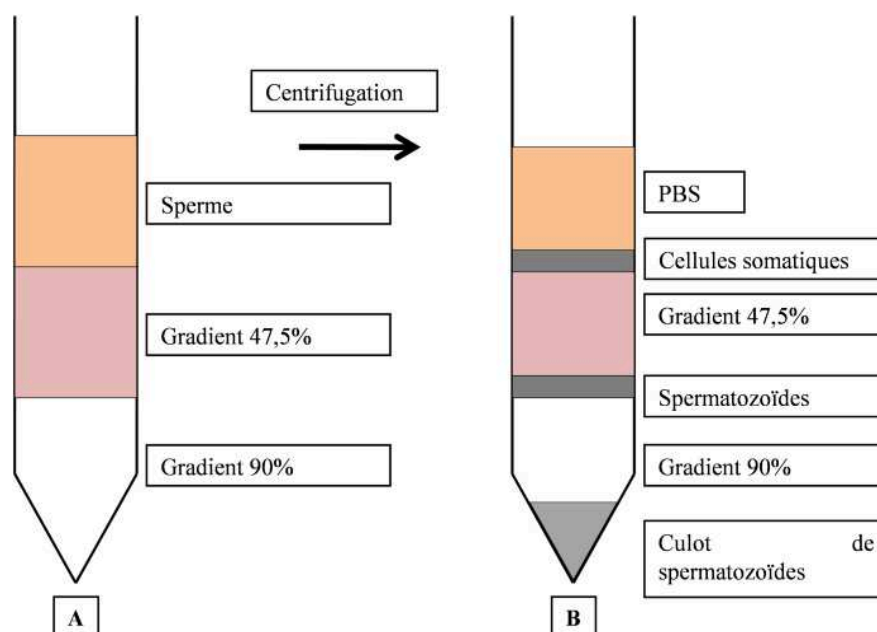


Figure 33 – A : Différents composants du gradient de densités discontinues. B : Différentes couches cellulaires obtenues après la centrifugation.

1.2.3 Association du gradient de densités discontinues et de la lyse des cellules somatiques

La meilleure condition du gradient de densités discontinues est suivie par la meilleure condition de lyse des cellules somatiques. L'objectif de cette expérience est d'éliminer toutes les cellules somatiques. Pour cela, du sperme est déposé doucement sur le gradient d'Isolate 90%-47,5%. Ensuite la centrifugation qui a donné le meilleur résultat auparavant permet de récupérer les spermatozoïdes. Puis, les cellules sont mises en suspension avec la solution de lyse et l'incubation est faite dans la meilleure condition obtenue par l'expérience précédente (Figure 34). Cette expérience est faite sur 12 échantillons de sperme congelé.

2. Evaluation de l'efficacité de deux kits d'extraction d'ARN

Vu que la quantité d'ARN présente dans le spermatozoïde est très faible, une méthode d'extraction d'ARN optimale permettant d'extraire tous les ARNm spermatiques est donc indispensable. Dans le cadre de la mise au point des techniques, nous comparons l'efficacité de deux kits d'extraction d'ARN en terme de rendement qui est le rapport entre la quantité d'ARN extrait en nanogrammes et le nombre de spermatozoïdes en millions. Les ARN spermatiques sont extraits par RNeasy plus Mini

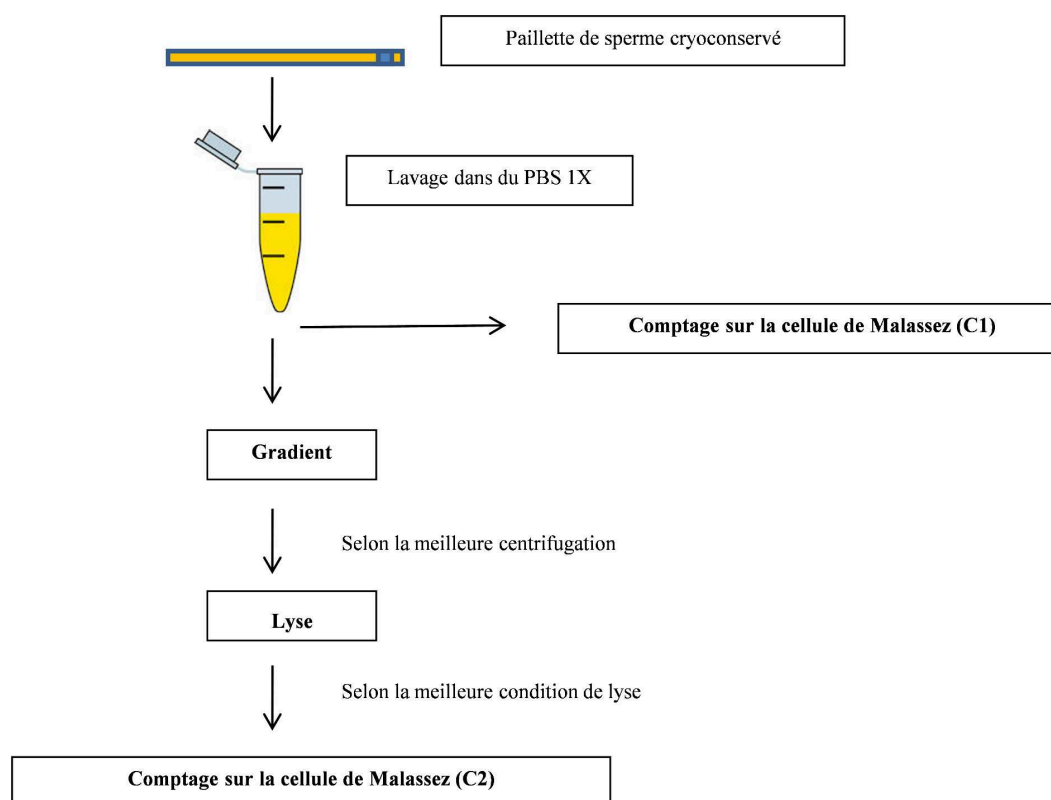


Figure 34 – Schéma de l'organisation de l'optimisation du gradient de densités discontinues suivi de la lyse sur du sperme congelé

Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) et Nucleosin[®] RNA XS (Macherey-Nagel, Hoerd, France) selon le modèle présenté dans la figure 35. Après la purification avec du sperme frais ainsi que du sperme congelé, un même échantillon est divisé en 2 fractions égales dont les ARN spermatiques sont extraits selon les deux kits d'extraction.

Le kit RNeasy Plus Mini est capable de retenir 100 μ g d'ARN au maximum sur une colonne. Puis, 600 μ l de la solution RLT Plus (qui contient de la guanidine isothiocyanate, utilisée pour lyser les cellules) complétée avec 100 μ l de DTT 0,1M (Dithiothreitol) permettant une inactivation des RNases et une lyse efficace des spermatozoïdes, sont ajoutés en suspension. Le lysat est bien homogénéisé par le vortex et transféré dans la colonne afin d'éliminer l'ADN génomique suivi par une centrifugation à 10000g à 4°C pendant 30 secondes. Le lysat est gardé en éliminant la colonne. Ensuite, 600 μ l d'éthanol 70% sont ajoutés au lysat et bien homogénéisés. Cette étape permet aux ARN de bien s'attacher sur la membrane silica-gel. Ensuite, 600 μ l du mélange sont transférés dans une colonne montée sur un tube de 2ml, la colonne est fermée doucement et centrifugée à 10000g pendant 15 secondes. Le filtrat est éliminé, le reste de 600 μ l du mélange est transféré dans cette colonne et la même

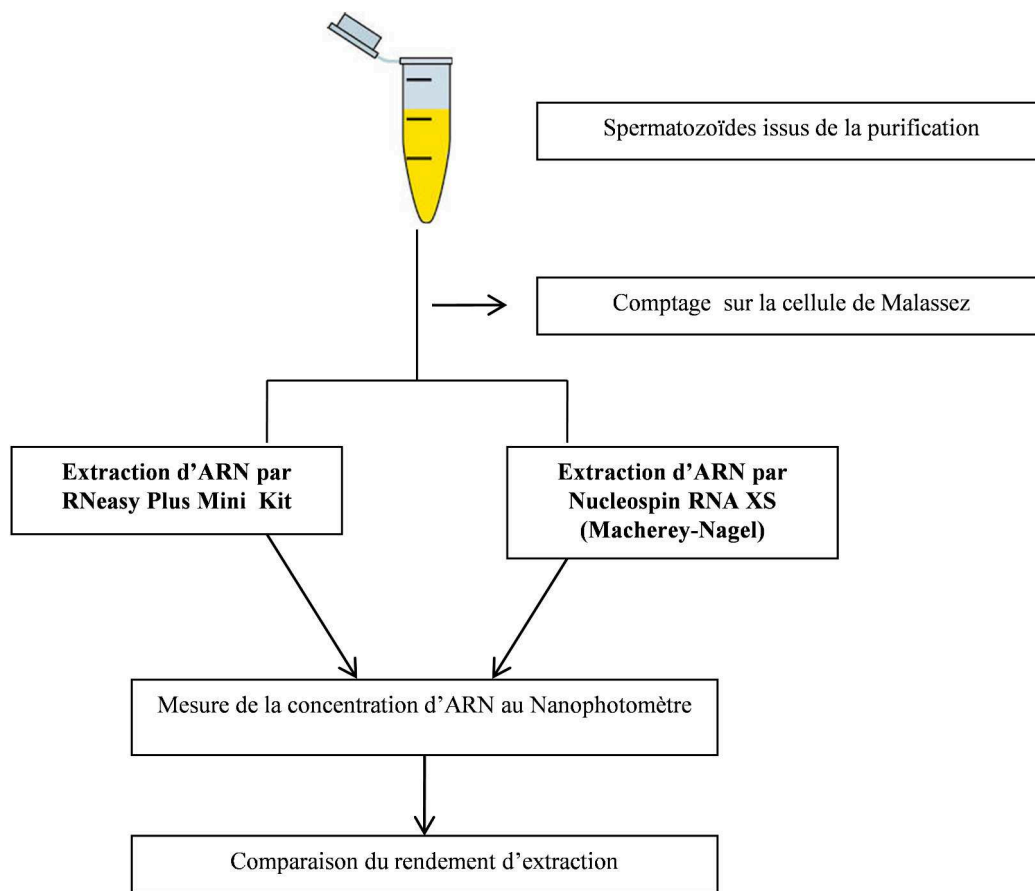


Figure 35 – Schéma de l'organisation de l'optimisation de l'extraction d'ARN spermatique

manipulation est répétée.

La colonne est lavée par l'ajout de 700 μ l de tampon RW1 (RNeasy[®] Minikit, Qiagen) suivie d'une centrifugation à 10000g pendant 15 secondes. Puis, le liquide est éliminé en retournant le tube de collection.

Ensuite, 500 μ l du tampon RPE (RNeasy[®] Minikit, Qiagen) sont ajoutés directement à la colonne et l'ensemble est suivi d'une centrifugation de 15 secondes à 10000g. Une fois le filtrat éliminé, ceci est refait une fois en ajoutant 500 μ l du tampon RPE.

La colonne est transférée dans un nouveau tube collecteur et centrifugée pendant 2 minutes à 10000g en laissant la colonne ouverte pour la sécher. Le tube et le filtrat sont éliminés et la colonne est transférée sur un microtube de 1,5ml. L'élution est faite en ajoutant 30 μ l de H₂O du kit directement au centre de la membrane. Après une minute d'attente, la colonne ouverte est centrifugée une minute à 10000g pour récupérer les

ARN. Afin d'obtenir le maximum d'ARN, le filtrat est repris en répétant une deuxième fois l'élution.

Quant au Nucleospin RNA XS kit, il est capable de retenir 110 μ g d'ARN au maximum sur sa colonne. L'ajout de 100 μ l du tampon RA1 (qui contient de la guanidine thiocyanate) et 2 μ l de TCPE (Tris 2-carboxyethyl phosphine) permet de réduire l'activité des RNases. L'ensemble est bien vortexé en ajoutant l'ARN "carrier", permettant de retenir mieux les ARN sur la colonne. Ensuite, le mélange est transféré dans un NucleoSpin[®]Filter monté sur un tube collecteur de 2ml suivi par une centrifugation à 11000g pendant 30 secondes. La colonne est jetée, 100 μ l d'éthanol sont ajoutés dans le lysat et l'ensemble est bien homogénéisé. Le mélange est transféré dans une colonne NucleoSpin[®]RNA XS monté sur un tube collecteur de 2ml. Après centrifugation à 11000g pendant 30 secondes, la colonne est placée sur un nouveau tube collecteur. L'ajout de 100 μ l de MDB (Membrane Desalting Buffer) et une centrifugation à 11000g pendant 30 secondes permettent un lavage de la colonne. L'ADN génomique est éliminé par incubation 15 minutes à température ambiante après l'ajout de 25 μ l de rDNase sur la colonne. Ensuite, le premier lavage est réalisé par l'ajout de 100 μ l de RA2 sur la colonne, une incubation de 2 minutes suivie par une centrifugation à 11000g pendant 30 secondes. Le deuxième lavage est fait en ajoutant 400 μ l de tampon RA3 dans la colonne suivi d'une centrifugation à 11000g pendant 30 secondes. Le filtrat est éliminé, le tube collecteur est repris permettant le troisième lavage par l'ajout de 200 μ l de tampon RA3 et une centrifugation à 11000g pendant 2 minutes.

Le tube et le filtrat sont éliminés et la colonne est transférée sur un microtube de 1,5ml. L'élution est faite en ajoutant 20 μ l de H₂O du kit directement au centre de la membrane. Après une minute d'attente, la colonne ouverte est centrifugée une minute à 11000g pour récupérer les ARN. Afin d'obtenir le maximum d'ARN, le filtrat est repris en répétant une deuxième fois l'élution.

Suite à l'extraction d'ARN, un dosage est réalisé au Nanophotomètre (Implen, Munich, Allemagne). Ce dosage permet d'obtenir la concentration d'ARN (ng/ μ l) et également les ratios d'absorbance optique 260/280 et 230/260. Les derniers permettent de vérifier l'absence de contamination par de l'ADN, des protéines ou des solvants.

3. Evaluation de la pureté des ARN spermatiques

La pureté des ARN spermatiques est évaluée par deux méthodes : la RT-PCR et le Bioanalyzer 2100 (Agilent). Le but de cette vérification est de s'assurer de la présence

des ARN spermatiques et de l'absence totale des ARN somatiques. Cela permet de confirmer l'efficacité de la méthode de purification des spermatozoïdes à partir du sperme. Les deux méthodes de vérification de la pureté des ARN spermatiques sont réalisées sur les échantillons frais et congelés.

3.1. RT-PCR

La pureté des ARN spermatiques est vérifiée par l'absence des amplicons de CD45 à 847 pb, de E-Cadhérine à 476 pb et de C-Kit à 780 pb qui sont spécifiques pour les leucocytes, les cellules épithéliales et les cellules germinales, respectivement. De plus, la présence de l'amplicon de la protamine 2 à 149 pb et non à 310 pb (spécifique des ADN complémentaires et des ADN génomiques, respectivement) assure la pureté des ARN spermatiques.

La transcription inverse est faite grâce au SuperScriptTM II (InvitrogenTM, California, USA). Le contenu et le protocole sont décrits dans le tableau suivant. Quand nous travaillons avec plusieurs échantillons, nous préparons un mélange selon le tableau 2.

	Pour 1 échantillon (μ l)	Pour (x-1) échantillons (μ l)
Oligo dT Amorce	1	x
dNTP Mélange	1	x
ARN	10	10 par échantillon
Incubation à 65°C pendant 5 minutes puis dans la glace		
5X First-Strand Buffer	4	4x
0,1M DTT	2	2x
RNasin	1	x
SuperScript TM II RT	1	x
Incubation à 42°C pendant 50 minutes		
Inactivation de la réaction à 70°C pendant 15 minutes		

Tableau 2 – Protocole employé pour la transcription inverse par le SuperScript II

Une fois la transcription inverse faite, le produit RT peut être utilisé pour réaliser la PCR ou bien être conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

La PCR est réalisée grâce au PhusionTM High-Fidelity DNA Polymerases (Finnzyme, Boston, USA). Un mélange d'1 μ l de l'amorce sens et de l'amorce antisens à 10 μ M, de 10 μ l de Phusion HF Master Mélange 2X, de 4 μ l de l'ADNc issu de la RT, complété à 20 μ l par de l'H₂O est fait pour une réaction. Les conditions retenues pour

les cycles de PCR sont indiquées dans le tableau 3. Les amorces CD45 et Protamine 2 sont incubées à 57°C lors de l'étape d'hybridation tandis que les amorces C-Kit et E-Cadhérine sont incubées à 60°C permettant une amplification optimale.

Etape		Température (°C)	Durée	Nombre de cycles
Activation de l'enzyme		98	30s	
Dénaturation		98	10s	
Hybridation	C-Kit et E-cadhérine	60	32s	35
	CD45 et Protamine 2	57		
Elongation		72	30s	
Extension finale		72	7 min	

Tableau 3 – Cycle d'amplification des séquences spécifiques des cellules somatiques (CD45, E-Cadhérine et C-Kit) et des spermatozoïdes (Protamine 2)

La migration des produits de PCR se fait sur gel d'agarose (Eurobio, Courtaboeuf, France) à 1% avec 0,005% de bromure d'éthidium (BET) (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Deux μl de tampon de charge 6x (Bleu de Bromophénol 0,02%, Xylène Cyanol 0,12%, Glycérol 30%, Tris-HCL 60 mM, EDTA 1 mM) sont mélangés à 10 μl de produit de PCR et l'ensemble est déposé dans chaque puits. L'ajout de 5 μl d'un marqueur de taille de 100 à 1000pb (SmartLadder[®], Eurogentec) permet la révélation des résultats. Les produits PCR migrent sur gel dans une cuve à 110 V pendant 60 minutes. Les bandes correspondant à différentes amorces sont révélées grâce à un système d'imagerie Infinity[®] (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France).

3.2. Bioanalyzer 2100

La puce Agilent Bioanalyzer 2100 permet d'évaluer non seulement la quantité d'ARN mais également la qualité des ARN en mesurant le RIN (RNA Integrity Number) qui est basé sur la présence des unités 18S et 28S ribosomales. Le RIN s'échelonne de 1 à 10 : 1 signifie une dégradation complète des ARN et 10 représente des ARN intacts. Or, dans les spermatozoïdes, les ARN ribosomiques sont fragmentés (Goodrich *et al.* 2013). Ainsi, la valeur du RIN ne permet pas d'évaluer la qualité des ARN spermatiques. Par contre, cette technique est utile pour vérifier la pureté des ARN spermatiques par l'absence des unités 18S et 28S ribosomiques.

- **Préparation du marqueur de taille**

Le marqueur de taille est dénaturé pendant 2 minutes à 70°C puis mis dans la glace. Après une dilution au 1/2 avec de l'eau RNase-free, le marqueur de taille

est prêt à l'emploi.

- **Préparation du mélange Gel-Dye**

Le Gel-matrix est sorti du frigo et mis à température ambiante pendant 30 minutes. Un prélèvement de $550\mu\text{l}$ de Gel-matrix est mis dans une colonne filtrée suivi d'une centrifugation à $1500g$ à température ambiante pendant 10 minutes. Pour fabriquer le mélange Gel-Dye, $1\mu\text{l}$ du RNA-Dye Concentrate est ajouté dans $65\mu\text{l}$ du Gel-matrix filtré et bien homogénéisé. Après une centrifugation à $13000g$ pendant 10 minutes, le mélange Gel-Dye est gardé à l'abri de la lumière et est prêt à l'emploi.

- **Préparation des échantillons**

Pour chaque nanopuce, il est possible d'analyser 12 échantillons. Pour chaque échantillon $1,2\mu\text{l}$ sont dénaturés à 70°C pendant 2 minutes. Ensuite, les échantillons sont mis immédiatement dans la glace.

- **Préparation de la nanopuce**

Un plateau de puce est mis en place. Ensuite, $9\mu\text{l}$ du mélange Gel-Dye sont déposés au fond du puits **G** et le "chip priming station" est fermé. Le piston est baissé jusqu'au loquet pendant exactement 30 secondes, puis libéré. Le piston remonte jusqu'à la position initiale. Après ouverture de la station, $9\mu\text{l}$ du Gel-Dye sont déposés dans les deux autres puits **G**.

Puis, $5\mu\text{l}$ de marqueur RNA 6000 Nano (Agilent) sont déposés dans chaque puits-échantillon et dans le puits-échelle. Enfin, $1\mu\text{l}$ de chaque échantillon est déposé dans chaque puits-échantillon et $1\mu\text{l}$ du marqueur de taille est déposé dans le puits-échelle. La puce est homogénéisée par vortex pendant une minute.

- **Préparation du Bioanalyzer 2100**

Les électrodes sont décontaminées par un lavage avec RNaseZap[®]. La puce est placée dans le Bioanalyzer 2100. Le logiciel "2100 Expert" permet d'analyser la puce.

4. Amplification et marquage des ARN spermatiques

Une fois la qualité et la quantité des ARN spermatiques vérifiées, les ARN spermatiques sont amplifiés et marqués par de la Cyanine 3 grâce au kit One Color Low Input Quick Amp Labeling (Agilent) selon la figure 36.

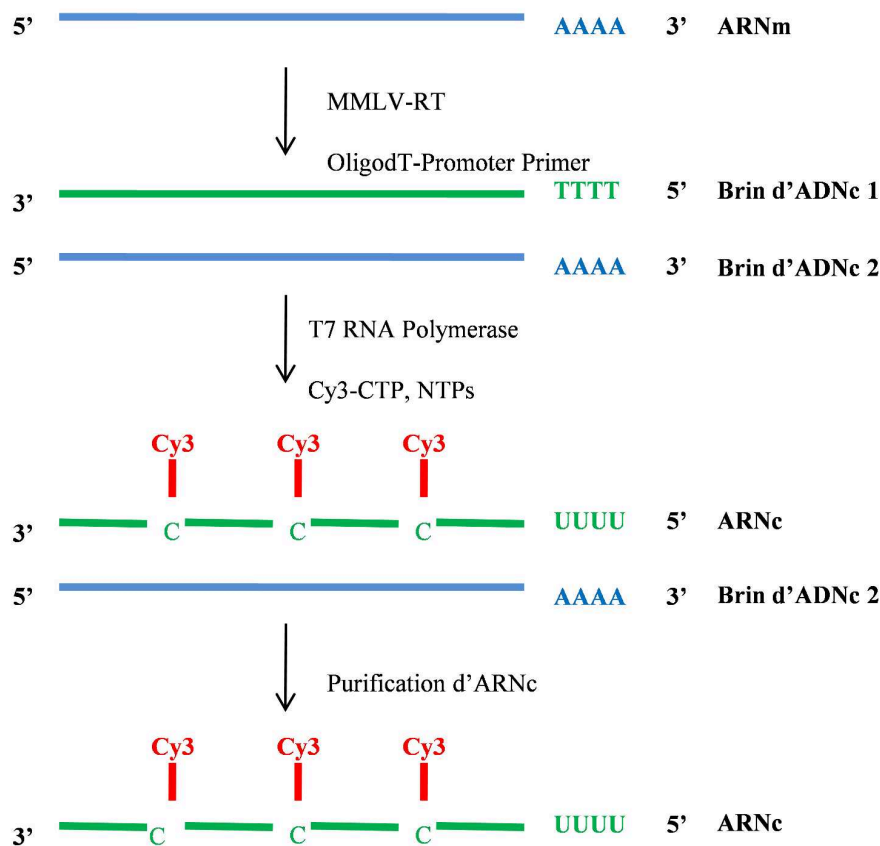


Figure 36 – Schéma du protocole d'amplification et de marquage de l'ARNc.

• Préparation du Spike-in

Le Spike-in est un ARN messager utilisé pour calibrer les mesures d'hybridation lors d'une expérience de puce à ARN. Le Spike-in est bien vortexé, puis chauffé à 37°C pendant 5 minutes. Il est dilué en fonction de la quantité d'ARN utilisé. Pour nos échantillons, nous avons fait trois dilutions successives 1:20, 1:25 et 1:10. Deux μl du Spike-in sont prélevés et mis dans un tube 1,5ml étiqueté "première dilution", puis 38 μl d'eau sont ajoutés. Cette solution peut être conservée à -80°C pendant 2 mois. Ensuite, un prélèvement de 2 μl de la première dilution est déposé dans un tube étiqueté "deuxième dilution" et 48 μl d'eau sont ajoutés dans ce tube. La troisième dilution se fait par 2 μl de la "deuxième dilution" avec 18 μl d'eau dans un autre tube. Il faut bien homogénéiser cette dilution et la garder dans la glace.

• Préparation du marquage

Les échantillons sont préparés de façon à ce que la quantité d'ARN soit de 10 à 200 ng dans un volume total de 1,5 μl . Puis, 2 μl de la troisième dilution du

Spike-in sont ajoutés pour un volume total de $3,5\mu\text{l}$.

La préparation du mélange d'amorce T7 est faite en ajoutant $0,8\mu\text{l}$ d'amorce T7 dans $1\mu\text{l}$ d'eau pour chaque échantillon. Puis, $1,8\mu\text{l}$ du mélange sont mis dans le tube contenant $3,5\mu\text{l}$ d'ARN et de Spike-in. L'ensemble est dénaturé à 65°C pendant 10 minutes et mis dans la glace pendant 5 minutes.

Le mélange cDNA Master est fait pour chaque échantillon selon le tableau 4.

	Pour 1 échantillon (μl)
5X First Strand	2
0,1M DTT	1
dNTP mélange 10mM	0,5
Affinity Script	1,2
Volume total	4,7

Tableau 4 – Préparation du Master Mélange pour une synthèse des ADNc.

Le mélange est transféré dans chaque tube d'ARN et l'ensemble est incubé à 40°C pendant 2 heures. La réaction est stoppée en incubant le mélange à 70°C pendant 15 minutes puis en le placant 5 minutes dans la glace.

Une fois que les ARN sont reverse transcrits en ADN complémentaire, les ARN complémentaires (ARNc) sont synthétisés grâce à la transcription in-vitro qui permet d'amplifier les ARN et d'incorporer la Cyanine 3 à la Cystéine en même temps. La préparation du mélange de marquage est faite selon le tableau 5.

	Pour 1 échantillon (μl)
H2O	0,67
5X Transcription Buffer	3,2
0,1M DTT	0,6
NTP mélange	1
T7 RNA Polymerase	0,21
Cyanine 3	0,32
Volume total	6

Tableau 5 – Préparation du mélange pour le marquage des ARNc.

Pour chaque tube d'ARN, les $6\mu\text{l}$ du mélange de marquage sont ajoutés et le tube est incubé à 40°C pendant 2 heures.

- **Purification des ARN complémentaires**

Une fois la synthèse des ARNc finie, nous réalisons une purification permettant de récupérer les ARNc marqués par le kit RNeasy Mini. Pour cela, $84\mu\text{l}$ d' H_2O

sont ajoutés dans le tube pour un volume total de 100 μ l. Ensuite, 350 μ l du tampon RLT sont ajoutés et bien mélangés. Les ARN sont précipités par l'ajout de 250 μ l d'Ethanol 100°. Le mélange est transféré dans une colonne montée sur un tube collecteur de 2ml et centrifugé à 13000g pendant 30 secondes. Le filtrat est jeté et 500 μ l du tampon RPE sont ajoutés dans la colonne suivi d'une centrifugation de 30 secondes à 13000g. Un lavage par 500 μ l de tampon RPE est répété une fois encore. La colonne est placée sur un nouveau tube collecteur et centrifugée à 13000g pendant 30 secondes pour sécher la membrane. Enfin, la colonne est mise dans un tube 1,5ml, 30 μ l d'H₂O sont ajoutés sur la membrane et l'élution est faite par une centrifugation à 13000g pendant 30 secondes. La colonne est jetée et le tube d'élution est mis dans la glace pour le dosage par le NanoDrop.

- **Quantification des ARN complémentaires**

La quantité d'ARNc et la concentration de la Cyanine 3 sont mesurées par le NanoDrop en utilisant 2 μ l de chaque échantillon. Les paramètres sont les suivants :

- La concentration de la Cyanine 3 (pmol/ μ l)
- La DO 260/280
- La concentration d'ARN complémentaire (ng/ μ l)

Ces paramètres permettent de mesurer le rendement en ARNc et l'activité spécifique de chaque réaction selon les formules suivantes :

$$\mu\text{g d'ARNc} = \frac{\text{Concentration d'ARNc} \times 30\mu\text{l (volume d'élution)}}{1000}$$

Et

$$\text{Activité spécifique (pmol Cy3/ } \mu\text{g d'ARNc)} = \frac{\text{Concentration de la Cy3}}{\text{Concentration d'ARNc}} \times 1000$$

La quantité d'ARNc recommandée est de 0,825 μ g et l'activité spécifique recommandée est de 6 pmol Cy3/ μ g d'ARNc.

5. Hybridation des ARN marqués sur puces à ARN

Les ARNc marqués avec la Cyanine 3 sont ensuite hybridés sur le microarray SurePrint G3 Human GE 8x60K V2 (Agilent Technologies) permettant l'étude du transcriptome dans les gamètes mâles.

- **Fragmentation des ARNc**

L'hybridation sur la puce à ARN demande que les ARNc marqués soient fragmentés. Pour cela, un mélange de fragmentation est préparé selon le tableau suivant :

	8 puits microarray
ARNc marqués	600 ng
10X Gene Expression Blocking Agent (μ l)	5
H ₂ O Nuclease-free (μ l)	Qsp à 24
25X Fragmentation Buffer (μ l)	1
Volume total (μ l)	25

Tableau 6 – Préparation du mélange pour la fragmentation des ARNc.

Les ARNc sont fragmentés par une incubation à 60°C pendant exactement 30 minutes avant d'être mis dans la glace pendant une minute. La réaction de fragmentation est arrêtée par l'ajout de 25 μ l de tampon 2X Hi-RPM Hybridization pour obtenir un volume final de 50 μ l. L'homogénéisation est faite à la pipette en évitant de former des bulles. L'échantillon est prêt à être hybridé et mis dans la glace pour une hybridation sur la puce le plus tôt possible.

- **Hybridation sur puce à ARN**

La préparation de la chambre d'hybridation est faite par la mise d'une lame dans une chambre Agilent SureHyb avec les joints au dessus. Ensuite, 40 μ l de mélange des ARNc fragmentés et du tampon 2X Hi-RPM Hybridization de chaque échantillon sont déposés délicatement sur chaque puits de gauche à droite de la puce. La lame Agilent est déposée doucement en parallèle sur la lame-joint. Le couvercle de la chambre est placé correctement puis vissé fermement. L'ensemble est relevé verticalement afin d'humidifier la lame Agilent et des rotations sont faites afin de faire bouger les bulles. L'hybridation est faite pendant 17 heures à 65°C avec une rotation de 10g dans un four à hybridation.

- **Lavage et scanner de la puce**

Des lavages sont réalisés par le tampon de lavage fourni dans le kit. La préparation est selon le tableau suivant :

Une fois la lame séchée, elle est placée dans le carrousel "Agilent" afin d'être analysée. Les données extraites peuvent être récupérées et analysées par le logiciel "Agilent Feature Extraction".

		Contenu	Temps d'incubation
Démontage	Bain 1	Wash Buffer 1	
1 ^{er} lavage	Bain 2	Wash Buffer 1	1 min
2 ^{er} lavage	Bain 3	Wash Buffer 2	1 min
Option	Bain 4	Acétonitrile	10 sec
Stabilisation et séchage	Bain 5	Stabilising and Drying solution	30 sec

Tableau 7 – Composants et temps d'incubation de chaque bain de lavage.

6. Analyse des données

Les données brutes sont exploitées en deux formes : une fiche technique permettant d'évaluer dans un premier temps la qualité de l'hybridation et un texte numérisé permettant d'analyser l'expression des gènes. Ce dernier a été analysé par la plate-forme génomique et transcriptomique de l'UMR_S.910 (Marseille). Les données sont analysées en utilisant le logiciel GeneSpring GX version 12.5 (Agilent).

- **Evaluation de la qualité de l'hybridation**

La qualité de l'hybridation est évaluée en analysant les sondes de contrôle et la distribution des signaux sur la fiche technique de chaque puce.

- **Normalisation**

La normalisation permet de faire abstraction d'éventuelles différences techniques entre les expériences afin de n'identifier que les différences biologiques qui existent potentiellement entre les échantillons. Dans cette analyse, la normalisation au 75^{ème} percentile a été utilisée. Le 75^{ème} percentile est une valeur d'intensité de fluorescence robuste pour normaliser les données. Sachant que, dans n'importe quel tissu étudié, il y a un certain pourcentage de gènes qui sont non-exprimés, même si un gène est non-exprimé, une sonde s'hybridant à ce gène émettra tout de même une fluorescence. L'intensité de ces signaux fluorescents se situera par contre dans des fourchettes de faibles percentiles sur la puce étudiée dans le cas des microarrays. Ces valeurs d'intensité de fluorescence faibles sont donc considérées comme du bruit de fond, elles sont moins fiables et doivent être exclues de l'analyse. Ainsi, en prenant une intensité de fluorescence égale ou supérieure à 75, cela permet de prendre la médiane des sondes qui possèdent uniquement des intensités fiables et d'exclure toutes les autres.

- **Analyse statistique**

Les résultats une fois normalisés sont analysés par la méthode statistique dite test de Student ou test t . Deux méthodes de correction multiparamétrique sont utilisées afin d'éliminer d'éventuels faux positifs : la méthode "Storey Bootstrapping" et "Storey with curve fitting" .

Tous les gènes exprimés différentiellement avec une p -value corrigée inférieure à 0,05 sont considérés comme significatifs et étudiés plus en détail.

SECTION 3 Résultats

1. Purification des spermatozoïdes à partir du sperme

1.1. Du sperme frais

1.1.1 Swim-up

Cette technique permet de récupérer uniquement des spermatozoïdes purs qui sont les plus mobiles. La vérification par l'observation au microscope affirme l'absence totale des cellules somatiques (dans les limites de la technique utilisée). Toutefois, une perte très importante (90,4%) est remarquée après cette méthode de purification (Tableau 8). Les 10% des spermatozoïdes récupérés ne sont pas représentatifs de l'échantillon. Ainsi, cette technique n'est pas choisie pour la suite de la mise au point de l'étude du transcriptome dans les gamètes mâles.

Echantillon	1	2	3	4	5
Nombre initial de spermatozoïdes (millions)	50	22	25	45	23
Nombre de spermatozoïdes après le swim-up (millions)	7,2	0,5	3	3,8	1,8
Perte en spermatozoïdes (%)	85,6	97,7	88	91,6	92,2

Tableau 8 – Résultats obtenus après capacitation pour 5 échantillons.

1.1.2 Lyse des cellules somatiques

La lyse des cellules somatiques est réalisée par la solution de lyse composée de SDS et de Triton X-100 selon le protocole de Goodrich *et al.* (2007) jusqu'à l'absence des cellules somatiques. Malgré trois lyses consécutives de 30 minutes, les cellules somatiques persistent lors du contrôle au microscope. De plus, une perte en spermatozoïdes importante, avec une moyenne de 45,7%, est remarquée après trois cycles de lyse (Tableau 9). Nos résultats montrent que la lyse seule ne permet pas d'éliminer toutes les cellules somatiques.

Echantillon	1	2	3	4	5
Nombre initial de spermatozoïdes (millions)	180	58	28	6,4	35
Nombre de spermatozoïdes après le swim-up (millions)	80	31	16	3,8	20
Perte en spermatozoïdes (%)	55,6	46,6	42,9	40,6	42,9

Tableau 9 – Résultats obtenus après lyse des cellules somatiques pour 5 échantillons.

1.1.3 Gradient de densités discontinues

Le gradient de densités discontinues est utilisé afin de séparer les différents composants du sperme en couches cellulaires. Les spermatozoïdes plus denses vont

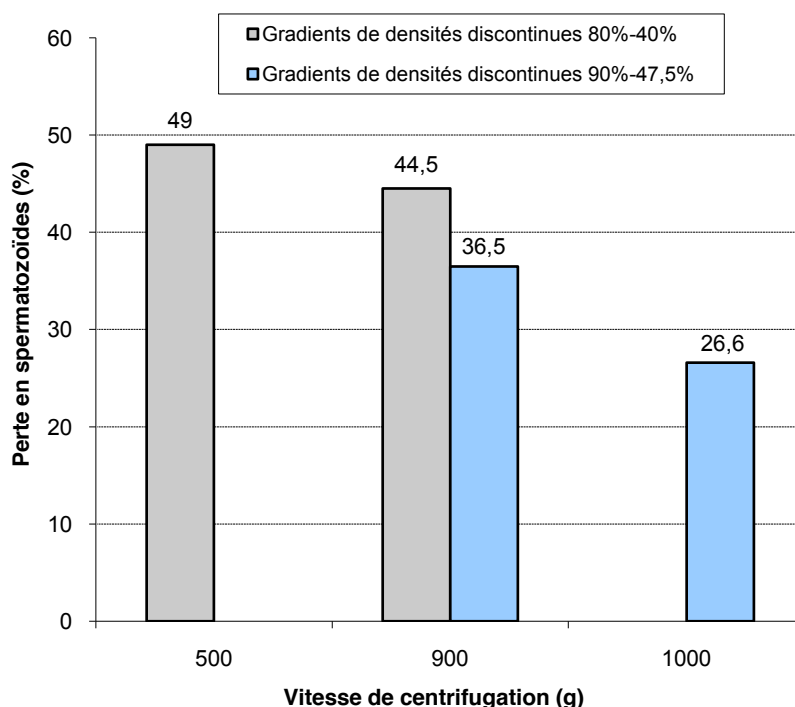


Figure 37 – Perte en spermatozoïdes (%) avec différents gradients de densités discontinues

se retrouver dans la partie du gradient 80% ou 90%. La perte en spermatozoïdes est représentée dans la figure 37. Dans un premier temps, nous purifions les spermatozoïdes en utilisant le gradient 80%-40%. Deux vitesses de centrifugation à 500g et à 900g pendant 20 minutes sont testées. La centrifugation à 500g permet de récupérer 51% des spermatozoïdes par rapport à la quantité initiale. Quand la vitesse est augmentée à 900g, 55,5% des spermatozoïdes sont récupérés. Etant donné que lors de l'utilisation du gradient 80%-40% nous notons une perte en spermatozoïdes importante (plus de 40%), nous testons donc le gradient 90%-47,5%. Grâce aux résultats préliminaires, la vitesse

de centrifugation à 900g est d'abord testée. La perte en spermatozoïdes est visiblement abaissée de 44,5% avec le gradient 80%-40% à 36,5% avec le gradient 90%-47,5%. Ensuite, la vitesse de centrifugation est augmentée à 1000g, la perte n'est que de 26,6%. La vérification de la pureté des spermatozoïdes par observation au microscope et par RT-PCR a révélé une contamination par des cellules somatiques. Il est donc impossible d'exclure toutes les cellules somatiques avec un seul gradient de densités discontinues.

1.1.4 Association du gradient de densités discontinues et de la lyse des cellules somatiques

Le gradient de densités discontinues seul ne permet pas d'exclure toutes les cellules somatiques dans le sperme. Nous envisageons une association entre le gradient de

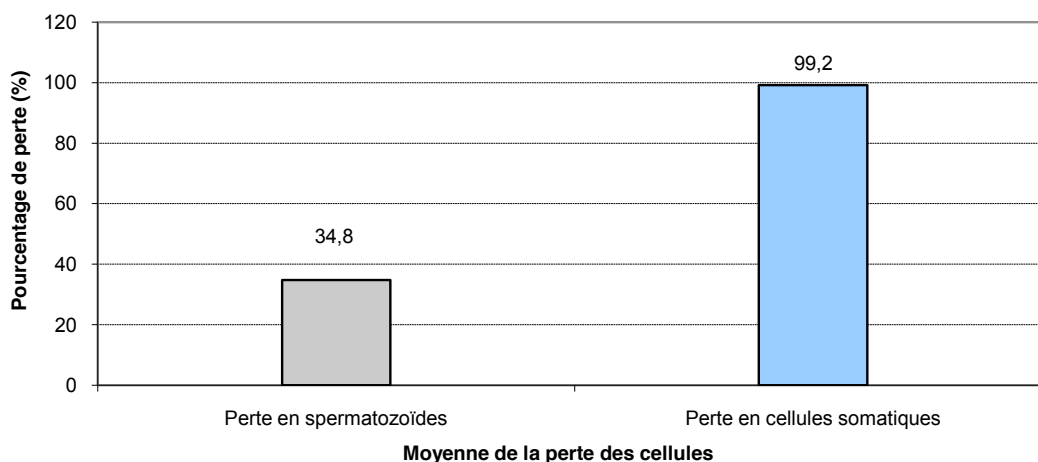


Figure 38 – Perte en spermatozoïdes et en cellules somatiques (%) après association du gradient de densités discontinues et de la lyse des cellules somatiques à partir du sperme frais

densités discontinues et la lyse des cellules somatiques. Pour cela, du sperme est fractionné par le gradient de densités discontinues 90%-47,5%, puis les spermatozoïdes sont placés dans la solution de lyse des cellules somatiques, dans la glace, pendant 20 minutes. Le temps dans la solution de lyse après le gradient de densités discontinues est diminué par rapport à la lyse seule. En effet, nous avons observé des résultats similaires avec des temps d'incubation de 20 minutes ou de 30 minutes dans la solution de lyse. Or la lyse affecte négativement les cellules somatiques mais également les spermatozoïdes. Ainsi, une incubation de 20 minutes permet d'éliminer les cellules somatiques persistantes après le gradient de densités discontinues en gardant l'intégrité des spermatozoïdes. Les pertes en spermatozoïdes et en cellules somatiques sont

représentées dans la figure 38. En moyenne, une perte en spermatozoïdes de 34,8% est remarquée. Cette méthode permet d'éliminer 99,2% des cellules somatiques dans le sperme. La purification n'exclut pas complètement les cellules somatiques à cause de la quantité initiale importante de cellules rondes dans 2 échantillons. Ces échantillons présentent initialement plus de 3 millions des cellules somatiques.

1.2. Du sperme congelé

1.2.1 Lyse des cellules somatiques

Les résultats obtenus dans le cadre de l'optimisation de la lyse sont représentés dans la figure 39. Pour chaque condition, 5 échantillons sont testés et les moyennes des pourcentages de perte en spermatozoïdes (gris) et en cellules rondes (bleu) sont présentées.

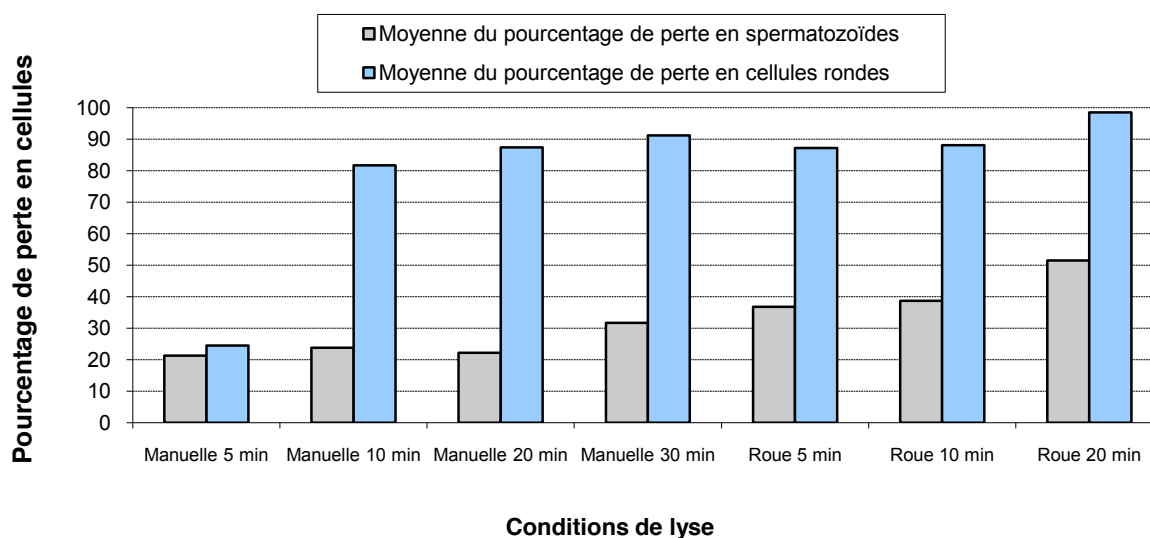


Figure 39 – Résultats de la purification du sperme par la lyse des cellules somatiques

La méthode d'agitation manuelle est effectuée pour 4 conditions selon le temps passé dans la glace (de 5 minutes à 30 minutes). La perte en cellules rondes augmente avec le temps de contact jusqu'à 30 minutes. Cette perte est de 24% pour un temps de contact de 5 minutes et de 91% à 30 minutes. En revanche, pour les spermatozoïdes, l'augmentation du temps de contact dans la solution de lyse ne semble pas avoir d'effet et ce jusqu'à 20 minutes. La perte à 5 minutes est de 21%, à 10 minutes est de 23% et à 20 minutes est de 22%. Pourtant, lors d'un contact pendant 30 minutes, la perte en spermatozoïdes augmente jusqu'à 32%.

Quant à la méthode d'agitation sur roue, trois conditions selon le temps de contact dans la glace sont testées (de 5 minutes à 20 minutes). Les pertes en spermatozoïdes et en cellules somatiques augmentent successivement selon le temps de présence. Un contact durant 5 minutes entraîne une élimination de 87% et un contact pendant 20 minutes permet d'éliminer 98% des cellules somatiques. Par ailleurs, un contact pendant 5 minutes montre une perte de 37% de gamètes contre 52% lors d'un contact de 20 minutes.

L'agitation sur roue semble plus agressive pour toutes les cellules conduisant à une perte très importante en spermatozoïdes. Elle ne répond pas aux exigences de la purification et est donc exclue. La meilleure condition est donc un temps de contact dans la glace de 20 minutes avec une agitation manuelle.

1.2.2 Gradient de densités discontinues

Les résultats obtenus pour l'optimisation du gradient de densités discontinues sont représentés dans la figure 40. Pour chaque condition, 5 échantillons sont testés et les moyennes des pourcentages de perte en spermatozoïdes (gris) et en cellules rondes (bleu) sont présentées.

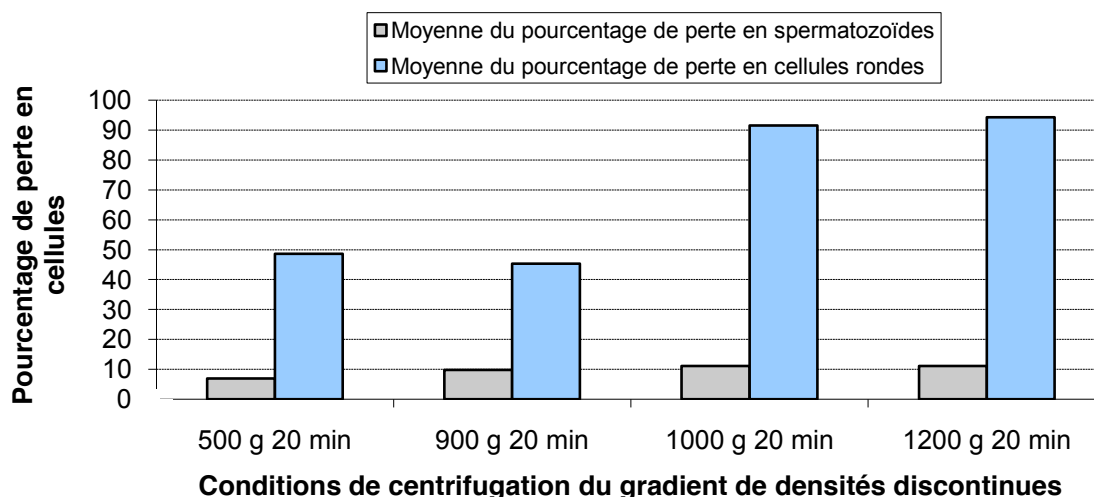


Figure 40 – Résultats de la purification du sperme par le gradient de densités discontinues

La perte en cellules rondes est inférieure à 50% avec une centrifugation à 500g ou à 900g, contrairement à la perte plus importante obtenue grâce à des centrifugations de 1000g et 1200g. La différence des taux de perte entre 1000g et 1200g est faible. L'élimination des cellules somatiques est en moyenne de 92% pour une centrifugation

à 1000g et de 94% pour la centrifugation à 1200g.

La perte en spermatozoïdes semble être un peu moins affectée par la vitesse de centrifugation. En effet, elle est de l'ordre de 7% pour la vitesse la plus faible et de 11% pour la vitesse la plus élevée.

Les meilleures conditions de centrifugation du gradient discontinu sont 1000g et 1200g pendant 20 minutes.

1.2.3 Association du gradient de densités discontinues et de la lyse des cellules somatiques

Les résultats obtenus dans le cadre de la vérification des effets de l'association des meilleures conditions de centrifugation du gradient et de l'incubation dans la solution de lyse sont présentés dans la figure 41. Les gradients de densités discontinues sont centrifugés pendant 20 min à 1000g suivi de la lyse pendant 20 minutes, avec une agitation manuelle. Nous testons cette méthode de purification du sperme sur 12 échantillons. La perte en spermatozoïdes est en moyenne de 26,8% et la perte en cellules rondes est, en moyenne, de 97,4%. La perte totale en cellules somatiques a été remarquée sur 10 des 12 échantillons testés. Deux échantillons présentent encore des cellules somatiques après la purification à cause de la quantité initiale très importante de ces cellules (plus de 3,38 millions de cellules rondes au départ).

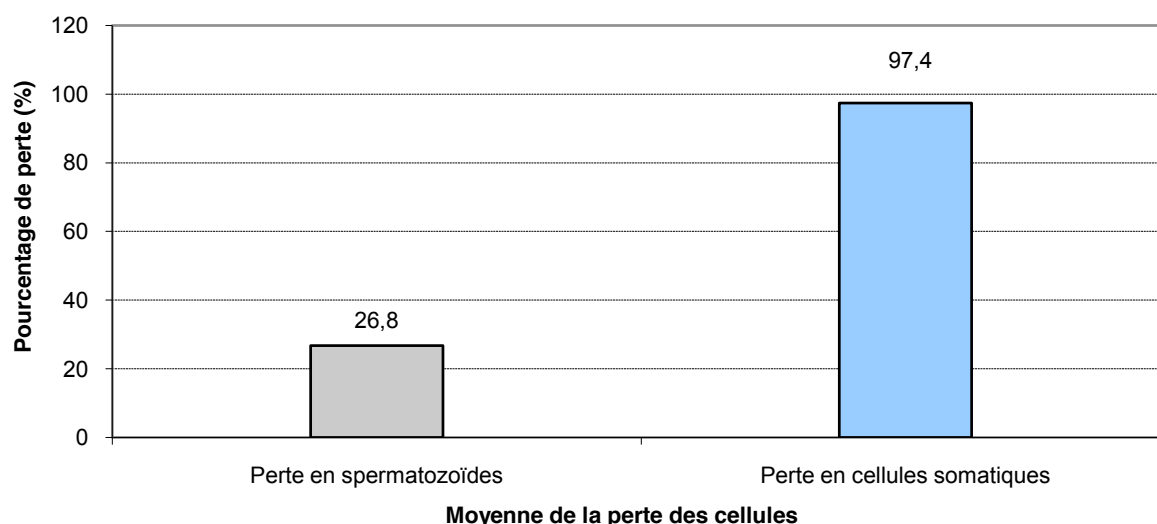


Figure 41 – Perte en spermatozoïdes et en cellules somatiques (%) après association du gradient de densités discontinues et de la lyse des cellules somatiques à partir du sperme congelé

2. Evaluation de l'efficacité de deux kits d'extraction d'ARN

Nous utilisons les deux kits d'extraction RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) et NucleoSpin RNA XS (Macherey-Nagel) afin d'extraire des ARN à partir des 5 échantillons de sperme frais et 5 échantillons du sperme congelé. Le rendement en moyenne (ng d'ARN/ million de spermatozoïdes) est calculé pour comparer l'efficacité de ces deux méthodes (Figure 42).

Pour les échantillons spermatiques frais, nous remarquons que l'extraction d'ARN par le kit NucleoSpin RNA XS est plus efficace que par le kit RNeasy Plus Mini. En effet, le rendement d'extraction est deux fois plus important quand l'extraction est faite à l'aide du kit Macherey-Nagel en comparaison avec celui de Qiagen. Quant aux échantillons de sperme congelé, le rendement d'extraction grâce au kit Macherey-Nagel est 10 fois plus élevé que celui de Qiagen (43,2 ng/10⁶ spermatozoïdes *vs* 4,32 ng/10⁶ spermatozoïdes). La différence de rendement entre les deux kits d'extraction est importante.

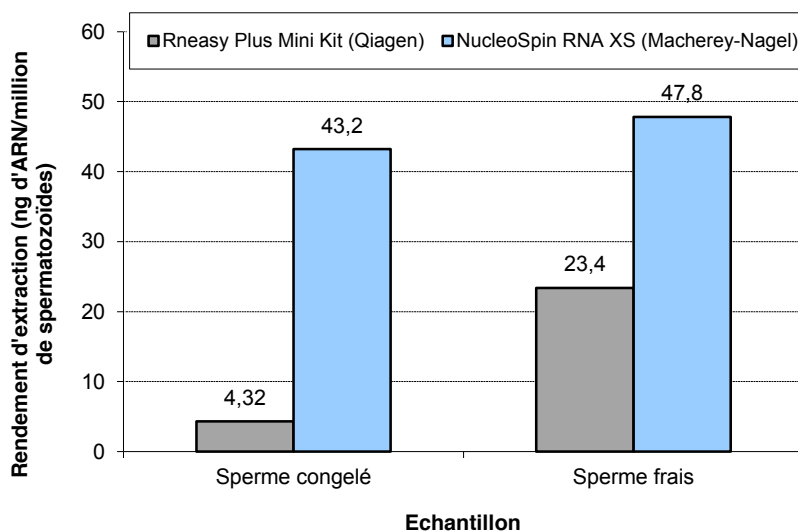


Figure 42 – Rendement d'extraction d'ARN des deux kits à partir du sperme frais et du sperme congelé.

3. Evaluation de la pureté des ARN spermatiques

3.1. RT-PCR

La RT-PCR avec les ARN spermatiques frais et congelés partage le même profil. En effet, les échantillons issus de la lyse des cellules somatiques seule ou du gradient de

densités discontinues seul révèlent la présence de cellules somatiques (déjà observées au microscope). Lors de la révélation des produits de PCR sur gel, les bandes correspondant aux amplicons CD45, E-Cadhérine, C-Kit et Protamine 2 mettant en évidence, respectivement, les leucocytes, les cellules épithéliales, les cellules germinales et les spermatozoïdes, sont bien présentes (Figure 43, échantillon 1).

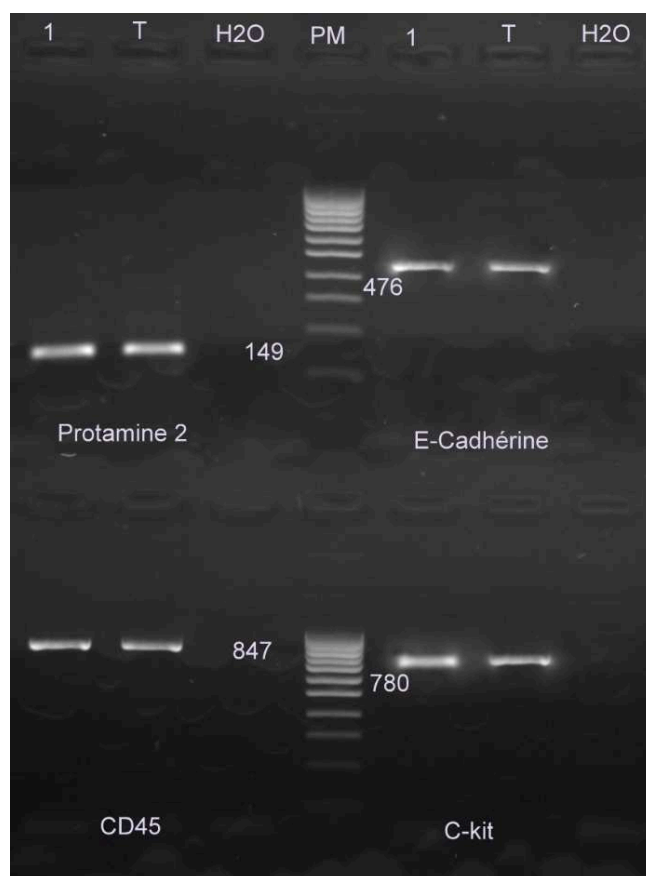


Figure 43 – Présence des amplicons CD45 à 847pb, C-Kit à 780pb, E-Cadhérine à 476pb et Protamine 2 à 149pb pour un échantillon de sperme traité par la lyse des cellules somatiques (1) ainsi que pour le témoin positif (T) révélée par la RT-PCR.

Le témoin H₂O est négatif pour les 4 amorces. (PM : poids moléculaire).

L'association du gradient de densités discontinues suivi de la lyse des cellules somatiques permet de purifier les spermatozoïdes à partir du sperme. L'absence des cellules somatiques est observée au microscope. Ces échantillons spermatiques sont attendus comme purs. Pourtant, nous obtenons deux profils différents lors de la vérification de la pureté des ARN spermatiques par RT-PCR. Dans le premier cas, les amorces spécifiques des cellules somatiques (CD45) ainsi que les amorces spécifiques des spermatozoïdes (Protamine 2) sont détectées suggérant une contamination (Figure 44, échantillon 3). Dans le deuxième cas, l'absence des amorces spécifiques des cellules

somatiques et la présence des amorces spécifiques des spermatozoïdes confirment la pureté des ARN spermatiques (Figure 44, échantillons 1 et 2).

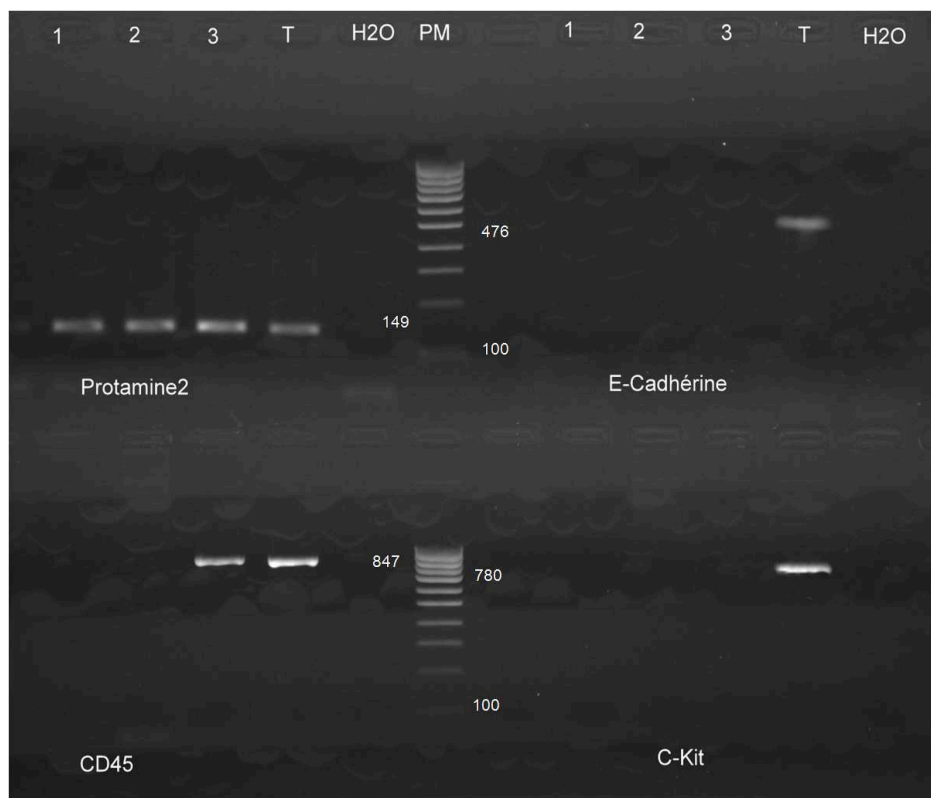


Figure 44 – Absence des amplicons du CD45 à 847pb, C-Kit à 780pb, E-Cadhérine à 476pb et présence de l'amplicon à 149pb de la Protamine 2 pour les deux échantillons (1 et 2) indiquant la pureté. Présence de l'amplicon du CD45 à 847pb et de la Protamine 2 à 149pb indiquant une contamination par des leucocytes pour l'échantillon 3. Le témoin sperme frais (T) est positif pour les 4 amorces révélées par la RT-PCR et le témoin H₂O est négatif pour les 4 amorces. (PM : poids moléculaire).

3.2. Bioanalyzer 2100

Le profil obtenu par le Bioanalyzer 2100 est similaire pour les ARN extraits des spermatozoïdes frais et des spermatozoïdes congelés. Le RIN est normalement un critère important pour l'évaluation de la qualité des ARN. Le RIN est basé sur la présence des ARN ribosomiques, or ces derniers sont absents dans les échantillons d'ARN spermatiques. Il est donc inutile lors de l'évaluation de la qualité des ARN spermatiques. De plus, la présence des pics correspondants aux ARN ribosomiques 18S ou 28S est considérée comme des ARN d'origine somatique.

Pour les échantillons de spermatozoïdes purifiés par une seule méthode soit le

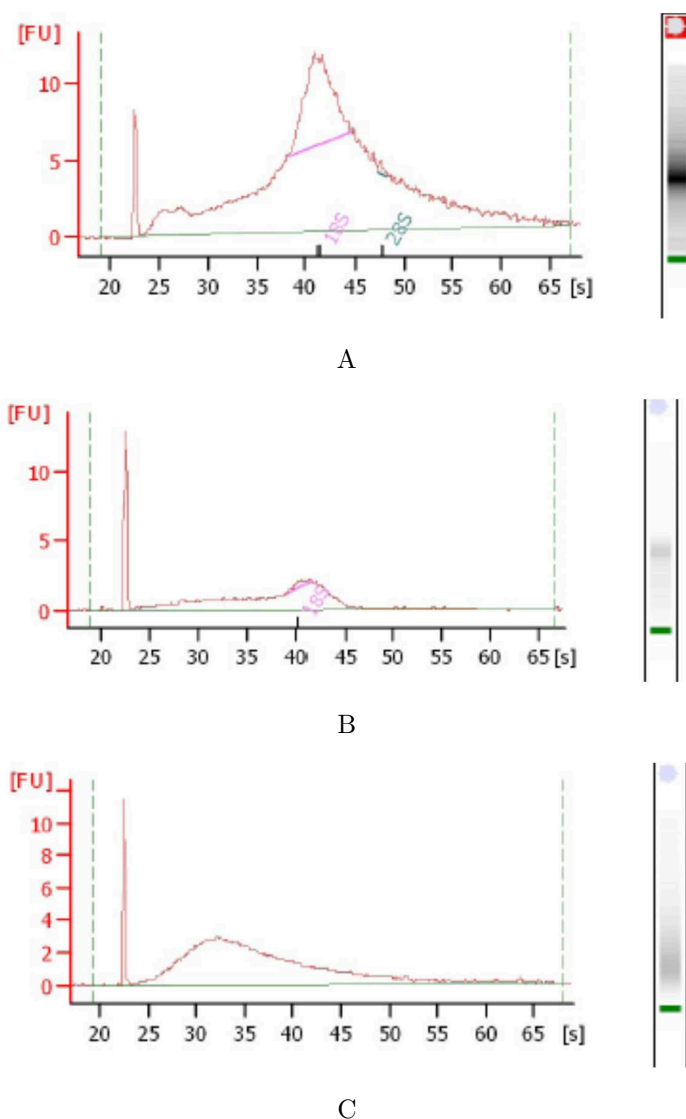


Figure 45 – Différents profils obtenus par le Bioanalyzer 2100. A : Echantillon après la lyse seule ou le gradient de densités discontinues seul en présence des cellules somatiques après observation au microscope. B : Echantillon après l'association des deux techniques en absence des cellules somatiques après observation au microscope, la présence des ARN ribosomiques 18S indique une contamination. C : Echantillon après l'association des deux techniques, absence des cellules somatiques après observation au microscope, l'absence des ARN ribosomiques indique la pureté d'ARN spermatiques.

gradient de densités discontinues soit la lyse des cellules somatiques, la présence des cellules somatiques observées au microscope perdure. Les ARN extraits de ces échantillons présentent toujours des ARN ribosomiques 18S et/ou 28S indiquant une contamination par des cellules somatiques (Figure 45A). Ces échantillons sont considérés comme des témoins positifs.

Les spermés purifiés par l'association du gradient de densités discontinues et de la lyse ne présentent aucune cellule somatique lors d'une observation au microscope. Pour ces échantillons, deux profils différents sont révélés au Bioanalyzer 2100. Certains présentent des pics d'ARN ribosomiques 18S et/ou 28S suggérant une contamination par des cellules somatiques (Figure 45B). Les échantillons purs de spermatozoïdes ne présentent qu'une petite courbe en absence des ARN ribosomiques 18S et/ 28S (Figure 45C).

3.3. Corrélation de résultats obtenus par la RT-PCR et le Bioanalyzer 2100

Nous regardons alors si les résultats obtenus par RT-PCR sont bien corrélés avec ceux obtenus par le Bioanalyzer 2100. En fait, une bonne concordance entre ces deux méthodes est mise en évidence (Tableau 10). Un échantillon révélé comme contaminé par RT-PCR présente des pics d'ARN ribosomiques 18S et/ou 28S au Bioanalyzer 2100 (échantillons 8, 9, 10, 11 dans le tableau 10). Une fois que la pureté des ARN spermatiques est déterminée par RT-PCR, elle est confirmée par Bioanalyzer 2100. Cette forte corrélation des résultats de ces deux méthodes concernant l'évaluation de la pureté des ARN spermatiques suggère que l'utilisation d'une seule méthode, soit la RT-PCR soit le Bioanalyzer 2100 selon la disponibilité du laboratoire, est suffisante pour une évaluation fiable de la pureté des ARN spermatiques.

4. Amplification et marquage des ARN spermatiques

Seuls les échantillons qui sont purs après vérification par RT-PCR et par Bioanalyzer 2100 sont amplifiés et marqués par de la Cyanine 3. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 11. La quantité d'ARNc recommandée est de 0,825 μg et l'activité spécifique recommandée est de 6 pmol Cy3/ μg d'ARNc.

Sept échantillons de sperme frais et un témoin issu du colon (T 139) sont choisis pour être hybridés sur la puce à ARN n°1 et un échantillon de sperme frais (F8) sur la puce n°2. Le témoin (T) permet de valider le fonctionnement de la technique. L'échantillon F4 (73c) présente une activité spécifique de 1,95 pmol Cy3/ μg d'ARNc, ce qui est faible par rapport à la recommandation du fournisseur (6 pmol Cy3/ μg d'ARNc). Nous voulons savoir si un échantillon avec une faible activité pourrait avoir un profil correct.

Echantillon	Quantité d'ARN (ng)	Pureté						
		RT-PCR				Bioanalyzer 2100		
		CD45	C-Kit	E-Cad	Prm2	RIN	18S/28S	Présence d'ARN attendue
1	288	-	-	-	+	2,3	-	+
2	432	-	-	-	+	2,1	-	+
3	376	-	-	-	+	2,2	-	+
4	712	-	-	-	+	2,4	-	+
5	400	-	-	-	+	1	-	+
6	248	-	-	-	+	1,6	-	+
7	1176	-	-	-	+	2,3	-	+
8	408	+	+	+	+	6,4	+	+
9	1544	+	-	+	+	N/D	+	+
10	384	+	+	-	-	1,1	+	-
11	1136	+	-	+	+	2,5	+	+

Tableau 10 – Tableau récapitulatif de résultats obtenus par RT-PCR et Bioanalyzer 2100 sur 11 échantillons. Les résultats montrent clairement une bonne corrélation de ces deux méthodes dans l'évaluation de la pureté des ARN spermatiques. E-Cad : E-Cadhérine, Prm2 : Protamine 2, N/D : non disponible.

Pour les 7 échantillons de sperme congelé, 2 échantillons C3 et C4 présentent une faible quantité d'ARNc en comparaison avec la recommandation du fournisseur (0,825 μ g). Ces deux échantillons sont choisis afin de tester si un échantillon présentant une quantité d'ARNc à la limite de la recommandation pourrait tout de même avoir un profil correct.

5. Hybridation des ARN marqués sur puces à ARN

Nous avons réussi à hybrider 8 échantillons de sperme frais et 7 échantillons de sperme congelé sur les deux puces à ARN. Un rapport technique permet de déterminer si l'hybridation a bien fonctionné. Les sondes de contrôle sont bien placées dans les quatre coins de chaque array permettant de déterminer la grille lors de l'analyse (Figure 46). Dans nos deux puces, tous les échantillons ont une grille normale indiquant que l'hybridation a bien fonctionné.

L'histogramme des signaux montre la distribution qui devrait suivre une courbe de Gauss. Dans la figure 47, la distribution des signaux est une courbe gaussienne centrée vers 2log pour le témoin (A). Pour l'échantillon de bonne qualité d'ARNc du sperme

	N° échantillon	[ARNc] (ng/ μ l)	ARNc marqué (μ g)	[Cyanine 3 dye] (pmol/ μ l)	Activité (pmol Cy3/ μ g)
Puce à ARN n°1	F1	28,58	0,68	0,25	8,75
	F2	55,09	1,65	0,42	7,62
	F3	30,81	0,92	0,26	8,44
	F4	138,28	4,15	0,27	1,95
	F5	56,64	1,7	0,33	7,16
	F6	39,38	1,18	0,47	11,93
	F7	60,18	1,81	0,47	7,81
	T (139)	121,05	3,63	1,46	12,06
Puce à ARN n°2	C1	27,17	0,82	0,37	13,62
	C2	79,1	2,37	0,82	10,37
	C3	23,27	0,7	0,33	14,18
	C4	19,97	0,6	0,13	7, 0
	C5	107	3,21	1,21	11
	F8	42,43	1,27	0,52	12,26
	C6	40	1,2	1,07	26,75
	C7	105,74	3,17	1,64	16

Tableau 11 – Caractéristiques des échantillons d'ARN amplifiés et marqués en vue de l'hybridation sur puce. F1→F7 de la puce n°1 et F8 de la puce n°2 : échantillons du sperme frais. T : Témoin somatique. C1→C7 : échantillons de sperme congelé.

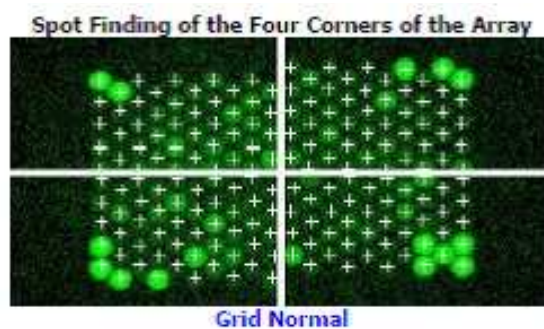


Figure 46 – Sondes de contrôle retrouvées dans les quatre coins de chaque array

frais (B) et du sperme congelé (C), la distribution de signaux est centrée vers llog. L'histogramme des signaux est déformé pour le cas d'un échantillon ayant une activité spécifique d'ARNc insuffisante (D).

6. Analyse des données

Pour la première puce à ARN sur les échantillons de sperme frais, 4 échantillons (F3, F5, F6, F7) et l'échantillon témoin (T) sont interprétables. En fait, les signaux

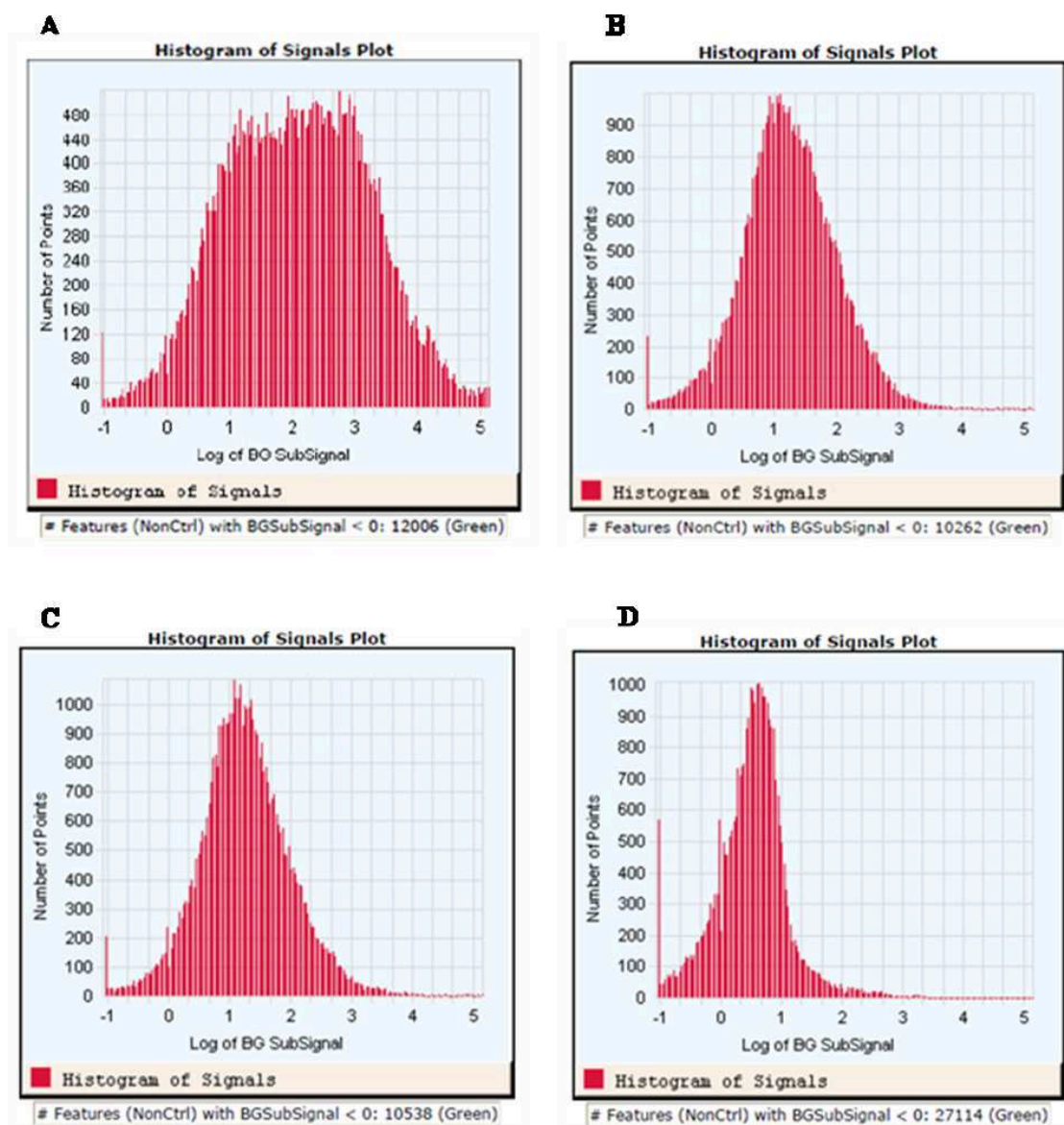


Figure 47 – Distribution des signaux sur l’histogramme du témoin somatique (A), de l’échantillon F6 (B), de l’échantillon C2 (C) et de l’échantillon F4 (D).

obtenus de ces 5 échantillons sont au dessus du bruit de fond et donc peuvent être exploités. Les échantillons F1 et F4 ont une qualité insuffisante à cause de la qualité et de la quantité des ARNc marqués avant l’hybridation. L’échantillon F2 a une qualité et une quantité des ARNc marqués suffisante pour l’hybridation. Par contre, lors de la manipulation, une erreur technique a été remarquée provoquant une qualité insuffisante pour l’analyse des données.

Quant à la deuxième puce comprenant un échantillon frais et 7 échantillons congelés (C1 → C7), 5 échantillons (F8, C2, C5, C6, C7) sont de bonne qualité et interprétables. Les trois échantillons C1, C3, C4 ont une quantité d’ARNc marqués insuffisante

avant l'hybridation et donc ne peuvent pas être exploités. Nous avons finalement 9 échantillons de sperme interprétables. Selon le spermogramme de chaque patient nous envisageons des analyses entre les groupes suivants : 2 échantillons de sperme frais asthénozoospermiques *vs* 3 échantillons de sperme frais normaux et 3 échantillons de sperme frais normaux *vs* 4 échantillons de sperme cryoconservé normaux (Tableau 12).

Sperme Frais					Sperme Congelé			
F3	F6	F5	F7	F8	C2	C5	C6	C7
Asthéno	Asthéno	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

Tableau 12 – Spermogramme des échantillons interprétables issus des deux puces à ARN

6.1. Validation de base des données de microarray

Chaque puce SurePrint G3 Human GE 8x60K V2 (Agilent Technologies) permet de détecter plus de 40 000 transcrits dans le génome humain. Dans nos échantillons normaux issus des spermés frais et cryoconservés, la présence de 27 784 séquences d'ARNm a été détectée. Parmi les 1000 gènes les plus exprimés dans les spermatozoïdes détectés par le séquençage à ARN (Sandler *et al.* 2013), 900 gènes sont retrouvés dans notre base de données. Les gènes révélés sont impliqués dans différents processus biologiques : la spermatogenèse, l'apoptose, la régulation de transcription, l'oncogenèse, la prolifération cellulaire et le développement embryonnaire. Les gènes exprimés spécifiquement selon les différents stades de la spermatogenèse sont également identifiés dans les spermatozoïdes matures (Tableau 13). Ce sont les gènes spécifiques du testicule et les gènes liés au chromosome Y (Ostermeier *et al.* 2002).

Sonde	Gène	Description	Rôle dans la spermatogenèse	Références
Pré-méiotique				
A.33_P3282325	<i>DAZ1</i>	Homo sapiens deleted in azoospermia 1 (DAZ1), mRNA [NM_004081]	Formation et différenciation des cellules germinales	Kee <i>et al.</i> 2009
A.32_P504673	<i>DAZ2</i>	Homo sapiens deleted in azoospermia 2 (DAZ2), transcript variant 3, mRNA [NM_001005786]	Formation et différenciation des cellules germinales	Kee <i>et al.</i> 2009

A_23_P212105	<i>DAZL</i>	Homo sapiens deleted in azoospermia-like (DAZL), transcript variant 2, mRNA [NM_001351]	Formation et différenciation des cellules germinales	Kee <i>et al.</i> 2009
A_23_P63681	<i>IDE</i>	Homo sapiens insulin-degrading enzyme (IDE), transcript variant 1, mRNA [NM_004969]	Corégulateur du récepteur d'androgène	Feig <i>et al.</i> 2007
A_23_P502350	<i>RFX2</i>	Homo sapiens regulatory factor X, 2 (influences HLA class II expression) (RFX2), transcript variant 1, mRNA [NM_000635]	Facteur de transcription	vanWert <i>et al.</i> 2008
A_33_P3239634	<i>NFYA</i>	Homo sapiens nuclear transcription factor Y, alpha (NFYA), transcript variant 1, mRNA [NM_002505]	Facteur de transcription	vanWert <i>et al.</i> 2008
A_23_P109072	<i>SALL4</i>	Homo sapiens spalt-like transcription factor 4 (SALL4), mRNA [NM_020436]	Prolifération des spermatogonies	Eildermann <i>et al.</i> 2012
A_23_P166027	<i>SPO11</i>	Homo sapiens SPO11 meiotic protein covalently bound to DSB (SPO11), transcript variant 1, mRNA [NM_012444]	Implication dans la méiose	Smirnova <i>et al.</i> 2006
A_23_P88303	<i>HSPA2</i>	Homo sapiens heat shock 70kDa protein 2 (HSPA2), mRNA [NM_021979]	Implication dans la méiose	Dix <i>et al.</i> 1997
A_32_P107493	<i>SPATA33</i>	spermatogenesis associated 33 [Source : HGNC Symbol; Acc : 26463] [ENST00000301031]	Implication dans la méiose	Chen <i>et al.</i> 2013
A_24_P203308	<i>STRA8</i>	Homo sapiens stimulated by retinoic acid 8 (STRA8), mRNA [NM_182489]	Implication dans la méiose	Mark <i>et al.</i> 2008
Post-méiotique				
A_23_P100189	<i>PRM1</i>	Homo sapiens protamine 1 (PRM1), mRNA [NM_002761]	Remodelage de la chromatine	Zhao <i>et al.</i> 2001, Lalancette <i>et al.</i> 2009
A_33_P3358893	<i>PRM2</i>	Homo sapiens protamine 2 (PRM2), transcript variant 5, mRNA [NM_001286359]		
A_23_P165504	<i>TNP1</i>	Homo sapiens transition protein 1 (TNP1), mRNA [NM_003284]		
A_33_P3242304	<i>TNP2</i>	Homo sapiens transition protein 2 (TNP2), mRNA [NM_005425]		

A.24_P231025	<i>BRWD1</i>	Homo sapiens bromodomain and WD repeat domain containing 1 (BRWD1), transcript variant 2, mRNA [NM_033656]	Différenciation des spermatides	Pattabiraman <i>et al.</i> 2015
A.23_P217621	<i>TAF7L</i>	Homo sapiens TAF7-like RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 50kDa (TAF7L), transcript variant 1, mRNA [NM_024885]	Régulation de la spermiogenèse	Zhou <i>et al.</i> 2013
A.33_P3304322	<i>ZPBP</i>	zona pellucida binding protein [Source : HGNC Symbol; Acc : 15662] [ENST00000465922]	Participation à l'interaction spz-ovocyte	Lin <i>et al.</i> 2007
A.33_P3382217	<i>KIF3A</i>	PREDICTED : Homo sapiens kinesin family member 3A (KIF3A), transcript variant X3, mRNA [XM_006714526]	Structuration du flagelle spermatique	Lehti <i>et al.</i> 2013
A.23_P31626	<i>ODF1</i>	Homo sapiens outer dense fiber of sperm tails 1 (ODF1), mRNA [NM_024410]	Structuration du flagelle spermatique	Burmester et Hoyer-Fender. 1996
A.24_P307014	<i>BRD2</i>	Homo sapiens bromodomain containing 2 (BRD2), transcript variant 1, mRNA [NM_005104]	Remodelage de la chromatine	Jodar <i>et al.</i> 2012
Fonction des spermatozoïdes				
A.23_P11081	<i>AKAP4</i>	Homo sapiens A kinase (PRKA) anchor protein 4 (AKAP4), transcript variant 1, mRNA [NM_003886]	Régulation de la mobilité des spz	Miki <i>et al.</i> 2002
A.23_P314712	<i>CABYR</i>	Homo sapiens calcium binding tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated (CABYR), transcript variant 1, mRNA [NM_012189]	Implication dans la capacitation des spz	Naaby-Hansen <i>et al.</i> 2002
A.23_P18684	<i>CLGN</i>	Homo sapiens calmegin (CLGN), transcript variant 1, mRNA [NM_004362]	Régulation de la capacité fécondante des spz	Ikawa <i>et al.</i> 2011
A.33_P336083	<i>IQCF1</i>	Homo sapiens IQ motif containing F1, mRNA (cDNA clone IMAGE : 5266078), complete cds. [BC034228]	Implication dans la capacitation des spz	Fang <i>et al.</i> 2015

A_23_P27538	<i>CALR3</i>	Homo sapiens calreticulin 3 (CALR3), mRNA [NM_145046]	Régulation de la capacité fécondante des spz	Ikawa <i>et al.</i> 2011
A_23_P53039	<i>LDHC</i>	Homo sapiens lactate dehydrogenase C (LDHC), transcript variant 1, mRNA [NM_002301]	Implication dans la mobilité et la capacitation des spz	Goldberg <i>et al.</i> 2010

Tableau 13 – Gènes retrouvés dans les spermatozoïdes impliqués dans différents stades de la spermatogenèse. (Spz : spermatozoïdes).

D'autre part, des gènes pouvant avoir un rôle dans la fécondation et le développement embryonnaire selon la littérature ont été retrouvés dans les spermatozoïdes (Tableau 14). De plus, un grand nombre de ncARN (ARN non-codant) a été remarqué dans nos échantillons.

Sonde	Gène	Description	Rôle dans l'embryogenèse	Références
A_33_P3341499	<i>WNT5A</i>	Homo sapiens wingless-type MMTV integration site family, member 5A (WNT5A), transcript variant 1, mRNA [NM_003392]	Embryogenèse	Ostermeier <i>et al.</i> 2004, Krawetz 2005
A_23_P11081	<i>AKAP4</i>	Homo sapiens A kinase (PRKA) anchor protein 4 (AKAP4), transcript variant 1, mRNA [NM_003886]	Post-fécondation	Ostermeier <i>et al.</i> 2004, Krawetz 2005
A_23_P215913	<i>CLU</i>	Homo sapiens clusterin (CLU), transcript variant 1, mRNA [NM_001831]	Embryogenèse	Ostermeier <i>et al.</i> 2004, Krawetz 2005
A_32_P46981	<i>HSBP1L1</i>	Homo sapiens heat shock factor binding protein 1-like 1 (HSBP1L1), mRNA [NM_001136180]	Croissance embryonnaire	Krawetz 2005, Bonache <i>et al.</i> 2012, Fang <i>et al.</i> 2014
A_23_P205428	<i>FOXG1</i>	Homo sapiens forkhead box G1 (FOXG1), mRNA [NM_005249]	Embryogenèse	Ostermeier <i>et al.</i> 2004 Fang <i>et al.</i> 2014

A_33_P3321070	<i>WNT4</i>	wingless-type MMTV integration site family, member 4 [Source : HGNC Symbol ; Acc : 12783] [ENST00000415567]	Embryogenèse	Fang <i>et al.</i> 2014
A_33_P3316045	<i>INTS1</i>	Homo sapiens integrator complex subunit 1 (INTS1), mRNA	Croissance embryonnaire	Jodar <i>et al.</i> 2013
A_23_P150609	<i>IGF2</i>	Homo sapiens insulin-like growth factor 2 (somatomedin A) (IGF2), transcript variant 1, mRNA [NM_000612]	Facteur de transcription	Dadoune. 2009, Constancia <i>et al.</i> 2002
A_23_P68031	<i>STAT4</i>	Homo sapiens signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4), transcript variant 1, mRNA [NM_003151]	Facteur de transcription	Krawetz 2005
A_23_P366376	<i>TDGF1</i>	Homo sapiens teratocarcinoma-derived growth factor 1 (TDGF1), transcript variant 1, mRNA [NM_003212]	Facteur de transcription	Vassena <i>et al.</i> 2011
A_23_P204640	<i>NANOG</i>	Homo sapiens Nanog homeobox (NANOG), mRNA [NM_024865]	Facteur de transcription	Vassena <i>et al.</i> 2011
A_23_P401055	<i>SOX2</i>	Homo sapiens SRY (sex determining region Y)-box 2 (SOX2), mRNA [NM_003106]	Facteur de transcription	Vassena <i>et al.</i> 2011
A_24_P144601	<i>POU5F1</i>	Homo sapiens POU class 5 homeobox 1 (POU5F1), transcript variant 1, mRNA [NM_002701]	Facteur de transcription	Vassena <i>et al.</i> 2011

Tableau 14 – Gènes retrouvés dans les spermatozoïdes impliqués dans différents stades de la fécondation et le développement embryonnaire.

6.2. Comparaison du profil d'expression des gènes entre les échantillons de sperme frais et de sperme cryoconservé ayant un spermogramme normal

Le profil d'expression génétique entre 3 échantillons de sperme frais et 4 échantillons de sperme cryoconservé est comparé. Deux méthodes de correction multiparamétrique sont utilisées afin de donner une analyse fiable. Nous observons que les deux populations de spermatozoïdes ne partagent pas le même profil d'expression des gènes (Figure 48).

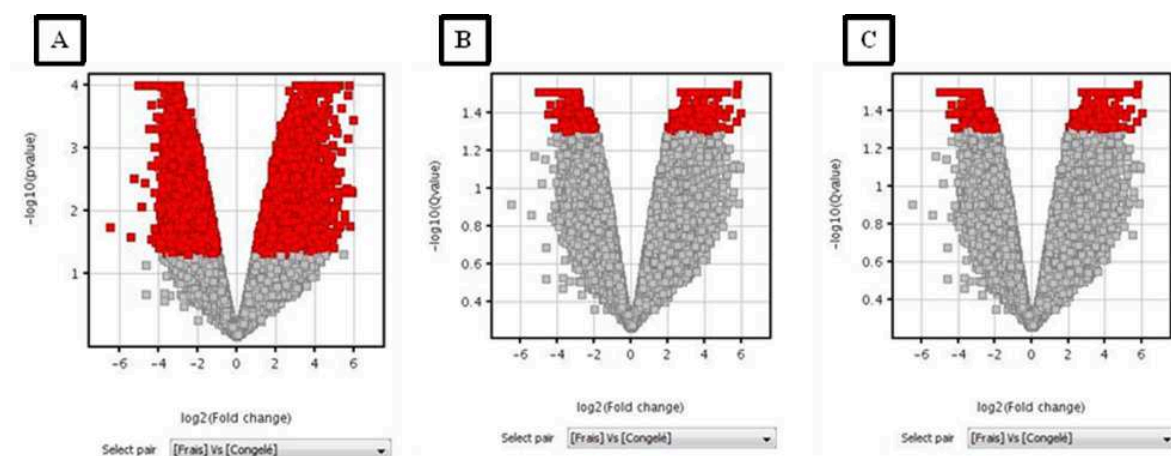


Figure 48 – Profil d’expression des gènes entre les échantillons ayant un spermogramme normal issus de sperme frais et de sperme cryoconservé sans correction multiparamétrique (A) et avec la correction “Storey with Bootstrapping” (B) et la correction “Storey with Curve Fitting” (C). Les points en rouge représentent des gènes qui sont significativement exprimés différemment entre les deux groupes ($p < 0,05$).

La comparaison des profils a permis d’identifier 288 gènes et 68 ncARN significativement sous-exprimés ($p < 0,05$) et 204 gènes et 80 ncARN surexprimés dans le sperme frais comparé au sperme cryoconservé. Parmi ces gènes, certains ont un rôle dans les différents processus de la spermatogenèse et de l’apoptose (Tableau 15).

Sonde	p-valeur	Gène	Description	Fonction
Sous-expression				
A_23_P500799	0,0009	<i>CASP6</i>	Homo sapiens caspase 6, apoptosis-related cysteine peptidase (CASP6), transcript variant alpha, mRNA [NM_001226]	Apoptose
A_23_P134814	0,0005	<i>THAP1</i>	Homo sapiens THAP domain containing, apoptosis associated protein 1 (THAP1), transcript variant 1, mRNA [NM_018105]	Apoptose
A_23_P104798	0,0006	<i>IL18</i>	Homo sapiens interleukin 18 (IL18), transcript variant 1, mRNA [NM_001562]	Cytokine pro-inflammatoire
A_24_P37441	0,0008	<i>PDK1</i>	Homo sapiens pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1 (PDK1), transcript variant 2, mRNA	Antioxydant

A.24_P304051	0,0009	<i>GSTO1</i>	Homo sapiens glutathione S-transferase omega 1 (GSTO1), transcript variant 1, mRNA	Antioxydant
A.23_P397208	0,0003	<i>GSTM2</i>	Homo sapiens glutathione S-transferase mu 2 (muscle) (GSTM2), transcript variant 1, mRNA [NM.000848]	Antioxydant
Sur-expression				
A.23_P165504	0,0001	<i>TNP1</i>	Homo sapiens transition protein 1 (during histone to protamine replacement) (TNP1), mRNA [NM.003284]	Remodelage de la chromatine
A.23_P339480	0.001	<i>HAT1</i>	Homo sapiens histone acetyltransferase 1 (HAT1), transcript variant 1, mRNA [NM.003642]	Assemblage de la chromatine
A.33_P3417944	0,0005	<i>HDAC11</i>	Homo sapiens histone deacetylase 11 (HDAC11), transcript variant 2, mRNA [NM.001136041]	Assemblage de la chromatine
A.24_P204214	0,0001	<i>NCOR1</i>	Homo sapiens nuclear receptor corepressor 1 (NCOR1), transcript variant 1, mRNA [NM.006311]	Répression transcriptionnelle
A.24_P82419	0,0004	<i>H3F3B</i>	Homo sapiens H3 histone, family 3B (H3.3B) (H3F3B), mRNA [NM.005324]	Transcription
A.23_P133814	0,0001	<i>HIST1H3C</i>	Homo sapiens histone cluster 1, H3c (HIST1H3C), mRNA [NM.003531]	Transcription
A.23_P100189	0,00008	<i>PRM1</i>	Homo sapiens protamine 1 (PRM1), mRNA [NM.002761]	Remodelage de la chromatine
A.33_P3358893	0.001	<i>PRM2</i>	Homo sapiens protamine 2 (PRM2), transcript variant 5, mRNA [NM.001286359]	Remodelage de la chromatine
A.32_P219660	0,001	<i>SPANXA1</i>	Homo sapiens sperm protein associated with the nucleus, X-linked, family member A1 (SPANXA1), mRNA [NM.013453]	Association avec le noyau spermatique
A.33_P3217364	0,0001	<i>SPATA31A3</i>	Homo sapiens SPATA31 subfamily A, member 3 (SPATA31A3), mRNA [NM.001083124]	Localisation dans l'acrosome

A_33_P3242609	0,0002	<i>SPATA31D1</i>	Homo sapiens SPATA31 subfamily D, member 1 (SPATA31D1), mRNA [NM_001001670]	Localisation dans l'acrosome
A_33_P3216819	0,001	<i>SPATA31D4</i>	Homo sapiens SPATA31 subfamily D, member 4 (SPATA31D4), mRNA [NM_001145197]	Localisation dans l'acrosome
A_23_P352389	0,0004	<i>SPATA32</i>	Homo sapiens spermatogenesis associated 32 (SPATA32), mRNA [NM_152343]	Localisation dans l'acrosome
A_33_P3227264	0,0001	<i>CDK11A</i>	Homo sapiens cyclin-dependent kinase 11A (CDK11A), transcript variant 1, mRNA	Contrôle du cycle cellulaire
A_33_P3313595	0,0004	<i>CDK11B</i>	Homo sapiens cyclin-dependent kinase 11B (CDK11B), transcript variant 3, mRNA [NM_033487]	Contrôle du cycle cellulaire
A_23_P89710	0,0001	<i>CEP192</i>	Homo sapiens centrosomal protein 192kDa (CEP192), mRNA [NM_032142]	Constitution du centrosome
A_24_P324814	0,0004	<i>CEP95</i>	Homo sapiens centrosomal protein 95kDa (CEP95), mRNA [NM_138363]	Constitution du centrosome
A_21_P0011355	0,0006	<i>GOLGA8K</i>	Homo sapiens golgin A8 family, member K (GOLGA8K), mRNA [NM_001282493]	Constitution de l'appareil de Golgi
A_21_P0011307	0,0003	<i>GOLGA8N</i>	golgin A8 family, member N [Source : HGNC Symbol; Acc : 44405] [ENST00000567075]	Constitution de l'appareil de Golgi

Tableau 15 – Gènes sous-exprimés et surexprimés dans les spermatozoïdes frais par rapport aux spermatozoïdes cryoconservés

6.3. Comparaison du profil d'expression des gènes entre les échantillons de sperme issus des patients asthénozoospermiques et des hommes ayant un spermogramme normal

L'expression des gènes entre les deux échantillons de sperme frais des patients ayant une asthénozoospermie (F3 et F6) par rapport aux trois échantillons de sperme frais des hommes présentant un spermogramme normal est comparée. Ces deux populations n'ont pas le même profil d'expression génétique (Figure 49). Par contre

le nombre d'échantillons asthénozoospermiques limité (2 échantillons) ne permet pas de réaliser une correction multiparamétrique. Les résultats devraient être interprétés prudemment. Il y a en effet 140 transcrits qui sont exprimés différemment entre les deux groupes. Parmi les transcrits sous-exprimés dans les spermatozoïdes des patients asthénozoospermiques par rapport aux hommes normaux, quelques gènes pourraient être impliqués dans la fertilité masculine : *SHBG*, *RBM5*, *DICER1*.

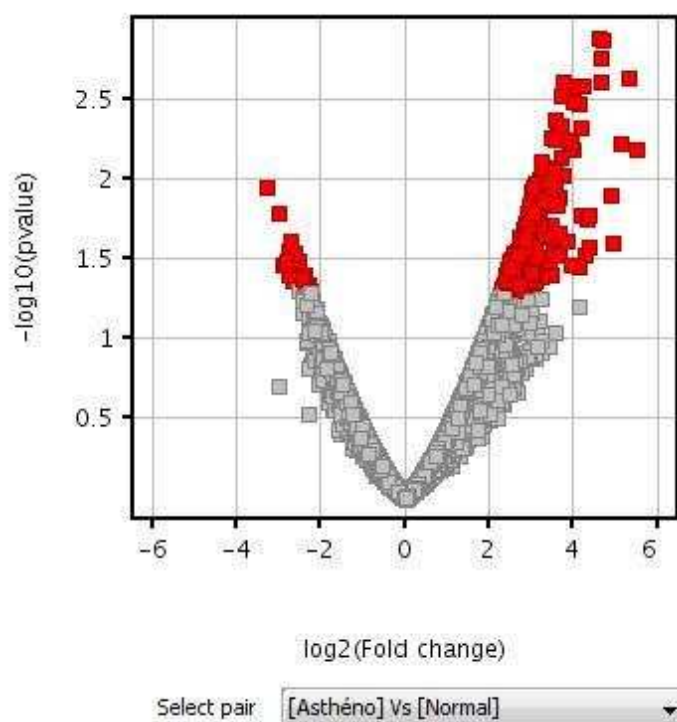


Figure 49 – Profil d'expression des gènes dans les gamètes des hommes ayant une asthénozoospermie par rapport à celui des hommes ayant un spermogramme normal sans correction multiparamétrique

4 Discussion

Plusieurs études du transcriptome dans les spermatozoïdes ont été menées afin d'étudier les facteurs génétiques affectant la fertilité (Platts *et al.* 2007, Garcia-Herrero *et al.* 2011, Jodar *et al.* 2012, Montjean *et al.* 2012, Bonache *et al.* 2012, Metzler-Guillemain *et al.* 2015). Ces études supposent une élimination complète des cellules somatiques présentes dans le sperme, une extraction optimale d'ARN ainsi que la vérification de sa pureté. Néanmoins, il n'existe pas aujourd'hui de consensus entre les méthodes utilisées. Dans notre étude sur la mise au point de l'étude du transcriptome, nous avons établi un protocole optimal permettant d'obtenir un profil transcriptomique représentatif de l'éjaculat initial à partir du sperme frais ou congelé.

1. Purification des spermatozoïdes à partir du sperme

Dans les études du transcriptome dans les spermatozoïdes, les auteurs ont envisagé différentes méthodes de purification des spermatozoïdes à partir du sperme. Certains utilisent le gradient de densités discontinues (Chen *et al.* 2010, Pacheco *et al.* 2011, Bonache *et al.* 2012, Goodrich *et al.* 2013) d'autres la lyse des cellules somatiques (Platts *et al.* 2007, Goodrich *et al.* 2007) ou l'association du gradient et de la lyse (Jodar *et al.* 2012) ou encore la combinaison du gradient et de la capacitation (swim-up) (Montjean *et al.* 2012). Chacune de ces méthodes développées montre une exclusion complète des cellules somatiques. Pourtant, aucune ne prend pas en compte la perte en spermatozoïdes. Quant à nous, nous voulons développer une méthode de purification des spermatozoïdes à partir du sperme éjaculé permettant d'éliminer totalement les cellules somatiques en gardant le plus possible de spermatozoïdes. Notre étude a été menée avec deux types de sperme : du sperme frais et du sperme congelé à -196°C .

Nous avons dans un premier temps étudié les différentes méthodes de purification décrites dans la littérature sur le sperme frais. Tout d'abord, le swim-up (ou la capacitation) a été envisagé pour 5 échantillons. Une perte complète des cellules somatiques a été remarquée par l'observation au microscope et la vérification par RT-PCR. Pourtant, nous n'avons récupéré qu'une petite proportion (10%) de

spermatozoïdes. De plus, les spermatozoïdes récupérés sont les plus mobiles; ils ne sont donc pas représentatifs de l'ensemble de spermatozoïdes initiaux. Cette méthode ne répond pas aux exigences et est donc rejetée.

Ensuite, la lyse des cellules somatiques par une solution hypotonique contenant 0,1% SDS, 0,5% Triton X-100 (Goodrich *et al.* 2007) a été testée sur 5 échantillons. Après 3 cycles de lyse de 30 minutes dans la glace, la présence des cellules somatiques est toujours remarquée par l'observation au microscope. Par ailleurs, les spermatozoïdes ont commencé à être lysés au bout du troisième cycle de lyse. Cela explique une perte importante en spermatozoïdes de 45,7% après les trois lyses. Il est donc évident qu'une lyse seule ne permet pas d'exclure toutes les cellules somatiques dans le sperme. Cette méthode seule n'est pas considérée comme efficace dans la purification des spermatozoïdes.

Le gradient de densités discontinues est une méthode courante utilisée en AMP et un grand nombre d'études transcriptomiques dans les spermatozoïdes utilise cette technique afin de récupérer les spermatozoïdes. Nous avons commencé par le gradient de densités discontinues 80%-40% avec deux vitesses de centrifugation à 500g et à 900g pendant 20 minutes. La perte en spermatozoïdes en moyenne est de 49% et de 44,5% correspondant respectivement à la vitesse de centrifugation à 500g et à 900g. L'observation au microscope révèle la présence des cellules somatiques. Le gradient de densités discontinues 80%-40% avec deux vitesses de centrifugation ne nous satisfait pas. Ainsi, nous avons testé le gradient de densités discontinues 90%-47,5%. Les résultats préliminaires nous permettent de commencer le test avec la vitesse de centrifugation à 900g. La perte en spermatozoïdes est visiblement baissée à 36,5% avec ce gradient. La vitesse de centrifugation est ensuite augmentée à 1000g permettant de diminuer la perte en spermatozoïdes jusqu'à 26,6%. L'absence des cellules somatiques a été confirmée par l'observation au microscope pour la plupart des cas. Pourtant lors de la révélation par RT-PCR, une contamination par ces cellules a été affirmée. L'utilisation du gradient de densités discontinues seul ne permet pas d'exclure complètement les cellules somatiques dans le sperme.

Nous avons associé le gradient de densités discontinues et la lyse des cellules somatiques. Nous avons récupéré 65,2% des spermatozoïdes en éliminant 99,2% des cellules somatiques. Les résultats suggèrent que les échantillons présentant une quantité initiale de plus de trois millions de cellules somatiques ne pourraient pas être purifiés. Il est donc important de sélectionner les échantillons selon le nombre des cellules rondes présentes avant la manipulation.

Nous avons réalisé la lyse des cellules somatiques et le gradient de densités discontinues séparément sur les échantillons de sperme congelé. Les résultats montrent qu'une seule méthode ne permet pas de purifier le sperme. Il est donc important d'associer ces deux méthodes afin d'obtenir une purification complète. Nous avons réussi à récupérer 73,2% des spermatozoïdes en éliminant 97,4% des cellules somatiques dans le sperme. Il est impossible d'exclure toutes les cellules somatiques si la quantité initiale de ces cellules est supérieure à 3,3 millions.

Récemment, une étude de Mao *et al.* (2013) a montré que l'utilisation du gradient PureSperm permet de récupérer 63,2% des spermatozoïdes et que la lyse des cellules somatiques permet de récupérer 87,2% des spermatozoïdes. Cependant, ils n'ont pas mentionné la perte en cellules somatiques après chaque technique (Mao *et al.* 2013). Quant à notre étude, nous avons montré qu'avec une seule méthode soit le gradient de densités discontinues soit la lyse des cellules somatiques, la purification des spermatozoïdes n'est pas complète. Or, plusieurs auteurs utilisent uniquement la lyse (Ostermeier *et al.* 2005, Goodrich *et al.* 2007, Linschoosten *et al.* 2009, Platts *et al.* 2007) ou le gradient de densités discontinues (Cappallo-Obermann *et al.* 2011, Goodrich *et al.* 2013, Bonache *et al.* 2012) comme méthode de purification. Nous avons développé une méthode optimale pour la purification des spermatozoïdes à partir du sperme frais ou congelé en associant le gradient de densités discontinues et la lyse des cellules somatiques. Cette méthode permet de récupérer 65,2% et 73,2% des spermatozoïdes à partir du sperme frais et congelé, respectivement. Plus intéressant, les spermatozoïdes éliminés présentent une hétérogénéité de morphologie comparable au spermocytogramme initial. Cette observation permet d'être certain que la population de spermatozoïdes est représentative de l'échantillon initial. De plus, nous avons également déterminé le critère d'exclusion des échantillons du sperme frais et congelé qui présentent plus de 3 millions et plus de 3,3 millions des cellules somatiques, respectivement. Ce critère permet d'inclure plus d'échantillons dans l'étude du transcriptome que ceux de la littérature (les échantillons présentant plus d'un million de cellules somatiques sont exclus) (Lambard *et al.* 2004).

2. Extraction d'ARN spermatiques

Le kit d'extraction d'ARN de Qiagen est utilisé couramment dans l'étude du transcriptome des spermatozoïdes (Jodar *et al.* 2012, Cappallo-Obermann *et al.* 2011, Goodrich *et al.* 2013, Mao *et al.* 2013). Nous avons comparé le rendement d'extraction

(ng d'ARN/ 10^6 spermatozoïdes) du kit Qiagen (RNeasy Plus Mini Kit) avec celui du kit Marcherey-Nagel (NucleoSpin RNA XS). Un rendement plus important a été remarqué par l'extraction d'ARN avec le kit Marcherey-Nagel en comparaison du kit Qiagen. En effet, pour le sperme frais, l'extraction d'ARN est deux fois plus efficace avec le kit Marcherey-Nagel qu'avec le kit Qiagen. Quant aux échantillons de sperme congelé, le rendement d'extraction est dix fois plus élevé avec le kit Marcherey-Nagel qu'avec le kit Qiagen. L'efficacité du kit Marcherey-Nagel peut s'expliquer par l'ajout d'autres solutions lors de la lyse cellulaire, ce sont le "TCEP" et le "Carrier RNA". En fait, le "TCEP" permet d'inactiver les RNases et donc de protéger les ARN spermatiques de la dégradation par les RNases. Le "Carrier RNA" permet d'augmenter la quantité et la qualité des ARN extraits (Kildemo. 2012). Nous avons donc choisi cette méthode d'extraction des ARN spermatiques pour les expériences en aval.

La quantité d'ARN spermatique extrait par le kit Marcherey-Nagel est en moyenne de 47,8 ng/ 10^6 spermatozoïdes et de 43,2 ng/ 10^6 spermatozoïdes avec des spermatozoïdes frais et congelés, respectivement. Il est vraisemblable que la méthode de conservation du sperme n'affecte ni la quantité ni la qualité des ARN spermatiques. De plus, le rendement d'extraction est dans la norme selon la littérature (Goodrich *et al.* 2007, Cappallo-Obermann *et al.* 2011, Mao *et al.* 2013).

3. Evaluation de la pureté des ARN spermatiques

Pour les échantillons présentant des cellules somatiques observées au microscope après la purification, la contamination a été affirmée par RT-PCR et le Bioanalyzer 2100. En fait, la présence des amorces de CD45, C-Kit et E-Cadhérine lors de la révélation par RT-PCR et la présence des pics correspondant aux ARN ribosomiques lors du Bioanalyzer 2100 sont constatées. Ces échantillons sont utilisés comme des témoins positifs.

Quant aux échantillons qui ne présentent pas de cellules somatiques au microscope, un certain nombre entre eux présente une contamination détectée par RT-PCR et par le Bioanalyzer 2100. Or, certains auteurs utilisent l'observation au microscope comme seul moyen d'évaluation de la pureté du sperme (Garcia-Herrero *et al.* 2011). Nos résultats suggèrent que la vérification de la pureté des ARN spermatiques par les techniques moléculaires est indispensable et obligatoire.

Plus intéressant, nous avons remarqué que les résultats obtenus par RT-PCR sont bien corrélés avec ceux obtenus par le Bioanalyzer 2100. En fait, quelques auteurs

ont utilisé ces deux méthodes pour la vérification de la pureté des ARN spermatiques (Jodar *et al.* 2012). La double vérification demande une quantité d'ARN suffisante. Nos résultats suggèrent que l'utilisation de l'une des deux méthodes pour évaluer la pureté des ARN, soit la RT-PCR soit le Bioanalyzer 2100, est largement suffisante et peut donner des résultats fiables. Par les études en aval, nous évaluerons la pureté des ARN spermatiques avec la Bioanalyzer 2100 car cette méthode est moins consommatrice d'ARN que la RT-PCR ($1,2\mu\text{l}$ d'ARN *vs* $10\mu\text{l}$ d'ARN).

4. Validation et analyse des données de microarray

4.1. Validation de base des données de microarray

Au niveau technique, nous avons réussi à hybrider nos 15 échantillons de sperme (1 témoin issu du tissu somatique) sur deux puces à ARN. Lors de l'analyse des données, 6 échantillons ne sont pas de bonne qualité pour exploiter l'expression des gènes. Ces 6 échantillons sont hybridés avec pour objectif de savoir s'il est possible d'abaisser la quantité des ARNc marqués et la spécificité du marquage par rapport à ce que les fournisseurs recommandent. Vu que la quantité des ARN spermatiques est faible, si les échantillons ayant un peu moins de rendement des ARNc marqués peuvent être hybridés avec succès sur les puces à ARN, nous pourrions avoir plus d'échantillons à étudier. Ce n'est malheureusement pas le cas. Il est donc recommandé de n'hybrider sur microarray que les échantillons ayant une quantité d'ARNc d'au moins $0,825\ \mu\text{g}$ et une activité spécifique d'au moins de $6\ \text{pmol Cy3}/\ \mu\text{g}$ d'ARNc.

L'analyse du profil d'expression génétique dans nos 7 échantillons ayant un spermogramme normal révèle 27 784 transcrits présents dans les spermatozoïdes humains. Ce résultat est en accord avec celui trouvé dans la littérature (Zhao *et al.* 2006, Sendler *et al.* 2013, Fang *et al.* 2014). Nous avons trouvé 90% des gènes concordants avec la liste des 1000 gènes les plus exprimés dans les spermatozoïdes selon Sendler *et al.* (Sendler *et al.* 2013) Des gènes spécifiques des spermatozoïdes comme : *PRM1*, *PRM2*, *TNP1*, *TNP2* (Ostermeier *et al.* 2005, Lalancette *et al.* 2009) ont été bien identifiés dans nos échantillons. Ces gènes codent des protéines qui sont essentielles dans le remodelage de la chromatine spermatique lors de la spermiogenèse. En effet, les histones sont temporairement remplacées par les protéines de transition puis définitivement par les protamines. La perturbation de l'expression de ces gènes est liée strictement à l'infertilité masculine (Zhao *et al.* 2001, Dadoune. 2009, Jodar *et al.*

2012).

La présence des gènes impliqués dans les différents stades de la spermatogenèse a été mise en évidence dans les spermatozoïdes matures (Tableau 12). Plusieurs gènes sont impliqués dans la préméiose de la spermatogenèse. Le gène *DAZL* joue un rôle dans la formation des cellules germinales primordiales, tandis que le gène *DAZ* promeut des stades ultérieurs de la méiose et le développement des gamètes haploïdes (Kee *et al.* 2009). La protéine Spo11 et la protéine HspA2 ont un rôle dans la formation du complexe synaptonémal et le désynapsis, respectivement. Chez la souris, la perturbation de ces gènes peut provoquer l'arrêt à la prophase I de la méiose (Smirnova *et al.* 2006, Dix *et al.* 1997). Concernant les modifications post-méiotiques, plusieurs gènes impliqués dans la différenciation des spermatides et dans la régulation génétique sont présents dans nos échantillons. En effet, les gènes *BRWD1* et *TAF7L* sont impliqués dans la spermatogenèse. La perturbation de l'expression de ces gènes n'affecte pas la division méiotique mais la spermiogenèse. En fait, ces gènes régulent la transcription des gènes post-méiotiques qui sont impliqués dans la formation du flagelle, l'organisation de la chromatine spermatique et la mobilité des spermatozoïdes (Pattabirama *et al.* 2014, Zhou *et al.* 2013). Les gènes *ODF1*, *KIF3A* qui jouent un rôle essentiel dans la formation du flagelle sont retrouvés dans les spermatozoïdes (Burmester et Hoyer-Fender. 1996, Lehti *et al.* 2013). De plus, le gène *ZPBP* code des protéines participant à la formation de l'acrosome et donc affecte l'interaction avec la zone pellucide lors de la pénétration des spermatozoïdes dans l'ovocyte. Chez les souris, l'extinction de l'expression de ce gène provoque l'infertilité à cause de la fragmentation de l'acrosome et la diminution de la capacité de pénétration dans la zone pellucide des spermatozoïdes (Lin *et al.* 2007). Le gène *ZPBP* est retrouvé également dans les spermatozoïdes.

D'ailleurs, plusieurs gènes ayant un rôle dans le fonctionnement des spermatozoïdes sont également identifiés dans nos échantillons (Tableau 13). Les spermatozoïdes passent à travers le tractus génital féminin, ils subissent une série de modifications biochimiques et biologiques comme la capacitation permettant aux spermatozoïdes d'avoir la capacité de féconder l'ovocyte. Les protéines impliquées dans le processus de capacitation et la réaction acrosomale des spermatozoïdes sont nombreuses : CABYR, CLGN, CALR3, LDHC. Le dysfonctionnement des gènes codant ces protéines peut entraîner une infertilité à cause d'une mauvaise capacitation et d'une incapacité des spermatozoïdes à féconder (Naaby-Hansen *et al.* 2002, Ikawa *et al.* 2011, Goldberg *et al.* 2010, Fang *et al.* 2015). La présence des gènes spécifiques des différentes lignées

cellulaires dans les spermatozoïdes matures permet d'étudier les événements intervenus pendant la spermatogenèse (Ostermeier *et al.* 2002).

Plus intéressant, nous avons remarqué dans nos échantillons des gènes impliqués dans le développement embryonnaire (Tableau 14). En fait, des gènes liés à la pluripotence depuis l'étape de deux cellules jusqu'au stade de la morula comme : *TDGF1*, *NANOG*, *SOX2*, *POU5F1*, *STAT4* (Dadoue. 2009, Vassena *et al.* 2011) sont retrouvés dans les spermatozoïdes. Les protéines issues de ces gènes sont des facteurs de transcription qui régulent la division et la prolifération cellulaire. Parmi les transcrits spermatiques caractérisés par microarray ayant un rôle dans l'embryogenèse précoce, six candidats, révélés par RT-PCR, sont présents dans les spermatozoïdes mais absents dans les ovocytes non fécondés (Ostermeier *et al.* 2004). Ce sont *CLU*, *AKAP4*, *PRM2*, *HSPB1*, *FOXG1*, *WNT5A*. Ces transcrits ont été identifiés également dans nos échantillons. En effet, la protéine FOXG1 est très importante pour la structuration précoce de l'embryon, tandis que la protéine WNT5A est impliquée dans la différenciation cellulaire associée à la morphogenèse embryonnaire (Krawetz. 2005, Dadoue. 2009). Les transcrits *WNT4*, *FOXG1* sont détectés au stade d'une cellule et deux cellules du zygote et sont délivrés par le spermatozoïde (Fang *et al.* 2014). La protéine WNT4 joue un rôle essentiel dans la signalisation de la progestérone lors de l'implantation embryonnaire et la décidualisation (Franco *et al.* 2011). Un certain nombre d'ARNm délivrés par les spermatozoïdes sont traduits dans l'ovocyte fécondé et pourraient avoir un rôle dans les premiers stades du développement embryonnaire (Ostermeier *et al.* 2004, Krawetz. 2005, Fang *et al.* 2014).

4.2. Comparaison du profil d'expression des gènes entre les échantillons de sperme frais et de sperme cryoconservé chez des patients ayant un spermogramme normal

Le profil d'expression des gènes entre 3 échantillons de sperme frais et 4 échantillons de sperme cryoconservé issus d'hommes ayant un spermogramme normal a été comparé par microarray. Nous avons observé que les spermatozoïdes frais n'ont pas le même profil d'expression génétique que les spermatozoïdes congelés. En effet, 492 gènes sont exprimés différemment entre les deux groupes. Les auteurs ont remarqué qu'il y a moins de transcrits détectés, par microarray, dans les spermatozoïdes congelés que dans les spermatozoïdes frais (Garcia-Herrero *et al.* 2011). Dans les deux groupes d'échantillons, des voies métaboliques sont révélées : les marqueurs épigénétiques

(*PRM1*, *PRM2*), l'apoptose (*CASP6*, *THAP1*) et les antioxydants (*PDK1*, *GSTO1*, *GSTM2*). En fait, le ratio anormal de P1/P2 est lié à une condensation chromatinienne anormale qui augmente la fragmentation de l'ADN spermatique (Castillo *et al.* 2011). Les gènes *PRM1* et *PRM2* sont sous-exprimés dans les spermatozoïdes des hommes infertiles en comparaison avec ceux des hommes fertiles (Jodar *et al.* 2012, Montjean *et al.* 2012). Nous avons trouvé que l'expression des transcrits *PRM1*, *PRM2* est diminuée significativement dans les spermatozoïdes congelés par rapport aux spermatozoïdes frais. Les mêmes résultats ont été présentés dans une étude sur les spermatozoïdes frais et congelés du cochon (Zeng *et al.* 2014). Ces résultats montrent que la cryoconservation, en quelque sorte, peut produire une fragmentation de l'ADN spermatique (Zeng *et al.* 2014). Plus intéressant, les gènes impliqués dans l'apoptose comme *CASP6* et *THAP1* et le gène codant la cytokine pro-inflammatoire *IL18* sont surexprimés dans les spermatozoïdes congelés. L'inflammation et l'apoptose pourraient être déclenchées par les procédures de congélation-décongélation. L'augmentation du niveau d'expression des transcrits antioxydants dans les spermatozoïdes congelés pourrait être un mécanisme de compensation des spermatozoïdes afin de se protéger eux-mêmes des stress oxydatifs.

Les gènes *SPATA* localisés au niveau de l'acrosome semblent avoir un rôle dans la fertilité. En effet, la perturbation du gène *SPATA31* est liée à l'infertilité masculine (Wu *et al.* 2015). Dans notre étude, les gènes *SPATA31* et *SPATA32* sont surexprimés dans les spermatozoïdes frais. D'autres gènes codant des protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire (*CDK11A*, *CDK11B*) ou constituantes du centrosome (*CEP192*, *CEP95*) et de l'appareil de Golgi (*GOLGA8K*, *GOLGA8N*) sont aussi surexprimés. Ces transcrits pourraient avoir un rôle dans l'infertilité.

Nos résultats et ceux de Garcia-Herrero *et al* montrent bien que les échantillons de sperme congelé ne pourraient pas être considérés comme la reproduction parfaite des échantillons de sperme frais car la procédure de cryoconservation des spermatozoïdes affecte le profil d'expression génétique (Garcia-Herrero *et al.* 2011). Toutefois, nous avons étudié un nombre limité d'échantillons, les résultats devraient être interprétés avec précaution. Il est nécessaire d'augmenter le nombre d'échantillons de sperme frais et congelé pour une interprétation plus fiable. Il faudrait aussi envisager une comparaison entre le sperme frais et le sperme congelé chez un même homme afin de s'affranchir des variations interindividuelles.

4.3. Comparaison du profil d'expression des gènes entre les échantillons de sperme issu des patients asthénozoospermiques et des hommes ayant un spermogramme normal

Seulement deux échantillons de sperme issu d'hommes présentant une asthénozoospermie sont comparés à des échantillons de sperme issu d'hommes ayant un spermogramme normal. Le nombre d'échantillons limite ne permet pas de réaliser une correction multiparamétrique, ainsi l'interprétation des résultats doit être faite avec précaution.

Nous avons remarqué que le profil d'expression des gènes entre les deux groupes n'est pas identique. Quelques gènes impliqués dans la spermatogenèse présentent une expression différente entre les deux groupes comme : *SHBG*, *RBM5*, *DICER1*. En fait, la protéine SHBG possède une grande affinité avec les hormones œstradiol et testostérone. La présence du transcrite *SHBG* a été mise en évidence dans le testicule et dans les spermatozoïdes (Selva *et al.* 2005). De plus, les auteurs ont trouvé que l'expression de *SHBG* est moins élevée dans les spermatozoïdes ayant une mobilité réduite que dans les spermatozoïdes ayant une bonne mobilité (Selva *et al.* 2005). Nous avons remarqué une sous-expression du transcrite *SHBG* dans les échantillons de sperme asthénozoospermique par rapport aux échantillons de sperme normal. L'épissage alternatif qui se produit au sein des régions codant des protéines peut conduire la production de multiples isoformes de protéine à partir d'un seul gène. Le contrôle précis de l'épissage alternatif est crucial pour la spermiogenèse et la protéine RBM5 est un régulateur d'épissage essentiel dans les spermatides rondes (OBryan *et al.* 2013). La perturbation de l'expression du gène *RBM5* est associée à la malformation du flagelle, de l'acrosome (OBryan *et al.* 2013). Il est donc logique de trouver que le transcrite *RBM5* est sous-exprimé dans les spermatozoïdes issus des hommes asthénozoospermiques par rapport aux spermatozoïdes issus des hommes normaux.

Les micro-ARNs (miARNs) dont font partie les ncARNs sont impliqués dans la régulation de l'expression des ARNm par l'inhibition ou l'activation de la traduction ou le ciblage des ARNm pour la dégradation. Les miARNs jouent un rôle très important dans la régulation de la spermatogenèse (Papaioannou et Nef. 2010). La protéine DICER1 est essentielle pour le développement des miARNs. La présence de *DICER1* et des miARNs est cruciale pour la spermatogenèse (Maatouk *et al.* 2008, Romero *et al.* 2011). Dans cette étude, nous avons remarqué que l'expression du *DICER1* est

moins élevée dans les échantillons de sperme d'hommes asthénozoospermiques que dans les échantillons de spermes normaux. Il a été montré chez la souris que les spermatozoïdes dans lesquels *DICER1* est manquante, présentent quelques anomalies liées au flagelle. Les spermatozoïdes chez ces souris présentent des angulations du flagelle et des restes cytoplasmiques (Maatouk *et al.* 2008). Ainsi, la perturbation de l'expression de *DICER1* et des miARNs provoque des défauts morphologiques qui affectent la maturation et la mobilité des spermatozoïdes (Maatouk *et al.* 2008).

1. Préparation de l'ARN spermatique humain pour l'étude du transcriptome

Minh Huong NGUYEN, Aurore PERRIN, Nathalie DOUET-GUILBERT, Véronique AMICE, Frédéric MOREL, Marc DE BRAEKELEER, "*Préparation de l'ARN spermatique humain pour l'étude du transcriptome*". Congrès FFER (Fédération Française d'Etude de la Reproduction) 2013 à Rouen.

Résumé

Les ARNm sont le reflet des événements intervenus lors de la spermatogenèse. L'analyse des ARNm spermatiques, considérée comme moyen d'étude des gènes exprimés pendant la spermatogenèse, s'avère difficile à cause d'une faible quantité d'ARNm dans les spermatozoïdes et de la présence des cellules riches en ARN dans le sperme. L'objectif de ce travail est d'optimiser les méthodes de séparation des spermatozoïdes à partir d'un prélèvement de sperme afin d'obtenir un échantillon d'ARN spermatique le plus représentatif possible.

Nous avons étudié la purification des spermatozoïdes à partir du sperme par le gradient 90%-47,5% et 80%-40% en variant la vitesse de centrifugation (500g, 900g et 1000g). Une étape de lyse des cellules somatiques est suivie par l'ajout d'une solution hypotonique contenant 0,1% SDS et 0,5% Triton X-100. L'ARN spermatique total est extrait par le kit Plus RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). La pureté d'ARN spermatique est vérifiée par RT-PCR avec des amorces CD45, E-Cadhérine, C-Kit (spécifique des leucocytes, des cellules épithéliales et des cellules germinales, respectivement) et Protamine 2 (spécifique des spermatozoïdes).

Les résultats obtenus montrent que l'utilisation du gradient 90%-47,5% associée à une centrifugation de 1000g permet de récupérer le plus de spermatozoïdes. La quantité d'ARN extrait selon les échantillons varie de 2,4ng à 13,2ng pour un million de spermatozoïdes. L'absence des amplicons correspondants à CD45, E-Cadhérine et

C-kit ainsi que la présence de la Protamine 2 à 149pb mais non à 310pb assure la pureté de nos ARN spermatiques. La purification des spermatozoïdes par le gradient 90%-47,5% suivi d'une lyse permet de récupérer le maximum de spermatozoïdes. La quantité et la qualité des ARN spermatiques dans nos échantillons sont suffisantes pour passer à la puce à ARN.

2. Etude du transcriptome dans les spermatozoïdes humains

Marion FLODROPS, Minh Huong NGUYEN, Aurore PERRIN, Nathalie DOUET-GUILBERT, Audrey BASINKO, Marie-Josée LE BRIS, Marc DE BRAEKELEER, Frédéric MOREL, *“Etude du transcriptome dans les spermatozoïdes humains”*. Congrès FFER (Fédération Française d'Etude de la Reproduction) 2014 à Paris.

Résumé

Les ARNm dans les spermatozoïdes sont une réplique des gènes qui sont à l'état actif dans les différentes cellules de la lignée germinale. L'étude du transcriptome dans les spermatozoïdes peut donc aider à identifier les mécanismes sous-jacents aux anomalies révélées par le spermogramme, le spermocytogramme, la FISH et la technique TUNEL. L'analyse du transcriptome dans les spermatozoïdes s'avère difficile. En effet, toutes les cellules rondes présentes dans le sperme doivent être éliminées afin d'obtenir de façon exclusive les ARN des spermatozoïdes. De plus, les ARN spermatiques sont en très faible quantité. Le but de ce travail est de mettre au point une technique d'étude du transcriptome des spermatozoïdes humains.

Les échantillons de sperme cryoconservé sont recrutés dans cette étude. Pour la séparation des spermatozoïdes à partir du sperme, trois méthodologies ont été testées : la lyse contenant du SDS et du Triton X-100, le gradient de densité 90%-47,5% et la combinaison de ces deux méthodes. L'extraction des ARN spermatiques a été faite par deux kits d'extraction différents : RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) et NucleoSpin RNA XS (Macherey-Nagel). La pureté des échantillons a été vérifiée par RT-PCR et par Bioanalyzer 2100. Le marquage et l'hybridation sur microarray de 8 spermes de patients normozoospermiques ont été effectués.

Les résultats obtenus indiquent que l'utilisation de la lyse seule ou du gradient de densité seul ne permet pas d'obtenir des échantillons purs de spermatozoïdes. Ainsi la combinaison du gradient de densité 90%-47,5% avec une centrifugation de 1000g suivi d'une lyse de 20 minutes est nécessaire afin d'éliminer toutes les cellules rondes.

Les rendements d'extraction avec le kit RNeasy Plus Mini et le kit NucleoSpin RNA XS vont, respectivement, de 0 à 13,4 ng/10⁶ spermatozoïdes et de 12,4 à 69,1 ng/10⁶ spermatozoïdes. Concernant la vérification de la pureté par RT-PCR ou Bioanalyzer 2100, les résultats sont concordants. Les données obtenues après interprétation de la micropuce permettront de constituer notre groupe témoin. Nous avons réussi à mettre au point une technique fiable d'étude du transcriptome dans les spermatozoïdes.

3. Sperme frais versus sperme cryoconservé : Analyse transcriptomique des spermatozoïdes humains.

Minh Huong Nguyen, Aurore Perrin, Damien Beauvillard, Véronique Amice, Frédéric Morel, Marc De Braekeleer, "*Sperme frais versus sperme cryoconservé : Analyse transcriptomique des spermatozoïdes humains*". Congrès FFER (Fédération Française d'Etude de la Reproduction) 2015 à Montpellier (soumis).

Résumé

Depuis son introduction en 1992, l'injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde (ICSI) est devenue le traitement de choix de l'infertilité masculine. Les spermatozoïdes contiennent une population riche d'ARN dont certains sont le reflet de la spermiogenèse et spermatogenèse et d'autres impliqués dans le processus de fécondation et du développement embryonnaire précoce. L'analyse transcriptomique des spermatozoïdes d'hommes infertiles a montré des différences dans l'expression de plusieurs ARN par rapport à ceux d'hommes fertiles. De même, la comparaison des profils d'expression des spermatozoïdes ayant engendré ou non une grossesse montre des différences selon les techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP) utilisée. Par contre, à notre connaissance, aucune étude n'a comparé les profils transcriptomiques des spermatozoïdes issus de sperme frais et de sperme cryoconservé.

Nous avons isolé les ARN spermatiques de 3 échantillons de sperme frais et de 4 échantillons de sperme cryoconservé d'hommes ayant un spermogramme et un spermocytogramme normaux. La purification des spermatozoïdes a été réalisée par une combinaison du gradient de densité 90%-47,5% avec centrifugation à 1000g pendant 20 minutes suivie d'une lyse des cellules somatiques par une solution hypotonique dans la glace pendant 20 minutes. Le kit NucleoSpin RNA XS (Marcherey-Nagel) a été utilisé pour extraire les ARN spermatiques. La pureté des ARN spermatiques a ensuite été évaluée par le Bioanalyzer 2100. L'hybridation a été faite sur des puces SurePrint

G3 Human GE 8x60K V2 (Agilent Technologies) et l'analyse en utilisant le logiciel GeneSpring GX version 12.5 (Agilent) en collaboration avec la plate-forme génomique et transcriptomique de l'UMR_S.910 (Marseille).

La comparaison des profils a permis d'identifier 288 gènes et 68 "long non-coding" (linc) ARN significativement sous-exprimés ($p < 0,05$) dans le sperme frais comparé au sperme cryoconservé. Parmi ces gènes, nous notons *CASP6* et *THAP1* (impliqués dans l'apoptose), *IL18* (cytokine pro-inflammatoire), *PDK1*, *GSTO1* et *GSTM2* (impliqués dans le processus antioxydant en réponse au stress oxydatif). Deux cents quatre gènes et 80 linc ARN sont surexprimés dans le sperme frais comparé au sperme cryoconservé. Parmi ces gènes, nous notons *TNP1* (protéine remplaçant les histones au stade spermatide), *HAT1*, *HDAC11* et *NCOR1* (impliqués dans l'assemblage de la chromatine et la répression transcriptionnelle), *H3F3B* et *HIST1H3C* (protéines appartenant toutes deux à la famille des histones H3 et présentes dans des régions permettant la transcription), *PRM1* et *PRM2* (protamines), *SPANX5* (appartenant à la famille des protéines SPANX associée au noyau des spermatozoïdes matures), *SPATA31* et *SPATA32* (localisés au niveau de l'acrosome). D'autres gènes codant des protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire (*CDK11A* et *CDK11B*) ou constituantes du centrosome (*CEP192* et *CEP95*) et de l'appareil de Golgi (*GOLGA8K* et *GOLGA8N*) sont aussi surexprimés.

Cette étude a permis d'identifier des différences d'expression d'un certain nombre de gènes et linc ARN entre sperme frais et cryoconservé. Cependant, cette analyse réalisée dans le cadre de la mise au point de la technique du transcriptome sur spermatozoïdes, souffre de deux écueils. D'une part, elle ne concerne qu'un petit nombre d'hommes et, d'autre part, les échantillons de sperme frais et cryoconservé ne sont pas issus des mêmes hommes. Cette étude exploratoire doit être confirmée par d'autres études portant sur un plus grand nombre d'hommes et appariant les échantillons. Il n'en demeure pas moins que si ces résultats devaient être confirmés ils pourraient avoir un impact sur la prise en charge des couples en AMP.

Conclusion générale et perspectives

A. Etude de la ségrégation méiotique et de la fragmentation de l'ADN spermatique dans les gamètes d'hommes infertiles porteurs d'une anomalie chromosomique

L'étude de l'équipement chromosomique par la technique FISH et de la fragmentation de l'ADN par la technique TUNEL dans les spermatozoïdes est devenue courante au laboratoire de Cytogénétique. Par ces deux techniques, nous avons évalué le taux des gamètes chromosomiquement anormaux et le taux des gamètes avec un ADN fragmenté chez les patients présentant un caryotype anormal.

Chez un patient présentant un marqueur chromosomique surnuméraire ayant pour origine le chromosome 22, 15,6% des spermatozoïdes déséquilibrés contenant le MCS ont été trouvés, ce qui est beaucoup plus faible que la distribution théorique (50%). Ce résultat pourrait être expliqué par la présence de mosaïque dans les cellules germinales ou un mécanisme d'élimination du MCS pendant la méiose. De plus, le taux de disomie des chromosomes 13 et 21 chez ce patient est significativement plus élevé que dans le groupe témoin. Un effet inter-chromosomique a été suggéré afin d'expliquer les résultats. L'ICSI a été proposée au couple et un enfant sans malformations est né.

Nous avons étudié trois patients présentant une mosaïque gonosomique incluant la lignée 45,X. Une proportion des aneuploïdies des chromosomes sexuels et autosomiques ainsi que le taux de fragmentation de l'ADN spermatique chez les trois hommes sont légèrement plus élevés que le groupe témoin. Deux patients ont un spermogramme normal et sont pères naturellement tandis qu'un patient a une OAT sévère. L'étude de

la mosaïque dans les tissus testiculaires pourrait donner des explications à l'infertilité, malheureusement nous n'avons pas pu la réaliser. Les hommes infertiles porteurs d'une mosaïque gonosomique peuvent bénéficier d'une prise en charge en AMP suivie d'un diagnostic prénatal.

Concernant les 11 patients porteurs d'une anomalie chromosomique de structure, nous avons analysé l'équipement chromosomique de chaque gamète et l'état de son ADN. Le taux de gamètes chromosomiquement déséquilibrés et le taux de fragmentation de l'ADN spermatique sont plus élevés chez les patients par rapport au groupe témoin. Plus précisément, nos résultats indiquent que les gamètes chromosomiquement déséquilibrés ont un ADN plus fragmenté que ceux dont l'équipement chromosomique est normal ou équilibré. Ces résultats sont supportés par la théorie de l'apoptose abortive. En effet, les gamètes chromosomiquement déséquilibrés devraient être éliminés par apoptose lors du passage au point de contrôle de la méiose I. Mais il est possible que certains d'entre eux aient réussi à échapper à ce processus pendant la spermatogenèse tout en présentant des marqueurs apoptotiques, telle que la fragmentation de l'ADN. Ils ont pu terminer leur maturation jusqu'à la formation de spermatozoïdes matures. Cette hypothèse permettrait d'expliquer l'existence, dans l'éjaculat, de spermatozoïdes avec un ADN fragmenté et un équipement chromosomique déséquilibré. Les spermatozoïdes avec un ADN fragmenté sont potentiellement moins féconds que ceux avec un ADN intact. Pourtant il faut être très prudent lors de l'interprétation des résultats car tous les spermatozoïdes ayant un ADN fragmenté n'ont pas toujours un équipement chromosomique déséquilibré. De plus, l'équipement chromosomique n'est déterminé que pour les chromosomes impliqués dans l'anomalie constitutionnelle.

Récemment, l'équipe de Rouen *et al.* ont étudié la fragmentation de l'ADN spermatique et l'équipement chromosomique dans les mêmes gamètes de 6 patients porteurs d'une anomalie chromosomique de structure (3 translocations réciproques équilibrées, 2 translocations robertsoniennes et 1 inversion péricentrique). Ils ont trouvé également que les spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés ont un ADN plus fragmenté que ceux dont l'équipement chromosomique est équilibré. Ils ont suggéré que les spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés perturbent l'architecture tridimensionnelle du noyau spermatique. Cela augmente la sensibilité des spermatozoïdes aux facteurs exogènes de l'apoptose et, par conséquent, favorise le processus de la fragmentation de l'ADN spermatique (Rouen *et al.* 2013). Cette étude montre les mêmes résultats que les nôtres mais les auteurs ont proposé

d'autres explications. En effet, nous avons considéré l'apoptose abortive lors de la spermatogenèse comme étant à l'origine de la fragmentation de l'ADN spermatique tandis que Rouen et ses collaborateurs ont envisagé l'apoptose induite par les facteurs exogènes durant le transit des spermatozoïdes dans l'appareil génital comme l'auteur de la fragmentation de l'ADN spermatique.

Dans l'étude de Rouen et la nôtre, des sondes centromériques et télomériques sont utilisées afin de déterminer l'équipement chromosomique dans les gamètes. Nous n'avons pas pu différencier les spermatozoïdes chromosomiquement équilibrés des spermatozoïdes chromosomiquement normaux. De plus, la technique TUNEL détecte non seulement la fragmentation de l'ADN spermatique issue de l'apoptose mais également des cassures induites par la voie nécrotique. D'autres marqueurs de l'apoptose devraient être étudiés afin d'élucider le mécanisme de l'infertilité masculine.

L'apoptose se caractérise par différents processus biologiques incluant l'externalisation de la phosphatidylsérine et la fragmentation de l'ADN spermatique. Chez les patients porteurs d'une anomalie chromosomique de structure, ces deux marqueurs apoptotiques sont plus élevés par rapport au groupe témoin. Pourtant aucune corrélation entre ces deux marqueurs n'a été remarquée (Brugnon *et al.* 2006). Cela pourrait s'expliquer par l'apparition de ces deux marqueurs à différents moments du processus apoptotique. L'externalisation de la phosphatidylsérine qui se situe normalement à la couche interne de la membrane plasmique des spermatozoïdes est un marqueur de l'apoptose rapporté dans les spermatozoïdes humains (Oosterhuis *et al.* 2000). L'annexine V est une protéine qui possède une forte affinité pour la phosphatidylsérine mais elle ne peut pas entrer dans les spermatozoïdes avec une membrane intacte. Ainsi, la fixation de l'annexine V sur la phosphatidylsérine se produit à la surface extérieure de la membrane spermatique, ce qui indique que l'intégrité de la membrane spermatique est compromise.

Le tri des spermatozoïdes peut être réalisé à l'aide de microbilles magnétiques conjuguées à l'annexine V. Les spermatozoïdes sont incubés avec l'annexine V couplé à des billes magnétiques. Le tout passe au travers d'une colonne posée dans un champ magnétique. Les spermatozoïdes marqués magnétiquement et positifs pour la phosphatidylsérine sont retenus dans la colonne tandis que les spermatozoïdes non marqués sont recueillis dans la fraction non retenue. La séparation de MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) permet de trier les spermatozoïdes en deux fractions : la fraction d'annexine V-négative (les spermatozoïdes, non apoptotiques, ayant une membrane intacte) et la fraction d'annexine Vpositive (les spermatozoïdes, apoptotiques, ayant

externalisé la phosphatidylsérine) (Figure 50).

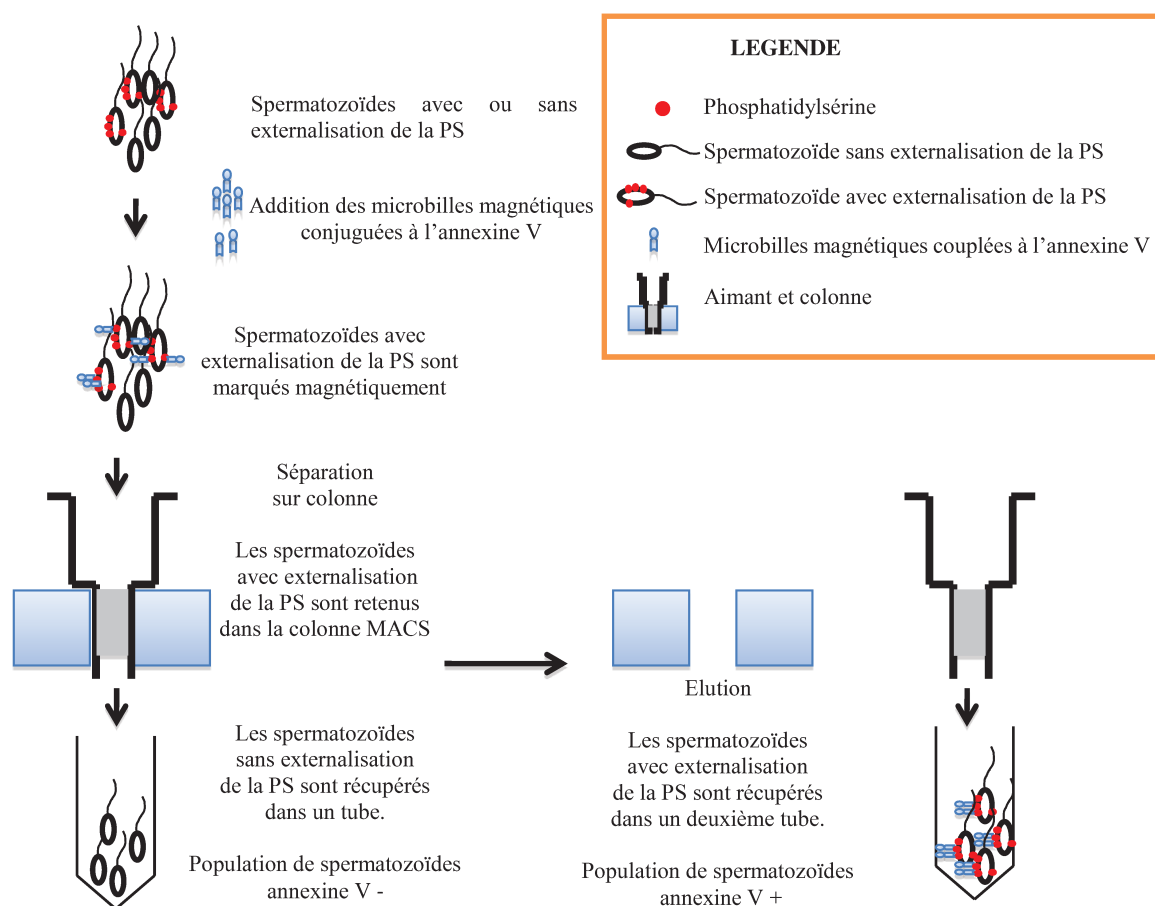


Figure 50 – Schéma de la séparation des spermatozoïdes par MACS.

Dans notre prochain projet, l'équipement chromosomique et la fragmentation de l'ADN spermatique seront étudiés dans les gamètes de ces deux fractions cellulaires chez les patients présentant une anomalie chromosomique de structure. Après avoir identifié les points de cassure par la technique FISH sur le sang des patients, nous allons utiliser des sondes BACs et/ou des sondes commerciales afin de couvrir les points de cassure sur les chromosomes étudiés dans les gamètes. Avec cette méthode nous pourrions différencier les spermatozoïdes ayant un remaniement chromosomique équilibré des spermatozoïdes chromosomiquement normaux (Figure 51).

Si l'hypothèse proposée par Rouen *et al.* est exacte, nous devrions trouver, dans la fraction annexine V-positif, une augmentation des gamètes chromosomiquement déséquilibrés et également des gamètes chromosomiquement équilibrés. Si notre hypothèse sur l'apoptose abortive est exacte, nous devrions trouver plus de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés avec un ADN fragmenté parmi

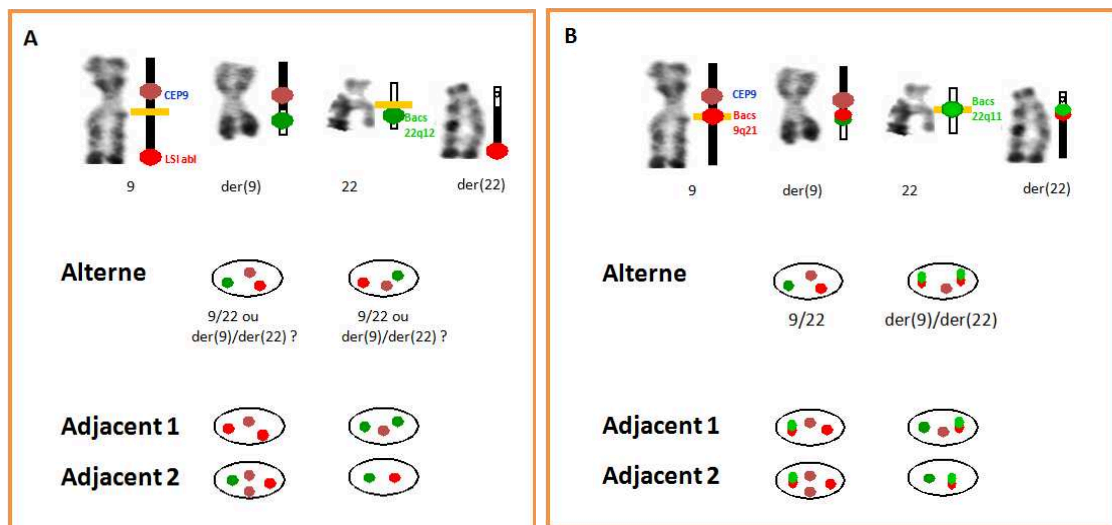


Figure 51 – Etude de la ségrégation méiotique d'un patient 46,XY,t(9;22)(q21;q11.2). A : en utilisant des sondes centromériques et télomériques. B : en utilisant des sondes centromériques et des sondes chevauchant les points de cassure

ceux dans la fraction annexine V-positive que dans la fraction annexine V-négative. Les résultats attendus permettraient de mieux comprendre le (les) mécanisme(s) de l'infertilité masculine et d'améliorer le traitement de l'infertilité.

B. Expression de la signature génétique dans les spermatozoïdes : mise au point de l'étude du transcriptome dans les spermatozoïdes

Vu le rôle important des facteurs génétiques dans l'infertilité masculine, nous avons mis au point l'étude du transcriptome dans les spermatozoïdes au sein du laboratoire de Cytogénétique, Inserm U1078. Nous avons optimisé les méthodes de purification des spermatozoïdes à partir du sperme frais et congelé, d'extraction des ARN spermatiques, d'évaluation de la qualité des ARN spermatiques et d'hybridation sur puce à ARN.

Pour la purification des spermatozoïdes à partir du sperme frais et congelé, une combinaison du gradient de densité 90%-47,5% avec une centrifugation de 1000g pendant 20 minutes suivie d'une lyse des cellules somatiques (une solution hypotonique) dans la glace pendant 20 minutes est nécessaire afin d'éliminer toutes les cellules somatiques en gardant le plus possible de spermatozoïdes. Nous avons récupéré après

purification 65,2% et 73,2% des spermatozoïdes pour les spermés frais et congelé, respectivement. Le critère d'exclusion des échantillons de sperme a été établi selon le nombre des cellules somatiques initiales ; les échantillons présentant plus de 3 millions et 3,3 millions pour les spermés frais et congelé, respectivement, doivent être exclus.

Quant à l'extraction des ARN spermatiques, nous avons comparé deux kits d'extraction : RNA Plus Mini Kit (Qiagen) et NucleoSpin RNA XS (Marcherey-Nagel). Nous avons remarqué que la quantité des ARN spermatiques extraits est plus importante en utilisant le kit NucleoSpin RNA XS pour les spermés frais et congelé. Ce kit d'extraction est donc vivement recommandé dans le laboratoire.

Concernant les méthodes d'évaluation de la pureté des ARN spermatiques, nous avons utilisé la RT-PCR et le Bioanalyzer 2100. Les résultats obtenus par ces deux méthodes sont bien corrélés. Ainsi, la vérification de la pureté des ARN spermatiques par une de ces deux méthodes est strictement recommandée. Le Bioanalyzer 2100 réclamant moins d'ARN est retenu au laboratoire.

Lors de l'hybridation sur puce, il faut respecter la quantité d'ARNc et l'activité spécifique recommandée qui sont d'au moins 0,825 μg et 6 pmol Cy3/ μg d'ARNc, respectivement. L'hybridation des échantillons qui ne respectent pas ces recommandations risque l'échec dans l'interprétation des données obtenues.

Le protocole retenu est établi selon la figure 52.

L'analyse des données de microarray permet d'identifier un grand nombre de gènes présents dans les spermatozoïdes matures. Ces transcrits sont impliqués dans les différentes voies métaboliques lors de la spermatogenèse et également dans le développement précoce du zygote selon la littérature. Très intéressant, nous avons remarqué qu'il y a de nombreux transcrits qui sont exprimés différemment entre les échantillons de sperme frais et de sperme cryoconservé issus des hommes ayant un spermogramme normal. Il est possible que la cryoconservation puisse affecter le profil d'expression génétique dans les spermatozoïdes. En comparant la présence des gènes dans les échantillons de sperme de patients avec une asthénozoospermie et de spermés normaux, nous avons noté des gènes qui sont exprimés de façon différente entre ces deux groupes. Toutefois, le nombre faible d'échantillons ne permet pas une analyse complète.

Nous avons construit un profil d'expression des gènes d'un groupe d'hommes avec un spermogramme et un spermocytogramme normaux. Ces données vont servir de référence lors de la comparaison avec celles obtenues pour des patients infertiles ayant

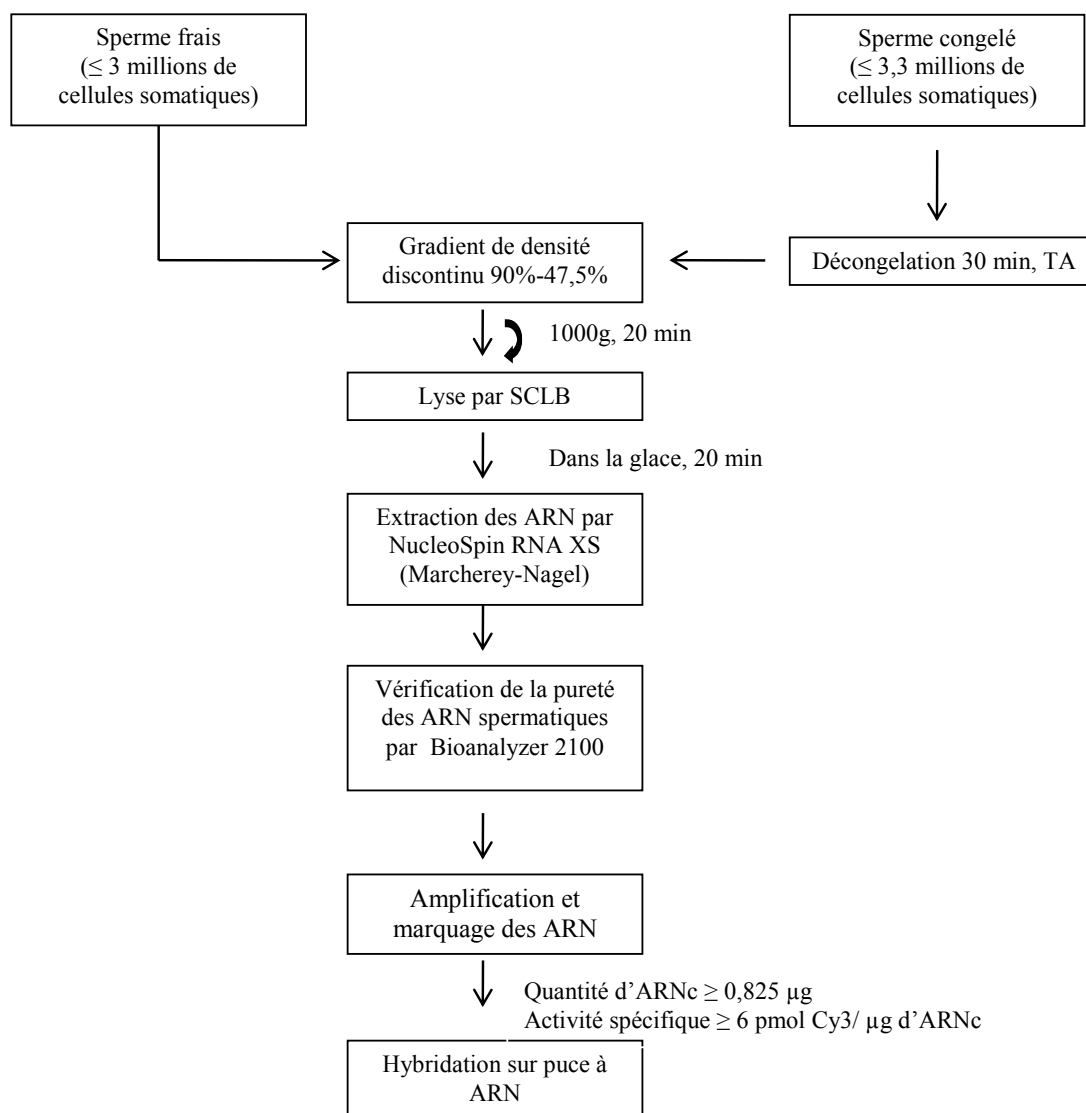


Figure 52 – Protocole employé dans l'étude du transcriptome dans les spermatozoïdes

des altérations quantitatives et qualitatives du sperme.

La mise au point de l'étude du transcriptome ouvre une grande fenêtre pour la recherche de l'expression des gènes dans les gamètes mâles afin de mieux comprendre le rôle des facteurs génétiques dans la formation et la fonction des spermatozoïdes.

Dans la littérature, la majorité des travaux portant sur l'étude du transcriptome des spermatozoïdes consistent en la comparaison de différents groupes de patients (Platts *et al.* 2007, Jodar *et al.* 2012, Montjean *et al.* 2012). Nous étudierons le transcriptome dans les gamètes dans des études longitudinales. Il est connu que certains traitements comme la chimiothérapie peuvent induire des perturbations importantes

de la spermatogenèse associées à des troubles de la méiose et à une augmentation du taux de fragmentation de l'ADN spermatique (Bujan *et al.* 2013, Bujan *et al.* 2014). La cause de ces anomalies n'est pas encore connue mais il est possible que des gènes impliqués dans le contrôle des divisions cellulaires pendant la spermatogenèse et/ou dans la production de substances oxygénées réactives et/ou dans la compaction de l'ADN spermatique et/ou dans l'apoptose pourraient être perturbés. L'étude des profils d'expression génomique, des aneuploïdies et de la fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes d'un même patient avant, pendant et après traitement permettrait peut-être d'élucider les mécanismes sous-jacents.

Nous étudierons également le profil d'expression génomique dans des populations homogènes de spermatozoïdes comme les tératozoospermies monomorphes ou dans des populations enrichies pour un critère donné après tri cellulaire à l'aide de microbilles.

Dans la littérature, l'étude du transcriptome portant sur les patients tératozoospermiques a montré des perturbations des gènes impliqués dans le remodelage cellulaire (Platts *et al.* 2007). Pourtant les patients recrutés dans cette étude présentent une tératozoospermie multi-morphe. L'hétérogénéité des échantillons ne permet pas d'identifier des gènes impliqués dans chacune des morphologies anormales. Nous envisageons d'étudier l'expression des gènes dans les spermatozoïdes de patients présentant des spermatozoïdes macrocéphales multiflagellés. Chez ces patients, nous avons montré que tous leurs spermatozoïdes sont chromosomiquement déséquilibrés (Annexe 1). Cette étude transcriptomique permettra de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents dans cette pathologie.

Le profil d'expression génomique sera aussi étudié dans les deux populations de spermatozoïdes apoptotiques et non apoptotiques après la séparation par MACS des spermatozoïdes d'hommes porteurs (ou non) d'une anomalie chromosomique. Nous étudierons également la fragmentation de l'ADN spermatique et la ségrégation méiotique dans ces deux populations (Figure 53). Les résultats obtenus permettront d'établir une relation entre les spermatozoïdes externalisant ou non la phosphatidylsérine et (i) le profil d'expression des gènes, (ii) l'équipement chromosomique et (iii) la fragmentation de l'ADN spermatique.

Dans la littérature, les auteurs ont montré que l'externalisation de la phosphatidylsérine dans les spermatozoïdes est liée à la réaction acrosomiale pendant le processus de capacitation (Martin *et al.* 2005, de Vries *et al.* 2003). Au contraire, plusieurs études ont mis en évidence la corrélation entre l'externalisation de la

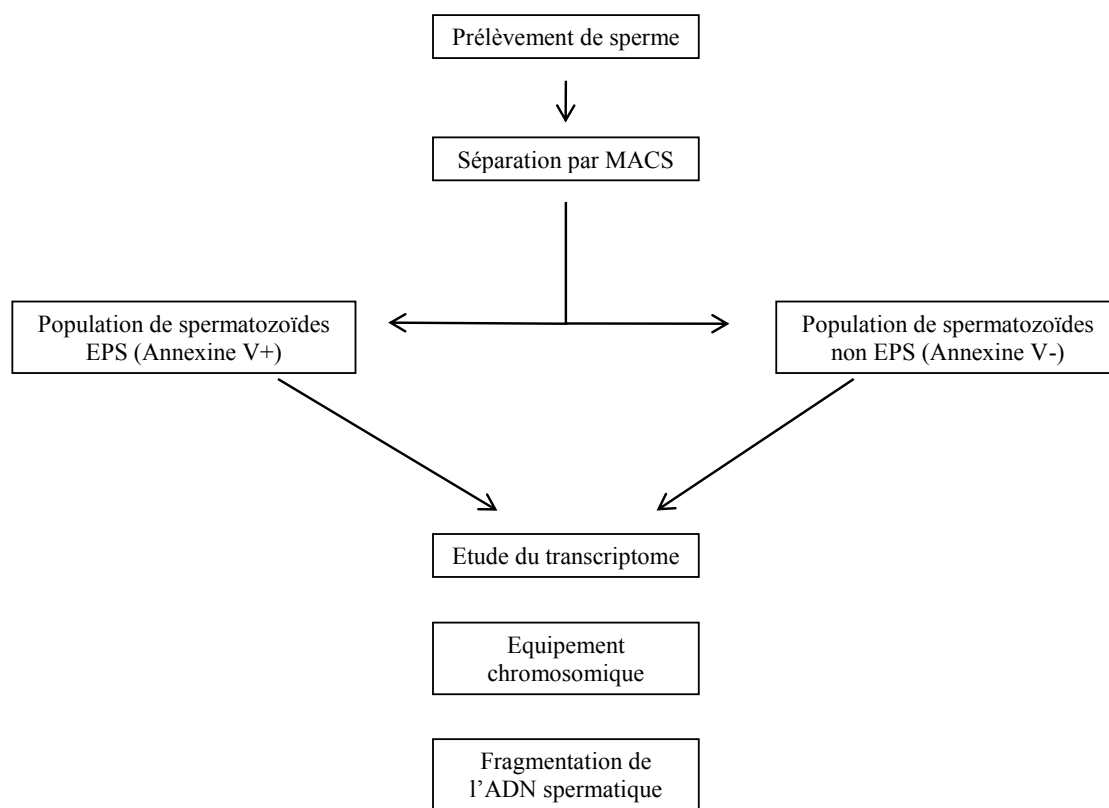


Figure 53 – Méthodologie employée afin d'étudier le profil d'expression génomique, la fragmentation de l'ADN spermatique et l'équipement chromosomique dans deux populations de spermatozoïdes séparées par MACS (EPS : Externalisation de la phosphatidylsérine)

phosphatidylsérine et les événements apoptotiques comme la fragmentation de l'ADN spermatique, l'activation des capasses apoptotiques et/ou la diminution du potentiel de la membrane mitochondriale (Barroso *et al.* 2000, Barroso *et al.* 2006, Paasch *et al.* 2003). En étudiant le profil d'expression génomique dans deux populations Annexine V positive et négative, nous aimerions déterminer le mécanisme de l'externalisation de la phosphatidylsérine dans les spermatozoïdes. De plus, nous devrions trouver une augmentation du taux de spermatozoïdes avec un ADN fragmenté et de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés dans la fraction Annexine V positive (mentionné précédemment). La comparaison des profils d'expression des gènes dans les deux populations nous permettra de définir des voies métaboliques anormales et ainsi nous aidera à mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux anomalies révélées.

Bibliographie

Abu-Halima M, Hammadeh M, Schmitt J, Leidinger P, Keller A, Meese E, Backes C (2013). Altered microRNA expression profiles of human spermatozoa in patients with different spermatogenic impairment. *Fertil Steril* 99(5) : 1249-1255.

Acloque H, Bonnet-Garnier A, Mompert F, Pinton A, Yerle-Bouissou M (2013). Sperm nucleus architecture is locally modified in presence of a robertsonian translocation t(13;17). *Plos One* 8(10) : e78005.

Adachi Y, Sasagawa I, Tomaru M, Ishigooka M, Kubota Y, Nakada T (1997). Short-arm dicentric Y chromosome associated with Sertoli-cell-only-tubule. *Scand J Urol Nephrol* 31(5) : 459-461.

Agarwal A and Said TM (2003). Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 9(4) : 331-345.

Ahmadi A, Ng SC (1999). Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool* 284 : 696-704.

Aitken RJ and Koppers AJ (2010). Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl* : 1-11.

Aitken RJ, Baker MA (2013). Oxidative stress, spermatozoa and leukocytic infiltration : relationships forged by the opposing forces of microbial invasion and the search for perfection. *J Reprod Immun* 100 : 11-19.

Aitken RJ, Bronson R, Smith TB, De Iuliis GN (2013). The source and significance of DNA damage in human spermatozoa ; a commentary on diagnostic strategies and straw man fallacies. *Mol Hum Reprod* 19(8) : 475-485.

Aitken RJ, De Iuliis GN (2010). On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 16(1) : 3-13.

Aitken RJ, De Iuliis GN, McLanchlan RI (2009). Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl* 32 : 46-56.

Aitken RJ, Fisher H (1994). Reactive oxygen species generation and human spermatozoa : the balance of benefit and risk. *Bioassays* 16 : 259-67.

Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS (1998). Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 59 : 1037-1046.

Aitken RJ, Kerr L, Bolton V, Hargreave T (1990). Analysis of sperm function in globozoospermia : implications for the mechanism of spermzona interaction. *Fertil Steril* 54 :701-7.

Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Iuliis GN (2014). Oxidative stress and male reproductive health. *Asian Journal of Andrology* 16 : 31-38.

Aitken RJ, West KM (1990). Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *Int J Androl* 13 : 433-451.

Alvarez JG, Sharma RK, Ollero M, Saleh RA, Lopez MC, Thomas AJ Jr, Avenson DP, Agarwal A (2002). Increased DNA damage in sperm from leucocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 78 : 319-329.

Amar-Hoffet A, Hédon B, Belaisch-Allart J (2010). Place des techniques d'assistance médicale à la procréation. *J Gynécol Obstet Biol Repro* 39 (8 suppl 2) : 88-99.

Amiri I, Ghorbani M, Heshmati S (2012). Comparison of the DNA fragmentation and the sperm parameters after processing by the density gradient and the swim up method. *J Clin Diag Res* 6(9) : 1451-1453.

Anton E, Blanco J, Eqozcue J, Vidal F (2005). Sperm study in heterozygote inversion carriers : a review. *Cytogenet Genome Res* 111(3-4) : 297-304.

Anton E, Vidal F, Blanco J (2007). Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers. *Hum Reprod* 22(8) : 2088-2092.

Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, Liu L, Mullen JBM, Carrell DT (2005). DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *Journal of Andrology* 26(6) : 741-48.

Appert-Collin A, Baisamy L, Diviani D (2006). Regulation of g protein-coupled receptor signaling by a-kinase anchoring proteins. *J Recept Signal Transduct Res* 26 : 631-646.

Auger J and Eustache F (2000). Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. *Andrologie* 10-14 : 358-373.

Avendano C, Franchi A, Duran H, Oehninger S (2010). DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril* 94(2) : 549-557.

Avendano C, Franchi A, Jones E, Oehninger S (2009). Pregnancy-specific β -1-glycoprotein I and human leukocyte antigen-E mRNA in human sperm : differential expression in fertile and infertile men and evidence of a possible functional role during early development. *Hum Reprod* 24(2) : 270-277.

Balhorn Rob (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biology* 8(227).

Barratt CLR, Aitken RJ, Bjorndahl L, Carrell DT, Boer P, Kvist U, Lewis SEM, Perreault SD, Perry MJ, Ramos L, Robaire B, Ward S, Zini A (2010). Sperm DNA : organization, protection and vulnerability : from basic science to clinical applications- apposition report. *Hum Reprod* 25(4) : 824-838.

Barroso G, Morshedi M, Oehninger S (2000). Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 15 : 1338-44.

Barroso G, Taylor S, Morshedi M, Manzur F, Gavino F, Oehninger S (2006). Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers : a comparison of two different sperm populations. *Fertil Steril* 85 : 149-154.

Bartels I, Starke H, Argyriou L, Sauter SM, Zoll B, Liehr T (2007). An exceptional complex chromosomal rearrangement (CCR) with eight breakpoints involving four chromosomes (1;3;9;14) in an azoospermic male with normal phenotype. *Eur J Med Genet* 50 : 133-138.

Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y, Barak Y (2002). Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl* 23 : 1-8.

Batoov 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.

- Berkovitz A**, Eltes F, Lederman H, Peer S, Ellenbogen A, Feldberg B *et al* (2006). How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection. *Reprod Biomed Online* 12 : 634-638.
- Bettio D**, Venci A, Levi Setti PE (2008). Chromosomal abnormalities in miscarriages after different assisted reproduction procedures. *Placenta* 29 : S126-S128.
- Bhatt S**, Moradkhani K, Mrasek K, Puechberty J, Manvelyan M, Hunstiq F, *et al* (2009). Breakpoint mapping and complete analysis of meiotic segregation patterns in three men heterozygous for paracentric inversions. *Eur J Hum Genet* 17(1) : 44-50.
- Billig H**, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen M, and Hsueh AJW (1995). Apoptosis in testis germ cells : Developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 136 : 5-12.
- Blanco J**, Egozcue J, Vidal F (1996). Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescence in situ hybridization. *Hum Reprod* 11 : 722-726.
- Blanco-Arias P**, Sargent CA, Affara NA (2002). The human-specific Yp11.2/Xq21.3 homology block encodes a potentially functional testis-specific TGIF-like retroposon. *Mamm Genome* 13 : 463-468.
- Blanco-Rodriguez J**, Martinez-Garcia C (1999). Apoptosis is physiologically restricted to a specialized cytoplasmic compartment in rat spermatids. *Biol Reprod* 61 : 1541-1547.
- Boerke A**, Dieleman SJ, Gadella BM (2007). A possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theriogenology* 68S : S147-S155.
- Boivin J**, Bunting L, Collins JA, Nygren KG (2007). International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking : potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod* 22 : 1506-12.
- Bonache S**, Mata A, Ramos MD, Bassas L, Larriba S (2012). Sperm gene expression profile is related to pregnancy rate after insemination and is predictive of low fecundity in normozoospermic men. *Hum Reprod* 27(6) : 1556-1567.
- Boué J**, Boué A, Lazar P (1975). Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotypes spontaneous human abortions. *Teratology* 12 : 11-26.
- Brahem S**, Letaief K, Ali B, Saad A, Mehdi M (2012). Efficacy of the density gradient centrifugation method in eliminating sperm with aneuploidy. *Andrologia* 45 : 158-162.
- Brahem S**, Mehdi M, Elghezal H, Saad A (2011a). Detection of DNA fragmentation

and meiotic segregation in human with isolated teratozoospermia. *J Assist Reprod Genet* 28 : 41-48.

Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, Saad A (2011b). Study of aneuploidy rate and sperm DNA fragmentation in large-headed, multiple-tailed spermatozoa. *Andrologia* 44 : 130-135.

Brahems S, Mehdi M, Landolsi H, Mougou S, Elghezal H, Saad A (2011c). Semen parameters and sperm DNA fragmentation as causes of recurrent pregnancy loss. *Urology* 78(4) : 792-796.

Brugnon F, Janny L, Communal Y, Darcha C, Szczepaniak C, Pellestor F, Vago P, Pons-Rejraji H, Artonne C, Grizard G (2010). Apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm from Robertsonian translocation carriers patients. *Hum Reprod* 25(7) : 1631-1642.

Brugnon F, Van Assche E, Verheven G, Sion B, Boucher D, Pouly JL, *et al* (2006). Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. *Hum Reprod* 21 : 685-693.

Bujan L, Walschaerts M, Brugnon F, Daudin M, Berthaut I, Auger J, Saias J, Szerman E, Moinard N, Rives N, Hennebicq S (2014). Impact of lymphoma treatments on spermatogenesis and sperm deoxyribonucleic acid : a multicenter prospective study from the CECOS network. *Fertil Steril* 102(3) : 667-674.

Bujan L, Walschaerts M, Moinard N, Hennebicq S, Saias J, Brugnon F, Auger J, Berthaut I, Szerman E, Daudin M, Rives N (2013). Impact of chemotherapy and radiotherapy for testicular germ cell tumors on spermatogenesis and sperm DNA : a multicenter prospective study from CECOS network. *Fertil Steril* 100(3) : 673-680.

Burmester S, Hoyer-Fender S (1996). Transcription and translation of the outer dense fiber gene (Odf1) during spermiogenesis in the rat. A study by in situ analyses and polysome fractionation. *Mol Reprod Dev* 45(1) : 10-20.

Burrello N, Vicari E, Shin P, Agarwal A, De Palma A, Grazioso C, D'Agata R, Calogero AE (2003). Lower sperm aneuploidy frequency is associated with high pregnancy rates in ICSI programmes. *Hum Reprod* 18(7) : 1371-1376.

Caer E, Perrin A, Douet-Guilbert N, Amice V, De Braekeleer M, Morel F (2008). Differing mechanisms of meiotic segregation in spermatozoa from three carriers of a pericentric inversion of chromosome 8. *Fertil Steril* 89 : 1637-1640.

Carreau S, Lambard S, Said L, Saad A, Galeraud-Denis I (2007). RNA dynamics of

fertile and infertile spermatozoa. *Biochemical Society Transactions* 35 : 634-636.

Carrell DT (2012). Epigenetics of the male gamete. *Fertil and Steril* 97(2) : 267-274.

Carrell DT, Liu L, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Erickson L, Campbell B (2003a). Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl* 49(1) : 49-55.

Carrell DT, Wilcox AL, Lowy L, Peterson CM, Jones KP, Erickson L, Campbell B, Branch DW, Hatasaka HH (2003b). Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained pregnancy loss. *Obstet Gynecol* 101(6) : 1229-1235.

Castillo J, Simon L, de Mateo S, Lewis S, Oliva R (2011). Protamine/DNA ratios and DNA damage in native and density gradient centrifugated sperm for infertile patients. *J Androl* 32 : 324-332.

Cattanach BM, Beechey CV, Peters J (2004). Interactions between imprinting effects in the mouse. *Genetics* 168(1) : 397-413.

Chen H, Ruan YC, Xu WM, Chen J, Chan HC (2012). Regulation of male fertility by CFTR and implications in male infertility. *Hum Reprod Update* 18(6) : 703-713.

Chen H, Yi M, Sheng Y, Cheng H, Zhou R (2013). A novel testis-enriched gene *Spata33* is expressed during spermatogenesis. *PlosOne* 8(7) : e67882.

Chen J, Wang Y, Wei B, Lai Y, Yan Q, Gui Y, Cai Z (2011). Functional expression of ropporin in human testis and ejaculated spermatozoa. *J Androl* 32(1) : 26-32.

Cho C Willis WD, Goulding EH *et al* (2001). Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* 28 : 82-86.

Cho C, Jung-Ha H, Willis WD, Goulding EH, Stein P, Xu Z, Schultz RM, Hecht NB, Eddy EM (2003). Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biol Reprod* 69(1) : 211-217.

Coco R, Rahn MI, Garcia Estanga P, Antonioli G, Solari AJ (2004). A constitutional complex chromosome rearrangement involving meiotic arrest in an azoospermic male : case report. *Hum Reprod* 19(12) : 2784-2790.

Codina-Pascual M, Oliver-Bonet M, Navarro J, Starke H, Liehr T, Gutiérrez-Mateo C, Sanchez-Garcia JF, Arango O, Egozcue J, Benet J (2004). FISH characterization of a dicentric Yp(p11.32) isochromosome in an azoospermic male. *Am J Med Genet A* 127A(3) : 302-306.

Cohen J, Fehilly CB, Fishel SB, Edwards RG, Hewitt J *et al* (1984). Male infertility successfully treated by *in vitro* fertilization. *Lancet* 8388 : 1239-1240.

Cohlen BJ (2005). Should we continue performing intrauterine insemination in the year of 2004? *Gynecol Obstet Invest* 59 : 3-13.

Concha II, Urzua U, Yanez A, Schroeder R, Pessot C, Burzio LO (1993). U1 and U2 snRNA are localized in the sperm nucleus. *Exp Cell Res* 204 : 378-381.

Constancia M, Hemberger M, Hughes J, Dean W, Ferguson-Smith A, *et al* (2002). Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature* 417 (27) : 945-948.

Cooper TG (2005). Cytoplasmic droplets : the good, the bad or just confusing? *Hum Reprod* 20(1) : 9-11.

Cotter PD, Ko E, Larabell SK, Rademaker AW, Martin RH (2000). Segregation of a supernumerary del(15) marker chromosome in sperm. *Clin Genet* 58 : 488-492.

Cummins JM (2001). Cytoplasmic inheritance and its implications for animal biotechnology. *Theriogenology* 55(6) : 1381-1399.

Cuppens H and Cassiman JJ (2004). CFTR mutations and polymorphisms in male infertility. *Inter J Androl* 27 : 251-256.

Dacheux JL, Belghazi M, Lanson Y, Dacheux F (2006). Human epididymal secretome and proteome. *Mol Cell Endocrinol* 250 : 36-42.

Dadoune JP (2006). *Biologie de la reproduction humaine*.

Dadoune JP (2009). Spermatozoa RNAs : what about their functions? *Microscopy Res Tech* 72 : 536-551.

Dadoune JP, Alfonsi MF, Fain-Maurel MA (1991). Cytochemical variations in the nucleolus during spermiogenesis in man and monkey. *Cell Tissue Res* 264 : 167-173.

Dadoune JP, Pawlak A, Alfonsi MF, Siffroi JP (2005). Identification of transcripts by macroarrays, RT-PCR and *in situ* hybridization in human ejaculate spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 11(2) : 133-140.

Dadoune JP, Siffroi JP, Alfonsi MF (2004). Transcription in haploid male germ cells. *Inter Review of Cytology* 237 : 1-56.

Dam AHDM, Koscinski I, Kremer JA, Mouton C, Jaeger AS, *et al* (2007). Homozygous mutation in *SPATA16* is associated with male infertility in human globozoospermia. *Am J Hum Genet* 81 : 813-820.

David G, Bisson P, Czyglick F, Jounnet P, Gernigon C (1975). Anomalies morphologiques du spermatozoïde humain. Proposition pour un système de classification. *J Gynecol Obst Biol Reprod* 4(suppl) : 379-384.

De Almeida Ferreira Braga DP, Sette AS, Figueira RC, Nichi M, Martinhago CD, Laconelli Jr A, Borges Jr E (2011). Sperm organelle morphologic anomalies : contributing factors and effects on intracytoplasmic sperm injection cycles outcomes. *Urology* 78 : 786-791.

De Braekeleer M, Dao TN (1991). Cytogenetic studies in male infertility : a review. *Hum Reprod* 6(2) : 245-250.

De Braekeleer M, Perrin A and Morel F (2006). Chromosomal abnormalities in male infertility. Dans : *Cytogenetics and Infertility*. Dir : De Braekeleer M. Transworld Research Network, Trivandrum (India) : 27-52.

De Iuliis GN, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A, Nixon B, Aitkent RJ (2009). DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'- deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol Reprod* 81 : 517-24.

De Vries KJ, Wiedmer T, Sims PJ, Gadella BM (2003). Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. *Biol Reprod* 68 : 2122-2134.

Delaroche L, Yazbeck C, Gout C, Kahn V, Oger P, Rougier n (2013). Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) after repeated IVF or ICSI failures : a prospective comparative study. *Eur J Obste Gyneco Reprod Biol* 167 : 76-80.

DeMarini DM (2004). Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate : A review. *Mutat Res* 567 : 447-474.

Dieterich K, Soto Rifo R, Faure AK, Hennebicq S, Ben Amar B, Zahi M, *et al* (2007). Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nat Genet* 39 : 661-665.

Dieterich R, Zouari R, Hazbuz R, Vialard F *et al* (2009). The Aurora Kinase C c.144delC mutation causes meiosis I arrest in men and is frequent in the North African population. *Hum Mol Genet* 18(7) : 1301-1309.

Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Poorman-Allen P, Mori C *et al* (1997). HSP70-2 is required for desynapsis of synaptonemal complexes during meiotic prophase in juvenile and adult mouse spermatocytes. *Development* 124(22) : 4595-603.

Dorjpurev U, Kuwahara A, Yano Y, Taniguchi T, Yamamoto Y, Suto A, Tanaka Y, Matsuzaki T, Yasui T, Irahara M (2011). Effect of semen characteristics on pregnancy rate following intauterine insemination. *J Med Invest* 58 : 127-133.

Douet-Guilbert N, Basinko A, Le Bris M-J, Herry A, Morel F, De Braekeleer M (2008). Strategy to identify supernumerary chromosomal markers in cytogenetic. *Pathologie Biologie* 56 : 362-367.

Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Amice V, Marchetti C, Delobel B, Amice J, De Braekeleer M, Morel F (2005). Interchromosomal effect in sperm of males with translocations : report of 6 cases and review of the literature. *Int J Androl* 28 : 372-379.

Duzcan F, Aybek Z, Tepeli E, Caner V, Cetin GO, Aybek H and Bagci H (2006). Sex chromosome aneuploidy rates in the somatic cells of infertile men. *J Reprod Med* 51(6) : 489-492.

Eaker S, Pyle A, Cobb J, Handel MA (2001). Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. *J Cell Sci* 114(Pt 16) : 2953-2965.

Eggermann K, Mau UA, Bujdoso G, Koltai E, Engels H, Schubert R, Eggermann T, Raff R, Schwanitz G (2002). Supernumerary marker chromosomes derived from chromosome 15 : analysis of 32 new cases. *Clin Genet* 62 : 89-93.

Egozcue J, Blanco J and Vidal F (1997). Chromosome study in human sperm nuclei using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Hum Reprod Update* 3 : 441-452.

Eiben B, Bartels I, Bahr-Porch S, Borgmann S, Gatz G, Gellert G, Goebel R, Hammans W, Hentemann M, Osmers R *et al* (1990). Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct- preparation method of chorionic villi and its applications for studying genetic causes of pregnancy wastage. *Am J Hum Genet* 47(4) : 656-663.

Eilderman K, Aeckerle N, Debowski K, Godmann M, Christiansen H, Heistermann M, *et al.* (2012). Developmental expression of the pluripotency factor sal-like protein 4 in the monkey, human and mouse testis : restriction to premeiotic germ cells. *Cells Tissues Organs* 196 : 206-220.

El-Domyati MM, Al-Din A, Barakat M, El-Fakahany H, Xu J, Sakkas D (2009). DNA repair and apoptosis in testicular germ cells of aging fertile men : the role of the poly(ADP-ribosyl)ation pathway. *Fertil Steril* 91(5) : 2221-2229.

Elghezal H, Hidar S, Braham R, Denguezli W, Ajina M, Saad A (2006). Chromosome

abnormalities in one thousand infertile males with nonobstructive sperm disorders. *Fertil Steril* 86(6) : 1792-1795.

Eloualid A, Rouba H, Rhaissi H, Barakat A, Louanjli N, Bashamboo A, McElreavey K (2014). Prevalence of the Aurora kinase C c.144delC mutation in infertile Moroccan men. *Fertil Steril* (in press).

Ensiso M, Alfarawati S, Wells D (2013). Increased numbers of DNA-damaged spermatozoa in samples presenting an elevated rate of numerical chromosome abnormalities. *Hum Reprod* 28(6) : 1707-1715.

Erenpreiss J, Bars J, Lipatnikova V, Erenpreisa J, Zalkaln J (2001). Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. *J Androl* 22(1) : 45-51.

Erenpreiss J, Jepson K, Giwercman A, Tsarev I, Erenpreisa J, Spano M (2004). Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation : comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *Hum Reprod* 19(10) : 2277-2282.

Erenpreiss J, Saad E, Giwercman A (2008). Sperm DNA damage in men from infertile couples. *Asian J Androl* 10(5) : 786-790.

Escudero T, Estop A, Ficher J, Munne S (2008). Preimplantation genetic diagnosis for complex chromosomal rearrangements. *Am J Med Genet A* 146 : 1662-1669.

Evenson DP, Darzynkiewicz Z, and Melamed MR (1980). Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity of fertility. *Science* 240 : 1131-1133.

Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP (1999). Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 14(4) : 1039-1049.

Fang P, Xu W, Li D, Zhao X, Dai J, Wang Z *et al* (2015). A novel acrosomal protein, IQCF1, involved in sperm capacitation and the acrosome reaction. *Andrology* 3(2) : 332-344.

Fang P, Zeng P, Wang Z, Liu M, Xu W, Dai J, *et al* (2014). Estimated diversity of messenger RNAs in each murine spermatozoa and their potential function during early zygotic development. *Biol Reprod* 90(5) : 94

Farra C, Singer S, Dufke A, Ashkar H, Monsef C, Awwad J (2011). De novo exceptional complex chromosomal rearrangement in a healthy fertile male : case report and review of the literature. *Fertil Steril* 96(5) : 1160-1164.

Fatehi AN, Bevers MM, Schoevers E, Roelen BA, Colenbrander B, Gadella BM

(2006). DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *J Androl* 27(2) : 176-88.

Feig C, Kirchhoff C, Ivell R, Naether O, Schulze W, Spiess AN (2007). A new paradigm for profiling testicular gene expression during normal and disturbed human spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* 13(1) : 33-43.

Feinberg JM, Rainteau DP, Kaetzel MA, Dacheux JL, Dedman JR, Weinman SJ (1991). Differential localization of annexins in ram germ cells : a biochemical and immunocytochemical study. *J Histochem Cytochem* 39 : 955-963.

Ferguson-Smith MA, Lennox B, Mack WS, Stewart JSS (1957). Klinefelter's syndrome. Frequency and testicular morphology in relation to nuclear sex. *Lancet*, ii : 167-169.

Ferlin A, Arredi B, Foresta C (2006). Genetic causes of male infertility. *Reprod Toxicol* 22 : 133-141.

Ferlin A, Garolla A, Foresta C (2005). Chromosome abnormalities in sperm of individuals with constitutional sex chromosomal abnormalities. *Cytogenet Genome Res* 111 : 310-316.

Ferlin A, Raicu F, Gatta V, Zuccarello D, Palka G, Foresta C (2007). Male infertility : role of genetic background. *Reprod Biomed Online* 14 : 734-745.

Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Enciso M, LaFromboise M, De Jonge C (2005). Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril* 84(4) : 833-842.

Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG (2003). The sperm chromatin dispersion test : a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Andrology* 24(1) : 59-69.

Foresta C, Ferlin A, Gianaroli L, Dallapiccola B (2002). Guideline for the appropriate use of genetic tests in infertile couples. *Eur J Hum Genet* 10 : 303-312.

Foresta C, Moro E, Ferlin A (2001). Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocrinol Rev* 22(2) : 226-239.

Foresta C, Moro E, Rossi A, Rossato M, Garolla A *et al* (2000). Role of the AZFa candidate genes in male infertility. *J Endocrinol Invest* 23 : 646-651.

Fox MS, Ximena Ares V, Turek PJ, Haqq C, Reijo Pera RA (2003). Feasibility of global gene expression analysis in testicular biopsies from infertile men. *Mol Reprod Dev* 66(4) : 403-421.

Franco HL, Dai D, Lee KY, Rubel CA, Roop D, Boerboom D, *et al* (2011). WNT4 is a regulator of normal postnatal uterine development and progesterone signalling during embryo implantation and decidualization in the mouse. *FASEB J* 25 : 1176-1187.

Frydman N, Prisant N, Hesters L, Frydman R, Tachdjian G, Cohen-Bacrie P, Fanchin R (2008). Adequate ovarian follicular status does not prevent the decrease in pregnancy rates associated with high sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 89(1) : 92-97.

Fuster CD, Farrell D, Stern FA, Hecht NB (1977). RNA polymerase activity in the bovine spermatozoa. *J Cell Biol* 74 : 698-706.

Gabory A and Dandolo L (2005). Épигénétique et développement : l'empreinte parentale. *Medecine/Sciences* 21 : 390-395.

Garcia-Herrero S, Garrido N, Martinez-Conejero JA, Remohi J, Pellicer A, Mesenguer M (2011). Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. *Reprod Biomed Online* 22 : 25-36.

Garcia-Herrero S, Garrido N, Martinez-Conejero JA, Remohi J, Pellicer A, Mesenguer M (2010a). ontological evaluation of transcriptional differences between sperm of infertile males and fertile donors using microarray analysis. *J Assist Reprod Genet* 27 : 111-120.

Garcia-Herrero S, Mesenguer M, Martinez-Conejero JA, Remohi J, Pellicer A, Garrido N (2010b). the transcriptome of spermatozoa used in homologous intrauterine insemination varies considerably between samples that achieve pregnancy and those that do not. *Fertil Steril* 94 : 1360-1373.

Gardo S, Bajnoczky K (1992). Cytogenetic analysis of spontaneous abortions with direct analysis of chorionic villi. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 47(2) : 117-120.

Garrido N, Martinez-Conejero JA, Jaurequi J, Horcajadas JA, Simon C, Remohi J, Meseguer M (2009). Microarray analysis in sperm from fertile and infertile men without basic sperm analysis abnormalities reveals a significantly different transcriptome. *Fertil Steril* 91 : 1307-1310.

Gasca S, Pellestor F, Loup V, Anahory T, Dechaud H, De Vos J, Hamamad S (2007). Identifying new human oocyte marker genes : a microarray approach. *Reprod Biomed Online* 14(2) : 175-83.

Gatta V, Raicu F, Ferlin A, Antonucci I, Scioletti AP, Garolla A, Palka G, Foresta C, Stuppia L (2010). Testis transcriptome analysis in male infertility : new insight on the pathogenesis of oligo-azoospermia in cases with and without AZFc microdeletion.

BMC Genomics 11 : 401.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119(3) : 493-501.

Geserick C, Weiss B, Schleuning W, Haendler B (2002). OTEX, an androgen-regulated human member of the paired-like class of homeobox genes. *Biochem J* 375 : 367-375.

Giordano R, Maqnano AR, Zaccagnini G, Pittoggi C, Moscufo N, Lorenzini R, Spadafora C (2000). Reverse transcriptase activity in mature spermatozoa of mouse. *J Cell Biol* 148(6) : 1107-1113.

Godó A, Blanco J, Vidal F, Parriego M, Boada M, Anton E (2013). Sequential FISH allows the determination of the segregation outcome and the presence of numerical anomalies in spermatozoa from a t(1;8;2)(q42;p21;p15) carrier. *J Assist Reprod Genet* 30 : 1115-1123.

Goldberg E, Eddy EM, Duan C, Odet F (2010). LDHC : the ultimate testis-specific gene. *J Androl* 31(1) : 86-94.

Goodrich RJ, Anton E, Krawetz SA (2013). Isolating mRNA and small noncoding RNAs from human sperm. *Methods in Molecular Biology* 927 : 385-396.

Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z (1993). Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA *in situ* to denaturation in abnormal human sperm cells : analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 207 : 202-205.

Grizard G, Jimenez C (1997). Les examens du sperme dans l'exploration de la fertilité masculine. *Progrès en Urologie* 7 : 496-504.

Guediche N, Tosca L, Kara Terki L, Young J, Briand-Suleau A, Tou B, Bouligand J, Brisset S, Misrahi M, Guiochon-Mantel A, Goossens M, Tachdjian G (2012). Array comparative hybridization analysis of small supernumerary marker chromosomes in human infertility. *Reprod Biomed Online* 24(1) : 72-82.

Gur Y and Breitbart H (2006). Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Gene Dev* 20 : 411-416.

Haidl G, Allam JP, Schuppe HC (2008). Chronic epididymitis : impact on semen parameters and therapeutic options. *Andrologia* 40 : 92-96.

Hammoud SS, Nix DA, Hammoud AO *et al* (2011). Genome-wide analysis identifies changes in histone retention and epigenetic modifications at developmental and imprinted gene loci in the sperm of infertile men. *Hum Reprod* 26(9) : 2558-2569.

Hammoud SS, Nix DA, Zhang H *et al* (2009). Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 460 : 473-478.

Hann MC, Lau PE, Tempest HG (2011). Meiotic recombination and male infertility : from basic science to clinical reality ? *Asian J Androl* 13 : 212-218.

Hayashi S, Yang J, Christenson L, Yanaghimachi R, Hecht NB (2003). Mouse preimplantation embryos developed from oocytes injected with round spermatids or spermatozoa have similar but distinct patterns of early messenger RNA expression. *Biol Reprod* 69 : 1170-1176.

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.

Honigberg L and Kenyon C (2000). Establishment of left/right asymmetry in neuroblast migration by UNC-40/DCC, UNC-73/Trio and DPY19 proteins in *C.elegans*. *Development* 127 : 4655-4668.

Hu Z, Dandekar D, O'Shaughnessy PJ, De Gendt K, Verhoeven G, Wilkindson MF (2010). Androgen-induced RhoX homeobox genes modulate the expression of AR-regulated genes. *Mol Endocrinol* 24 : 60-75.

Hu Z, Shanker S, Maclean JA, Ackerman SL and Wilkindson MF (2008). The RHOX5 homeodomain protein mediates transcriptional repression of the netrin-1 receptor gene *Unc5c*. *J Biol Chem* 283 : 3866-76.

Humeau C et Arnal F (2008). *Reproduction et développement*. 3^{ème} édition revue et corrigé.

Hunt PA, Hassold TJ (2002). Sex matters in meiosis. *Science* 296 : 2181-2183.

Ikawa M, Tokuhiko K, Yamaguchi R, Benham AM, Tamura T, Wada I (2011). Calsperin is a testis-specific chaperone required for sperm fertility. *J Biol Chem* 286(7) : 5639-5646.

Imken L, Rouba H, El Houate B, Louanjli N, Barakat A, Chafik A *et al* (2009). Mutations in the protamine locus : association with spermatogenic failure ? *Mol Hum Reprod* 15 : 733-738.

ISCN (2013). *An international System for Human Cytogenetic Nomenclature*, S.Karger, Basel, 2013.

Ishikawa T, Kondo Y, Yamaguchi K, Oba T, Sakamoto Y, Takenaka A, Fujisawa M (2007). An unusual reciprocal X-autosome translocation in an infertile azoospermic

man. *Fertil Steril* 88(3) : 705 e15-e17.

Jaafar H, Gabriel-Robez O, Vignon F, Flori E, Rumpler Y (1994). Supernumerary chromosomes and spermatogenesis in a human male carrier. *Hum Genet* 94 : 74-76.

Jacobs PA (1971). Chromosome abnormalities and fertility in man, in *Proceedings International Symposium, The Genetics of the Spermatozoon*, edited by Beatty RA, Gluecksohn-Waaelsh S, Edinburgh : 346-358.

Jacobs PA and Strong JA (1959). A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 183 : 302-303.

Jedrzejczak P, Kempisty B, Bryja A, Mostowska M, Depa-Martynow M, Pawelczyk L, Jaqodzinski PP (2007). Quantitative assessment of transition proteins 1, 2 spermatid-specific linker histone H1-like protein transcripts in spermatozoa from normozoospermic and asthenozoospermic men. *Arch Androl* 53(4) : 1999-205.

Jenkins TG and Carrell DT (2012). The sperm epigenome and potential implications for the developing embryo. *Reproduction* 143 : 727-734.

Jodar M and Oliva R (2014). Protamine alterations in human spermatozoa. *Adv Exp Med Biol* 791 : 83-102.

Jodar M, Kalko S, Castillo J, Balleca JL, Oliva R (2012). Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients. *Hum Reprod* 27(5) : 1431-1438.

Jodar M, Selvaraju S, Sendler E, Diamond MP, Krawetz SA (2013). The presence, role and clinical use of spermatozoa RNAs. *Hum Reprod Update* 19(6) : 604-624.

Johnson GD, Lalancette C, Linnemann AK *et al* (2011). The sperm nucleus : chromatin, RNA, and the nuclear matrix. *Reproduction* 141 : 21-36.

Johnson GD, Sendler E, Lalancette C, Hauser R, Diamond MP, Krawetz SA (2011). Cleavage of rRNA ensures translational cessation in sperm at fertilization. *Mol Hum Reprod* 17(12) : 721-726.

Joseph AM, Gosden JR, Chandley AC (1984). Estimation of aneuploidy levels in human spermatozoa using chromosome specific probes and in situ hybridization. *Hum Genet* 66 : 234-238.

Kamp G, Huelle K, Fernandes S, Sousa M, Schlegel PN *et al* (2001). High deletion frequency of the complete AZFa sequence in men with Sertoli cell only syndrome. *Mol Hum Reprod* 7 : 987-994.

Kausch K, Haaf T, Kohler J, Schid M (1988). Complex chromosomal rearrangement

in a woman with multiple miscarriages. *Am J Med Genet* 31 : 415-420.

Kee K, Angeles VT, Flores M, Nguyen HN, Pera RAR (2009). Human DAZL, DAZ and BOLLE genes modulate primordial germ cell and haploid gamete formation. *Nature* 462(7270) : 222-225.

Kempisty B, Depa-Martynow M, Lianeri M, Jedrzejczak P, Darul-Wasowicz A, Jaqodzinski PP (2007). Evaluation of protamine 1 and 2 transcript contents in spermatozoa from asthenozoospermic men. *Folia Histochem Cytobiol* 45(Suppl 1) : S109-113.

Khallouk A, Tazi ME, Fassi MJ-LE, Farib MH (2010). L'infertilité masculine : physiopathologie, bilan et prise en charge. *Urologie* 170 : 421-429.

Khattabi LE, Dupont C, Sermondade N, Hugues JN, Poncelet C, Porcher R, Cedrin-Durnerin I, Lévy R, Sifer C (2013). Is intracytoplasmic morphologically selected sperm injection effective in patients with infertility related to teratozoospermia or repeated implantation failure? *Fertil Steril* 100(1) : 62-68.

Khelifa MB, Zouari R, Harbuz R, Halouani L, Arnoult C, Lunardi J, Ray PF (2011). A new AURKC mutation causing macrozoospermia : implications for human spermatogenesis and clinical diagnosis. *Mol Hum Reprod* 17(12) : 762-768.

Kildemo H (2012). RNA expression in sperm as markers of sperm-quality. Master Thesis, Department of Biology, University of Oslo (Norway).

Kim JM, Ghosh SR, Weil AC, Zirkin BR (2001). Caspase-3 and caspase-activated deoxyribonuclease are associated with testicular germ cell apoptosis resulting from reduced intratesticular testosterone. *Endocrinology* 142 : 3809-3816.

Kjessler B (1966). Karyotype, meiosis and spermatogenesis in a sample of men attending an infertility clinic. In *Monographs in Human Genetics* 2.

Kleene KC (2003). Patterns, mechanism, and functions of translation regulation in mammalian spermatogenic cells. *Cytogenet Genome Res* 103(3-4) : 217-224.

Kleene KC, Bagarova J (2008). Comparative genomics reveals gene-specific and shared regulatory sequences in the spermatid-expressed mammalian *Odf1*, *Prm1*, *Prm2*, *Tnp1*, *Tnp2* genes. *Genomics* 92 : 101-106.

Klement AH, Koren-Morag N, Itsykson P, Berkovitz A (2013). Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection versus intracytoplasmic sperm injection : a step toward a clinical algorithm. *Fertile Steril* 99(5) : 1290-1293.

Knez K, Tomazevic T, Zorn B, Vrtacnik-Bokal E, Virant-Klun I (2012).

Intacytoplasmic morphologically selected sperm injection improves development and quality of preimplantation embryos in teratozoospermia patients. *Reprod Biomed Online* : 168-79.

Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasi H, Tanak T (1997). Increased deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril* 65 : 519-524.

Kono T, Obata Y, Wu Q, Niwa K, Ono Y, Yamamoto Y, Park ES, Deo JS, Ogawa H (2004). Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. *Nature* 428 : 860-864.

Koppers AJ, Mitchell LA, Wang P, Lin M, Aitken RJ (2011). Phosphoinositide 3 kinase signaling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. *Biochem J* 436 : 687-698.

Koscinski I, Ellnati E, Fossard C, Redin C, Muller J, *et al* (2011). *DPY19L2* deletion as a major cause of globozoospermia. *Am J Hum Genet* 88 : 344-350.

Kovanci E, Kovacs T, Moretti E, Vigue L, Bray-Ward P, Ward DC, Huszar G (2001). FISH assessment of aneuploidy frequencies in mature and immature human spermatozoa classified by the absence or presence of cytoplasmic retention. *Hum Reprod* 16(6) : 1209-1217.

Kramer JA and Krawetz SA (1997). RNA in spermatozoa : implications for the alternative haploid genome. *Mol Hum Reprod* 3 : 473-478.

Krawetz SA (2005). Paternal contribution : new insights and future challenges. *Nature Reviews* 6 : 633-642.

Krawetz SA, Kruger A, Lalancette C, Tagett R, Anton E, Draghici S, Diamond MP (2011). A survey of small RNAs in human sperm. *Hum Reprod* 26(12) : 3401-3412.

Kullisaar T, Türk S, Punad M, Korrovits P, Kisand K, Rehema A, Zilmer K, Zilmer M, Mändar R (2008). Oxidative stress in leucocytospermic prostatitis patients : preliminary results. *Andrologia* 40 : 161-172.

Kumar G, Patel D, Naz RK (1993). C-MYC mRNA is present in human sperm cells. *Cell Mol Biol Res* 39(2) : 111-117.

Kumari A, Yadav SK, Sher A (2012). Organizational and functional status of the Y-linked genes and loci in the infertile patients having normal spermiogram. *PlosOne* 7(7) : e41488 (1-12).

Kurahashi H, Bolor H, Kato T, Kogo H, Tsutsumi M, Inagaki H, Ohye T (2009). Recent advance in our understanding of the molecular nature of chromosome abnormalities. *J Hum Genet* 54 : 253-260.

Laberge RM and Boissonneault G (2005a). On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatid. *Biol Reprod* 73 : 289-296.

Laberge RM, Boissonneault G (2005b). Chromatin remodeling in spermatids : a sensitive step for the genetic integrity of the male gamete. *Arch Androl* 51 :125-133.

Lalancette C, Miller D, Li Y, Krawetz SA (2008). Paternal contributions : new functional insights for spermatozoa RNA. *J Cell Biochem* 104 : 1570-1579.

Lambard S, Galeraud-Denis I, Martin G, Levy R, Chocat A, Carreau S (2004). Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors : relationship to sperm motility and capacitation. *Mol Hum Reprod* 10(7) : 535-541.

Leduc F, Maquennehan V, Nkoma GB, Boissonneault G (2008b). DNA damage response during chromatin remodeling in elongating spermatid of mice. *Biol Reprod* 72(2) : 324-32.

Leduc F, Nkoma GB and Boissonneault G (2008a). Spermiogenesis and DNA repair : a possible etiology of human infertility and genetic disorders. *Sys Biol Reprod Med* 54 : 3-10

Lee J, Richburg JH, Younkin SC and Boekelheide K (1997). The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* 138 : 2081-2088.

Lefort G, Blanchet P, Rivier F, Chaze AM, Sarda P, Demaille J, Pellestor F (2003). Stable dicentric duplication-deficiency chromosome 14 resulting from crossing-over within a maternal paracentric inversion. *Am J Med Genet A* 118A (2) : 333-338.

Lehti MS, Kotaja N, Sironen A (2013). KIF3A is essential for sperm tail formation and manchette function. *Mol Cell Endocrinol* 377 : 44-55.

Lespinasse J, Bugge M, Rethore MO, North MO, Lundsteen C, Kirchhoff M (2004). De novo complex chromosomal rearrangements (CCR) involving 1,5 and 6 resulting in microdeletion for 6q14 in a female carrier with psychotic disorder. *Am J Med Genet* 128 : 199-203.

Lewis SE, Aitken RJ (2005). DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res* 322(1) : 33-41.

Li L, Heng X, Yun W, Zheng S, Zhang J, Fan S (2013). Familial complex chromosomal

rearrangement (CCR) involving 5 breakpoints on chromosomes 1, 3, and 13 in a severe oligozoospermic patient. *J Assist Reprod Genet* 30 : 423-429.

Li Y, Lalancette C, Miller D, Krawetz SA (2008). Characterization of nucleohistone and nucleoprotamine components in the mature human sperm nucleus. *Asian J Androl* 10 : 535-541.

Liehr T and Weise A (2007). Frequency of small supernumerary marker chromosomes in prenatal, newborn, developmental retarded and infertility diagnostics. *Int J Mol Med* 19 : 719-731.

Liehr T, Heller A, Starke H, Rubtsov N, Trifonov V, Mrasek K, Weise A, Kuechler A, Claussen U (2002). Microdissection based high resolution multicolour banding for all 24 human chromosomes. *Int J Mol Med* 9 : 335-339.

Liehr T, Mrasek K, Weise A, Dufke A, Rodriguez L, Martinez Guardia N, *et al* (2006). Small supernumerary marker chromosomes - progress towards a genotype-phenotype correlation. *Cytogenet Genome Res* 112 : 23-34.

Liehr T, Mrasek K, Weise A, Kuechler A, von Eggeling F, Claussen U, *et al* (2004). Characterization of small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in human. *Curr Genomics* 5 : 279-286.

Lim CK, Cho JW, Kim JY, Kang IS, Shim SH, Jun JH (2008). A healthy live birth after successful preimplantation genetic diagnosis for carriers of complex chromosome rearrangements. *Fertil Steril* 90 : 1680-1684.

Lin YH, Lin YM, Lin YH, Chuang L, Wu SY, Kuo PL (2004). Ring (Y) in two azoospermic men. *Am J Med Genet A* 128A(2) : 209-213.

Lin YN, Roy A, Yan W, Burns KH, Matzuk MM (2007). Loss of zona pellucida binding proteins in the acrosomal matrix disrupts acrosome biogenesis and sperm morphogenesis. *Mol Cell Biol* 27(19) : 6794-6805.

Linchoosten JO, Van Schooten FJ, Baumgartner A, Cemeli E, van Delft J, Anderson D, Godschalk RWL (2009). Use of spermatozoa mRNA profiles to study gene-environment interactions in human germ cells. *Mutat Res* 667 : 70-76.

Lindsey JS and Wilkindson MF (1996). An androgen-regulated homeobox gene expressed in rat testis and epididymis. *Biol Reprod* 55 : 975-983.

Liu G, Shi QW, Lu GX (2010). A newly discovered mutation in *PICK1* in a human with globozoospermia. *Asia J Androl* 12 : 556-560.

Loup V, Bernicot I, Janssens P, Hedon B, Hamamah S, Pellestor F, Anahory T (2010).

Combined FISH and PRINS sperm analysis of complex chromosomal rearrangement t(1;19;13) : an approach facilitating PGD. *Mol Hum Reprod* 16(2) : 111-116.

Lozano GM, Bejarano I, Espino J, Gonzalez D, Ortiz A *et al* (2009). Relationship between caspase activity and apoptotic markers in human sperm in response to hydrogen peroxide and progesterone. *J Reprod Dev* 55 : 615-621.

Lu L, Lin M, Xu M, Zhou ZM, Sha JH (2006). Gene functional research using polyethylenimine-mediated in vivo gene transfection into mouse spermatogenic cells. *Asian J Androl* 8 : 53-59.

Lu LY, Wu J, Ye L *et al* (2010). RNF8-dependent histone modifications regulate nucleosome removal during spermatogenesis. *Dev Cell* 18(3) : 371-384.

Luciani JM, Guichaoua MR, Mattei A, Morazzani MR (1984). Pachytene analysis of a man with a 13q;14q translocation and infertility. Behavior of the trivalent and non random association with the sex vesicle. *Cytogenet Cell Genet* 38 : 14-22.

Maatouk DM, Loveland KL, McManus MT, Moore K, Harfe BD (2008). Dicer 1 required for differentiation of mouse male germline. *Biol reprod* 79 : 696-703.

Machev N, Gosset P, Viville S (2005). Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes : teratozoospermia. *Cytogenet Genome Res* 111(3-4) : 352-357.

Macleán JA, Chen MA, Wayne CM, Bruce SR, Rao M, Meistrichml, Macleod C, Wilkinson MF (2005). RhoX : a new homeobox gene cluster. *Cell* 120 : 369-382.

Mahfouz R, Sharma R, Sharma D, Sabanegh E, Agarwal A (2009). Diagnostic value of total antioxidant capacity (TAC) in human seminal plasma. *Fertil Steril* 91 : 805-811.

Maiti S, Doskow J, Li S, Nhim RP, Lindsey JS, Wilkindson MF (1996). The Pem homeobox gene. Androgene dependent and independent promoteurs and tissue-specific alternative RNA splicing. *J Biol Chem* 271 : 17536-46.

Manandhar G, Schatten H, Sutovsky P (2005). Centrosome reduction during gametogenesis and its significance. *Biol Reprod* 72 : 2-13.

Mandan K (2012). Balanced complex chromosome rearrangements : reproductive aspects. A review. *Am J Med Genet Part A* 158A : 947-963.

Manvelyan M, Riegel M, Santos M, Fuster C, *et al* (2008). Thirty-two new cases with small supernumerary marker chromosomes detected in connection with fertility problems : Detailed molecular cytogenetic characterization and review of the littérature. *Int J Mol Med* 21 : 705-714.

Mao B and Niehrs C (2003). Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling. *Gene* 302 : 179-183.

Marcelli F, Robin G, Rigot JM (2009). Prise en charge de l'infertilité. *Progrès en urologie* 19 : 260-264.

Mark M, Jacob H, Oulad-Abdelghani M, Dennefeld C, Féret B *et al.* (2008). *STRA8*-deficient spermatocytes initiate, but fail to complete, meiosis and undergo premature chromosome condensation. *J Cell Science* 121 : 3233-3242.

Martin G, Sabido O, Durand P, Levy Rachel (2005). Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187 : relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction. *Hum Reprod* 20(12) : 3459-3468.

Martin RH (2008). Cytogenetic determinants of male infertility. *Hum Reprod Update* 14(4) : 379-390.

Martin RH, Hildebrand KA, Yamamoto J, Peterson D, Rademaker AW, Taylor P, Lin CC (1986). The meiotic segregation of human sperm chromosomes in two men with accessory marker chromosomes. *Am J Med Genet* 25(2) : 381-388.

Martin RH, Lin CC, Balkan W, Burns K (1982). Direct chromosomal analysis of human spermatozoa : preliminary results from 18 normal men. *Am J Hum Genet* 34 : 459-468.

Mehdi M, Khantouche L, Ajina M, Saad A (2009). Detection of DNA fragmentation in human spermatozoa : correlation with semen parameters. *Andrologia* 41 : 383-386.

Mennicke K, Diercks P, Schlieker H, Bals-Pratsch M, Al HS, Diedrich K, Schwinger E (1997). Molecular cytogenetic diagnostics in sperm. *Int J Androl* 20(3) : 11-19.

Meyer-Ficcaml, Lonchar JD, Ihara M, Meistrchml, Austin CA, Meyer RG (2011). Poly(ADP-ribose) polymerases PARP1 and PARP2 modulate topoisomerase II beta (TOP2B) function during chromatin condensation in mouse spermiogenesis. *Biol Reprod* 84(5) : 900-9.

Metzler-Guillemain C, Victorero G, Lepoivre C, Bergon A, Yammine M, Perrin J, Sari-Minodier I, Boulanger N, Rihet P, Nguyen C (2015). Sperm mRNAs and microRNAs as candidate markers for the impact of toxicants on human spermatogenesis : an application to tobacco smoking. *Syst Biol Reprod Med* 61(3) : 139-149.

Miharu N (2005). Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal

somatic karyotypes : oligozoospermia. *Cytogenet Genome Res* 111 : 347-351.

Miki K, Willis WD, Brown PR, Goulding EH, Fulcher KD, Eddy EM (2002). Targeted disruption of the *Akap4* gene causes defects in sperm flagellum and motility. *Dev Biol* 248 : 331-342.

Miklos GL (1974). Sex-chromosome pairing and male infertility. *Cytogenet Cell Genet* 13 : 558-577.

Milazzo JP, Rives N, Mousset-Siméon N, Macé B (2006). Chromosome constitution and apoptosis of immature germ cells present in sperm of two 47,XYY infertile males. *Hum Reprod* 21(7) : 1749-1758.

Miller D, Briggs D, Snowden H, Hamlington J, Rollinson S, Lilford R, Krawetz SA (1999). A complex population of RNAs exists in human ejaculate spermatozoa : implications for understanding molecular aspects of spermiogenesis. *Gene* 237 : 385-392.

Miller D, Brinkworth M, Iles D (2010). Paternal DNA packaging in spermatozoa : more than the sum of its parts ? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 139 : 287-301.

Miller D, Ostermeier GC (2006). Spermatozoa RNA : why is it there and what does it do ? *Gynécol Obstrét Fertil* 34 : 840-846.

Miller D, Ostermeier GC, Krawetz SA (2005). The controversy, potential and roles of spermatozoa RNA. *TRENDS Mol Med* 11(4) : 156-163.

Miller D, Tang PZ, Skinner C, Lilford R (1994). Differential RNA fingerprinting as a tool in the analysis of spermatozoal gene expression. *Hum Reprod* 9(5) : 864-869.

Montanaro GM, Kruger TF, Coetzee K, Smith K, Van der Merwe JP, Lombard CJ (2001). Stepwise regression analysis to study male and female factors impacting on pregnancy rate in an intrauterine insemination programme. *Andrologia* 33 : 135-141.

Montjean D, De La Grange P, Gentien D, Rapinat A, Belloc S, Cohen-Bacrie P, Menezo Y, Benkhalifa M (2012). Sperm transcriptome profiling in oligozoospermia. *J Assist Reprod Genet* 29 : 3-10.

Moon RT, Brown JD, Torres M (1997). WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development. *Trends Genet* 13 : 157-162.

Morel F, Douet-Gilbert N, Le Bris MJ, Amice V, Le Martelo MT, Roche S, Valeri A, Derrien V, Amice J and De Braekeleer M (2004a). Chromosomal abnormalities in couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. A study of 370 couples and review of the literature. *Int J Androl* 27(3) : 178-82.

Morel F, Douet-Guilbert N, Roux C, Tripogney C, Le Bris MJ, De Braekeleer M, Bresson JL (2004b). Meiotic segregation of a t(7;8)(q11.21;cen) translocation in two carrier brothers. *Fertil Steril* 81(3) : 682-685.

Morel F, Laudier B, Guerif F, Couetml, Royere D, Roux C, Bresson JL, Amice V, De Braekeleer M and Douet-Gilbert N (2007). Meiotic segregation analysis in spermatozoa of pericentric inversion carriers using fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 22(1) : 136-141.

Morel F, Mercier S, Rouc C, Elmrini T, Clavequin MC, Bresson JL (1998). Interindividual variations in the disomy frequencies of human spermatozoa and their correlation with nuclear maturity as evaluated by aniline blue staining. *Fertil Steril* 69(6) : 1122-1127.

Morel F, Roux C and Bresson JL (2000). Segregation of sex chromosome in spermatozoa of 46,XY/47,XXY men with multicolour fluorescence in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod* 6(6) : 566-570.

Moura AA, Chapman DA, Killian GJ (2007). Proteins of accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididymal sperm from Holstein bulls of documented fertility. *Mol Reprod Dev* 74 : 214-222.

Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafer MA, Thomas AJ, Agarwal A (2004). Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod* 19 : 129-138.

Mupfiga C, Fisher D, Kruger T, Henkel R (2013). The relationship between seminal leucocytes, oxidative status in the ejaculate, and apoptotic markers in human spermatozoa. *Sys Biol Reprod Med* 59 : 304-311.

Muratori M, Maggi M, Spinelli S, Filimberti E, Forti G *et al* (2003). Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. *J Androl* 24 : 253-262.

Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Alvarez JG, Fernandez JL (2007). Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH analysis. *J Androl* 28(1) : 38-49.

Murphy DB, Wiese B, Burfeind P, Schmundt D, Mattei MG, Schulz-Schaeffer W, Thies U (1994). Human brain factor 1, a new member of the fork head gene family. *Genomics* 21 : 551-557.

Naaby-Hansen S, Mandal A, Wolkowicz MJ, Sen B, Westbrook VA *et al.* (2002). CABYR, a novel calcium-binding tyrosine phosphorylation-regulated fibrous sheath protein involved in capacitation. *Dev Biol* 242 : 236-254.

Navarro-Costa P, Nogueira P, Carvalho M, Leal F, Cordeiro I, Calhaz-Jorge C, Gonçalves J, Plancha CE (2010b). incorrect DNA methylation of the *DAZL* promoter CpG island associates with defective human sperm. *Hum Reprod* 25(10) : 2647-2654.

Navarro-Costa P, Plancha CE, Gonçalves J (2010a). genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome : thriller or filler for male (in)fertility? *J Biomed Biotech* 2010

Nielsen J, Wohlert M (1991). Chromosomal abnormalities found among 34910 newborn children : result from a 13-year incidence study in Aarhus, Denmark. *Hum Genet* 87 : 81-83.

Nistal M, Paniagua R, Herruzo A (1977). Multi-tailed spermatozoa in a case with asthenospermia and teratospermia. *Vrchows Arch B Cell Pathol* 26 : 111-118.

O'Flaherty CM, Chan PT, Hales BF, Robaire B (2012). Sperm chromatin structure components are differentially repaired in cancer survivors. *J Androl* 33 : 629-636.

O'Flynn O'Brien KL, Varghese AC, Agarwal A (2010). The genetics causes of male factor infertility : A review. *Fertil Steril* 93(1) : 1-12.

OBryan MK, Clark BJ, McLaughlin EA, DSylva RJ *et al* (2013). RBM5 is a male germ cell splicing factor and is required for spermatid differentiation and male fertility. *Plos Genetics* 9(7) : e1003628.

Ogur G, van Assche E, Vegetti W, Verheyen G, Tournaye H, Bonduelle M *et al* (2006). Chromosomal segregation in spermatozoa of 14 robertsonian translocation carriers. *Mol Hum Reprod* 12 : 209-215.

Oleszczuk K, Augustinsson L, Bayat N, Giwercman A and Bungum M (2012). Prevalence of high DNA fragmentation index in male partners of unexplained infertile couples. *Andrology* 1 : 357-360.

Oliva Rafael (2006). Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 12(4) : 417-435.

Oracova E, Musilova P, Kopecna O, Rybar R, Vozdova M, Vesela K, Rubes J (2009). Sperm and embryo analysis in a carrier of supernumerary inv dup(15) marker chromosome. *J Androl* 30(3) : 233-239.

Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, Khatri P, Krawetz SA (2002). Spermatozoal RNA

of normal fertile men. *Lancet* 360 : 772-777.

Ostermeier GC, Goodrich RJ, Moldenhauer JS, Diamond MP, Krawetz SA (2005). A suite of novel human spermatozoa RNAs. *J Androl* 26(1) : 70-74.

Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, Diamond MP, Krawetz SA (2004). Delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature* 429 : 154.

Ostling O et Johanson KJ (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123 : 291-298.

Ovari L, Sati L, Stronk J, Borsos A, Ward DC, Huszar G (2010). Double probing individual human spermatozoa : aniline blue staining for persistent histones and fluorescence in situ hybridization for aneuploidies. *Fertil Steril* 93(7) : 2255-2261.

Paasch U, Agarwal A, Gupta AK, Sharma RK, Grunewald S, Thomas Jr AJ *et al* (2003a). Apoptosis signal transduction and the maturity status of human spermatozoa. *Ann N Y Acad Sci* 1010 : 486-488.

Paasch U, Grunewald S, Fitzl G, Glander HJ (2003b). Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. *J Androl* 24 : 246-252.

Paetzold U, Schwanitz G, Schubert R, Van der Ven K, Montag M (2006). Sperm analyses, genetic counseling and therapy in an infertile carrier of a supernumerary marker chromosome 15. *Adv Med Sci* 51 : 31-35.

Palermo G, Munné S, Cohen J (1994). The human zygote inherits its mitotic potential from the male gamete. *Hum Reprod* 9 : 1220-1225.

Pan CS, Qiu XF, Huang XX, Weng ZL, Huang XF (2012). FISH analysis of meiotic segregation results of the spermatozoa from male pericentric inversion carriers. *Zhonghua Nan Ke Xue* 18(4) : 344-348.

Pan J, Eckardt S, Leu NA, Buffone MG, Zhou J, Gerton GL, McLaughlin KJ, Wang PJ (2009). Inactivation of Nxf2 causes defects in male meiosis and age-dependent depletion of spermatogonia. *Dev Biol* 330(1) : 167-174.

Pang MG, Zackowski JL, Hoegerman SF *et al* (1995). Detection by fluorescence in situ hybridization of chromosome 7, 11, 12, 18, X and Y abnormalities in sperm from oligoasthenoteratozoospermia patients of an in vitro fertilization program. *J Assist Reprod Genet* 12(suppl).

Papaoannou MD, Nef S (2010). MicroRNAs in the testis : bulding up male fertility.

J Androl 31 : 26-33.

Pattabiraman S, Baumann C, Guisado D, Eppig JJ, Schimenti JC, De La Fuente R (2014). Mouse BRWD1 is critical for spermatid postmeiotic transcription and female meiotic chromosome stability. J Cell Biol 208(1) : 53-69.

Pellestor F, Anahory T, Lefort G, Puechberty J, Liehr T, Hedon B, Sarda P (2011). Complex chromosomal rearrangements : origin and meiotic behavior. Hum Reprod Update 17(4) : 476-494.

Pentikäinen V, Erkkilä K and Dunkel L (1999). Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. Am J Physiol Endocrinol Metab 276 : 310-316.

Perrin A, Basinko A, Dou-et Guilbert N, Gueganic N, Le Bris MJ, Amice V, De Braekeleer M, Morel F (2011). Aneuploidy and DNA fragmentation in sperm of carriers of a constitutional chromosome abnormality. Cytogen Gen Res 133 : 100-106.

Perrin A, Caer E, Oliver-Bonet M, Navarro J, Benet J, Amice V, De Braekeleer M, Morel F (2009). DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality. Fertil Steril 92(2) : 583-589.

Perrin A, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Keromnes G, Langloisml, Barrière P, Amice J, Amice V, De Braekeleer M, Morel F (2008). Segregation of chromosome in sperm of a t(X;18)(q11;p11.1) carrier inherited from his mother : case report. Hum Reprod 23(1) : 227-230.

Perrin A, Louanjli N, Ziane Y, Louanjli T, Le Roy C, Gueganic N, Amice V, De Braekeleer M, Morel F (2011). Study of aneuploidy and DNA fragmentation in gametes of patients with severe teratozoospermia. Reprod Biomed Online 22 : 148-154.

Perrin A, Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Amice J, Amice V, De Braekeleer M (2010). A study of meiotic segregation of chromosomes in spermatozoa of translocation carriers using fluorescent *in situ* hybridization. Andrologia 42 : 27-34.

Perrin A, Nguyen MH, Douet-Guilbert N, Morel F, De Braekeleer M (2013). Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection or intracytoplasmic sperm injection : where are we 12 years later? Expert Rev Obstet Gynecol 8(3) : 261-270.

Perry MJ (2008). Effects of environmental and occupational pesticide exposure on human sperm : a systematic review. Hum Reprod Update 14(3) : 233-242.

Pessot CA, Brito M, Figueroa J, Concha II, Yanez A, Burzio LO (1989). Presence of RNA in the sperm nucleus. Biochem Biophys Res Commun 158(1) : 272-278.

Pieters MH, Geraedts JP, Meyer H, Dumoulin JC, Evers JL, Jongbloed RJ, Nederlor

PM, Van der Flier S (1990). Human gametes and zygotes studied by nonradioactive in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 53(1) : 15-19.

Pinho MJ, Neves R, Costa P, Ferras C, Sousa M, Alves C, Almeida C, Fernandes S, Silva J, Ferras L, Barros A (2005). Unique t(Y;1)(q12;q12) reciprocal translocation with loss of heterochromatic region of chromosome 1 in a male with azoospermia due to meiotic arrest : a case report. *Hum Reprod* 20(3) : 689-696.

Pittoggi C, Beraldi R, Sciamanna I, Barberi L, Giordano R, Magnano AR, *et al* (2006). Generation of biologically active retro-genes upon interaction of mouse spermatozoa with exogenous DNA. *Mol Reprod Dev* 73 : 1239-1246.

Pittoggi C, Renzi L, Zaccagnini G, Cimini D *et al* (1999). A fraction of mouse sperm chromatin is organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA. *J Cell Sci* 112 : 3537-3548.

Plachot M, Belaisch-Allart J, Mayenga JM, Chouraqui A, Tesquier L *et al* (2002). Outcome of conventional IVF and ICSI on sibling oocytes in mild male factor infertility. *Hum Reprod* 17 : 362-369.

Platts AE, Dix DJ, Chemes HE, Thompson KE, Goodrich R, Rockett JC, Rawe VY *et al* (2007). Success and failure in human spermatogenesis as revealed by teratozoospermic RNAs. *Hum Mol Genet* 16(7) : 763-773.

Pylyp LY, Spinenko LO, Verhoglyad NV, Zukin VD (2013). Chromosomal abnormalities in patients with oligozoospermia and non-obstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet* 30 : 729-732.

Ravel C, Berthaut I, Bresson JL, *et al* (2006). Prevalence of chromosomal abnormalities in phenotypically normal and fertile adult males : large-scale survey of over 10000 sperm donor karyotypes. *Hum Reprod* 21(6) : 1484-1489.

Richardson ME, Bleiziffer A, Tuttelmann F, Gromoll J, Wilkindson MF (2014). Epigenetic regulation of the *RHOX* homeobox gene cluster and its association with human male infertility. *Hum Mol Genet* 23(1) : 12-23.

Rives N (2005). Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes : asthenozoospermia. *Cytogenet Genome Res* 111 : 358-362.

Rives N, Milazzo JP, Miraux L, North MO, Sibert L, Macé B (2005). From spermatocytes to spermatozoa in an infertile XYY male. *Inter J Androl* 28 : 304-310.

Rives N, Siméon N, Milazzo JP, Barthélémy C, Macé B (2003). Meiotic segregation of sex chromosomes in mosaic and non-mosaic males : case reports and review of the

literature. *Int J Androl* 26 : 242-249.

Robbins WA, Vine MF, Truong KY and Everson RB (1997). Use of fluorescence in situ hybridization (FISH) to assess effects of smoking, caffeine, and alcohol on aneuploidy load in sperm of healthy men. *Environ Mol Mutagen* 30 : 175-183.

Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, and Vassalli P (1997). An early and massive wave of germinal cells apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *The EMBO J* 16 : 2262-2270.

Rodriguez S, Goyanes V, Segrelles E, Blasco M, Golsavez J, Fernandez JL (2005). Critically short telomeres are associated with sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 84(4) : 843-845.

Rohwedder A, Liedigk O, Schaller J, Glander HJ, Werchau H (1996). Detection of mRNA transcripts of beta 1 integrins in ejaculated human spermatozoa by nested reverse transcription-polymerase chain reaction. *Mol Hum Reprod* 2(7) : 499-505.

Romero Y, Meikar O, Papaioannou MD, Conne B, Grey C *et al* (2011). Dicer1 depletion in male germ cells leads to infertility due to cumulative meiotic and spermiogenic defects. *PlosOne* 6(10) : e25241.

Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, Scherer S, McLay K, Muzny D, Platzer M, Howell GR, Brrows C, Bird CP *et al* (2005). The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* 434 : 325-337.

Roti Roti JL, Wright WD (1987). Visualization of DNA loops in nucleoids from HeLa cells : assays for DNA damage and repair. *Cytometry* 8(5) : 461-467.

Rouen A, Balet R, Dorna M, Hyon C, Pollet-Villard X, Joyé N *et al* (2013a). Discontinuous gradient centrifugation (DGC) decreases the proportion of chromosomally unbalanced spermatozoa in chromosomal rearrangement carriers. *Hum Reprod* 28(7) : 2003-2009.

Rouen A, Pyram K, Pollet-Villard X, Hyon C, Dorna M, *et al* (2013b). Simultaneous cell by cell study of both DNA fragmentation and chromosomal segregation in spermatozoa from chromosomal rearrangement carriers. *J Assist Reprod Genet* 30 : 383-390.

Rougier N, Uriondo H, Papier S, Sueldo C, Alvarez Sedo C (2014). Changes in DNA fragmentation during sperm preparation for intracytoplasmic sperm injection over time. *Fertil Steril* 100(1) : 69-74.

Roux C, Tripogney C, Morel F, Joanne C, Fellmann F, Clavequin MC, *et al* (2005).

Segregation of chromosomes in sperm of Robertsonian translocations carriers. *Cytogenet Genome Res* 111 : 291-296.

Rudak E, Jacobs PA, Yanagimachi R (1978). Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature* 274(31) : 911-913.

Rybouchkin A, Dozortsev D, Pelinck MJ, De Sutter P, Dhont M (1996). Analysis of the oocyte activating capacity and chromosomal complement of round-headed human spermatozoa by their injection into mouse oocytes. *Hum Reprod* 11 :2170-5.

Sakkas D and Alvarez JG (2010). Sperm DNA fragmentation : mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil and Steril* 93(4) : 1027-36.

Sakkas D, Mariethoz E and St John JC (1999a). Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* 251 : 350-355.

Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi GP, Bianchi U (1999b). Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Reviews of Reproduction* 4 : 31-37.

Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D (2002). Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 66 : 1061-1067.

Saleh R, Agarwal A, Nelson D, Nada E, El-Tonsy MH, Alvarez JG, Thomas AJ, Sharma R (2002). Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men : a prospective study. *Fertil Steril* 78 : 313-318.

Sati L, Ovari L, Bennett D, Simon SD, Demir R, Huszar G (2008). Double probing of human spermatozoa for persistent histones, surplus cytoplasm, apoptosis and DNA fragmentation. *Reprod Biomed Online* 16 : 570-9.

Saunders CM, Swann K, Lai FA (2007). PLCzeta, a sperm-specific PLC and its potential role in fertilization. *Biochem Soc Symp* 74 : 23-36.

Schatten G (1994). The centrosome and its mode of inheritance : the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. *Dev Biol* 165 : 299-335.

Schirren CG, Holstein AF, Schirren C (1971). Uber die Morphogenese rundkopfiger Spermatozoen des Menschen. *Andrologia*.3 :125.

Schulz S, Jakubiczka S, Kropf S, Nickel I, Muschke P, Kleinstein J (2006). Increased frequency of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in

infertile males. *Fertile Steril* 85 : 135-138.

Secretan B, Straif K, Baan R, *et al*, WHO international agency for research on cancer monograph working group (2009). A review of human carcinogens-Part E : tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *Lancet Oncol* 10(11) : 1033-4.

Selva DM, Bassas L, Munell F, Mata A, Tekpetey F, Lewis JG, Hammond GL (2005). Human sperm sex hormone-binding globulin isoform : characterization and measurement by time-resolved fluorescence immunoassay. *J Clin Endocrinol Metabol* 90(11) : 6275-6282.

Sendler E, Johnson GD, Mao S, Goodrich RJ, Diamond MP, Hauser R, Krawetz SA (2013). Stability, delivery and functions of human sperm RNAs at fertilization. *Nucleic Acids Res* 41(7) : 4104-4117.

Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G (2005). Sperm DNA fragmentation : threshold value in male infertility. *Hum Reprod* 20(12) : 3446-3451.

Setti AS, De Almeida Ferreira Braga DP, Laconelli Jr A, Aoki T, Borges Jr E (2013). Twelve years of MSOME and IMSI : a review. *Reprod Biomed Online* 27 : 338-352.

Setti AS, Ferreira RC, de Almeida Ferreira Braga DP, Figueira RCS, laconelli Jr A, Borges Jr E (2010). Intracytoplasmic sperm injection outcome versus intracytoplasmic morphologically sperm injection outcome : a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 21 : 450-455.

Shah C, Modi D, Sachdeva G, Gabkar S, D'Souza S, Puri C (2005). N-terminal region of progesterone receptor B isoform in human spermatozoa. *Int J Androl* 28 : 360-371.

Shamshi MB, Iman SN, Dada R (2011). Sperm DNA integrity assays : diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *J Assist Reprod Genet* 28 : 1073-1085.

Sharma RK, Sabanegh E, Mahfouz R, Gupta S, Thiagarajan A, Agarwal A (2010). TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility. *J Urology* 76(6) : 1380-1386

Siffroi JP and Dadoune JP (2001). Accumulation of transcripts in the mature human sperm nucleus : Implication of the haploid genome in a functional role. *Ita J Anat Embryol* 106 : 189-197.

Siffroi JP, Benzacken B, Straub B, Le Bourhis C, North MO, Curotti G, Bellec V, Alvarez S, Dadoune JP (1997). Assisted reproductive technology and complex chromosomal rearrangements : the limits of ICSI. *Mol Hum Reprod* 3 : 847-851.

- Simon L**, Proutski I, Stevenson M, Jennings D, McManus J, Lutton D, Lewis SEM (2013). Sperm DNA damage has negative association with live birth rates after IVF. *Reprod Biomed Online* 26 : 68-78.
- Singh NP**, Danner DB, Tice RR, McCoy MT, Collins GD and Schneider EL (1989). "Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm." *Exp Cell Res* 184(2) :461-70.
- Singh NP**, McCoy MT, Tice RR and Schneider EL (1988). "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells." *Exp Cell Res* 175(1) : 184-91.
- Smirnova NA**, Romanienko PJ, Khil PP, Camerini-Otero RD (2006). Gene expression profiles of *Spo11*^{-/-} mouse testes with spermatocytes arrested in meiotic prophase I. *Reproduction* 132 : 67-77.
- Smit M**, van Casteren NJ, Wildhagen MF, Romjin JC, Dohle GR (2010). Sperm DNA integrity in cancer patients before and after cytotoxic treatment. *Hum Reprod* 25 : 1877-1883.
- Soleimani M**, Tavalae M, Aboutorabi R, Adib M, Bahramian H, Janzamin E, Kiani A, Nasr-Esfahani MH (2010). Evaluation of Fas positive sperm and complement mediated lysis in subfertile individuals. *J Assist Reprod Genet* 27 : 477-482.
- Soler A**, Sanchez A, Carrio A, Badenas C, Mila M, Margarit E, Borrell A (2005). Recombination in a male carrier of two reciprocal translocation involving chromosome 14, 14', 15, and 21 leading to balanced and unbalanced rearrangements in offspring. *Am J Med Genet* 134A : 309-314.
- Spadafora C** (2008). Sperm-mediated 'reverse' gene transfer : a role of reverse transcriptase in the generation of new genetic information. *Hum Reprod* 23(4) : 735-740.
- Spermon JR**, Ramos L, Wetzels AM, Sweep CG, Braat DD, Kiemeneij LA, *et al* (2006). Sperm integrity pre- and post-chemotherapy in men with testicular germ cell cancer. *Hum Reprod* 21 : 1781-1786.
- Spiral A** (1986). Epidemiology of human reproduction. *Hum Reprod* 1 : 111-115.
- Steuerward N** (2005). Meiotic spindle checkpoints for assessment of aneuploidy oocytes. *Cytogenet Genome Res* 111 : 256-259.
- Stouffs K**, Tournaye H, Liebaers I, Lissens W (2009). Male infertility and the involvement of the X chromosome. *Hum Reprod Update* 15(6) : 623-637.
- Stuppia L**, Antonucci I, Binni F, Grifone N, Colosimo A *et al* (2005). Screening of

mutations in the CFTR gene in 1195 couples entering assisted reproduction technique programs. *Eur J Hum Genet* 13 : 959-964.

Sutovsky P and Chatten G (2000). Paternal contributions to the mammalian zygote : Fertilization after sperm-egg fusion. *Int Rev Cytol* 195 : 1-65.

Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Domiko T, Simerly C, Schatten G (1999). Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 402 : 371-372.

Tamburino L, Guglielmino A, Venti E, Chamayou S (2008). Molecular analysis of mutations and polymorphisms in the CFTR gene in male infertility. *Reprod Biomed Online* 17 : 27-35.

Tang CJ, Lin CY, Tang TK (2006). Dynamic localization and functional implications of aurora-C kinase during male mouse meiosis. *Dev Biol* 290 : 398-410.

Tang SS, Gao H, Zhao Y, Ma S (2010). Aneuploidy and DNA fragmentation in morphologically abnormal sperm. *Int J Androl* 33 : e163-e179.

Tejada R, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S (1984). A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril* 42 : 87-91.

Templado C, Uroz L, Estop A (2013). New insights on the origin and relevance of aneuploidy in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 19(10) : 634-643.

Templado C, Vidal F, Navarro J, Marina S, Egozcue J (1984). Meiotic studies and synaptonemal complex analysis in two infertile males with a 13/14 balanced translocation. *Hum Genet* 67(2) : 162-165.

Terquem T and Dadoune JP (1983). Aniline blue staining of human spermatozoa chromatin. Evaluation of nuclear maturation. In : Andre J, ed. *The sperm cell*. The Hague, The Netherlands : Martinus Nijhoff Publishers : 249-252.

Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, *et al* (1991). Incidence and main causes of infertility in a resident population (1 850 000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod* 6 :811-6.

Tokuhiro K, Isotani A, Yokota S, Yano Y, Oshio S, Hirose M, Wada M *et al* (2009). OAZ-t/OAZ3 is essential for rigid connection of sperm tails to heads in mouse. *Plos Genet* 5 : e1000712.

Tomaiuolo R, Fausto M, Elce A, Strina I, Ranieri A, Amato F, Castakdo G, De Placido G, Alviggi C (2011). Enhanced frequency of CFTR gene variants in couples who are candidates for assisted reproductive technology treatment. *Clin Chem Lab*

Med 49 : 1289-1293.

Tomlinson MJ, Amissah-Arthur JB, Thompson KA, Kasraie JL, Bentick B (1996). Pronostic indicators for intrauterine insemination (IIU) : statistical model for IIU success. Hum Reprod 11 : 1892-1896.

Torregrosa N, Dominguez-Fandos D, Camejo MI, Shirley CR, Meistrichml, Ballecà JL and Oliva R (2006). Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ration, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. Hum Reprod 21 : 2084-2089.

Toshimori K (2003). Biology of spermatozoa maturation : an overview with an introduction to this issue. Microscopy research and technique 61 : 1-6.

Tournaye H (2012). Male factor infertility and ART. Asian J Androl 14 : 103-108.

Trougakos IP, Gonos ES (2002). Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer. Int J Biochem Cell Biol 34 : 1430-1448.

Umehara T, Nakamura Y, Jang MK, Nakano K, Tanaka A, Ozato K, Padmanabhan B, Yokoyama S (2010). Structural basis for acetylated histone H4 recognition by the human BRD2 bromodomain. J Biol Chem 285 : 7610-7618.

Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I (1996). Hum Reprod 11 : 1-26.

vanWert JM, Wolfe SA, Grimes SR (2008). Binding of RFX2 and NF-Y to the Testis-Specific Histone H1t Promoter May be Required for Transcriptional Activation in Primary Spermatocytes. Journal of Cellular Biochemistry 104 :1087-1101.

Vassena R, Boué S, Gonzalez-Roca E, Aran B, Auer H, Veiga A, Belmonte JCI (2011). Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during preimplantation development. Development 138 : 3699-3709.

Vialard F, Delanete A, Clement F, Simon-Bouy B, Aubriot FX, Selve J (2007). Sperm chromosome analysis in two cases of paracentric inversion. Fertil Steril 87(2) : 418.e1-5.

Vidal F, Templado C, Navarro J, Marina S, Egozcue J (1982). Meiotic and synaptonemal complex studies in a 14/21 translocation carrier. Int J Androl 5 : 21-26.

Vincent MC, Daudin M, De MP, Massat G, Mieusset R, Pontonier F, Calvas P, Bujan L, Bourrouillou G (2002). Cytogenetic investigations of infertile men with low sperm counts : a 25 year experience. J Androl 23 : 18-22.

Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O *et al* (1996). Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. Hum Mol Genet

5(7) : 933-943.

Wang JC (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases : a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 :430-440.

Wang M, Sun J, Wang L, Gao X, Lu X, Wu Z, Wang Y, Liu K, Tao J, Wu Y (2014). Assessment of density gradient centrifugation (DGC) and sperm chromatin dispersion (SCD) measurements in couples with male factor infertility undergoing ICSI. *J Assist Reprod Genet* (Epub ahead of print).

Wang W, Hu Y, Zhu H, Li J, Zhu R, Wang Y (2009). A case of an infertile male with a small supernumerary marker chromosome negative for M-FISH and containing only heterochromatin. *J Assist Reprod Genet* 26 : 291-295.

Ward WS, Kimura Y, Yanaghimachi R (1999). An intact nuclear matrix may be necessary for the mouse paternal genome to participate in embryonic development. *Biol Reprod* 60 : 702-706.

Ward WS, Kishikawa H, Akutsu H, Yanaghimachi R (2000). Further evidence that sperm nuclear proteins are necessary for embryogenesis. *Zygote* 8 : 51-56.

Wells D, Bermudez MG, Steuerwald N, Thornhill AR, Walker DL, Malter H, Delhantv JD, Cohen J (2005). Expression of genes regulating chromosome segregation, the cell cycle and apoptosis during human preimplantation. *Hum Reprod* 20(5) : 1339-48.

Whiteford ML, Baird C, Kinmond S, Donaldson B, Davidson HR (2000). A child with biosatellited, dicentric chromosome 15 arising from a maternal paracentric inversion of chromosome 15q. *J Med Genet* 37 : E11.

Wiland E, Jarmuz M, Kurpisz M (2005). Segregation of a marker chromosome der(20) in the sperm of a male with karyotype 46,XX(96)/47,XY,+mar(4). *Med Sci Monit* 11 : CS9-CS15.

Witkin SS, Bendich A (1977). DNA synthesizing activity in normal human sperm : location and characterization of the endogenous reaction. *Exp Cell Res* 106 : 47-54.

Wojcik C, Benchaid M, Lornage J, Czyba JC, Guerin JF (2000). Proteasome in human spermatozoa. *Int J Androl* 23(3) : 169-177.

Wong EC, Ferguson KA, Chow V, Ma S (2008). Sperm aneuploidy and meiotic sex chromosome configurations in an infertile XYY male. *Hum Reprod* 23(2) : 374-378.

Worsham MJ, Miller DA, Devries JM, *et al* (1989). A dicentric recombinant 9 derived from a paracentric inversion : phenotype, cytogenetics, and molecular analysis of centromeres. *Am J Hum Genet* 44 : 115-123.

Wykes SM and Krawetz (1999). Gene potentiation : forming long-range open chromatin structures. *Gene Ther Mol Biol* 4 : 303-312.

Wykes SM and Krawetz SA (2003). The structural organization of sperm chromatin. *The journal of Biological Chemistry* 278(32) : 29471-29477.

Wykes SM, Visscher DW, Krawetz SA (1997). Haploid transcripts persist in mature human spermatozoa. *Hum Reprod* 3 : 15-19.

Wu YY, Yang Y, Xu YD, Yu HL (2015). Targeted disruption of the spermatid-specific gene *Spata31* causes male infertility. *Mol Reprod Dev* [Epub ahead of print].

Xiao N, Kam C, Shen C, Jin W, Wang J, Lee KM, Jiang L, Xia J (2009). *PICK1* deficiency causes male infertility in mice by disrupting acrosome formation. *J Clin Invest* 19(4) : 802-812.

Xie BG, Huang YH, Zhu WJ, Jin S (2013). Comparison of the outcome of conventional in vitro fertilization and cytoplasmic sperm injection in moderate male infertility from ejaculate. *Urol Int* 13.

Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ (1976). The use of zona-free ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 15 : 471-476.

Yang F, Gell K, van der Heijden GW, Eckardt S, Leu NA *et al* (2008). Meiotic failure in male mice lacking an X-linked factor. *Genes Dev* 22 : 1089-1098.

Yatsenko AN, Georgiadis AP, Murthy LJ, Lamb DJ, Matzuk MM (2013). *UBE2B* mRNA alterations are associated with severe oligozoospermia in infertile men. *Mol Hum Reprod* 19(6) : 388-394.

Yatsenko AN, Yatsenko SA, Weedin JW, Lawrence AE, Patel A, Peacock S, Matzuk MM, Lamb DJ, Cheung SW, Lipshultz LI (2010). Comprehensive 5-year study of cytogenetic aberrations in 668 infertile men. *J Urol* 183(4) : 1636-1642.

Yoshida A, Kazukiyo M, Masafumi S (1997). Cytogenetic survey of 1,007 males. *Urol Int* 58 : 166-176.

Yoshida A, Kazukiyo M, Shirai M (1996). Chromosome abnormalities and male infertility. *Assist Reprod Rev* 6 : 93-99.

Yu B, Qi Y, Liu D, Gao X, Chen H, Bai C, Huang Z (2014). Cigarette smoking is associated with abnormal histone-to-protamine transition in human sperm. *Fertile Steril* 101(1) : 51-57.

Yu YE, Zhang Y, Unni E *et al* (2000). Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *PNAS* 97 : 4683-4688.

Zavos A, Daponte A, Garas A, Verykouki C, Papanicolaou E, Anifandis G, Polyzos NP (2013). Double versus single homologous intrauterine insemination for male factor infertility : a systematic review and meta-analysis. *Asian J Androl* 15(4) : 533-538.

Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, van der Poel S and WHO (2009). The international committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the world health organization (WHO) revised glossary on ART terminology, 2009. *Hum Reprod* 24 (11) : 2683-87.

Zeng C, Peng W, Ding L, He L, Zhang Y, Fang D, Tang K (2014). A preliminary study on epigenetic changes during boar spermatozoa cryopreservation. *Cryobiology* 69 : 119-127.

Zhao M, Shirley CR, Yu YE *et al* (2001). Targeted disruption of transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. *Molecular and Cellular Biology* 21 : 7243-7255.

Zhou H, Grubisic I, Zheng K, He Y, Wang J, Kaplan T, Tjian R (2013). *Taf7l* cooperates with *Trf2* to regulate spermiogenesis. *PNAS* 110(42) : 16886-16891.

Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT (2001). Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 75(4) : 674-677.

Zini A, Boman JM, Belzile E and Ciampi A (2008). Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI : systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 23(12) : 2663-2668.

Zini A, Gabriel MS, Baazeem A (2009). Antioxidants and sperm DNA damage : a clinical perspective. *J Assist Reprod Genet* 26 : 427-432.

Zini A, Meriano J, Kader K, Jarvi K, Laskin CA, Cadesky K (2005). Potential adverse effect of sperm DNA damage on embryo quality after ICSI. *Hum Reprod* 20(12) : 3476-80.

Zribi N, Feki Chakroun N, El Euch H, Gargouri J, Bahloul A *et al* (2010). Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril* 93 : 159-166.

Annexe 1

Article 1 : La cytogénétique moléculaire et les aspects génétiques de la globozoospermie.

Article 2 : Les aspects génétiques de la tératozoospermie monomorphe

ORIGINAL ARTICLE

Molecular cytogenetic and genetic aspects of globozoospermia: a reviewA. Perrin^{1,2,3}, C. Coat^{1,2}, M. H. Nguyen^{1,2,3}, M. Talagas^{1,2}, F. Morel^{1,2,3}, J. Amice^{1,2} & M. De Braekeleer^{1,2,3}

1 Laboratoire d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France;

2 Service de Cytogénétique, Cytologie et Biologie de la Reproduction, Hôpital Morvan, CHRU Brest, Brest, France;

3 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U613, Brest, France

Keywords

Aneuploidy—DNA fragmentation—gene mutation—globozoospermia

Correspondence

Prof. Marc De Braekeleer, Laboratoire de Cytogénétique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidentale, 22, avenue Camille Desmoulins, CS 93837, F-29238 Brest Cedex 3, France.

Tel.: +33 (0)2 98 01 64 76;

Fax: +33 (0)2 98 01 81 89;

E-mail: marc.debraekeleer@univ-brest.fr

Accepted: March 14, 2012

doi: 10.1111/j.1439-0272.2012.01308.x

Summary

Infertility is estimated to affect up to 15% of couples of reproductive age. Among the male factors, globozoospermia (also called round-headed sperm syndrome) is a rare type of teratozoospermia accounting for <0.1% of male infertility. Lack of acrosome, whose production is a postmeiotic event in spermatogenesis, and round sperm head are its main characteristics. The acrosomeless spermatozoon is unable to go through the zona pellucida and fuse with the oolemma of the oocyte, and fertilisation failures have been attributed to a deficiency in oocyte activation capacity, even when intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is attempted. The pathogenesis of this anomaly is still unclear but genetic factors are likely to be involved. DNA fragmentation rate has been reported for 16 globozoospermic males, usually using the terminal uridine nick-end labelling (TUNEL) assay. Most of the patients had a DNA fragmentation index (DFI) higher than that in fertile men. The rate of aneuploidy for some specific chromosomes was increased in 12 among the 26 globozoospermic males reported in the literature. The same results (high DFI and aneuploidy rates) were observed in infertile males compared to fertile men, notably in those with oligoasthenozoospermia or teratozoospermia, independently of the origins. Mutations or deletions in three genes, *SPATA16*, *PICK1* and *DPY19L2*, have been shown to be responsible for globozoospermia. Proteins coded by the first two genes localise to the Golgi apparatus and the proacrosomal granules that are transported in the acrosome. It is likely that other proteins involved in the acrosome formation remain to be identified.

Introduction

Infertility is estimated to affect up to 15% of couples of reproductive age (Boivin *et al.*, 2007). The causes of infertility are variable; they can be of male (20%), female (34%), mixed (38%) or even idiopathic (8%) origins (Thonneau *et al.*, 1991).

Among the male factors, globozoospermia (also called round-headed sperm syndrome) is a rare type of teratozoospermia accounting for <0.1% of male infertility (Holstein *et al.*, 1973). First described by Schirren *et al.* (1971), globozoospermia is a morphologic disorder of spermatozoa presenting with round heads. Singh (1992)

described two types of globozoospermia: type I with round-headed spermatozoa lacking the acrosome and acrosomal enzymes and type II with round-headed spermatozoa having remnants of the acrosome.

Lack of acrosome, whose production is a postmeiotic event in spermatogenesis, and round sperm head are its main characteristics. The acrosomeless spermatozoon is unable to go through the zona pellucida and fuse with the oolemma of the oocyte (Aitken *et al.*, 1990; Dale *et al.*, 1994). Therefore, men affected with globozoospermia are infertile, fertilisation failures having been attributed to a deficiency in oocyte activation capacity (Rybouchkin *et al.*, 1996).

Treatment options for globozoospermia

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is the sole treatment for patients with globozoospermia (Table 1). The first case of fertilisation and pregnancy was reported by Lundin *et al.* (1994). However, fertilisation rates in ICSI remains severely reduced (Table 1; Liu *et al.*, 1995; Trokoudes *et al.*, 1995; Battaglia *et al.*, 1997; Stone *et al.*, 2000;

Zeyneloglu *et al.*, 2002; Dam *et al.*, 2007a; Sahu *et al.*, 2010). Based on the assumption that a sperm-associated oocyte-activating factor that normally causes the Ca²⁺ flux required for fertilisation might be absent or downregulated in globozoospermic sperm (Rybouchkin *et al.*, 1996), ICSI in the presence of calcium ionophore A23187 was performed. It appeared to be able to overcome the failure in oocyte activation, and several pregnancies were

Table 1 Fertilisation rates and outcomes of treatment in couples for whom the male has a complete globozoospermia

References	No. of patients	Treatment	Fertilisation rate (%)	No. of embryos transferred	Outcome
Sermondade <i>et al.</i> (2011)	1	IMSI (without OAC for 5 oocytes)	60	2	1 singleton
		IMSI (with OAC for 6 oocytes)	66	0	
Koscinski <i>et al.</i> (2011)	9	24 ICSI + 1 IMSI	NA	NA	1 singleton and 1 miscarriage (ICSI)
Sahu <i>et al.</i> (2010)	1	ICSI	33	2	1 singleton
Taylor <i>et al.</i> (2010)	1	1 ICSI (without and with OAC)	NA	3	1 singleton
Banker <i>et al.</i> (2009)	2	4 ICSI	13–31	7 (one thawed)	1 singleton and 1 miscarriage
Egashira <i>et al.</i> (2009)	1	ICSI	0	No	1 singleton
		ICSI + OEA	100	2	
Kyono <i>et al.</i> (2009)	1	ICSI + OAC	88	1 (vitrified blastocyte)	1 singleton
Tejera <i>et al.</i> (2008)	1	ICSI	36	2	1 singleton
		ICSI + OAC	56		
Dirican <i>et al.</i> (2008)	2	ICSI + OMA	33	2	2 singletons
		ICSI	9	1	
Heindryckx <i>et al.</i> (2005)	6	ICSI + OAC	77	NA	6 singletons and 1 twin
Kilani <i>et al.</i> (2004)	5 brothers	20 ICSI	0–100	44	1 singleton and two miscarriages
Zeyneloglu <i>et al.</i> (2002)	1	ICSI	31	4	1 twin
Tesarik <i>et al.</i> (2002)	1	ICSI + OAC	75	2	
		Modified ICSI	82	3	
	1	ICSI + OAC	100	0	1 singleton
		Modified ICSI	67	2	
Stone <i>et al.</i> (2000)	1	Three ICSI	9–42	7	1 singleton
Kilani <i>et al.</i> (1998)	1	Three ICSI	43–89	9	1 triplet
Khalili <i>et al.</i> (1998)	4	Four ICSI	0	0	
Battaglia <i>et al.</i> (1997)	1	ICSI	7	5	
		ICSI + OAC 18-h post-	79		
		ICSI	10		
		ICSI + OAC 30-min post-ICSI	75		
		ICSI + OAC 20-h post-ICSI	73		
Trokoudes <i>et al.</i> (1995)	1	ICSI	50	2	1 singleton
Liu <i>et al.</i> (1995)	7	11 ICSI	0–71	10	1 miscarriage, one EUP and one twin
Bourne <i>et al.</i> (1995a,b)	1	ICSI	38	2	
Lundin <i>et al.</i> (1994)	1	2 ICSI	38–47	4	1 twin
Zhioua <i>et al.</i> (2011)	4	8 ICSI	0–33	3	

NA, not available; EUP, extra-uterine pregnancy; ICSI, intracytoplasmic sperm injection; IMSI, intracytoplasmic morphologically selected sperm injection; OAC, oocyte activation by calcium ionophore; OEA, oocyte electrical activation; OMA, oocyte mechanical activation.

obtained (Table 1; Kim *et al.*, 2001; Heindryckx *et al.*, 2005; Tejera *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2010).

Recently, Sermondade *et al.* (2011) reported the birth of a healthy child following intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) without assisted oocyte activation from a man with 100% globozoospermia on spermocytogram. However, motile sperm organelle morphology examination (MSOME) analysis (10 000× magnification) showed that 1% of the spermatozoa seemed to present a small bud of acrosome. Such a sperm was successfully used for IMSI (Sermondade *et al.*, 2011).

Globozoospermia: a genetic disorder?

It was recently suggested that a decrease or a defect in PLC ζ , a protein involved in the induction of calcium oscillations triggering oocyte activation, could explain the low fertilisation rates in some patients with globozoospermia (Yoon *et al.*, 2008; Heytens *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2010). However, the pathogenesis of this anomaly is still unclear (Dam *et al.*, 2007a; Ferfour *et al.*, 2011).

Studies of sperm DNA status demonstrated the abnormalities of chromatin packaging and DNA strand breaks (Larson *et al.*, 2001; Vicari *et al.*, 2002a). Furthermore, some reports described high levels of sperm aneuploidy (Carrell *et al.*, 2001; Morel *et al.*, 2004).

Analysis of the incidence of patients with globozoospermia showed a history of consanguinity and familial occurrence (Florke-Gerloff *et al.*, 1984; Carrell *et al.*, 2001; Kilani *et al.*, 2004; Dirican *et al.*, 2008). The familial aggregation of cases of globozoospermia suggests that this pathology has genetic origins, but the genetic defect is still unknown and different modes of inheritance (polygenic, X-linked, autosomal dominant, autosomal recessive, etc.) have been proposed (Trokoudes *et al.*, 1995; Stone *et al.*, 2000). The identification of some genes responsible for globozoospermia in mice (Kang-Decker *et al.*, 2001; Juneja & Deursen, 2005) triggered the search for genes and mutations involved in human globozoospermia (Pirrello *et al.*, 2005; Ferfour *et al.*, 2011).

DNA fragmentation

Spermatogenesis is a process of cell differentiation involving mitotic and meiotic divisions and transforming spermatogonia in spermatozoa. This rapid expansion must be tempered by mechanisms controlling the production of spermatozoa. In the past years, data have accumulated to suggest that apoptosis, a process of cellular death based on a genetic programme inducing biochemical, cellular and morphological changes, could be responsible for cell proliferation control in the testis (Billig *et al.*, 1996; Sakkas *et al.*, 1999; Sinha & Swerdloff, 1999).

Sperm chromatin condensation is a complex process involving the replacement of histones by protamines and the increased formation of disulphide bonds. Disturbances in this process can have a negative impact on male fertility (Evenson *et al.*, 1980; Ward, 1994; Kramer & Kraetz, 1997). Indeed, the highly organised and compacted chromatin has a crucial influence on the fertilisation process (Evenson *et al.*, 1980, 1999; Agarwal & Said, 2003; Perreault *et al.*, 2003).

Several techniques are currently used to measure the sperm DNA integrity in the investigation of male fertility (Morel *et al.*, 2006). They include the single cell gel electrophoresis assay (COMET) and the sperm-ubiquitin tag immunoassay (SUTI) that measure DNA damage, and the sperm chromatin structure assay (SCSA) that studies the degree of DNA denaturation.

However, the most widely used technique is the terminal uridine nick-end labelling (TUNEL) assay. Indeed, DNA fragmentation induces the formation of 3'-OH ends that are easily identifiable. The TUNEL technique uses the specific activity of the terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) to incorporate a digoxigenin-deoxyuridine complex at the 3'-OH end of a single strand of DNA. The signal is obtained following the addition of anti-digoxigenin coupled to rhodamine. The method utilises flow cytometry or fluorescence microscopy (Morel *et al.*, 2006).

Using the sperm-ubiquitin tag immunoassay (SUTI), Sutovsky *et al.* (2001) found that round-headed sperm cells were highly ubiquitinated, a sign of DNA damage. The DNA fragmentation index (DFI) was calculated in a few patients with globozoospermia (Table 2). The TUNEL assay was used in eight studies and other techniques in the remaining three studies. Using the SCSA and COMET assays, Larson *et al.* (2001) found no increase in DNA denaturation or fragmentation in round-headed sperm cells compared with those of fertile men. Sermondade *et al.* (2011) found a DFI value of 6% in a globozoospermic male, which was not different of the value calculated in controls. Zhioua *et al.* (2011) found a mean DFI value of 15.5% (standard deviation SD: 9.09) among six globozoospermic males, which was increased compared to the value calculated in fertile males (<13%). A statistically significant increase in the DFI value was found in other patients compared to fertile controls ($P < 0.05$; Vicari *et al.*, 2002b; Egashira *et al.*, 2009; Brahem *et al.*, 2011; Perrin *et al.*, 2011b).

The majority of the studies, although in a limited number, found that globozoospermic males had a sperm DFI statistically significantly higher than in fertile men. These results suggested that sperm of globozoospermic males could carry abnormal remodelled chromatin, which could be a possible source of DNA fragmentation. Indeed, some

Table 2 Summary of studies on sperm DNA fragmentation in globozoospermic males

References	No. of patients	No. of spermatozoa	DNA fragmentation index		P value
			Patient	Control	
Baccetti <i>et al.</i> (1996)	NA	NA	10%	0.1%	
Larson <i>et al.</i> (2001)	1	NA	13% ^a		NS
Vicari <i>et al.</i> (2002b)	1	NA	37%	22.5%	<i>P</i> < 0.005
Tejera <i>et al.</i> (2008)	1	NA	45.7% ^b	30%	
Egashira <i>et al.</i> (2009)	1	NA	97.1% ^c	41.3%	<i>P</i> < 0.05
Taylor <i>et al.</i> (2010)	1	200	80%	27±13%	
Brahem <i>et al.</i> (2011)	1	500	40%	12±2.12%	<i>P</i> < 0.001
Brahem <i>et al.</i> (2011)	1	500	80%	12±2.12%	<i>P</i> < 0.001
Sermondade <i>et al.</i> (2011)	1	500	6%		NS
Perrin <i>et al.</i> (2011b)	1	500	9.6%	1.2%	<i>P</i> < 0.001
Zhioua <i>et al.</i> (2011)	1	700	18%	^d	
Zhioua <i>et al.</i> (2011)	1	1000	29%	^d	
Zhioua <i>et al.</i> (2011)	1	950	19%	^d	
Zhioua <i>et al.</i> (2011)	1	1000	10%	^d	
Zhioua <i>et al.</i> (2011)	1	960	2%	^d	
Zhioua <i>et al.</i> (2011)	1	950	15%	^d	

NA, not available.

^aSCSA and COMET assays.

^bSperm chromatin disperse test (Halosperm technique).

^cAcridine orange test.

^dNormal values < 13%.

NS not significant (*P* > 0.05).

workers reported abnormal chromatin condensation in globozoospermia, with a high heterogeneity in the degree of maturity (Dam *et al.*, 2007a), due to an altered replacement of histones by protamines (Blanchard *et al.*, 1990; Carrell *et al.*, 1999).

Among the hypotheses emphasised in the literature to clarify the origin of sperm DNA fragmentation, one of the mechanisms that would explain these results is abortive apoptosis (Perrin *et al.*, 2011a). We can hypothesise that sperm with an abnormally remodelled chromatin could have undergone apoptosis, which would not have been completed, at least for some of them. Abnormally condensed chromatin could also be more sensitive to external aggressions, leading to DNA breakage. Oxidative stress, due to excess exposure to reactive oxygen species and/or to deficiencies in antioxidants, could act on vulnerable, poorly protaminated cells generated as a result of defective spermiogenesis (Aitken & Koppers, 2011).

However, it should be emphasised that the rate of DNA fragmentation is higher in infertile males than in fertile men, notably in those with oligoasthenozoospermia or teratozoospermia, independently of the origins (Perrin *et al.*, 2009, 2011a,b).

Aneuploidy

Since 1990, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) has been a technique that allows the detection of nucleic acid

sequences in cytological preparations using labelled probes marked with a fluorochrome (directly or indirectly with a hapten). This method, used to study the chromosomal contents of human spermatozoa, provides an alternative technique to the heterospecific fecundation, as it is less laborious, less time-consuming and easier to perform.

This latter technique was used by Rybouchkin *et al.* (1996) to evaluate the aneuploidy frequency in spermatozoa from one globozoospermic man; they found no sperm karyotype abnormalities.

The other workers used a FISH technique to investigate aneuploidy in spermatozoa from 26 globozoospermic men (Table 3). Controversial results were obtained, and some studies having found no relationship between globozoospermia and aneuploidy frequency in sperm nuclei and others having shown an increased aneuploidy frequency for at least one chromosome studied. In 46% (12/26) of the patients, there was an increased frequency of aneuploidy.

Based on a review of published cases, Machev *et al.* (2005) concluded that the increased aneuploidy rates occurred mostly for acrocentric and sex chromosomes. These conclusions should be tempered. Indeed, comparison between studies is made difficult, not only because some chromosomes, not even the same for all the patients, were studied in few patients, but also because the number of evaluated spermatozoa was different from one study to another (100–30 145 sperm nuclei).

Table 3 Summary of studies on sperm aneuploidy in globozoospermic males

References	Patient	Disomy (%)													Diploidy (%)	No. of spermatazoa	
		1	7	8	9	12	13	15	16	17	18	21	X	Y			XY
Carrell <i>et al.</i> (1999)	Sib 1						0.7				0	0.6	0.6	0	12.1*		±5000
Carrell <i>et al.</i> (1999)	Sib 2						0.3				0.2	3.0*	0.4	0	0		±5000
Viville <i>et al.</i> (2000)		0											0.5	0.2	0.4	0.1	3716
Carrell <i>et al.</i> (2001)	Sib 1						0.4	4.03*			0.74	0.4	0.43	0.52			10 000
Carrell <i>et al.</i> (2001)	Sib 2						0.32	0.58			0.74	0.14	0.58	0.6			10 000
Vicari <i>et al.</i> (2002a)			0		0						0		0.13	0	0		3885
Zeyneloglu <i>et al.</i> (2002)							2.0 for chromosomes 13, 18, 21, X and Y										1000
Martin <i>et al.</i> (2003)		0.09						0.13				0.19	0.12	0.07	0.18*	0.21	30 145
Morel <i>et al.</i> (2004)	Pat 1		0.26		0.2		0.39				0.02	0.39	0	0.04	0.15	0.88*	10 719
Morel <i>et al.</i> (2004)	Pat 2		0.1		0.14		0.08				0.04	0.06	0.02	0.08	0.08	0.3	15 152
Ditzel <i>et al.</i> (2005)							4.0*		5.0*			0.1*				1.0	100
Moretti <i>et al.</i> (2005)	Pat 1										0.052			0.364*		0.599*	7388
Moretti <i>et al.</i> (2005)	Pat 2										0.078			0.364*		0.494*	
Tejera <i>et al.</i> (2008)							NS				NS	NS		0.66*		NS	NA
Sahu <i>et al.</i> (2010)							Aneuploidy rate not higher in globozoospermic cells										NA
Taylor <i>et al.</i> (2010)							2.3	1.3	1.3				0.5	0.5			400
Brahem <i>et al.</i> (2011)	Pat 1			1.2*		0.09					0.12		0.2	1.8*	1.2*	0.15	±500
Brahem <i>et al.</i> (2011)	Pat 2			2.0*		0.15					0.15		0	2.75*	3.0*	2.0*	±500
Perrin <i>et al.</i> (2011b)							0.08				0.12	1.11*	0.27*	0.23*	0.35*	0.13	10 165
Sermondade <i>et al.</i> (2011)		<1.0 for chromosomes 13, 18, 21, X and Y															500
Zhioua <i>et al.</i> (2011)	Pat 1	1.06 for chromosomes 18, X and Y (NS)															658
Zhioua <i>et al.</i> (2011)	Pat 2	1.18 for chromosomes 18, X and Y (NS)															1019
Zhioua <i>et al.</i> (2011)	Pat 3	1.90 for chromosomes 18, X and Y (NS)															948
Zhioua <i>et al.</i> (2011)	Pat 4	0.9 for chromosomes 18, X and Y (NS)															1000
Zhioua <i>et al.</i> (2011)	Pat 5	0.8 for chromosomes 18, X and Y (NS)															963
Zhioua <i>et al.</i> (2011)	Pat 6	0.9 for chromosomes 18, X and Y (NS)															950

NS, not significant; NA, not available.

* $P < 0.05$.

The slightly increased aneuploidy rate observed in some patients could reflect disturbances in spermatogenesis, as commonly observed in patients with oligoasthenoteratozoospermia. Variations found in the studies presented in this review are of the same order as those that are commonly found in the literature about infertile men with a normal karyotype but altered sperm parameters (Kirkpatrick *et al.*, 2008; Perrin *et al.*, 2011b).

In conclusion, this form of severe teratozoospermia is not responsible for high rates of aneuploidy in the gametes. Therefore, from a chromosomal point of view, they can be used in assisted reproductive technology.

Genes involved in globozoospermia

The presence of consanguineous marriages in families affected with globozoospermia and reports of two or more sibs in several families suggested a genetic contribution to globozoospermia in humans (Florke-Gerloff *et al.*, 1984; Carrell *et al.*, 1999; Kilani *et al.*, 2004; Dam *et al.*, 2007b; Dirican *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010).

Furthermore, in mice, disruption of several genes results in a phenotype resembling that of globozoospermia in humans. They include *CSNK2A2* (casein kinase 2, α prime polypeptide), *HRB* (HIV-1 Rev-binding protein), *GOPC* (Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif containing protein) and *PICK1* (protein interacting with C kinase 1; Xu *et al.*, 1999; Kang-Decker *et al.*, 2001; Yao *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2009).

Therefore, given that males carrying a mutation in a gene associated with globozoospermia are infertile, the presence of consanguinity and multiple males affected in sibships, an autosomal recessive mode of inheritance was likely, although no segregation analysis studies have ever been performed in globozoospermia families.

At the time of writing this review, three genes segregating on an autosomal recessive mode have been identified to be associated with globozoospermia in humans. Dam *et al.* (2007b) performed a genome-wide scan analysis of six brothers from a consanguineous Ashkenazi Jewish family using a 10K SNP array (Affymetrix; Dam *et al.*, 2007b). They identified a homozygous mutation (c.848G->A) in exon 4 of the *SPATA16* (spermatogenesis-associated protein 16) gene (located at chromosome band 3q26.32) leading to the substitution of an arginine to a glutamine at residue 283 (R283Q) in the protein, in three brothers affected with globozoospermia. Both parents and two sibs were heterozygous for the c.848G->A mutation. The mutation c.848G->A was not found in a set of 29 globozoospermic patients of European or North African origin (Dam *et al.*, 2007b). No mutation or deletion was identified in the *SPATA16* gene in a globozoospermic man from Morocco (Sermondade *et al.*, 2011).

Liu *et al.* (2010) screened three Chinese globozoospermic men for mutations in four candidate genes (*CSNK2A2*, *HRB*, *GOPC* and *PICK1*). They identified in one patient a homozygous G->A transition at nucleotide 1567 in exon 13 of the *PICK1* gene (located at chromosome band 22q12.3-q13.2), generating a missense substitution (G393R) in the protein.

Performing genome-wide scan analysis using a 10 K SNP array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), Kosciński *et al.* (2011) identified homozygosity for an approximately 200-kb deletion encompassing the *DPY19L2* (*dpy-19-like 2*) gene (located at chromosome band 12q14.2) in four globozoospermic males of a same family while their fertile brothers were heterozygous for this region (Harbuz *et al.*, 2011; Kosciński *et al.*, 2011). Screening for the *DPY19L2* deletion identified more patients from various ethnic origins with homozygous deletions, suggesting that the deletion resulted from recurrent events rather than from a founder effect (Harbuz *et al.*, 2011; Kosciński *et al.*, 2011).

Two of these three genes (*SPATA16* and *PICK1*) could be involved in the same process of spermiogenesis. Indeed, the *SPATA16* protein localises to the Golgi apparatus and the proacrosomal granules that are transported in the acrosome in round and elongated spermatids (Xu *et al.*, 2003). Takeya *et al.* (2000) suggested that *PICK1* could regulate Golgi-to-endoplasmic reticulum vesicle transport. Furthermore, Xiao *et al.* (2009) found that the testis of mice knocked out for the *PICK1* gene showed fragmentation of acrosomes in early stages of spermiogenesis and increased apoptosis in seminiferous tubules. Indeed, *Pick1* localises to Golgi-derived proacrosomal granules; it is involved in vesicle trafficking from the Golgi to the acrosome and cooperates with *GOPC* and *CSNK2A2* in acrosome biogenesis (Xiao *et al.*, 2009). Therefore, although no globozoospermic male was found to carry a mutation in the *GOPC* or the *CSNK2A2* gene, it is likely that some cases of human globozoospermia could be explained by defects in these two genes.

Today, the most prevalent genetic defect observed in human globozoospermia is a homologous deletion of the *DPY19L2* gene, which role during spermiogenesis is still unknown. *DPY19L2* belongs to a family of genes derived from the *DPY-19* gene, present in *Caenorhabditis elegans*, that is involved in the establishment of cell polarity in the worm (Honigberg & Kenyon, 2000). Therefore, *DPY19L2* might be involved in indicating the anterior pole of the spermatozoon and in the acroplaxome positioning, a subacrosomal cytoskeletal plate towards which Golgi-derived vesicles fuse (Kierszenbaum & Tres, 2004; Harbuz *et al.*, 2011).

In conclusion, the equivocal results in DNA fragmentation and aneuploidy rates are presumably not directly

related to globozoospermia. DNA fragmentation is unlikely to be secondary to the round nature of the sperm or the lack of a functional acrosome, but is rather the function of increased vulnerability to DNA damage or incomplete apoptosis. The search for candidate genes is more promising and is just starting to give its first results. This will lead to a better understanding of the processes involved in acrosome formation.

References

- Agarwal A, Said TM (2003) Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 9:331–345.
- Aitken RJ, Koppers AJ (2011) Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl* 13:36–42.
- Aitken RJ, Kerr L, Bolton V, Hargreave T (1990) Analysis of sperm function in globozoospermia: implications for the mechanism of sperm–zona interaction. *Fertil Steril* 54:701–707.
- Baccetti B, Collodel G, Piomboni P (1996) Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). *J Submicrosc Cytol Pathol* 28:587–596.
- Banker MR, Patel PM, Joshi BV, Shah PB, Goyal R (2009) Successful pregnancies and a live birth after intracytoplasmic sperm injection in globozoospermia. *J Hum Reprod Sci* 2:81–82.
- Battaglia DE, Koehler JK, Klein NA, Tucker MJ (1997) Failure of oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection using round-headed sperm. *Fertil Steril* 68:118–122.
- Billig H, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJW (1996) Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Hum Reprod Update* 2:103–117.
- Blanchard Y, Lescoat D, Le Lannou D (1990) Anomalous distribution of nuclear basic proteins in round-headed human spermatozoa. *Andrologia* 22:549–555.
- Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG (2007) International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod* 22:1506–1512.
- Bourne H, Liu DY, Clarke GN, Baker HW (1995a) Normal fertilization and embryo development by intracytoplasmic sperm injection of round-headed acrosomeless sperm. *Fertil Steril* 63:1329–1332.
- Bourne H, Richings N, Harari O, Watkins W, Speirs AL, Johnston WI, Baker HW (1995b) The use of intracytoplasmic sperm injection for the treatment of severe and extreme male infertility. *Reprod Fertil Dev* 7:237–245.
- Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, Saad A (2011) Analysis of sperm aneuploidies and DNA fragmentation in patients with globozoospermia or with abnormal acrosomes. *Urology* 77:1343–1348.
- Carrell DT, Emery BR, Liu L (1999) Characterization of aneuploidy rates, protamine levels, ultrastructure, and functional ability of round-headed sperm from two siblings and implications for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 71:511–516.
- Carrell DT, Wilcox AL, Udoff LC, Thorp C, Campbell B (2001) Chromosome 15 aneuploidy in the sperm and conceptus of a sibling with variable familial expression of round-headed sperm syndrome. *Fertil Steril* 76:1258–1260.
- Dale B, Iaccarino M, Fortunato A, Gagnaniello G, Kyozyuka K, Tosti E (1994) A morphological and functional study of fusibility in round-headed spermatozoa in the human. *Fertil Steril* 61:336–340.
- Dam AH, Feenstra I, Westphal JR, Ramos L, van Golde RJ, Kremer JA (2007a) Globozoospermia revisited. *Hum Reprod Update* 13:63–75.
- Dam AH, Kosciński I, Kremer JA, Moutou C, Jaeger AS, Oudakker AR, Tournaye H, Charlet N, Lagier-Tourenne C, van Bokhoven H, Viville S (2007b) Homozygous mutation in SPATA16 is associated with male infertility in human globozoospermia. *Am J Hum Genet* 81:813–820.
- Dirican EK, Isik A, Vicdan K, Sozen E, Suludere Z (2008) Clinical pregnancies and livebirths achieved by intracytoplasmic injection of round headed acrosomeless spermatozoa with and without oocyte activation in familial globozoospermia: case report. *Asian J Androl* 10:332–336.
- Ditzel N, El Danasouri I, Just W, Sterzik K (2005) Higher aneuploidy rates of chromosomes 13, 16, and 21 in a patient with globozoospermia. *Fertil Steril* 84:217–218.
- Egashira A, Murakami M, Haigo K, Horiuchi T, Kuramoto T (2009) A successful pregnancy and live birth after intracytoplasmic sperm injection with globozoospermic sperm and electrical oocyte activation. *Fertil Steril* 92:2037e5–2037e9.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR (1980) Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210:1131–1133.
- Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP (1999) Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 14:1039–1049.
- Ferfourri F, Merdassi G, Vialard F (2011) Avons-nous percé le mystère de la globozoospermie? *Andrologie* 21:230–233.
- Florke-Gerloff S, Topfer-Petersen E, Muller-Esterl W, Mansouri A, Schatz R, Schirren C, Schill W, Engel W (1984) Biochemical and genetic investigation of round-headed spermatozoa in infertile men including two brothers and their father. *Andrologia* 16:187–202.
- Harbuz R, Zouari R, Pierre V, Ben Khelifa M, Kharouf M, Coutton C, Merdassi G, Abada F, Escoffier J, Nikas Y, Vialard F, Kosciński I, Triki C, Sermondade N, Schweitzer T, Zhioua A, Zhioua F, Latrous H, Halouani L, Ouafi M, Makni M, Jouk PS, Sele B, Hennebicq S, Satre V, Viville S, Arnoult C, Lunardi J, Ray PF (2011) A recurrent deletion of DPY19L2 causes infertility in man by blocking sperm head elongation and acrosome formation. *Am J Hum Genet* 88:351–361.

- Heindryckx B, Van der EJ, De Sutter P, Dhont M (2005) Treatment option for sperm- or oocyte-related fertilization failure: assisted oocyte activation following diagnostic heterologous ICSI. *Hum Reprod* 20:2237–2241.
- Heytens E, Parrington J, Coward K, Young C, Lambrecht S, Yoon SY, Fissore RA, Hamer R, Deane CM, Ruas M, Grasa P, Soleimani R, Cuvelier CA, Gerris J, Dhont M, Deforce D, Leybaert L, De Sutter P (2009) Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLCzeta) in spermatozoa from infertile men. *Hum Reprod* 24:2417–2428.
- Holstein AF, Schirren CG, Schirren C, Mauss J (1973) Rundköpfige Spermatozoen: eine Ursache der Infertilität des Mannes. *Dtsch Med Wochenschr* 98:61–62.
- Honigberg L, Kenyon C (2000) Establishment of left/right asymmetry in neuroblast migration by UNC-40/DCC, UNC-73/Trio and DPY-19 proteins in *C. elegans*. *Development* 127:4655–4668.
- Juneja SC, van Deursen JM (2005) A mouse model of familial oligoasthenoteratozoospermia. *Hum Reprod* 20:881–893.
- Kang-Decker N, Mantchev GT, Juneja SC, McNiven MA, van Deursen JMA (2001) Lack of acrosome formation in Hrb-deficient mice. *Science* 294:1531–1533.
- Khalili MA, Kalantar SM, Vahidi S, Ghafour-Zadeh M (1998) Failure of fertilization following intracytoplasmic injection of round-headed sperm. *Ann Saudi Med* 18:408–411.
- Kierszenbaum AL, Tres LL (2004) The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol* 67:271–284.
- Kilani ZM, Shaban MA, Ghunaim SD, Keilani SS, Dakkak AI (1998) Triplet pregnancy and delivery after intracytoplasmic injection of round-headed spermatozoa. *Hum Reprod* 13:2177–2179.
- Kilani Z, Ismail R, Ghunaim S, Mohamed H, Hughes D, Brewis I, Barratt CL (2004) Evaluation and treatment of familial globozoospermia in five brothers. *Fertil Steril* 82:1436–1439.
- Kim ST, Cha YB, Park JM, Gye MC (2001) Successful pregnancy and delivery from frozen-thawed embryos after intracytoplasmic sperm injection using round-headed spermatozoa and assisted oocyte activation in a globozoospermic patient with mosaic Down syndrome. *Fertil Steril* 75:445–447.
- Kirkpatrick G, Ferguson KA, Gao H, Tang S, Chow V, Yuen BH, Ma S (2008) A comparison of sperm aneuploidy rates between infertile men with normal and abnormal karyotypes. *Hum Reprod* 23:1679–1683.
- Koscinski I, Elinati E, Fossard C, Redin C, Muller J, Velez dC, Schmitt F, Ben Khelifa M, Ray PF, Kilani Z, Barratt CL, Viville S (2011) DPY19L2 deletion as a major cause of globozoospermia. *Am J Hum Genet* 88:344–350.
- Kramer JA, Krawetz SA (1997) RNA in spermatozoa: implications for the alternative haploid genome. *Mol Hum Reprod* 3:473–478.
- Kyono K, Nakajo Y, Nishinaka C, Hattori H, Kyoya T, Ishikawa T, Abe H, Araki Y (2009) A birth from the transfer of a single vitrified-warmed blastocyst using intracytoplasmic sperm injection with calcium ionophore oocyte activation in a globozoospermic patient. *Fertil Steril* 91:931–11.
- Larson KL, Brannian JD, Singh NP, Burbach JA, Jost LK, Hansen KP, Kreger DO, Evenson DP (2001) Chromatin structure in globozoospermia: a case report. *J Androl* 22:424–431.
- Liu J, Nagy Z, Joris H, Tournaye H, Devroey P, Van Steirteghem A (1995) Successful fertilization and establishment of pregnancies after intracytoplasmic sperm injection in patients with globozoospermia. *Hum Reprod* 10:626–629.
- Liu G, Shi QW, Lu GX (2010) A newly discovered mutation in PICK1 in a human with globozoospermia. *Asian J Androl* 12:556–560.
- Lundin K, Sjogren A, Nilsson L, Hamberger L (1994) Fertilization and pregnancy after intracytoplasmic microinjection of acrosomeless spermatozoa. *Fertil Steril* 62:1266–1267.
- 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.
- Martin RH, Greene C, Rademaker AW (2003) Sperm chromosome aneuploidy analysis in a man with globozoospermia. *Fertil Steril* 79:1662–1664.
- Morel F, Douet-Guilbert N, Moerman A, Duban B, Marchetti C, Delobel B, Le Bris MJ, Amice V, De Braekeleer M (2004) Chromosome aneuploidy in the spermatozoa of two men with globozoospermia. *Mol Hum Reprod* 10:835–838.
- Morel F, Douet-Guilbert N, Perrin A, Le Bris MJ, Amice V, Amice J, De Braekeleer M. (2006) Chromosomal abnormalities in spermatozoa. In: *Cytogenetics and Infertility*. De Braekeleer M (ed.). Transworld Research Network, Trivandrum, India, pp. 53–112.
- Moretti E, Collodel G, Scapigliati G, Cosci I, Sartini B, Baccetti B (2005) 'Round head' sperm defect. Ultrastructural and meiotic segregation study. *J Submicrosc Cytol Pathol* 37:297–303.
- Perreault SD, Aitken RJ, Baker HW, Evenson DP, Huszar G, Irvine DS, Morris ID, Morris RA, Robbins WA, Sakkas D, Spano M, Wroblek AJ (2003) Integrating new tests of sperm genetic integrity into semen analysis: breakout group discussion. *Adv Exp Med Biol* 518:253–268.
- Perrin A, Caer E, Oliver-Bonet M, Navarro J, Benet J, Amice V, De Braekeleer M, Morel F (2009) DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality. *Fertil Steril* 92:583–589.
- Perrin A, Basinko A, Douet-Guilbert N, Guéganic N, Le Bris MJ, Amice V, De Braekeleer M, Morel F (2011a) Aneuploidy and DNA fragmentation in sperm of carriers of a constitutional chromosomal abnormality. *Cytogenet Genome Res* 133:100–106.

- Perrin A, Louanjli N, Ziane Z, Louanjli T, Le Roy C, Guéganic N, Amice V, De Braekeleer M, Morel F (2011b) Study of aneuploidy and DNA fragmentation in gametes of patients with severe teratozoospermia. *Reprod Biomed Online* 22:148–154.
- Pirrello O, Machev N, Schimdt F, Terriou P, Menezo Y, Viville S (2005) Search for mutations involved in human globozoospermia. *Hum Reprod* 20:1314–1318.
- Rybouchkin A, Dozortsev D, Pelinck MJ, De Sutter P, Dhont M (1996) Analysis of the oocyte activating capacity and chromosomal complement of round-headed human spermatozoa by their injection into mouse oocytes. *Hum Reprod* 11:2170–2175.
- Sahu B, Ozturk O, Serhal P (2010) Successful pregnancy in globozoospermia with severe oligoasthenospermia after ICSI. *J Obstet Gynaecol* 30:869–870.
- Sakkas D, Mariehoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U (1999) Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 4:31–37.
- Schirren CG, Holstein AF, Schirren C (1971) Über die Morphogenese rundkopfiger Spermatozoen des Menschen. *Andrologia* 3:125.
- Sermondade N, Hafhouf E, Dupont C, Bechoua S, Palacios C, Eustache F, Poncelet C, Benzacken B, Levy R, Sifer C (2011) Successful childbirth after intracytoplasmic morphologically selected sperm injection without assisted oocyte activation in a patient with globozoospermia. *Hum Reprod* 26:2944–2949.
- Singh G (1992) Ultrastructural features of round-headed human spermatozoa. *Int J Fertil* 37:99–102.
- Sinha Hikim AP, Swerdloff RS (1999) Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 4:38–47.
- Stone S, O'Mahony F, Khalaf Y, Taylor A, Braude P (2000) A normal livebirth after intracytoplasmic sperm injection for globozoospermia without assisted oocyte activation: case report. *Hum Reprod* 15:139–141.
- Sutovsky P, Terada Y, Schatten G (2001) Ubiquitin-based sperm assay for the diagnosis of male factor infertility. *Hum Reprod* 16:250–258.
- Takeya R, Takeshige K, Sumimoto H (2000) Interaction of the PDZ domain of human PICK1 with class I ADP-ribosylation factors. *Biochem Biophys Res Commun* 267:149–155.
- Taylor SL, Yoon SY, Morshedi MS, Lacey DR, Jellerette T, Fissore RA, Oehninger S (2010) Complete globozoospermia associated with PLCzeta deficiency treated with calcium ionophore and ICSI results in pregnancy. *Reprod Biomed Online* 20:559–564.
- Tejera A, Molla M, Muriel L, Remohi J, Pellicer A, De Pablo JL (2008) Successful pregnancy and childbirth after intracytoplasmic sperm injection with calcium ionophore oocyte activation in a globozoospermic patient. *Fertil Steril* 90:1202–1205.
- Tesarik J, Rienzi L, Ubaldi F, Mendoza C, Greco E (2002) Use of a modified intracytoplasmic sperm injection technique to overcome sperm-borne and oocyte-borne oocyte activation failures. *Fertil Steril* 78:619–624.
- Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, Lopes P, Tabaste JM, Spira A (1991) Incidence and main causes of infertility in a resident population (1 850 000) of three French regions (1988–1989). *Hum Reprod* 6:811–816.
- Trokoudes KM, Danos N, Kalogirou L, Vlachou R, Lysiotis T, Georghiades N, Lerios S, Kyriacou K (1995) Pregnancy with spermatozoa from a globozoospermic man after intracytoplasmic sperm injection treatment. *Hum Reprod* 10:880–882.
- Vicari E, Perdichizzi A, De Palma A, Burrello N, D'Agata R, Calogero AE (2002a) Globozoospermia is associated with chromatin structure abnormalities. *Hum Reprod* 17:2128–2133.
- Vicari E, Perdichizzi A, De Palma A, Burrello N, D'Agata R, Calogero AE (2002b) Globozoospermia is associated with chromatin structure abnormalities: case report. *Hum Reprod* 17:2128–2133.
- Viville S, Mollard R, Bach ML, Falquet C, Gerlinger P, Warter S (2000) Do morphological anomalies reflect chromosomal aneuploidies? *Hum Reprod* 15:2563–2566.
- Ward WS (1994) The structure of the sleeping genome: implications of sperm DNA organization for somatic cells. *J Cell Biochem* 55:77–82.
- Xiao N, Kam C, Shen C, Jin W, Wang J, Lee KM, Jiang L, Xia J (2009) PICK1 deficiency causes male infertility in mice by disrupting acrosome formation. *J Clin Invest* 119:802–812.
- Xu X, Toselli PA, Russell LD, Seldin DC (1999) Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II alpha' catalytic subunit. *Nat Genet* 23:118–121.
- Xu M, Xiao J, Chen J, Li J, Yin L, Zhu H, Zhou Z, Sha J (2003) Identification and characterization of a novel human testis-specific Golgi protein, NYD-SP12. *Mol Hum Reprod* 9:9–17.
- Yao R, Ito C, Natsume Y, Sugitani Y, Yamanaka H, Kuretake S, Yanagida K, Sato A, Toshimori K, Noda T (2002) Lack of acrosome formation in mice lacking a Golgi protein, GOPC. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:11211–11216.
- Yoon SY, Jellerette T, Salicioni AM, Lee HC, Yoo MS, Coward K, Parrington J, Grow D, Cibelli JB, Visconti PE, Mager J, Fissore RA (2008) Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca(2+) release and are unable to initiate the first step of embryo development. *J Clin Invest* 118:3671–3681.
- Zeyneloglu HB, Baltaci V, Duran HE, Erdemli E, Batioglu S (2002) Achievement of pregnancy in globozoospermia with Y chromosome microdeletion after ICSI. *Hum Reprod* 17:1833–1836.
- Zhioua A, Merdassi G, Bhouiri R, Ferfourri F, Ben Ammar A, Amouri A, Vialard F, Zhioua F (2011) Apport de l'exploration cytogénétique et ultrastructurale dans le pronostic de fertilité des sujets globozoospermiques. *Andrologie* 21:240–246.

Genetic aspects of monomorphic teratozoospermia: a review

Marc De Braekeleer · Minh Huong Nguyen ·
Frédéric Morel · Aurore Perrin

Received: 22 November 2014 / Accepted: 9 January 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract Teratozoospermia is characterized by the presence of spermatozoa with abnormal morphology over 85 % in sperm. When all the spermatozoa display a unique abnormality, teratozoospermia is said to be monomorphic. Two forms of monomorphic teratozoospermia, representing less than 1 % of male infertility, are recognized: macrozoospermia (also called macrocephalic sperm head syndrome) and globozoospermia (also called round-headed sperm syndrome). Macrozoospermia is defined as the presence of a very high percentage of spermatozoa with enlarged head and multiple flagella. Meiotic segregation studies in 30 males revealed that over 90 % of spermatozoa were aneuploid, mainly diploid. Sperm DNA fragmentation studies performed in a few

patients showed an increase in DNA fragmentation index compared to fertile men. Four mutations in the *AURKC* gene, a key player in meiosis and more particularly in spermatogenesis, have been found to be responsible for macrozoospermia. Globozoospermia is characterized by round-headed spermatozoa with an absent acrosome, an aberrant nuclear membrane and midpiece defects. The rate of aneuploidy of various chromosomes in spermatozoa from 26 globozoospermic men was slightly increased compared to fertile men. However, this increase was of the same order as that commonly found in infertile men with altered sperm parameters. The majority of the studies found that globozoospermic males had a sperm DNA fragmentation index higher than in fertile men. Mutations or deletions in three genes, *SPATA16*, *PICK1* and *DPY19L2*, have been shown to be responsible for globozoospermia. Identification of the genetic causes of macrozoospermia and globozoospermia should help refine diagnosis and treatment of these patients, avoiding long and painful treatments. Elucidating the molecular causes of these defects is of utmost importance as intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is very disappointing in these two pathologies.

Capsule Two forms of monomorphic teratozoospermia are recognized: macrozoospermia (or macrocephalic sperm head syndrome) and globozoospermia (or round-headed sperm syndrome). Both pathologies are characterized by a high rate of sperm aneuploidy and DNA fragmentation index compared to fertile males. Identification of their genetic causes should help refine diagnosis and treatment of these patients, avoiding long and painful treatments. Elucidating the molecular causes of these defects is of utmost importance as intracytoplasmic sperm injection is very disappointing in these two pathologies.

M. De Braekeleer · M. H. Nguyen · F. Morel · A. Perrin
Laboratoire d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique,
Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé,
Université de Bretagne Occidentale, Brest, France

M. De Braekeleer · M. H. Nguyen · F. Morel · A. Perrin
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)
U1078, Brest, France

M. De Braekeleer · M. H. Nguyen · F. Morel · A. Perrin
Service de Cytogénétique et Biologie de la Reproduction,
Hôpital Morvan, CHRU Brest, Brest, France

M. De Braekeleer (✉)
Laboratoire de Cytogénétique, Hôpital Morvan, Bâtiment 5bis
CHRU Brest, 2, avenue Foch, 29609 Brest cedex, France
e-mail: marc.debraekeleer@univ-brest.fr

Keywords Male infertility · Teratozoospermia ·
Globozoospermia · Macrozoospermia · Meiotic segregation ·
Sperm DNA fragmentation · Molecular genetics

Introduction

Infertility is defined as the inability for a couple to conceive a child following two years of unprotected sexual intercourse [1]. Infertility is estimated to affect up to 15 % of couples of reproductive age [2]. The causes of infertility are variable; they can be of male (20 %), female (34 %), mixed (38 %) or even idiopathic (8 %) origins [3].

Causes of infertility of male origin are numerous and multifactorial. Among them, teratozoospermia is characterized by the presence of spermatozoa with abnormal morphology over 85 % in sperm. To be considered as morphologically normal, a spermatozoon should have a normal acrosome, an oval head between 5 and 6 μm long and 2.5 and 3.5 μm width, a midpiece of 4.0 to 5.0 μm and a tail or flagellum about 50 μm long [4].

Teratozoospermia can be subdivided into 2 categories. An ejaculate presenting an excess of spermatozoa with more than one type of abnormality is considered polymorphic teratozoospermia. When all the spermatozoa display a unique abnormality, teratozoospermia is said to be monomorphic. Two forms of monomorphic teratozoospermia are recognized: macrozoospermia (also called macrocephalic sperm head syndrome) and globozoospermia (also called round-headed sperm syndrome) [5, 6]. They are the subject of this review.

Macrozoospermia

Macrozoospermia is a very rare morphologic disorder of spermatozoa observed in less than 1 % of infertile men. It can be defined as the presence of a very high percentage of spermatozoa with enlarged head, an irregular head shape, and multiple flagella (Fig. 1a) [7].

Meiotic segregation studies

Using fluorescent in situ hybridization (FISH), several investigators found no association between the frequency of morphologically and chromosomally abnormal sperm [8, 9], except in macrozoospermia [5]. In 1996, Yurov et al. found in an

infertile man that 40 % of his spermatozoa were large headed. They found that the majority of these macrocephalic spermatozoa contained a diploid chromosomal content, whereas the majority of normal-sized spermatozoa had a haploid content [10]. Since that publication, detailed meiotic segregation analysis using FISH has been reported in 30 males with large-headed, multiple-tailed sperm (Table 1). A strong correlation was found between the rate of sperm macrocephalic forms and the rate of aneuploidy ($R=0.88$, $p<0.001$).

Dieterich et al. (2007) performed FISH for chromosomes X,Y and 18 on a total of 3689 spermatozoa from 5 patients. Only 8 % of the analyzed spermatozoa were haploid while some 25 % were diploid [11]. Brahem et al. (2011) studied the semen samples of 12 males with macrocephalic sperm head syndrome. Triple color FISH analysis showed a mean total sperm aneuploidy rate of 98.33 % in the macrozoospermia group, including a mean rate of 22.7, 25.3 and 18.3 % of sperm nuclei with diploidy, triploidy and tetraploidy, respectively [12]. Altogether, the meiotic segregation analysis shows that more than 90 % of the sperm heads have an aneuploid composition (Fig. 1b).

Guthauser et al. (2006) found that only very low proportions of normal headed-size spermatozoa had a normal chromosomal content (X18 or Y18). Therefore, low fertilization and pregnancy rates may be due to the high incidence of aneuploidy in the apparently normal-sized spermatozoa that may be used for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) [13].

Sperm DNA fragmentation studies

Two studies evaluated the presence of apoptosis-related DNA strand breaks in spermatozoa using the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine

Fig. 1 Macrozoospermia. **a** May Grünwald-Giemsa staining showing spermatozoa with enlarged head and multiple flagella. **b** Fluorescent in situ hybridization (FISH) showing a triploid sperm (probes: 13q14 in green, 21q22 in red) and a tetraploid sperm (probes: CEPX in green, CEPY in red, 18q11.1-2 in aqua). **c** TUNEL assay showing a sperm head with fragmented DNA (left side) and a normal sperm head (right side)

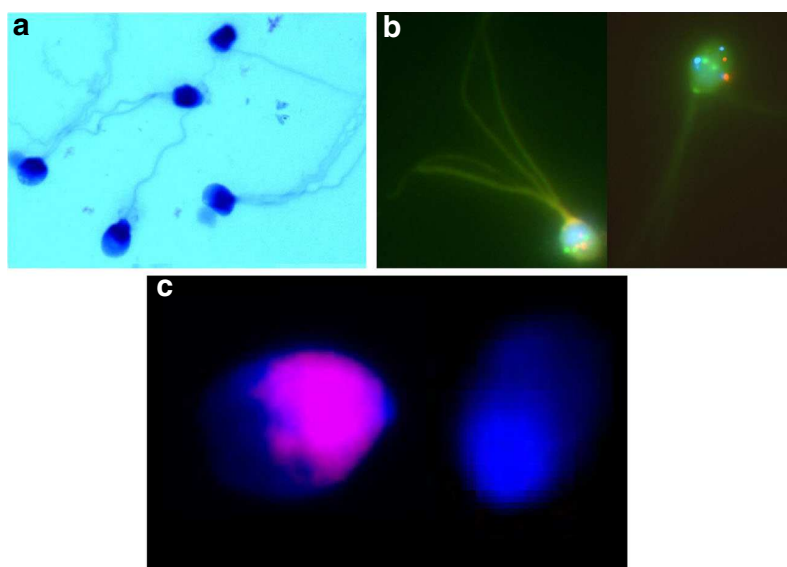


Table 1 Meiotic segregation analysis using FISH in 30 males with macrozoospermia

Reference	Nr sperm	Macrocephalic forms	Multiple flagella	Abnormal acrosome	Diploidy	Triploidy	Tetraploidy	Aneuploidy
[14]	>500	78	51	94	29.6	24.7	21.9	94
[14]	>500	74	30	84	16.8	19.1	16.7	93.7
[14]	>500	87	47	96	18.5	24.5	21	95.2
[14]	>500	60	37	65	21	10.7	11.8	91.7
[14]	>500	95	70	96	22.1	24.3	15.1	98.7
[14]	>500	79	50	85	15.4	8.9	11.1	92.7
[14]	>500	98	30	98	20.2	25.4	17.8	99.3
[14]	>500	98	64	99	30	27	19.3	100
[54]	68	76	76	77	32.5	26.5	3	100
[54]	50	60	49	72	4.5	2	1	85.5
[54]	200	54	50	80	18	12	4	76
[13]	130	91	NA	NA	50	NA	NA	100
[13]	314	82	NA	NA	23	NA	NA	100
[55]	500	100	NA	NA	40	24	5.1	98.4
[56]	1148	50	72	63	21.6	62.4	13.3	NA
[57]	2948	100	30	NA	80.4	14.8	4.4	99.6
[57]	1645	>95	NA	>95	71.3	16	12.7	100
[57]	473	100	NA	NA	58.8	23.2	17.8	99.8
[58]	102	100	100	NA	9.8	16.7	17.6	91.2
[59]	1430	29.5	NA	NA	17.1	NA	3.0	51.4
[59]	2811	22	NA	NA	10.2	NA	1.9	43.6
[59]	1955	49.7	NA	NA	18.1	NA	12.7	71.7
[59]	3981	19	NA	NA	16.5	NA	0.07	25.6
[60]	500	70	NA	NA	19.4	10.2	NA	99.2
[8]	1656	64	28	52	25.1	2.2	NA	89.2
[5]	1124	100	100	NA	18.42	6.14	33.99	99.29
[15]	1010	78	30	NA	0.99	18.12	44.55	99.9
[15]	2522	83	27	NA	4.52	9.99	35.65	99.92
[15]	576	72	10	NA	3.47	18.23	43.23	100
[15]	1103	80	47	NA	2.9	11.97	71.08	100

Some frequencies were recalculated from the raw data

triphosphate nick-end labelling (TUNEL) assay. Brahem et al. (2011) calculated the DNA fragmentation index to be included between 33 and 75 % in 8 males with macrozoospermia while it was less than 10 % in controls [14]. In a study published by Perrin et al. (2011) on three patients, the proportion of spermatozoa with DNA fragmentation varied from 4.4 to 28 %, the mean DNA fragmentation percentage among the control men being 1.20 ± 0.95 % (Fig. 1c) [15]. In all patients, the rate of DNA fragmentation was significantly higher than in their respective control groups.

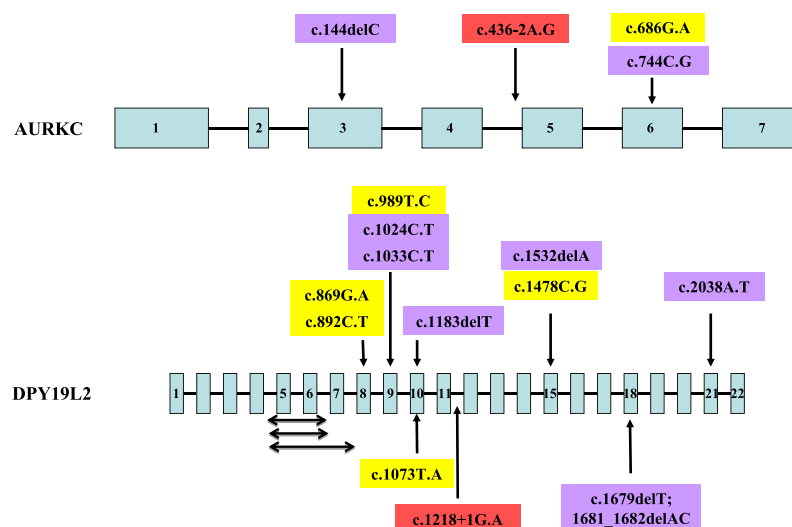
Molecular genetic studies

Dieterich et al. (2007) carried out a genome-wide microsatellite scan of ten infertile men (4 French citizens of North African descent and 6 from the Rabat region in Morocco) with a

large-headed sperm phenotype. Subsequently, they added 4 more males from Rabat [11]. They identified a small region of homozygosity at 19qter. As the aurora kinase C (*AURKC*) gene is located close to that region, they sequenced the coding sequence and detected a homozygous cytosine deletion in exon 3 (c.144delC) in all 14 individuals (Fig. 2). This mutation leads to the premature insertion of a stop codon, inducing the production of a non functional and truncated protein lacking its kinase domain [11].

Harbuz et al. (2009) analyzed 34 patients with macrozoospermia. The *AURKC* c.144delC mutation was found in a homozygous state in 32 patients. Two brothers had a compound genotype made of the c.144delC mutation and a new mutation in exon 6, c.686G.A (p.C229Y). They estimated the heterozygote rate to be 1 in 50 in the Maghreb population [16, 17].

Fig. 2 Schematic diagram of the *AURKC* and *DPY19L2* genes and localization of the mutations thus far identified. Double-headed arrows represent intragenic deletions; yellow boxes represent missense mutations; blue boxes represent nonsense mutations; red boxes represent splice-site mutations



Ben Khelifa et al. (2011) described a new mutation in *AURKC* in two brothers of Tunisian descent. They were compound heterozygotes for the c.144delC mutation and the c.436-2A.G mutation. This later mutation is located in the acceptor consensus splice site of exon 5 and leads to the skipping of exon 5. As a consequence, the mutant protein lacks the 50 amino acids coded by exon 5 (amino acids 146–195). These amino acids are localized in the middle of the catalytic domain and their absence is therefore very likely to severely hamper the functionality of the protein [18].

Ben Khelifa et al. (2012) genotyped 44 macrozoospermic males of European and North African origins. They identified a new nonsense mutation (c.744C.G, p.Y248X) in 11 males (9 homozygotes and 2 compound heterozygotes). Altogether, this group analyzed 83 probands. A mutation was identified in 68 out of these probands (82 %). The c.144delC and c.744C.G mutations represented 85.5 and 13 % of the mutated alleles respectively [19].

Eloualid et al. (2014) screened 326 infertile Moroccan patients for the presence of the *AURKC* c.144delC mutation. This mutation was detected in homozygous (4/326–1.23 %) and heterozygous (6/326–1.84 %) states, with frequencies of 1.23 and 1.84 %, respectively. Two homozygotes had azoospermia and the other 2 macrocephalic and multiflagellar spermatozoa. Eight heterozygous individuals carrying the c.144delC mutation were identified among 459 control fertile individuals (1.74 %) [20]. All 11 Moroccan males with a rate of macrocephalic spermatozoa representing at least 70 % of the total sperm concentration reported by El Kerch et al. (2011) were homozygous for the c.144delC mutation [21].

The *AURKC* gene, located at 19q13.43 has 7 coding exons and encodes a 309 amino acids protein that is a member of the Aurora subfamily of serine/threonine protein kinases [22]. It is a component of the chromosomal passenger complex (CPC), a complex that acts as a key regulator of mitosis. The CPC

complex has essential functions at the centromere in ensuring correct chromosome alignment and segregation and is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. It plays also a role in meiosis and more particularly in spermatogenesis [23–25].

Globozoospermia

Globozoospermia is also a very rare condition, observed in less than 0.1 % of infertile males. It is characterized by round-headed spermatozoa with an absent acrosome, an aberrant nuclear membrane and midpiece defects [26]. Lack of acrosome, which production is a postmeiotic event in spermatogenesis, and round sperm head are its main characteristics [27]. The acrosomeless spermatozoon is unable to go through the zona pellucida and fuse with the oolemma of the oocyte and fertilization failures have been attributed to a deficiency in oocyte activation capacity, even when ICSI is attempted [28–30].

Meiotic segregation studies

Several workers have investigated the rate of aneuploidy of various chromosomes in spermatozoa from 26 globozoospermic men using FISH [6] (Table 2). The slightly increased aneuploidy rate observed in some patients could reflect disturbances in spermatogenesis, as commonly observed in patients with oligoastheno-teratozoospermia.

Brahem et al. (2011) compared the sperm aneuploid rate between patients with polymorphic teratozoospermia, globozoospermia, macrozoospermia and healthy fertile men [12]. They found a statistically significant increase in the rate of aneuploidy between all three teratozoospermic groups compared to the fertile group ($P < 0.001$). However, no significant

Table 2 Sperm aneuploidy rates in globozoospermic males reported in the literature

References	Patient	Disomy (%)													Diploidy (%)	Nr spz		
		1	7	8	9	12	13	15	16	17	18	21	X	Y			XY	
[35]	Sib 1						0.7				0	0.6	0.6	0	12.1 *	±5000		
[35]	Sib 2						0.3				0.2	3.0 *	0.4	0	0	±5000		
[8]		0											0.5	0.2	0.4	0.1	3716	
[61]	Sib 1						0.4	4.03 *			0.74	0.4	0.43	0.52		10,000		
[61]	Sib 2						0.32	0.58			0.74	0.14	0.58	0.6		10,000		
[62]		0			0						0		0.13	0	0	3885		
[63]		2.0 for chromosomes 13, 18, 21, X and Y													1000			
[64]		0.09						0.13				0.19	0.12	0.07	0.18 *	0.21	30,145	
[65]	Pat 1		0.26		0.2		0.39				0.02	0.39	0	0.04	0.15	0.88 *	10,719	
[65]	Pat 2		0.1		0.14		0.08				0.04	0.06	0.02	0.08	0.08	0.3	15,152	
[66]							4.0 *		5.0 *			0.1 *				1.0	100	
[67]	Pat 1										0.052			0.364 *		0.599 *	7388	
[67]	Pat 2										0.078			0.364 *		0.494 *		
[68]							NS				NS	NS		0.66 *		NS	NA	
[69]		Aneuploidy rate not higher in globozoospermic cells													NA			
[70]							2.3	1.3	1.3				0.5	0.5			400	
[71]	Pat 1			1.2 *		0.09							0.12	0.2	1.8 *	1.2 *	0.15	±500
[71]	Pat 2			2.0 *		0.15							0.15	0	2.75 *	3.0 *	2.0 *	±500
[15]						0.08					0.12	1.11 *	0.27 *	0.23 *	0.35 *	0.13	10,165	
[72]		<1.0 for chromosomes 13, 18, 21, X and Y													500			
[73]	Pat 1	1.06 for chromosomes 18, X and Y (NS)													658			
[73]	Pat 2	1.18 for chromosomes 18, X and Y (NS)													1019			
[73]	Pat 3	1.90 for chromosomes 18, X and Y (NS)													948			
[73]	Pat 4	0.9 for chromosomes 18, X and Y (NS)													1000			
[73]	Pat 5	0.8 for chromosomes 18, X and Y (NS)													963			
[73]	Pat 6	0.9 for chromosomes 18, X and Y (NS)													950			

* $p < 0.05$ when compared to controls

NS not significant ($p > 0.05$)

difference in sperm aneuploidy was found between globozoospermia and polymorphic teratozoospermia ($p > 0.05$).

In fact, variations found in the studies presented here are of the same order as those that are commonly found in the literature about infertile men with a normal karyotype but altered sperm parameters [15, 31].

Sperm DNA fragmentation studies

Several techniques are currently used to measure the sperm DNA integrity in the investigation of male fertility [32]. However, the most widely used technique is the TUNEL assay [32]. The DNA fragmentation index (DFI) was calculated in a few globozoospermic patients [6] (Table 3). The majority of the studies, although in a limited number, found that globozoospermic males had a sperm DNA fragmentation index statistically significantly higher than in fertile men.

Brahem et al. (2011) compared the rate of sperm DNA fragmentation between patients with polymorphic teratozoospermia, globozoospermia and healthy fertile men [12]. They found a statistically significant increase in the rate of sperm DNA fragmentation between the globozoospermia and the fertile groups (40.00 % ± 3.55 % versus 8.90 % ± 1.3 %) ($P < 0.01$). However, no significant difference in sperm DNA fragmentation was found between globozoospermia and polymorphic teratozoospermia (40.00 % ± 3.55 % versus 45.33 % ± 10.02 %) ($p > 0.05$).

These results suggested that sperm of globozoospermic males could carry abnormal remodeled chromatin, which could be a possible source of DNA fragmentation. Indeed, some workers reported abnormal chromatin condensation in globozoospermia, with a high heterogeneity in the degree of maturity [33], due to an altered replacement of histones by protamines [34, 35].

Table 3 Sperm DNA fragmentation rates in globozoospermic males reported in the literature

	References	Number of patients	Number of spermatozoa	DNA fragmentation index		P value
				Patient	Control	
	[74]	NA	NA	10 %	0.1 %	
	[75]	1	NA	13 % ^a		NS
	[76]	1	NA	37 %	22.5 %	<i>P</i> <0.005
	[68]	1	NA	45.7 % ^b	30 %	
	[77]	1	NA	97.1 % ^c	41.3 %	<i>P</i> <0.05
	[70]	1	200	80 %	27±13 %	
	[71]	1	500	40 %	12±2.12 %	<i>P</i> <0.001
	[71]	1	500	80 %	12±2.12 %	<i>P</i> <0.001
	[72]	1	500	6 %		NS
	[15]	1	500	9.6 %	1.2 %	<i>P</i> <0.001
NA not available	[73]	1	700	18 %	^d	
^a SCSA and COMET assays	[73]	1	1000	29 %	^d	
^b sperm chromatin disperse test (Halosperm technique)	[73]	1	950	19 %	^d	
^c acridine orange test	[73]	1	1000	10 %	^d	
^d Normal values<13 %	[73]	1	960	2 %	^d	
NS not significant (<i>p</i> >0.05)	[73]	1	950	15 %	^d	

Molecular genetic studies

The presence of consanguineous marriages in families affected with globozoospermia and reports of two or more sibs in several families suggested a genetic contribution to globozoospermia in humans with an autosomal recessive mode of inheritance [6, 35–40]. Three genes segregating on an autosomal recessive mode have now been identified to be associated with globozoospermia in humans.

Dam et al. (2007) identified a homozygous mutation (c.848G.A) in exon 4 of the *SPATA16* (spermatogenesis-associated protein 16) gene (located at chromosome band 3q26.32), leading to the substitution of an arginine to a glutamine at residue 283 (R283Q) in the protein, in three brothers affected with globozoospermia from a consanguineous Ashkenazi Jewish family [39].

Liu et al. (2010) identified a homozygous G->A transition at nucleotide 1567 in exon 13 of the *PICK1* (protein interacting with PRKCA 1) gene (located at chromosome band 22q12.3-q13.2), generating a missense substitution (G393R) in the protein, in one patient [40].

These two genes could be involved in the same process of spermiogenesis. Indeed, the *SPATA16* protein localizes to the Golgi apparatus and the proacrosomal granules that are transported in the acrosome in round and elongated spermataids [41]. *Pick1* localizes to Golgi-derived proacrosomal granules and is involved in vesicle trafficking from the Golgi to the acrosome and participates in acrosome biogenesis [42].

In 2011, Kosciński et al. identified a homologous deletion of the *DPY19L2* (*dpy-19-like 2*) gene located at 12q14.2 in 4

globozoospermic brothers of a Jordanian consanguineous family and in three additional unrelated patients [43]. Subsequently, a whole genome SNP scan on 20 patients presenting with total globozoospermia allowed the identification of a 200 kb homozygous deletion encompassing only *DPY19L2* in 15 patients of different ethnic background [44]. More patients with globozoospermia associated with a homozygous deletion of the whole *DPY19L2* were reported [45–48]. The mechanism underlying this deletion is due to a non-allelic homologous recombination (NAHR) between two low copy repeats that share 96.5 % identity and flank the *DPY19L2* locus [43].

However, it appears very quickly that other genetic defects in the *DPY19L2* gene could be responsible for globozoospermia (Fig. 2). At present, three intragenic deletions have been described [45]. One patient had a deletion of exons 5, 6 and 7 inducing an aberrant splicing between exons 4 and 8 that would give rise to a protein with a deletion of 91 amino acids. Two other patients had a deletion of exons 5 and 6 inducing an aberrant splicing between exons 4 and 7 that would give rise to a frame shift, introducing a premature stop codon; it should be noted that the breakpoints location in these two patients was different.

The other genetic defects consisted in mutations [45, 47, 48]. A donor splice-site mutation in intron 11 (c.1218+1G.A) was identified in one patient. Six mutations, located in exons 9, 11, 15, 18 and 21, introduced a premature stop codon; two of these mutations (c.1183delT and c.1532delA) were identified in two unrelated patients each. Five point mutations, including one (c.869G.A) found in three unrelated males, lead to

an amino acid change; they were distributed in exons 8, 9, 10 and 15. Altogether, 10 of the 12 mutations thus far identified clustered between exons 5 and 15 (Fig. 2).

The *DPY19L2* gene belongs to a family of genes derived from the *DPY-19* gene, present in *Caenorhabditis elegans*, that is involved in the establishment of cell polarity in the worm. This family of proteins has no obvious homology with any other membrane proteins and represents a new family of integral membrane proteins [49]. The *DPY19L2* gene has 22 coding exons [50] and the resulting protein 758 amino acids. It might be involved in indicating the anterior pole of the spermatozoon and in the acroplaxome positioning, a subacrosomal cytoskeletal plate toward which Golgi-derived vesicles fuse [51].

The *DPY19L2* protein is thought to be a transmembrane protein with 10 putative transmembrane segments with the N- and C-terminal domains located in the nucleoplasm. It is expressed specifically in spermatids and localized only in the inner nuclear membrane of the nucleus facing the acrosome. *Dpy19l2* participates in the anchoring of the acrosome to the nucleus, bridging the nuclear envelope to both the nuclear dense lamina and the acroplaxome [44].

Conclusions

It is thought that between 1500 and 2000 genes are involved in the control of spermatogenesis. Therefore, it is expected that genetic alterations in these genes would disturb male fertility [52]. Furthermore, a novel mechanism of posttranscriptional control mediated by microRNAs has lately emerged as an important regulator of spermatogenesis [53]. Development of next generation sequencing is likely to identify new genes involved in male infertility.

Although monomorphic teratozoospermia is very rare, macrozoospermia and globozoospermia represent a brand new avenue for the search of genes involved in spermatogenesis. Identification of the genetic causes should help refine diagnosis and treatment of these patients, avoiding long and painful treatments. Elucidating the molecular causes of these defects is of utmost importance as ICSI is very disappointing in these two pathologies.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest

References

- World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. New York: Cambridge University Press; 1999.
- Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod.* 2007;22:1506–12.
- Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1 850 000) of three French regions (1988–1989). *Hum Reprod.* 1991;6:811–6.
- Perrin A, Nguyen MH, Douet-Guilbert N, Morel F, De Brackeleer M. Motile sperm organelle morphology examination (MSOME): where do we stand twelve years later? *Expert Rev Obstet Gynecol.* 2013;8:249–60.
- Perrin A, Morel F, Moy L, Colleu D, Amice V, De Brackeleer M. Study of aneuploidy in large-headed, multiple-tailed spermatozoa: case report and review of the literature. *Fertil Steril.* 2008;90:1201–7.
- Perrin A, Coat C, Nguyen MH, Talagas M, Morel F, Amice J, et al. Molecular cytogenetic and genetic aspects of globozoospermia: a review. *Andrologia.* 2013;45:1–9.
- Nistal M, Paniagua R, Herruzo A. Multi-tailed spermatozoa in a case with asthenospermia and teratospermia. *Virchows Arch B Cell Pathol.* 1977;26:111–8.
- Viville S, Mollard R, Bach ML, Falquet C, Gerlinger P, Warter S. Do morphological anomalies reflect chromosomal aneuploidies? *Hum Reprod.* 2000;15:2563–6.
- Celik-Ozenci C, Jakab A, Kovacs T, Catalanotti J, Demir R, Bray-Ward P, et al. Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. *Hum Reprod.* 2004;19:2052–9.
- Yurov YB, Saias MJ, Vorsanova SG, Erny R, Soloviev IV, Sharonin VO, et al. Rapid chromosomal analysis of germ-line cells by FISH: an investigation of an infertile male with large-headed spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 1996;2:665–8.
- Dieterich K, Soto Rifo R, Faure AK, Hennebicq S, Ben Amar B, Zahi M, et al. Homozygous mutation of *AURKC* yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nat Genet.* 2007;39:661–5.
- Brahem S, Elghezal H, Ghedir H, Landolsi H, Amara A, Ibala S, et al. Cytogenetic and molecular aspects of absolute teratozoospermia: comparison between polymorphic and monomorphic forms. *Urology.* 2011;78:1313–9.
- Guthauser B, Vialard F, Dakouane M, Izard V, Albert M, Selva J. Chromosomal analysis of spermatozoa with normal-sized heads in two infertile patients with macrocephalic sperm head syndrome. *Fertil Steril.* 2006;85:750.e5–7.
- Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, Saad A. Study of aneuploidy rate and sperm DNA fragmentation in large-headed, multiple-tailed spermatozoa. *Andrologia.* 2012;44:130–5.
- Perrin A, Louanjli N, Ziane Z, Louanjli T, Le Roy C, Guéganic N, et al. Study of aneuploidy and DNA fragmentation in gametes of patients with severe teratozoospermia. *Reprod Biomed Online.* 2011;22:148–54.
- Harbuz R, Zouari R, Dieterich K, Nikas Y, Lunardi J, Hennebicq S, Ray PF [Function of aurora kinase C (*AURKC*) in human reproduction]. *Gynecol Obstet Fertil.* 2009;37:546–51.
- Dieterich K, Zouari R, Harbuz R, Vialard F, Martinez D, Bellayou H, et al. The Aurora Kinase C c.144delC mutation causes meiosis I arrest in men and is frequent in the North African population. *Hum Mol Genet.* 2009;18:1301–9.
- Ben Khelifa M, Zouari R, Harbuz R, Halouani L, Arnoult C, Lunardi J, et al. A new *AURKC* mutation causing macrozoospermia: implications for human spermatogenesis and clinical diagnosis. *Mol Hum Reprod.* 2011;17:762–8.
- Ben Khelifa M, Coutton C, Blum MG, Abada F, Harbuz R, Zouari R, et al. Identification of a new recurrent aurora kinase C mutation in both European and African men with macrozoospermia. *Hum Reprod.* 2012;27:3337–46.

20. Eloualid A, Rouba H, Rhaissi H, Barakat A, Louanjli N, Bashamboo A, et al. Prevalence of the Aurora kinase C c.144delC mutation in infertile Moroccan men. *Fertil Steril*. 2014;101:1086–90.
21. El Kerch F, Lamzouri A, Laarabi FZ, Zahi M, Ben Amar B, Sefiani A [Confirmation of the high prevalence in Morocco of the homozygous mutation c.144delC in the aurora kinase C gene (AURKC) in the teratozoospermia with large-headed spermatozoa]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2011;40:329–33.
22. Bernard M, Sanseau P, Henry C, Couturier A, Prigent C. Cloning of STK13, a third human protein kinase related to *Drosophila* aurora and budding yeast Ipl1 that maps on chromosome 19q13.3-ter. *Genomics*. 1998;53:406–9.
23. Kimura M, Matsuda Y, Yoshioka T, Okano Y. Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/Ipl1-related protein kinase, AIK3. *J Biol Chem*. 1999;274:7334–40.
24. Tang CJ, Chuang CK, Hu HM, Tang TK. The zinc finger domain of Tzfp binds to the tbs motif located at the upstream flanking region of the Aie1 (aurora-C) kinase gene. *J Biol Chem*. 2001;276:19631–9.
25. Tang CJ, Lin CY, Tang TK. Dynamic localization and functional implications of Aurora-C kinase during male mouse meiosis. *Dev Biol*. 2006;290:398–410.
26. Schirren CG, Holstein AF, Schirren C. Über die Morphogenese rundkopfiger Spermatozoen des Menschen. *Andrologia*. 1971;3:125.
27. Singh G. Ultrastructural features of round-headed human spermatozoa. *Int J Fertil*. 1992;37:99–102.
28. Aitken RJ, Kerr L, Bolton V, Hargreave T. Analysis of sperm function in globozoospermia: implications for the mechanism of sperm-zona interaction. *Fertil Steril*. 1990;54:701–7.
29. Dale B, Iaccarino M, Fortunato A, Gragnaniello G, Kyozuka K, Tosti E. A morphological and functional study of fusibility in round-headed spermatozoa in the human. *Fertil Steril*. 1994;61:336–40.
30. Rybouchkin A, Dozortsev D, Pelinck MJ, De Sutter P, Dhont M. Analysis of the oocyte activating capacity and chromosomal complement of round-headed human spermatozoa by their injection into mouse oocytes. *Hum Reprod*. 1996;11:2170–5.
31. Kirkpatrick G, Ferguson KA, Gao H, Tang S, Chow V, Yuen BH, et al. A comparison of sperm aneuploidy rates between infertile men with normal and abnormal karyotypes. *Hum Reprod*. 2008;23:1679–83.
32. Morel F, Douet-Guilbert N, Perrin A, Le Bris MJ, Amice V, Amice J, et al. Chromosomal abnormalities in spermatozoa. In: De Braekeleer M, editor. *Cytogenetics and Infertility*. Trivandrum: Transworld Research Network; 2006. p. 53–112.
33. Dam AH, Feenstra I, Westphal JR, Ramos L, van Golde RJ, Kremer JA. Globozoospermia revisited. *Hum Reprod Update*. 2007;13:63–75.
34. Blanchard Y, Lescoat D, Le Lannou D. Anomalous distribution of nuclear basic proteins in round-headed human spermatozoa. *Andrologia*. 1990;22:549–55.
35. Carrell DT, Emery BR, Liu L. Characterization of aneuploidy rates, protamine levels, ultrastructure, and functional ability of round-headed sperm from two siblings and implications for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 1999;71:511–6.
36. Florke-Gerloff S, Topfer-Petersen E, Müller-Esterl W, Mansouri A, Schatz R, Schirren C, et al. Biochemical and genetic investigation of round-headed spermatozoa in infertile men including two brothers and their father. *Andrologia*. 1984;16:187–202.
37. Kilani Z, Ismail R, Ghunaim S, Mohamed H, Hughes D, Brewis I, et al. Evaluation and treatment of familial globozoospermia in five brothers. *Fertil Steril*. 2004;82:1436–9.
38. Dirican EK, Isik A, Vicdan K, Sozen E, Suludere Z. Clinical pregnancies and livebirths achieved by intracytoplasmic injection of round headed acrosomeless spermatozoa with and without oocyte activation in familial globozoospermia: case report. *Asian J Androl*. 2008;10:332–6.
39. Dam AH, Kosciński I, Kremer JA, Moutou C, Jaeger AS, Oudakker AR, et al. Homozygous mutation in SPATA16 is associated with male infertility in human globozoospermia. *Am J Hum Genet*. 2007;81:813–20.
40. Liu G, Shi QW, Lu GX. A newly discovered mutation in PICK1 in a human with globozoospermia. *Asian J Androl*. 2010;12:556–60.
41. Xu M, Xiao J, Chen J, Li J, Yin L, Zhu H, et al. Identification and characterization of a novel human testis-specific Golgi protein, NYD-SP12. *Mol Hum Reprod*. 2003;9:9–17.
42. Xiao N, Kam C, Shen C, Jin W, Wang J, Lee KM, et al. PICK1 deficiency causes male infertility in mice by disrupting acrosome formation. *J Clin Invest*. 2009;119:802–12.
43. Kosciński I, Elinati E, Fossard C, Redin C, Müller J, Velez DC, et al. DPY19L2 deletion as a major cause of globozoospermia. *Am J Hum Genet*. 2011;88:344–50.
44. Harbuz R, Zouari R, Pierre V, Ben Khelifa M, Kharouf M, Coutton C, et al. A recurrent deletion of DPY19L2 causes infertility in man by blocking sperm head elongation and acrosome formation. *Am J Hum Genet*. 2011;88:351–61.
45. Elinati E, Kuentz P, Redin C, Jaber S, Vanden Meerschaut F, Makarian J, et al. Globozoospermia is mainly due to DPY19L2 deletion via non-allelic homologous recombination involving two recombination hotspots. *Hum Mol Genet*. 2012;21:3695–702.
46. Noveski P, Madjunkova S, Maleva I, Sotiroska V, Petanovski Z, Plaseska-Karanfilska D. A homozygous deletion of the DPY19L2 gene is a cause of globozoospermia in Men from the republic of Macedonia. *Balk J Med Genet*. 2013;16:73–6.
47. Coutton C, Zouari R, Abada F, Ben KM, Merdassi G, Triki C, et al. MLPA and sequence analysis of DPY19L2 reveals point mutations causing globozoospermia. *Hum Reprod*. 2012;27:2549–58.
48. Zhu F, Gong F, Lin G, Lu G. DPY19L2 gene mutations are a major cause of globozoospermia: identification of three novel point mutations. *Mol Hum Reprod*. 2013;19:395–404.
49. Honigberg L, Kenyon C. Establishment of left/right asymmetry in neuroblast migration by UNC-40/DCC, UNC-73/Trio and DPY-19 proteins in *C. elegans*. *Development*. 2000;127:4655–68.
50. Carson AR, Cheung J, Scherer SW. Duplication and relocation of the functional DPY19L2 gene within low copy repeats. *BMC Genomics*. 2006;7:45.
51. Kierszenbaum AL, Tres LL. The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol*. 2004;67:271–84.
52. Matzuk MM, Lamb DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med*. 2008;14:1197–213.
53. Papaioannou MD, Nef S. microRNAs in the testis: building up male fertility. *J Androl*. 2010;31:26–33.
54. Lewis-Jones I, Aziz N, Seshadri S, Douglas A, Howard P. Sperm chromosomal abnormalities are linked to sperm morphologic deformities. *Fertil Steril*. 2003;79:212–5.
55. In't Veld PA, Broekmans FJ, de France HF, Pearson PL, Pieters MH, van Kooij RJ. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and chromosomally abnormal spermatozoa. *Hum Reprod*. 1997;12:752–4.
56. Benzacken B, Gavelle FM, Martin-Pont B, Dupuy O, Lievre N, Hugues JN, et al. Familial sperm polyploidy induced by genetic spermatogenesis failure. *Hum Reprod*. 2001;16:2646–51.
57. Devillard F, Metzler-Guillemain C, Pelletier R, DeRobertis C, Bergues U, Hennebicq S, et al. Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases. *Hum Reprod*. 2002;17:1292–8.
58. Mateu E, Rodrigo L, Prados N, Gil-Salom M, Remohi J, Pellicer A, et al. High incidence of chromosomal abnormalities in large-headed and multiple-tailed spermatozoa. *J Androl*. 2006;27:6–10.
59. Achard V, Paulmyer-Lacroix O, Mercier G, Porcu G, Saïas-Magnan J, Metzler-Guillemain C, et al. Reproductive failure in patients with various percentages of macronuclear spermatozoa: high level of aneuploid and polyploid spermatozoa. *J Androl*. 2007;28:600–6.

60. Weissenberg R, Aviram A, Golan R, Lewin LM, Levron J, Madgar I, et al. Concurrent use of flow cytometry and fluorescence in-situ hybridization techniques for detecting faulty meiosis in a human sperm sample. *Mol Hum Reprod*. 1998;4:61–6.
61. Carrell DT, Wilcox AL, Udoff LC, Thorp C, Campbell B. Chromosome 15 aneuploidy in the sperm and conceptus of a sibling with variable familial expression of round-headed sperm syndrome. *Fertil Steril*. 2001;76:1258–60.
62. Vicari E, Perdichizzi A, De Palma A, Burrello N, D'Agata R, Calogero AE. Globozoospermia is associated with chromatin structure abnormalities. *Hum Reprod*. 2002;17:2128–33.
63. Zeyneloglu HB, Baltaci V, Duran HE, Erdemli E, Batioglu S. Achievement of pregnancy in globozoospermia with Y chromosome microdeletion after ICSI. *Hum Reprod*. 2002;17:1833–6.
64. Martin RH, Greene C, Rademaker AW. Sperm chromosome aneuploidy analysis in a man with globozoospermia. *Fertil Steril*. 2003;79:1662–4.
65. Morel F, Douet-Guilbert N, Moerman A, Duban B, Marchetti C, Delobel B, et al. Chromosome aneuploidy in the spermatozoa of two men with globozoospermia. *Mol Hum Reprod*. 2004;10:835–8.
66. Ditzel N, El Danasouri I, Just W, Sterzik K. Higher aneuploidy rates of chromosomes 13, 16, and 21 in a patient with globozoospermia. *Fertil Steril*. 2005;84:217–8.
67. Moretti E, Collodel G, Scapigliati G, Cosci I, Sartini B, Baccetti B. 'Round head' sperm defect. Ultrastructural and meiotic segregation study. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 2005;37:297–303.
68. Tejera A, Molla M, Muriel L, Remohi J, Pellicer A, De Pablo JL. Successful pregnancy and childbirth after intracytoplasmic sperm injection with calcium ionophore oocyte activation in a globozoospermic patient. *Fertil Steril*. 2008;90:1202–5.
69. Sahu B, Ozturk O, Serhal P. Successful pregnancy in globozoospermia with severe oligoasthenospermia after ICSI. *J Obstet Gynaecol*. 2010;30:869–70.
70. Taylor SL, Yoon SY, Morshedi MS, Lacey DR, Jellerette T, Fissore RA, et al. Complete globozoospermia associated with PLCzeta deficiency treated with calcium ionophore and ICSI results in pregnancy. *Reprod Biomed Online*. 2010;20:559–64.
71. Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, Saad A. Analysis of sperm aneuploidies and DNA fragmentation in patients with globozoospermia or with abnormal acrosomes. *Urology*. 2011;77:1343–8.
72. Sermondade N, Hafhouf E, Dupont C, Bechoua S, Palacios C, Eustache F, et al. Successful childbirth after intracytoplasmic morphologically selected sperm injection without assisted oocyte activation in a patient with globozoospermia. *Hum Reprod*. 2011;26:2944–9.
73. Zhioua A, Merdassi G, Bhourri R, Ferfourri F, Ben Ammar A, Amouri A, et al. Apport de l'exploration cytogénétique et ultrastructurale dans le pronostic de fertilité des sujets globozoospermiques. *Andrologie*. 2011;21:240–6.
74. Baccetti B, Collodel G, Piomboni P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1996;28:587–96.
75. Larson KL, Brannian JD, Singh NP, Burbach JA, Jost LK, Hansen KP, et al. Chromatin structure in globozoospermia: a case report. *J Androl*. 2001;22:424–31.
76. Vicari E, Perdichizzi A, De Palma A, Burrello N, D'Agata R, Calogero AE. Globozoospermia is associated with chromatin structure abnormalities: case report. *Hum Reprod*. 2002;17:2128–33.
77. Egashira A, Murakami M, Haigo K, Horiuchi T, Kuramoto T. A successful pregnancy and live birth after intracytoplasmic sperm injection with globozoospermic sperm and electrical oocyte activation. *Fertil Steril*. 2009;92:2037e5–9.

Annexe 2

Article 3 : MSOME : où sommes nous après 12 ans ?

Article 4 : IMSI ou ICSI, où sommes nous après 12 ans ?

For reprint orders, please contact reprints@expert-reviews.com

EXPERT
REVIEWS

Motile sperm organelle morphology examination: where do we stand 12 years later?

Expert Rev. Obstet. Gynecol. 8(3), 249–260 (2013)

Aurore Perrin^{1,2}, Minh Huong Nguyen¹, Nathalie Douet-Guilbert^{1,2}, Frédéric Morel^{1,2} and Marc De Braekeleer^{*1,2}

¹Laboratoire d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, INSERM U1078, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France

²Service de Cytogénétique, Cytologie et Biologie de la Reproduction, Hôpital Morvan, CHRU Brest, France

*Author for correspondence:

Tel.: +33 2 98 22 36 94

Fax: +33 2 98 22 39 61

marc.debraekeleer@univ-brest.fr

Selection of a spermatozoon presenting both motility and normal morphology is one of the main concerns in intracytoplasmic sperm injection. Spermatozoa appearing as morphologically normal at the 400× magnification could carry various structural abnormalities that could negatively influence embryo development and pregnancy establishment, but only be detected with the use of higher optical magnifications. This led to the development of motile sperm organelle morphology examination (MSOME), which can achieve magnification ranging from 6300× to 13000×. Several approaches were used to classify spermatozoa. However, the prevalence of morphologically normal spermatozoa in MSOME is low (usually less than 5%). The most striking abnormalities are vacuoles, thought to be of acrosomal and/or nuclear origin and related to failure of sperm chromatin condensation. Twelve years after the introduction of MSOME, many questions remain unsolved. A consensual definition of a 'normal' spermatozoon and a classification of abnormal spermatozoa accepted by all workers in this field is still awaited. We are far away from understanding the nature and the consequences of the vacuoles.

KEYWORDS: DNA fragmentation • DNA integrity • motile sperm organelle morphology examination • spermatozoa • vacuoles

Since its first introduction in 1992, intracytoplasmic sperm injection (ICSI) has become the treatment of choice in male factor infertility and a major advance in the field of assisted reproduction [1].

However, several challenges are faced by most assisted reproduction centers. One is to improve pregnancy rate. Therefore, selection of a spermatozoon presenting both motility and normal morphology is one of the main concerns in ICSI. Morphology has been suggested to play a significant role in ICSI outcome, although some studies have failed to observe a relationship between sperm morphology and the success of ICSI [2–7]. Another challenge is the risk of birth defects. Indeed, a slight increase in birth defects is noted after ICSI, and the rate of spontaneous pregnancy loss remains higher than that of naturally conceived pregnancies [8–11].

Although one cannot exclude that these differences are due to the technique itself, it has been postulated that it could be the result of subtle morphological abnormalities in the human

spermatozoon invisible under the optical magnification of 400× that is commonly used for selecting spermatozoa for ICSI. Indeed, the accuracy with which the 'morphological normality' of spermatozoa is assessed depends on the resolving power of the optical magnification system used. Spermatozoa appearing as morphologically normal at the 400× magnification could carry various structural abnormalities that could negatively influence embryo development and pregnancy establishment, but would only be detected with the use of higher optical magnifications [12,13].

This led to the introduction of a new method for real-time evaluation of sperm morphology called 'motile sperm organelle morphology examination' (MSOME) [12,13]. MSOME is accomplished by utilizing an inverted light microscope equipped with high-power Nomarski optics (differential interference contrast [DIC]) enhanced by digital imaging to achieve a 6300× magnification [13]. Using different apparatus, magnification up to 8400× [14], 12,500× [15] and 13,000× [16] can be achieved. The MSOME

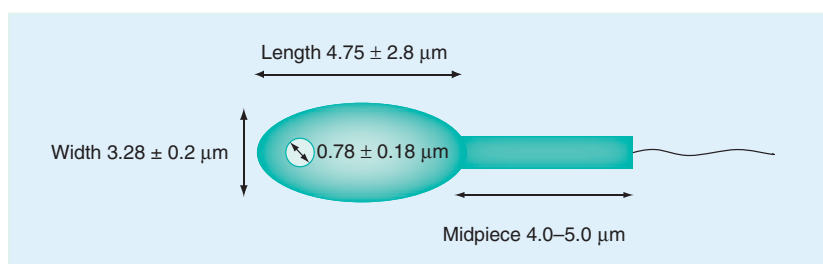


Figure 1. Representation of a normal spermatozoon in motile sperm organelle morphology examination. Size as defined by Bartoov *et al.* Data taken from [13].

technique reveals small morphological abnormalities and other defects in human spermatozoa not seen at the 400× magnification. This could prevent injection of spermatozoa presenting structural abnormalities, including nuclear defects [12].

As MSOME is an unstained cytological technique, this allows its incorporation with a micromanipulation system, leading to a modified ICSI procedure called intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) [13].

However, several questions remain unanswered and the topic has led to numerous papers within the last 12 years. This article reviews what is known about MSOME and discusses unsolved matters.

Criteria of a normal spermatozoon in MSOME

Based on electron microscopy and high magnification optic microscopy, Bartoov *et al.* defined criteria for considering a spermatozoon to be normal in MSOME [13]. To be considered as morphologically normal, a spermatozoon should have a normal acrosome, postacrosomal lamina, neck, tail, mitochondria and no cytoplasmic droplet or cytoplasm around the neck. It should also have a normal nucleus, which is smooth and symmetric, with an oval configuration and homogeneity of the nuclear chromatin mass. It should not contain 'nuclear vacuoles' exceeding more than 4% of the nuclear area. Finally, a normal spermatozoon should have a length of $4.75 \pm 0.28 \mu\text{m}$ and a width of $3.28 \pm 0.20 \mu\text{m}$ (FIGURE 1).

These criteria are now commonly accepted and routinely used, sometimes with minor modifications, by workers performing MSOME [17–19]. However, defining a morphologically abnormal spermatozoon in MSOME is less consensual, which has led to several classifications.

MSOME classifications

Following the definition of a normal spermatozoon, Bartoov *et al.* described several specific morphological malformations of sperm subcellular organelles (TABLE 1) [13].

This led to what will be called 'Bartoov classification' hereafter. A spermatozoon that did not have all criteria to be considered as morphologically normal was therefore abnormal.

Based on the Bartoov classification and the modified David classification [20,21], Sermondade *et al.* developed a classification in which criteria pertaining to mitochondria, solely visible in electron microscopy, and the acrosome were deleted. More details were given on the 'chromatin content' as the number of vacuoles was determined and their relative area over the whole nuclear area (expressed in %) was calculated [17].

Saidi *et al.* proposed a different classification based on the number of vacuoles and their relative area (TABLE 2). They defined two relative area thresholds, one at 6.5% and the other at 13%, allowing discrimination between normal and abnormal spermatozoa [22].

In 2008, Vanderzwalmen *et al.* wanted to address the question as to whether the existence of vacuoles in the nuclei of spermatozoa affected embryo development to the blastocyst stage. They developed their own classification solely based on the head shape (normal or not) and the number and size of vacuoles. Spermatozoa were distributed in four groups (TABLE 3) [23].

Cassuto *et al.* developed a scoring scale for individual spermatozoon [24]. They took into account the normalcy of head size and shape, the acrosome, the basis of the head, the axial position of the tail and the presence or absence of cytoplasmic droplets and/or vacuole (TABLE 4). Each spermatozoon could be assigned a score

Table 1. Specific morphological malformations of sperm subcellular organelles observed in motile sperm organelle morphology examination.

Acrosome	Postacrosomal lamina	Nucleus		Neck	Tail	Mitochondria
		Shape	Chromatin content			
Lack	Lack	Small oval	Vacuole area >4%	Abaxial	Lack	Lack
Partial	Vesiculated	Large oval		Irregular	Coiled	Partial
Vesiculated		Narrow (width: <2.9 μm)		Cytoplasmic droplets	Irregular	Disorganized
		Wide (width: >3.7 μm)			Multiple	
		Short (length: <4.2 μm)			Short	
		Irregular				

Reproduced with permission from [13].

between 10 and 0, which led to the establishment of three classes of spermatozoa: class I or normal spermatozoa (score between 10 and 7), class II or abnormal spermatozoa (score between 6 and 3) and class III or very abnormal spermatozoa (score under 3). Following simplification of the scoring scale (1 for normal and 0 for abnormal) and application of the equation ($[2 \times \text{head}] + [3 \times \text{vacuole}] + [1 \times \text{basis}]$), they calculated a spermatozoon score ranging from 6 to 0 that was the basis of the classification of Cassuto (TABLE 5).

Recently, Perdrix *et al.* proposed another classification based on the absence or presence of vacuoles and their relative size (TABLE 6) [25]. This new classification is similar to that proposed by Saidi *et al.* [22].

Spermatozoa quality in MSOME

Prevalence of normal spermatozoa in MSOME

Several studies determined the frequency of normal spermatozoa forms in MSOME (TABLE 7). Although different classifications were used, all applied the criteria proposed by Bartoov *et al.* for a spermatozoon to be considered as normal [13]. The mean frequency of normal spermatozoa was very low, usually below 5% among infertile males. Sermondade *et al.* found a frequency as high as 29.3%, but the number of spermatozoa was low (25/male) and the spermatozoa examined in MSOME were first selected at low magnification (200–400 \times) and then considered to be used for ICSI [17].

Two studies estimated the effects of age among infertile males on sperm normalcy by MSOME (TABLE 7). Pfeffer *et al.* distributed 231 males in four age classes; they found no statistically significant difference in the percentages of normal sperm ($p > 0.05$) [26]. Silva *et al.* found no difference in the percentages of normal sperm between men less than 36 years old and those between 36 and 40 years old ($p > 0.05$). However, the percentage of normal sperm among males older than 40 years old was significantly lower than among those younger than 40 years old ($p < 0.05$) [27].

Few fertile males were analyzed (TABLE 7) [17,22,28]; therefore, no reference value can be determined, which is not satisfactory to assess whether differences in the frequency of normal forms exist between infertile and fertile males.

Prevalence of abnormal spermatozoa in MSOME

As different classifications were proposed to categorize the abnormal forms observed in MSOME, it is very difficult to extract data that could be compared between publications. Three studies assessed the frequency of spermatozoa presenting vacuoles whose size was greater than 50% of the head size (TABLE 7) [27,29,30]. Although the mean values were quite close between studies, ranging from 25 to 35%, Silva *et al.* found that the percentage of spermatozoa with vacuoles was significantly higher among males older than 40 years ($p < 0.05$) [27]. Two other studies determined the frequency of spermatozoa with vacuoles representing more than 15% of the head size (TABLE 7) [22,26]. Saidi *et al.* found that infertile males had a significantly higher proportion of vacuolated spermatozoa than men with normal sperm parameters ($p < 0.001$) [22]. No significant difference was found between infertile males according to age [26].

Table 2. Classification of spermatozoa as proposed by Saidi *et al.*

Type	Subtype	Vacuoles (n)	Relative area
0		0	
I		1	Less than 6.5%
II	Ila	1	Between 6.5 and 13%
	Ilb	Several	Less than 13%
III		≥ 1	Greater than 13%
Data taken from [22].			

Sermondade *et al.* compared 625 spermatozoa that could potentially be used for ICSI at low magnification (200–400 \times) from 25 infertile men with 125 spermatozoa from five fertile men with normal sperm parameters. They found a significant difference in the percentage of spermatozoa with vacuoles ($>4\%$ of the head size) between infertile and fertile men (53.44 ± 18.58 vs $34.40 \pm 9.21\%$; $p = 0.0001$) [17].

Using the classification described by Cassuto (TABLES 4 & 5) [24], Le Foll *et al.* found no relationship between the prevalence of spermatozoa distributed in classes and the segregation profile in six males with reciprocal translocations and two with Robertsonian translocations [31].

The question as to whether the processing preparation for ICSI could have had an impact on the selection of the best spermatozoon to be injected has also been addressed. Monqaut *et al.* compared the quality of sperm preparations obtained by density gradient and swim-up techniques in 53 males according to the classification described by Vanderzwalmen (TABLE 3) [32]. They found an increase in the proportion of grade I and II spermatozoa compared with nonprepared spermatozoa, indicating that both methods were effective in selecting better quality sperm. Furthermore, they showed that swim-up technique produced a higher increment of grade I and II spermatozoa compared with density gradient ($p < 0.001$) [32].

Reliability of MSOME

The method for evaluating sperm morphology at a high magnification needs to be practical, reliable and repeatable. A few studies were conducted, addressing different questions; one of them compared the results obtained by MSOME and those using Tygerberg

Table 3. Classification of spermatozoa as proposed by Vanderzwalmen *et al.*

Grade	Head shape	Vacuoles
I	Normal	Absence of vacuoles
II	Normal	Less than or equal to two small vacuoles ($<4\%$ head surface)
III	Normal	More than two small vacuoles or at least one large vacuole ($>4\%$ head surface)
IV	Abnormal	Large vacuoles
Data taken from [23].		

Table 4. Scoring scale for individual spermatozoon and classification proposed by Cassuto *et al.*

Head	Acrosome	Vacuole	Basis (neck)	Cytoplasmic droplets	Axial tail	Tail
3 = normal on both axes	1 = normal	2 = no vacuole	1 = normal	1 = absence	1 = normal	1 = normal
2 = normal on one axis		1 = one small-diameter vacuole				
0 = abnormal on both axes	0 = abnormal	0 = more than one vacuole or one large-diameter vacuole	0 = abnormal	0 = presence	0 = abnormal	0 = abnormal

strict criteria [33,34]. Oliveira *et al.* analyzed 200 spermatozoa from 97 men from an unselected group of couples undergoing infertility investigation for Tygerberg criteria and 200 other motile spermatozoa in MSOME [35]. Performing regression analysis, they demonstrated a significant positive correlation between the percentage of normal sperm forms by Tygerberg criteria and by MSOME ($p < 0.0001$). However, the incidence of morphologically normal spermatozoa by Tygerberg criteria ($9.4\% \pm 4.8$; range: 2–23%) was significantly higher than under MSOME ($3.3\% \pm 3.2$; range: 0–18%; $p < 0.0001$). Indeed, the magnification level is much lower in 'routine' sperm examination than in MSOME. Therefore, the difference could be due to the identification of vacuoles and chromatin abnormalities that are not evaluated with the same precision using Tygerberg criteria. Furthermore, the definition by the WHO of 'normal semen' from the point of view of morphology has changed over the last 30 years.

It is also of utmost importance to know whether the results are reproducible over time. Oliveira *et al.* evaluated by MSOME the variation of sperm morphology after a 3-month time interval on 240 infertile males [30]. No significant difference in the frequency of normal spermatozoa or spermatozoa with vacuoles (representing more than 50% of head size) was found between both samples ($1.6\% \pm 2.2$ vs $1.6\% \pm 2.2$ and $25.2\% \pm 19.2$ vs $26.1\% \pm 19.0$, respectively). Furthermore, regression analysis found a significant positive correlation between both samples in the frequency of normal spermatozoa and those with vacuoles (>50% head size; $p < 0.0001$).

Since sperm analysis based on MSOME is time consuming, the question was raised as to whether the length of analysis could have an impact on the morphologic normalcy of the sperm nucleus. Peer *et al.* evaluated the frequency of spermatozoa with a morphologically normal nucleus and those with a vacuolated nucleus over time [36]. Working at a temperature of 37°C, they found

a significant decrease in the rate of spermatozoa with morphologically normal nuclei, but a significant increase in the rate of spermatozoa with vacuolated nuclei, when they were examined at 0, 2 and 22 h ($p < 0.01$).

Spermatozoa abnormalities in MSOME

Since MSOME has been developed, the nature of the abnormalities observed in MSOME is much debated. This is particularly true for the nature of vacuoles. They were described as 'nuclear vacuoles' by Bartoov *et al.* in their principle paper [13]. Several studies tried to evaluate the morphological aspect and localization of vacuoles and to relate them to the nuclear integrity of the spermatozoa.

Origin of vacuoles

One of the questions to be addressed concerns a potential relationship with conventional semen parameters. Perdrix *et al.* compared the MSOME results obtained on 331 males with at least one abnormal sperm parameter with those of 109 men with normal sperm parameters [25]. They found significant differences in the proportion of sperm with vacuoles and the relative vacuole area between the abnormal and the normal group (99.4 vs 98.4% and 7.88 ± 0.16 vs 5.88 ± 0.19 , respectively; $p < 0.0001$). The relative vacuole area was also found to increase when sperm concentration, vitality, progressive motility and proportion of normal forms decreased.

The nature of the so-called 'nuclear vacuoles', considered as being 'chromatin vacuoles', has been questioned [37]. Indeed, electron microscopy examination with magnification approximately 20,000 or more is necessary for chromatin to be seen. Analyzing sperm structures by electron microscopy, Zamboni reported acrosome malformations appearing as hernias within the sperm nucleus, including the presence of some acrosomal material and membranes within the nucleus [38]. Furthermore, DIC microscopy only allows images of surfaces by reflection of birefringent light rays. It does not show the difference between a depression and an outgrowth and does not allow analysis of intracellular structures [39].

As the vacuoles are mostly located in the anterior part of the sperm head, where the acrosome is located, Kacem *et al.* questioned whether they were linked to the presence of the acrosome or of acrosomal material. Using *Pisum sativum* agglutinin staining to evaluate the acrosome status,

Table 5. Classification proposed by Cassuto *et al.*

Class	Definition	Characteristics	Score
1	High-quality spermatozoon	Normal head Maximum of two other abnormalities not located in the head	Between 4 and 6
2	Medium-quality spermatozoon	Normal head More than two abnormalities	Between 1 and 3
3	Low-quality spermatozoon	Several head defects	Equal to 0

Data taken from [24].

they found that vacuoles were absent in 70.9% of acrosome-reacted sperm, but present in 60.7% of sperm with incomplete acrosome reaction or intact acrosome ($p < 0.0001$). Furthermore, induction of acrosome reaction by A23587 increased the acrosome-reacted sperm from 17.4 to 36.1% ($p < 0.001$) and the vacuole-free spermatozoa from 41.2 to 63.8% ($p < 0.005$). They concluded that spermatozoa with no vacuoles were likely to have undergone a complete acrosome reaction [37].

Similar results were obtained in a more recent study; Montjean *et al.* determined whether there was a correlation between the presence of vacuoles and variation in acrosomal status in 35 males consulting for fertility problems. Incubation with follicular fluid, which induces acrosomal reaction, increased the acrosomal reaction rate and decreased the proportion of spermatozoa bearing vacuoles ($p < 0.05$). In the same way, incubation with hyaluronic acid, which induces capacitation, increased the rate of acrosome-reacted sperm and decreased the proportion of spermatozoa bearing vacuoles ($p < 0.05$). Both results tended to demonstrate a link between acrosomal reaction and the incidence of vacuoles [40].

A possible relationship between large vacuoles, defined as occupying more than 13% of the sperm head and acrosome morphology, studied by proacrosin immunostaining, was studied in males with teratozoospermia by Perdrix *et al.* [41]. Compared with native sperm, more sperm with large vacuoles had an abnormal or absent acrosome (77.6 ± 2.54 vs 70.6 ± 2.62 ; $p = 0.014$). However, in their population, acrosome morphology was deeply altered in native sperm, questioning a possible specific association between vacuoles and acrosome defects. Furthermore, analysis by transmission electron microscopy and confocal microscope on three patients showed that vacuoles were exclusively present in the nucleus.

Yet, the nature of vacuoles remains unclear; vacuoles can be small or large, anterior or posterior and deep-lying or superficial, suggesting that they could not have the same origin [42]. Dorphin *et al.* tried to establish a correlation between some DIC observations and the sperm histological structures associated with vacuoles. Motile spermatozoa selected by DIC at high magnification were subjected to several immunostaining techniques. Superficial vacuoles were found to involve the cytoplasmic membrane while acrosomal vacuoles could only be observed by immunofluorescence with *P. sativum* agglutinin but not by DIC. Middle size and large vacuoles were mainly located in the nucleus but could also involve the cytoplasmic membrane and the acrosome. Therefore, although sperm-head vacuoles involved all structures, they were mainly localized in the nucleus [43].

Boitrelle *et al.* also addressed the question of whether vacuoles were of nuclear, membrane and/or acrosomal origin. They analyzed spermatozoa with a large vacuole accounting for at least 25% of the head area in 15 infertile patients to identify the structures involved in the vacuole using a 3D deconvolution microscopy. In all spermatozoa, the acrosome and the plasma membrane were intact and the vacuole appeared to be a nuclear thumbprint-like concavity covered by the acrosome, the acrosomal membrane and the plasma membrane [42].

Watanabe *et al.* classified vacuoles in two groups based on their respective sizes; those with a diameter of 1.5 μm and visible at

Table 6. Classification of spermatozoa proposed by Perdrix *et al.*

Type	Vacuoles	Relative area
0	Absent	
1	Present	Less than 5.9%
2	Present	Between 5.9 and 12.4%
3	Present	Greater than 12.4%

Data taken from [25].

400 \times magnification were considered as 'large', with others considered as 'small'. Most of the vacuoles existed in the tip (50%) or the middle areas (74%), large vacuoles being mainly located at the tip of the sperm heads (97%). Vacuoles were observed in more than 90% of normal-shaped sperm from patients and fertile men, which led to the conclusion that vacuoles should probably be considered as a common feature in normal human sperm, indicating that vacuoles were not signs of pathology [28].

The same conclusion was reached by Tanaka *et al.* Based on the incidence of vacuoles in germ cells of 28 men at various developmental and maturation stages, they proposed that vacuole formation occurred naturally during the process of condensation of sperm nuclei and that they should be considered as physiological changes. Small vacuoles (<25% of surface area of total sperm head) were preferentially found in ejaculated and epididymal spermatozoa whereas large vacuoles (>50% of surface area) were most frequently found in spermatids. Furthermore, the incidence of vacuoles on epididymal and testicular spermatozoa were almost the same as on mature or elongated Sc-Sd2 spermatids, but higher than on spermatids of the earlier Sb2 and Sb1 stages and lower than on ejaculated sperm [44].

Vacuoles & chromatin (nuclear) defects

As the vacuoles have been considered, at least for some of them, to be of 'nuclear' origin, several studies have tried to relate them to the chromatin integrity of the spermatozoa (TABLE 8). Several cytochemical staining methods or fluorochromes, including aniline blue, chromomycin A3 and acridine orange assays, were applied in order to assess different aspects of sperm DNA integrity.

During spermiogenesis, DNA histones are mainly replaced by protamines in order to acquire a highly packed sperm chromatin structure [45]. Aniline blue staining detects the presence of extra histones and, therefore, indirectly infers the presence of lower amounts of protamines in the sperm nucleus. It assesses the degree of sperm nuclear condensation or maturation by discriminating between lysine-rich histones on the one hand, and arginine- and cysteine-rich protamines on the other [46,47]. Chromomycin A3 is a fluorochrome that has been shown to compete with the protamines for binding to the minor groove of DNA and detects protamine deficiency in loosely packed chromatin. It is a useful tool for assessing the packaging quality of the chromatin in sperm and may allow indirect visualization of protamine deficiency [48,49]. Acridine orange staining is a cytochemical fluorescence method for determining sperm DNA integrity. It allows differentiation between normal, double-stranded

Table 7. Prevalence of normal spermatozoa and those with vacuoles in motile sperm organelle morphology examination.

Classification	Population	Patients (n)	Spermatozoa (n motile/man)	Mean frequency \pm SD (%)	Ref.
<i>Normal spermatozoa</i>					
Bartoov	Infertile	100	$\pm 100^{\dagger}$	3.3 \pm 0.5 (range: 0–38)	[13]
Bartoov	Normal or subnormal sperm [†]	52	100–150	8	[71]
Bartoov	Infertile	97	200	3.3 \pm 3.2 (range: 0–18)	[35]
Bartoov	Infertile	240	>200	1.6 \pm 2.2 (range: 0–15)	[30]
Bartoov	Infertile	538	≥ 200	1.8	[29]
Bartoov	Infertile	111	>200	1.5 \pm 2.2 (range: 0–13)	[72]
Bartoov	Infertile	17	40	2.6	[28]
Bartoov	Fertile	3	40	0	[28]
Bartoov	Infertile	975	>200	1.2 \pm 2 (range: 0–15)	[27]
Bartoov	Infertile, ≤ 35 years old	407	>200	1.2 \pm 2 (range: 0–15)	[27]
Bartoov	Infertile, 36–40 years old	292	>200	1.32 \pm 2.1 (range: 0–11)	[27]
Bartoov	Infertile, ≥ 41 years old	276	>200	0.96 \pm 1.7 (range: 0–11)	[27]
Bartoov	Infertile with high DNA fragmentation rate (<13%)	8	NA	1–4	[59]
Sermondade	Infertile	25	25 [§]	29.32 (range: 0–56)	[17]
Sermondade	Fertile (normal sperm parameters)	5	25	53.6	[17]
Saidi	Infertile	53	100	2.52 (range: 0–33)	[22]
Saidi	Normal sperm parameters	50	100	9.81 (range: 0–36)	[22]
Saidi	Infertile	231	NA	2.1 \pm 4	[26]
Saidi	Infertile, <30 years old	21	NA	2.2 \pm 3.8	[26]
Saidi	Infertile, 30–39 years old	144	NA	2.4 \pm 4.3	[26]
Saidi	Infertile, 40–49 years old	58	NA	1.5 \pm 3.1	[26]
Saidi	Infertile, ≥ 50 years old	8	NA	2.4 \pm 2.1	[26]
Vanderzwalmen	Infertile	NA	307	5	[15]
Vanderzwalmen	Infertile	NA	442	7	[23]
<i>Spermatozoa with vacuoles >50% of the head size</i>					
Bartoov	Infertile	538	≥ 200	25.9	[29]
Bartoov	Infertile	975	>200	30.8 \pm 20.6 (range: 2–100)	[27]
Bartoov	Infertile, ≤ 35 years old	407	>200	28.6 \pm 19 (range: 3–96.5)	[27]
Bartoov	Infertile, 36–40 years old	292	>200	31.1 \pm 21.8 (range: 2–100)	[27]
Bartoov	Infertile, ≥ 41 years old	276	>200	33.8 \pm 21.3 (range: 2–100)	[27]
Bartoov	Infertile	240	>200	25.2 \pm 19.2 (range: 2–94)	[30]
<i>Spermatozoa with vacuoles >15% of the head size</i>					
Saidi	Infertile	53	100	29.44 \pm 2.55 (range: 5–81)	[22]
Saidi	Normal sperm parameters	50	100	11.71 \pm 1.58 (range: 0–46)	[22]
Saidi	Infertile	231	NA	40.2 \pm 24.5	[26]

[†]Excluding spermatozoa with a severe head malformation identified by low magnification (200–400 \times).
[†]No selection based on low magnification.
[§]Spermatozoa considered for potential use for intracytoplasmic sperm injection at low magnification (200–400 \times).
 NA: Not available; SD: Standard deviation.

Table 7. Prevalence of normal spermatozoa and those with vacuoles in motile sperm organelle morphology examination (cont.).

Classification	Population	Patients (n)	Spermatozoa (n motile/man)	Mean frequency \pm SD (%)	Ref.
Saidi	Infertile, <30 years old	21	NA	39.0 \pm 23.4	[26]
Saidi	Infertile, 30–39 years old	144	NA	39.7 \pm 24.5	[26]
Saidi	Infertile, 40–49 years old	58	NA	42.8 \pm 25.5	[26]
Saidi	Infertile, \geq 50 years old	8	NA	31.5 \pm 20.2	[26]

[†]Excluding spermatozoa with a severe head malformation identified by low magnification (200–400 \times).
[‡]No selection based on low magnification.
[§]Spermatozoa considered for potential use for intracytoplasmic sperm injection at low magnification (200–400 \times).
NA: Not available; SD: Standard deviation.

and abnormal, denatured/single-stranded DNA, also suggesting that the chromatin could be less compact [50,51].

Seven research groups reported results on a possible relationship between vacuoles and sperm DNA integrity [14,16,41,42,52–54], whereas one study looked for a relationship with another type of nuclear malformation [18]. These studies used different dyes (aniline blue, chromomycin A3 and acridine orange), but all found a highly statistically significant difference in DNA integrity between spermatozoa with or without vacuoles (TABLE 8).

Spermatogenesis is a process of cell differentiation involving mitotic and meiotic divisions and transforming spermatogonia to spermatozoa. This rapid expansion must be tempered by mechanisms controlling sperm production. During apoptosis, it is known that double-stranded DNA fragmentation occurs. These breaks can be evaluated by the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling assay [55–57].

Several studies applied the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling assay to determine whether vacuoles were related to DNA fragmentation (TABLE 8). Controversial results were obtained; some workers reported a statistically significant increase in DNA fragmentation in spermatozoa with vacuoles [14,16,29,41,58,59], but others found no relationship [18,19,28,29,42,52,53].

Among the five studies that analyzed sperm aneuploidy using FISH, four did not find an increase in the aneuploidy rate [16,19,42,52] and a single study showed a statistically significant increase in spermatozoa with vacuoles (TABLE 8) [41].

Pitfalls & unsolved questions

It is very difficult to summarize the literature on MSOME because various authors have used different approaches. Therefore, several questions remain unsolved.

Normal or abnormal spermatozoon

The characteristics of a normal spermatozoon in MSOME were defined by Bartoov *et al.* based on electron microscopic observations [13]. To be considered as normal, a spermatozoon should have average length and width of $4.75 \pm 0.28 \mu\text{m}$ and $3.28 \pm 0.2 \mu\text{m}$ for the nucleus and one or more vacuoles occupying less than 4% of the nuclear area (FIGURE 1). This arbitrary descriptive approach is now widely used [23,35,54,60–62].

However, identifying a normal spermatozoon under the microscope at high magnification is not that easy. The fact that the degree of magnification varies in function of the equipment, ranging from 6300 \times [13] to 13,000 \times [16], making this even more difficult. Some researchers used a fixed, transparent, celluloid form of a normal sperm nucleus and normal vacuole [35,54,61,63], others made a subjective visual evaluation [16,24,28,42], whereas others use an imaging system software analysis [25].

Classifying the abnormal spermatozoa is an even more difficult task, which may explain why several classifications were developed [17,22–25]. This abundance of classifications makes the results difficult to compare between studies.

Vacuoles: pathological or not, nuclear or not?

When first described, the vacuoles were thought to be of nuclear origin. Conflicting hypotheses were put forward on the nature of vacuoles. Some researchers considered that vacuoles were a common feature in normal human sperm, not a sign of pathology [28,44]. Others made a link between vacuoles and acrosomal reaction, suggesting that spermatozoa with vacuoles may not have undergone a complete acrosome reaction [37,40,41]. Others suggested that all vacuoles do not have the same origin, some being of acrosomal origin, others of nuclear origin [42,43].

DIC microscopy does not show the difference between a depression and an outgrowth [39]. Therefore, one should consider that the concept of vacuoles may be misleading and that they may have different origins. A question remains: are all vacuoles 'real' vacuoles?

Vacuoles: confounding factors

Several studies focused on nuclear vacuoles to evaluate the potential deleterious impact of these vacuoles on sperm nucleus quality. These studies argued for a relationship between the presence of sperm vacuoles and DNA quality, suggesting that nuclear vacuoles are an expression of anomalies in the nucleus (TABLE 8).

These studies introduced the concept of 'large' vacuoles. What is a large vacuole? Again, the definition varied from 13% of the sperm head area [41] to 25% [42], and even 50% [14,29,61]. For Watanabe *et al.*, a large vacuole was a vacuole having a diameter of more than $1.5 \mu\text{m}$ and visible at 400 \times magnification [28]. Sometimes, no criteria were given [16].

Table 8. Studies analyzing the relationship between vacuoles and DNA defect.

Chromatin condensation (aniline blue)	Chromatin packaging (chromomycin A3)	DNA integrity (acridine orange)	DNA fragmentation (TUNEL)	Aneuploidy (FISH)	Ref.
At least one large vacuole; $p < 0.0001$ (19.5 ± 8.7 vs $10.1 \pm 6\%$)			At least one large vacuole; NS (4.2 ± 5.5 vs $3.7 \pm 6.7\%$)		[53]
	Large vacuoles; $p < 0.0001$ (53.2 vs 40.3%)				[54]
Large vacuoles (>13% of sperm head)*; $p < 0.0001$ (50.4 ± 3.10 vs $26.5 \pm 2.57\%$)			Large vacuoles (>13% of sperm head)*; $p < 0.0001$ (8.6 ± 1.09 vs $1.7 \pm 0.65\%$)	Large vacuoles (>13% of sperm head)*; $p < 0.0001$ (7.80 ± 1.98 vs $1.3 \pm 0.18\%$)	[41]
Large vacuole (>25% of sperm head)*; $p < 0.00001$ (31.6 vs 7.5%)			Large vacuole (>25% of sperm head)*; NS (1.3 vs 0.7%)	Large vacuole (>25% of sperm head)*; NS (2.2 vs 1.1%)	[52]
			Vacuoles (>4% of sperm head); $p = 0.031$ (14.7 ± 7.2 vs $6.1 \pm 7.2\%$)		[58]
		Vacuoles [§] ; $p < 0.001$ (71.9 ± 11.1 vs $5.3 \pm 3\%$)	Vacuoles [§] ; $p < 0.001$ (40.1 ± 11.6 vs $9.3 \pm 4.8\%$)	Vacuoles [§] ; NS (5.1 ± 3.1 vs 0%)	[16]
		Vacuoles (>50% of the sperm nuclear area)*; $p < 0.0001$ (67.9 vs 33.1%)	Vacuoles (>50% of the sperm nuclear area)*; $p < 0.0001$ (29.1 vs 15.9%)		[14]
			Vacuoles (between 5 and 50% of sperm head); NS**		[29]
			Vacuoles (>50% of sperm head); $p = 0.015^{**}$		[29]
			Anterior vacuoles (>4% of sperm head)*; $p = 0.013$ (15.9 ± 2.9 vs $4.1 \pm 1.1\%$)		[59]
			Posterior vacuoles (>4% of sperm head)*; $p = 0.0007$ (22.5 ± 3.6 vs $4.1 \pm 1.1\%$)		[59]
			Large vacuoles; NS		[28]
One large vacuole (>25% of sperm head); $p < 0.0001$ ($36.2 + 1.9$ vs $7.6 + 1.3\%$)			One large vacuole (>25% of sperm head); NS ($1.3 + 0.4$ vs $0.7 + 0.4\%$)	One large vacuole (>25% of sperm head); NS ($2.2 + 0.7$ vs $1.1+0.5$)	[42]
			Vacuoles (small or large); NS**	Vacuoles (small or large); NS**	[19]
		Regional nuclear shape malformation; $p < 0.0001$ (59.1 vs 44.9%)	Regional nuclear shape malformation; NS (19.6 vs 20%)		[18]

*Males with teratozoospermia.

*Males normo- terato-, oligo- and OAT-spermics.

*Severely oligozoospermic males with testicular damage and absent sperm motility.

*Males in an unselected group of couples undergoing infertility investigation.

*Males with infertility and high DNA fragmentation rate (>13%).

**Regression analysis.

**Multivariate regression analysis.

NS: Not significant; TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling assay.

Another problem arises from the lack of knowledge of the prevalence of spermatozoa with vacuoles, large or not, in semen samples, notably due to the heterogeneity of the populations analyzed. Indeed, the authors studied patients with differing sperm characteristics, DNA fragmentation rates and various degrees of spermatogenesis impairment, such as men with an ICSI indication [64], infertile men [32], males with teratozoospermia [41], severely oligozoospermic males with testicular damage and absent sperm motility [16], males in an unselected group of couples undergoing infertility investigation [14], males with infertility and high DNA fragmentation rate (>13%) [59].

Furthermore, the spermatozoa of reference for comparison purposes varied between studies: native sperm [41], top spermatozoa according to the classification described by Vanderzwalmen [23] and normal spermatozoa in MSOME, as defined by Bartoov [13].

Finally, as shown by Monqaut *et al.*, the sperm processing methods, swim-up or density gradient centrifugation, could have an impact on the number of spermatozoa with vacuoles recovered [32]. The length of examination under high magnification and the temperature (37 vs 21°C) at which the analysis is performed also influences the frequency of spermatozoa with morphologically normal nuclei and those with vacuolated nuclei [36].

Vacuoles: a sign of DNA integrity?

Several researchers have tried to establish a link between vacuoles and the degree of sperm DNA damage (TABLE 8). DNA fragmentation and DNA condensation (or packaging) are two different processes that are markers of sperm DNA integrity [65]. DNA fragmentation is thought to be linked to defective apoptosis and increased production of reactive oxygen species [66,67]. DNA condensation is mainly a feature of sperm maturity in relation with the replacement of histones by protamines [47].

It is difficult to summarize the literature on the relationship between vacuoles and DNA quality, due notably to the lack of consistency in the methodology used in the studies thus far published (see preceding section). However, all of them reported a lack of DNA packaging. It is well known that the capacity of spermatozoa to fertilize and produce a good-quality embryo with a high implantation and development potential depends on its DNA integrity [68]. During spermatogenesis, deleterious effects could occur that affect the chromatin condensation and DNA integrity. Nuclear vacuoles could reflect the presence of molecular anomalies, such as abnormal chromatin packaging, which would facilitate DNA damage.

Although the impact of sperm vacuoles on embryogenesis is a matter for debate, this could explain why they are thought to exert a deleterious effect on embryo development [23,24,64,69,70]. Therefore, one has to question whether vacuoles could be a reflection of a lack of DNA condensation and in fact be nuclear ‘bumps’.

Expert commentary

MSOME was introduced 12 years ago. The purpose of this new method is to identify subtle morphological abnormalities in the human spermatozoon invisible under the optical magnification of 400× commonly used in ICSI. Furthermore, because MSOME is a real-time, unstained cytological technique, spermatozoa can be used for microinjection, leading to IMSI.

An abundant number of papers were published and many more presented at congresses. However, 12 years later, many questions remain unsolved. We are still awaiting a consensual definition of a ‘normal’ spermatozoon in MSOME and a classification of abnormal spermatozoa accepted by all workers in this field. We are also far away from understanding the nature and the consequences of the abnormalities observed in MSOME, more particularly, those related to the so-called vacuoles.

Five-year view

The major interest of MSOME is the selection of spermatozoa with a better morphology to be used in IMSI. The next 5 years should be devoted to better define the abnormalities and to achieve an international consensus on MSOME classification.

Until these questions are settled, it will be difficult to decide whether IMSI is preferable to ICSI. Further studies are needed to establish the usefulness of MSOME in assisted reproductive technologies. Indeed, there is still a debate on the advantages of IMSI over the classical ICSI. In the next paper, we will review the literature on the subject [70].

Financial & competing interests disclosure

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Key issues

- A major challenge faced by most assisted reproduction centers is to improve pregnancy rate.
- Spermatozoon morphology has been suggested to play a significant role in the outcome of intracytoplasmic sperm injection.
- Motile sperm organelle morphology examination (MSOME) allows magnification ranging from 6000× to 13,000×, revealing small morphological abnormalities.
- The prevalence of spermatozoa considered to be normal in MSOME is very low (usually less than 5%).
- Several classifications to categorize the abnormal forms observed in MSOME have been proposed, ‘vacuoles’ being the most striking abnormality.
- The nature and origin of vacuoles remains largely unknown, being possibly of acrosomal or nuclear origin.
- Vacuoles are associated with a defect in DNA compaction and/or integrity.
- Further studies are needed to further establish the usefulness of MSOME in assisted reproductive technologies.

References

Papers of special note have been highlighted as:

• of interest

•• of considerable interest

- 1 Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340(8810), 17–18 (1992).
- 2 Nagy ZP, Verheyen G, Tournaye 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.* 13(Suppl. 1), 143–154 (1998).
- 3 Oehninger S, Chaturvedi S, Toner J *et al.* Semen quality: is there a paternal effect on pregnancy outcome in *in vitro* fertilization/ intracytoplasmic sperm injection? *Hum. Reprod.* 13(8), 2161–2164 (1998).
- 4 Tasdemir I, Tasdemir M, Tavukcuoglu S, Kahraman S, Biberoglu K. Effect of abnormal sperm head morphology on the outcome of intracytoplasmic sperm injection in humans. *Hum. Reprod.* 12(6), 1214–1217 (1997).
- 5 De Vos A, Van De Velde H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A. Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* 79(1), 42–48 (2003).
- 6 Tesarik J, Mendoza C, Greco E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Hum. Reprod.* 17(1), 184–189 (2002).
- 7 Chemes EH, Rawe YV. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum. Reprod. Update* 9(5), 405–428 (2003).
- 8 Wen SW, Leader A, White RR *et al.* A comprehensive assessment of outcomes in pregnancies conceived by *in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 150(2), 160–165 (2010).
- 9 Hindryckx A, Peeraer K, Debrock S *et al.* Has the prevalence of congenital abnormalities after intracytoplasmic sperm injection increased? The Leuven data 1994–2000 and a review of the literature. *Gynecol. Obstet. Invest.* 70(1), 11–22 (2010).
- 10 Davies MJ, Moore VM, Willson KJ *et al.* Reproductive technologies and the risk of birth defects. *N. Engl. J. Med.* 366(19), 1803–1813 (2012).
- 11 Wen J, Jiang J, Ding C *et al.* Birth defects in children conceived by *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis. *Fertil. Steril.* 97(6), 1331.e1–1337.e1 (2012).
- 12 Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F. Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection. *N. Engl. J. Med.* 345(14), 1067–1068 (2001).
- The first paper describing the motile sperm organelle morphology examination (MSOME) method.
- 13 Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y, Barak Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J. Androl.* 23(1), 1–8 (2002).
- Defines a normal spermatozoon under MSOME and showed how using MSOME could improve intracytoplasmic sperm injection through a new technique called intracytoplasmic morphologically selected sperm injection.
- 14 Franco JG Jr, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB, Vagnini L. Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. *Reprod. Biomed. Online* 17(1), 42–45 (2008).
- 15 Bach M, Neyer A, Stecher A *et al.* Morphological integrity of human sperm nuclei and blastocyst formation after intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI). *Hum. Reprod.* 22(Suppl. 1), i108–i109 (2007).
- 16 Garolla A, Fortini D, Menegazzo M *et al.* High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. *Reprod. Biomed. Online* 17(5), 610–616 (2008).
- 17 Sermondade N, Vialard F, Bergère M *et al.* [Evaluation of the contribution of the observation method of sperm in ICSI magnification]. *Andrologie* 17, 212–221 (2007).
- 18 Mauri AL, Oliveira JB, Baruffi RL *et al.* Significance of extruded nuclear chromatin (regional nuclear shape malformation) in human spermatozoa: implications for ICSI. *Int. J. Androl.* 34(6 Pt 1), 594–599 (2011).
- 19 de Almeida Ferreira Braga DP, Setti AS, Figueira RC *et al.* Sperm organelle morphologic abnormalities: contributing factors and effects on intracytoplasmic sperm injection cycles outcomes. *Urology* 78(4), 786–791 (2011).
- 20 David G, Bisson JP, Czyglik F, Jouannet P, Gernigon C. [Morphological anomalies of human spermatozoa. 1) Proposals for a classification system]. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)* 4, 7–36 (1975).
- 21 Auger J, Eustache F. [Standardisation of the morphological classification of human spermatozoa according to the modified method of David]. *Andrologie* 10, 358–373 (2000).
- 22 Saidi R, Rives N, Gruel E, Mazurier S, Mousset-Simeon N, Mace B. [New classification of spermatocytogram at high magnification]. *Med. Repro. Gyn. Endo.* 10, 315–324 (2008).
- 23 Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P *et al.* Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reprod. Biomed. Online* 17(5), 617–627 (2008).
- Examines how the existence of vacuoles in the nuclei of spermatozoa could affect embryo development.
- 24 Cassuto NG, Bouret D, Plouchart JM *et al.* A new real-time morphology classification for human spermatozoa: a link for fertilization and improved embryo quality. *Fertil. Steril.* 92(5), 1616–1625 (2009).
- 25 Perdrix A, Saïdi R, Ménard JF *et al.* Relationship between conventional sperm parameters and motile sperm organelle morphology examination (MSOME). *Int. J. Androl.* 35(4), 491–498 (2012).
- 26 Pfeffer J, Moyer G, Louison M *et al.* [Influence of man's age on the presence of vacuoles in the sperm head: evaluation at high magnification by ultra-morphology of spermatozoa]. *15èmes Journées Nationales de la FFER* 1, 57–59 (2010).
- 27 Silva LF, Oliveira JB, Petersen CG *et al.* The effects of male age on sperm analysis by motile sperm organelle morphology examination (MSOME). *Reprod. Biol. Endocrinol.* 10, 19 (2012).
- 28 Watanabe S, Tanaka A, Fujii S *et al.* 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(5), 978–986 (2011).
- 29 Oliveira JB, Massaro FC, Baruffi RL *et al.* Correlation between semen analysis by motile sperm organelle morphology examination and sperm DNA damage. *Fertil. Steril.* 94(5), 1937–1940 (2010).
- 30 Oliveira JB, Petersen CG, Massaro FC *et al.* Motile sperm organelle morphology examination (MSOME): intervariation study of normal sperm and sperm with

- large nuclear vacuoles. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8, 56 (2010).
- 31 Le Foll N, Siffroi JP, Chantot-Bastaraud S, Cassuto G, Pornoi MF, Joyé N. [Relation between sperm head morphology observed at high magnification (6100x) and meiotic segregation profile]. *15èmes Journées Nationales de la FFER* 1, 91–92 (2010).
- 32 Monqaut AL, Zavaleta C, López G, Lafuente R, Brassesco M. Use of high-magnification microscopy for the assessment of sperm recovered after two different sperm processing methods. *Fertil. Steril.* 95(1), 277–280 (2011).
- 33 Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, Kruger TF, van Zyl JA. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum. Reprod.* 5(5), 586–592 (1990).
- 34 WHO. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, NY, USA (1999).
- 35 Oliveira JB, Massaro FC, Mauri AL *et al.* Motile sperm organelle morphology examination is stricter than Tygerberg criteria. *Reprod. Biomed. Online* 18(3), 320–326 (2009).
- 36 Peer S, Eltes F, Berkovitz A, Yehuda R, Itsykson P, Bartoov B. Is fine morphology of the human sperm nuclei affected by *in vitro* incubation at 37 degrees C? *Fertil. Steril.* 88(6), 1589–1594 (2007).
- 37 Kacem O, Sifer C, Barraud-Lange V *et al.* Sperm nuclear vacuoles, as assessed by motile sperm organellar morphological examination, are mostly of acrosomal origin. *Reprod. Biomed. Online* 20(1), 132–137 (2010).
- Addressed the question of the nature of the nuclear vacuoles.
- 38 Zamboni L. 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(5), 711–734 (1987).
- 39 Hoffman R, Gross L. The modulation contrast microscope. *Nature* 254(5501), 586–588 (1975).
- 40 Montjean D, Belloc S, Benkhalifa M, Dalleac A, Ménéz Y. Sperm vacuoles are linked to capacitation and acrosomal status. *Hum. Reprod.* 27(10), 2927–2932 (2012).
- 41 Perdrix A, Travers A, Chelli MH *et al.* Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles. *Hum. Reprod.* 26(1), 47–58 (2011).
- 42 Boitrelle F, Ferfour F, Petit JM *et al.* Large human sperm vacuoles observed in motile spermatozoa under high magnification: nuclear thumbprints linked to failure of chromatin condensation. *Hum. Reprod.* 26(7), 1650–1658 (2011).
- This paper reports an association between vacuoles and DNA defects.
- 43 Dorphin B, Lefevre M, Gout C, Oger P, Yazbeck C, Rougier N. Fine localization and characterization of some abnormalities observed in human sperm heads by interferential differential contrast. *Hum. Reprod.* 25, P-043 (2010).
- 44 Tanaka A, Nagayoshi M, Tanaka I, Kusunoki H. Human sperm head vacuoles are physiological structures formed during the sperm development and maturation process. *Fertil. Steril.* 98(2), 315–320 (2012).
- Suggests a physiological, not a pathological, origin of the vacuoles.
- 45 Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum. Reprod. Update* 12(4), 417–435 (2006).
- 46 Auger J, Mesbah M, Huber C, Dadoune JP. Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int. J. Androl.* 13(6), 452–462 (1990).
- 47 Foresta C, Zorzi M, Rossato M, Varotto A. Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Int. J. Androl.* 15(4), 330–337 (1992).
- 48 Iranpour FG, Nasr-Esfahani MH, Valojerdi MR, al-Taraihi TM. Chromomycin A3 staining as a useful tool for evaluation of male fertility. *J. Assist. Reprod. Genet.* 17(1), 60–66 (2000).
- 49 Bianchi PG, Manicardi GC, Urner F, Campana A, Sakkas D. Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 2(3), 139–144 (1996).
- 50 Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil. Steril.* 42(1), 87–91 (1984).
- 51 Kazerooni T, Asadi N, Jadid L *et al.* Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion. *J. Assist. Reprod. Genet.* 26(11–12), 591–596 (2009).
- 52 Boitrelle F, Ferfour F, Vialard F *et al.* Characterization of large vacuoles observed in sperm head in MSOME. *15èmes Journées Nationales de la FFER* 1, 34–35 (2010).
- 53 Cassuto NG, Hazout A, Hammoud I *et al.* Correlation between DNA defect and sperm-head morphology. *Reprod. Biomed. Online* 24(2), 211–218 (2012).
- 54 Franco JG Jr, Mauri AL, Petersen CG *et al.* Large nuclear vacuoles are indicative of abnormal chromatin packaging in human spermatozoa. *Int. J. Androl.* 35(1), 46–51 (2012).
- 55 Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119(3), 493–501 (1992).
- 56 Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp. Cell Res.* 207(1), 202–205 (1993).
- 57 Gandini L, Lombardo F, Paoli D *et al.* Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 15(4), 830–839 (2000).
- 58 Wilding M, Coppola G, di Matteo L, Palagiano A, Fusco E, Dale B. Intracytoplasmic injection of morphologically selected spermatozoa (IMSI) improves outcome after assisted reproduction by deselecting physiologically poor quality spermatozoa. *J. Assist. Reprod. Genet.* 28(3), 253–262 (2011).
- 59 Hammoud I, Boitrelle F, Ferfour F *et al.* Selection of normal spermatozoa with a vacuole-free head (x6300) improves selection of spermatozoa with intact DNA in patients with high sperm DNA fragmentation rates. *Andrologia* doi:10.1111/j.1439-0272.2012.01328.x (2012) (Epub ahead of print).
- 60 Antinori M, Licata E, Dani G *et al.* Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reprod. Biomed. Online* 16(6), 835–841 (2008).
- 61 Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB, Massaro FC, Baruffi RL, Franco JG Jr. 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(1), 42–46 (2010).
- 62 Figueira Rde C, Braga DP, Setti AS, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Morphological

- nuclear integrity of sperm cells is associated with preimplantation genetic aneuploidy screening cycle outcomes. *Fertil. Steril.* 95(3), 990–993 (2011).
- 63 Berkovitz A, Eltes F, Yaari S *et al.* The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Hum. Reprod.* 20(1), 185–190 (2005).
- 64 Berkovitz A, Eltes F, Ellenbogen A, Peer S, Feldberg D, Bartoov B. Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? *Hum. Reprod.* 21(7), 1787–1790 (2006).
- 65 Belloc S, Benkhalifa M, Junca AM, Dumont M, Bacrie PC, Ménézio Y. Paternal age and sperm DNA decay: discrepancy between chromomycin and aniline blue staining. *Reprod. Biomed. Online* 19(2), 264–269 (2009).
- 66 Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 13(4), 896–900 (1998).
- 67 Perrin A, Basinko A, Douet-Guilbert N *et al.* Aneuploidy and DNA fragmentation in sperm of carriers of a constitutional chromosomal abnormality. *Cytogenet. Genome Res.* 133(2–4), 100–106 (2011).
- 68 Miller D, Brinkworth M, Iles D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 139(2), 287–301 (2010).
- 69 Knez K, Tomazevic T, Zorn B, Vrtacnik-Bokal E, Virant-Klun I. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection improves development and quality of preimplantation embryos in teratozoospermia patients. *Reprod. Biomed. Online* 25(2), 168–179 (2012).
- 70 Perrin A, Nguyen MH, Douet-Gilbert N, Morel F, De Braekeleer M. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection or intracytoplasmic sperm injection: where are we 12 years later? *Expert Rev. Obstet. Gynecol.* 8(3), 261–270 (2013).
- 71 Boughali H, Wittmer C, Viville S. [Importance of the analysis of the morphology and fine quality of sperm nuclear techniques in MPA]. *Andrologie* 16, 38–45 (2006).
- 72 Akl LD, Oliveira JB, Petersen CG *et al.* Efficacy of the motile sperm organelle morphology examination (MSOME) in predicting pregnancy after intrauterine insemination. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9, 120 (2011).

For reprint orders, please contact reprints@expert-reviews.com

EXPERT
REVIEWS

Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection or intracytoplasmic sperm injection: where are we 12 years later?

Expert Rev. Obstet. Gynecol. 8(3), 261–270 (2013)

Aurore Perrin^{1,2},
Minh Huong
Nguyen¹, Nathalie
Douet-Guilbert^{1,2},
Frédéric Morel^{1,2} and
Marc De Braekeleer^{*1,2}

¹Laboratoire d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, INSERM U1078, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France

²Service de Cytogénétique, Cytologie et Biologie de la Reproduction, Hôpital Morvan, CHRU Brest, France

*Author for correspondence:

Tel.: + 33 29 822 3694

Fax: + 33 29 822 3961

marc.debraekeleer@univ-brest.fr

Twelve years ago, the introduction of motile sperm organelle morphology examination led to the development of a modified intracytoplasmic sperm injection procedure called intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) in which a spermatozoon selected under high magnification instead of 400× magnification is injected into an oocyte. Several studies found no correlation between IMSI and early embryo development in terms of fertilization while others found an increase in the fertilization rate. Conflicting results regarding the rates of implantation, pregnancy and abortion were also reported. A significant increase in the rate of top-quality embryos on days 3 and 5 was reported by the majority of the studies, and few failed to demonstrate a relationship between IMSI and embryo quality. Because of the extent of the population sizes and the diverse approaches and motile sperm organelle morphology examination classifications used by the studies reported thus far, definite conclusions on the consequences of vacuoles on embryo development cannot be drawn. More randomized controlled studies conducted by independent groups on large series are still needed, not only to identify the populations of patients that could benefit from the IMSI, but also to determine the efficacy of IMSI over intracytoplasmic sperm injection on the improvement of pregnancy outcomes.

KEYWORDS: embryo quality • ICSI • IMSI • MSOME • pregnancy outcome

Since its first introduction in 1992, intracytoplasmic sperm injection (ICSI) has become the treatment of choice in male factor infertility and a major advance in the field of assisted reproduction [1].

Twelve years ago, Bartoov *et al.* introduced a high-magnification examination of spermatozoa called 'motile sperm organelle morphology examination' (MSOME) [2]. This, in turn, allowed its incorporation with a micromanipulation system, leading to a modified ICSI procedure called intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) [3].

This method was thought to help improve pregnancy rate by preventing the injection of spermatozoa with structural abnormalities,

including nuclear defects, not identified at the 400× magnification commonly used in ICSI [2].

However, the place of IMSI in assisted reproductive technology is still a subject for debate and several questions remain unanswered. This paper will review the reports that were published in the last 12 years and discuss unsolved matters.

IMSI versus ICSI

In the principle study, Bartoov *et al.* performed IMSI on oocytes of 24 women with previous failure of at least five consecutive cycles of ICSI. They achieved pregnancies in 14 women [2]. Many studies were then conducted, comparing the outcomes of IMSI with those of ICSI. They are summarized in TABLE 1.

Table 1. Comparison between intracytoplasmic morphologically selected sperm injection and intracytoplasmic sperm injection outcomes.

Study (year)	Study type [†]	Inclusion criteria	Couples (n)		Outcomes	Ref.
			IMSI	ICSI		
Bartoov <i>et al.</i> (2001)	(1)	Maternal age <37 years. More than three retrieved ova. Diagnosis of male infertility. Previous failure of at least five consecutive cycles of ICSI	24 with previous ICSI failures		FR per cycle: 66.8 ± 19.1 vs 60.1 ± 20.9% (NS) IR per cycle: 46.9 vs 0% PR per transfer: 58 vs 0%	[2]
Bartoov <i>et al.</i> (2003)	PC (1)	Maternal age <37 years. More than three retrieved ova. Diagnosis of male infertility. Previous failure of at least two ICSI cycles	50	50	FR: 64.5 ± 17. vs 65.5 ± 21.5% (NS) TE: 45.2 ± 28.2 vs 31.0 ± 19.5% (p < 0.01) IR: 27.9 ± 26.4 vs 9.5 ± 15.3% (p < 0.01) PR: 66 vs 30% (p < 0.01) AR: 33 vs 9% (p < 0.05)	[6]
Berkovitz <i>et al.</i> (2006)	C (1)	Previous failure of at least two consecutive cycles of ICSI	80	80	FR: 67.4 ± 20.8 vs 69.1 ± 22.6% (NS) TE: 38.7 ± 31.6 vs 25.7 ± 28.3 (p ≤ 0.01) IR: 31.3 ± 36.3 vs 9.4 ± 17.4% (p ≤ 0.01) PR: 60 vs 25% (p ≤ 0.01) AR per pregnancy: 14 vs 40% (p ≤ 0.03)	[7]
Hazout <i>et al.</i> (2006)	C (1)	Two or more previous failed ICSI attempts. Normal ovarian reserve. Absence of endometriosis. Maternal age <38 years	125 same	125 same	IR: 20.3 vs 0.8% (p < 0.001) TE: 4.0 ± 1.2 vs 3.1 ± 1.1 (NS) PR: 40.8 vs 6.4% (p < 0.001) BR: 17.6 vs 0% (p < 0.001)	[23]
Bach <i>et al.</i> (2007)	PC (3)	≥2 previous failures of implantation	131 oocytes	151 oocytes	FR: 70.2 vs 72.2% (NS) Blastocysts rate: 52 vs 27.5% (p < 0.001) Good-quality blastocyst rate: 26 vs 12% (p < 0.01)	[8]
Antinori <i>et al.</i> (2008)	PRS	Diagnosis of severe OAT. At least 3 years of primary infertility. Maternal age <35 years. No female infertility factor	227	219	IR: 17.3 vs 11.3% (p = 0.004) PR: 39.2 vs 26.5% (p = 0.007) AR: 16.9 vs 24.1% (NS)	[47]
Boldi Cotti <i>et al.</i> (2008)	C	Maternal age <41 years. Male infertility factor	ND	ND	IR: 21.2 vs 17.1% (NS) PR: 46.1 vs 34.5% (NS)	[48]
	C	Maternal age <41 years. Unexplained infertility	ND	ND	IR: 20.6 vs 15.4% (NS) PR: 31.3 vs 29.4% (NS)	
	C	Maternal age <41 years. Female infertility factor	ND	ND	IR: 10.2 vs 16.6% (NS) PR: 27.8 vs 28.8% (NS)	
	C	Maternal age <41 years. ≥2 previous failures	ND	ND	IR: 15.4 vs 20.3% (NS) PR: 33.3 vs 34.5% (NS)	
Yazbeck <i>et al.</i> (2008)	(1)	≥2 previous IVF or ICSI failures	75 with previous ICSI failures		FR: 72.2 vs 63.3% (p = 0.02) TE: 89.0 vs 81.7 (p = 0.03) Blastocyst rate: 41.3 vs 26.7% (p = 0.04) PR: 29.3 vs 0% BR: 18.6 vs 0%	[20]
Nadalini <i>et al.</i> (2009)	C	Male factor infertility and/or ≥1 failed ICSI attempts. Maternal age <38 years. More than five retrieved ova	20	37	FR: 91.7 vs 78.3% (p = 0.043) IR: 18.9 vs 13.2% (NS) PR: 40.0 vs 16.2% (p = 0.05) AR: 0 vs 8.1% (NS)	[9]

[†]Study types are classified as follows:

- (1): IMSI with normal spermatozoa in MSOME (classification of Bartoov).
 (2): IMSI with high- or medium-quality spermatozoa in MSOME (Cassuto classification).
 (3): IMSI with class I spermatozoa or second best in MSOME (Vanderzwalmen classification).

*Sibling oocytes.

[‡]Exclusion criteria: female infertility (isolated or associated), azoospermia males, use of cryopreserved semen sample for ICSI.

A: Asthenozoospermia; AR: Abortion rate; BR: Birth rate; C: Comparative; FR: Fertilization rate; ICSI: Intracytoplasmic sperm injection; IMSI: Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection; IR: Implantation rate; ND: Not done; NS: Not significant; OAT: Oligoasthenoatozoospermia; PC: Prospective comparative study; PGS: Preimplantation genetic screening; PR: Pregnancy rate; PRS: Prospective randomized study; T: Teratozoospermia; TE: Top embryos; TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling.

Table 1. Comparison between intracytoplasmic morphologically selected sperm injection and intracytoplasmic sperm injection outcomes (cont.).

Study (year)	Study type ^f	Inclusion criteria	Couples (n)		Outcomes	Ref.
			IMSI	ICSI		
Nadalini <i>et al.</i> (2009)	C	High sperm DNA fragmentation (TUNEL). Male factor infertility and/or ≥ 1 failed ICSI attempts. Maternal age <38 years. More than five retrieved ova	9	37	FR: 92.3 vs 78.3% (NS) IR: 27.3 vs 13.2% (NS) PR: 66.7 vs 16.2% (p = 0.005) AR: 0.0 vs 8.1% (p = 0.063)	[9]
Mauri <i>et al.</i> (2010)	PRS (1)	Male factor infertility or ≥ 2 failed ICSI attempts	159 oocytes [‡]	172 oocytes [‡]	FR: 70.4 vs 70.9% (NS) TE: 52.2 vs 57.8% (NS)	[10]
	PRS (1)	Male factor infertility	74 oocytes [‡]	81 oocytes [‡]	FR: 70.3 vs 66.7% (NS) TE: 50 vs 57.4% (NS)	
	PRS (1)	≥ 2 failed ICSI attempts	85 oocytes [‡]	91 oocytes [‡]	FR: 70.6 vs 74.7% (NS) TE: 54.2 vs 58.2% (NS)	
Sifer <i>et al.</i> (2010)	PC (1)	Severe male factor infertility (<10% typical forms in ejaculate)	106 attempts	110 attempts	PR: 38.7 vs 20.9% (p = 0.004)	[49]
	PC (1)	≥ 2 failed ICSI attempts (>10% typical forms in ejaculate)	112 attempts	119 attempts	PR: 19.6 vs 19.3% (NS)	
Figueira <i>et al.</i> (2011)	PRS (1)	Advanced maternal age. More than five retrieved ova. Sperm concentration >1 × 10 ⁶ /ml and motility >20%	60	60	IR: 55.6 vs 40.9% (NS) PR: 53.8 vs 47.1% (NS) No embryo transfer due to absence of normal embryos rate: 2.5 vs 11.8% (p = 0.0016)	[22]
de Almeida Ferreira Braga <i>et al.</i> (2011)	C	Sperm DNA fragmentation >30% (TUNEL)	NA	NA	FR: 82.6 vs 80.2% (NS) TE: 61.6 vs 60.0% (NS)	[11]
Setti <i>et al.</i> (2011)	PRS (1)	Isolated male infertility (OAT/T/A). More than five retrieved ova [§]	250	250	FR: 73.0 vs 68.0% (p = 0.013) TE: 44.4 vs 37.3% (NS) IR: 23.8 vs 25.4% (NS) PR: 37.2 vs 36.8% (NS) AR: 18.4 vs 17.9% (NS)	[21]
	PRS (1)	Isolated male infertility (OAT/WHO 1999). More than five retrieved ova [§]	116	128	FR (p = 0.043) TE (NS) IR (NS) PR (NS) AR (NS)	
	PRS (1)	Isolated male infertility (OAT/WHO 2010). More than five retrieved ova [§]	77	88	FR (p = 0.004) TE (NS) IR (p = 0.013) PR (p = 0.045) AR (NS)	
Balaban <i>et al.</i> (2011)	PRS	Unselected infertile population (male, female, mixed)	81	87	FR: 81.60 ± 10.65 vs 80.97 ± 15.06% (NS) IR: 28.9 vs 19.5% (NS) PR: 54.0 vs 44.4% (NS)	[12]
	PRS	Severe male infertility factor	ND	ND	IR: 29.6 vs 15.2% (p = 0.01)	

^fStudy types are classified as follows:

(1): IMSI with normal spermatozoa in MSOME (classification of Bartoov).

(2): IMSI with high- or medium-quality spermatozoa in MSOME (Cassuto classification).

(3): IMSI with class I spermatozoa or second best in MSOME (Vanderzwalmen classification).

[‡]Sibling oocytes.

[§]Exclusion criteria: female infertility (isolated or associated), azoospermia males, use of cryopreserved semen sample for ICSI.

A: Asthenozoospermia; AR: Abortion rate; BR: Birth rate; C: Comparative; FR: Fertilization rate; ICSI: Intracytoplasmic sperm injection; IMSI: Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection; IR: Implantation rate; ND: Not done; NS: Not significant; OAT: Oligoasthenoteratozoospermia; PC: Prospective comparative study; PGS: Preimplantation genetic screening; PR: Pregnancy rate; PRS: Prospective randomized study; T: Teratozoospermia; TE: Top embryos; TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling.

Table 1. Comparison between intracytoplasmic morphologically selected sperm injection and intracytoplasmic sperm injection outcomes (cont.).

Study (year)	Study type [†]	Inclusion criteria	Couples (n)		Outcomes	Ref.
			IMSI	ICSI		
Oliveira <i>et al.</i> (2011)	PC (1)	≥2 failed ICSI attempts. Maternal age ≤39 years	100	100	FR: 65.4 ± 23.5 vs 62.0 ± 26.5% (NS) IR: 13.6 vs 9.8% (NS) PR: 26 vs 19% (NS) AR: 15.4 vs 31.6% (NS)	[13]
	PC (1)	Male infertility factor. ≥2 failed ICSI attempts. Maternal age ≤39 years	37	45	FR: 59.1 ± 23.1 vs 57.8 ± 25.2% (NS) IR: 11.8 vs 11.2% (NS) PR: 32.4 vs 24.4% (NS) AR: 16.7 vs 36.4% (NS)	
	PC (1)	No male infertility factor. ≥2 failed ICSI attempts. Maternal age ≤39 years	63	55	FR: 68.1 ± 24.4 vs 65.4 ± 27.4% (NS) IR: 14.6 vs 8.6% (NS) PR: 22.2 vs 14.5% (NS) AR: 14.3 vs 25.0% (NS)	
Knez <i>et al.</i> (2011)	PC (2)	Failed ICSI attempts. Male infertility with poor semen quality	20	37	FR: 51.2 vs 52.7% (NS) IR: 17.1 vs 6.8% (NS) PR: 25.0 vs 8.1% (NS). No embryo transfer due to developmental arrest rate: 0 vs 27.0% (p < 0.05)	[14]
Wilding <i>et al.</i> (2011)	PRS (1)	Normal male and female karyotypes. Semen between 1 × 10 ⁶ /ml and 20 × 10 ⁶ /ml [§]	122	110	FR: 68.0 vs 65.9% (NS) TE: 98.6 vs 66.0% (p < 0.001) IR: 24.2 vs 14.8% (p = 0.003) PR: 65.6 vs 40.0% (p < 0.001)	[15]
Setti <i>et al.</i> (2012)	PRS (1)	First IVF treatment with PGS for advanced maternal age. No case of severe spermatogenic alteration. More than five retrieved ova	80	80	FR: 80.0 vs 84.0% (NS) TE: 54.5 vs 48.5% (NS) IR: 46.1 vs 41.6% (NS) PR: 54.4 vs 47.4% (NS)	[16]
Setti <i>et al.</i> (2012)	C (1)	Sperm concentration >1 × 10 ⁶ /ml. Sperm motility >20%. More than four retrieved oocytes	332	332	FR: 68.5 vs 70.8% (NS) TE day 3: 51.2 vs 45.1% (p = 0.033) TE day 5: 37.3 vs 29.1% (p = 0.004) IR: 28.7 vs 24.4% (NS) PR: 38.8 vs 37.0% (NS) AR: 12.9 vs 20.0 (NS)	[17]
Knez <i>et al.</i> (2012)	PRS (3)	≥6 retrieved oocytes. Absence of endometriosis or polycystic ovaries. Male with isolated teratozoospermia	52	70	FR: 60 vs 64% (NS) Blastocysts rate: 31 vs 24% (NS) Morulae rate: 21 vs 13% (p < 0.05) Arrested embryos rate: 44 vs 62% (p < 0.01) PR: 48 vs 24% (p < 0.05)	[18]
De Vos <i>et al.</i> (2013)	PRS (3)	No female infertility factor. Male infertility: OAT. Sperm concentration ≥0.1 × 10 ⁶ /ml. Maternal age ≤37 years. ≥2 retrieved oocytes	1557 oocytes [†]	1548 oocytes [†]	FR: 79.1 vs 77.3% (NS) TE day 2: 35.0 vs 38.5% (p = 0.047) TE day 3: 37.0 vs 38.5% (NS) TE day 5: 9.8 vs 11.4% (NS) IR: 30.3 vs 32.2% (NS) PR: 34.4 vs 36.7% (NS)	[19]

[†]Study types are classified as follows:

(1): IMSI with normal spermatozoa in MSOME (classification of Bartoov).

(2): IMSI with high- or medium-quality spermatozoa in MSOME (Cassuto classification).

(3): IMSI with class I spermatozoa or second best in MSOME (Vanderzwalmen classification).

[†]Sibling oocytes.

[§]Exclusion criteria: female infertility (isolated or associated), azoospermia males, use of cryopreserved semen sample for ICSI.

A: Asthenozoospermia; AR: Abortion rate; BR: Birth rate; C: Comparative; FR: Fertilization rate; ICSI: Intracytoplasmic sperm injection; IMSI: Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection; IR: Implantation rate; ND: Not done; NS: Not significant; OAT: Oligoasthenoteratozoospermia; PC: Prospective comparative study; PGS: Preimplantation genetic screening; PR: Pregnancy rate; PRS: Prospective randomized study; T: Teratozoospermia; TE: Top embryos; TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling.

Table 2. Comparison of chromosomal content of embryos obtained by intracytoplasmic morphologically selected sperm injection and intracytoplasmic sperm injection.

Chromosomal content	Couples (n)		Frequency of embryos (%)		p-value	Ref.
	IMSI	ICSI	IMSI	ICSI		
Autosomal aneuploidy (chromosomes 13, 16, 18, 21 and 22)	60	60	51.3	56.9	0.092	[22]
Sex chromosome aneuploidy	60	60	15.0	23.5	0.014	[22]
Chaotic embryos [†]	60	60	18.8	27.5	0.019	[22]
Euploid XX embryos (females)	60	60	30.0	21.6	0.033	[22]
XX embryos	80	80	65.1	54.0	0.0277	[16]
XX embryos among euploid embryos (chromosomes 13, 15, 16, 18, 21 and 22)	80	80	66.9	52.5	0.0322	[16]

[†]Defined as embryos with two or more chromosomal numerical abnormalities.
ICSI: Intracytoplasmic sperm injection; IMSI: Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection.

The heterogeneity of the studies prevents us from drawing definite conclusions (TABLE 1). Since several classifications were used [4], the morphological characteristics of the spermatozoa used for IMSI differed between studies. Some studies were randomized; others were not. Some were prospective; others were not. The inclusion criteria were heterogeneous and the population sizes varied widely.

In 2010, Souza Setti *et al.* reported a meta-analysis on the comparison between IMSI outcome and ICSI outcome. They concluded that IMSI cycles demonstrated a statistically significant improvement in implantation and pregnancy rates and a statistically significant reduction in miscarriage rates than ICSI cycles [5]. It should be noted that only three studies were included in the meta-analysis, including two from the same group [6,7]. Furthermore, as acknowledged by the authors of the study, a weakness of their analysis was the inclusion of a randomized controlled study with comparative studies in which IMSI cycles were matched with ICSI cycles.

Several studies found no correlation between IMSI and early embryo development in terms of fertilization [2,6–19], while others found an increase in the fertilization rate [9,20,21]. Conflicting results regarding the rates of implantation, pregnancy and abortion were also reported, significant differences were found by some researchers, but not by others. A significant increase in the rate of top-quality embryos on days 3 and 5 was reported by the

majority of the studies [6–8,14,15,17,18,20,22], few studies failed to demonstrate a relationship between IMSI and embryo quality (TABLE 1) [10,11,16,19,21,23]. However, it should be noted that some studies reported were by the same group [11,21].

Two studies performed by the same group (Setti *et al.* and Figueira *et al.*) examined the effect of selecting spermatozoa at high magnification on the embryo development at the chromosomal level [16,22]. They compared the chromosomal content of embryos obtained by IMSI with normal spermatozoa according to the Bartoov classification with that of embryos obtained by ICSI (TABLE 2). They found a lower proportion of embryos with sex chromosome aneuploidy and with two or more chromosomal numerical abnormalities (chaotic embryos) in the IMSI group than in the ICSI group. Surprisingly, more female embryos were obtained by IMSI [22]. They expanded their first study to include 80 couples in each group. Again, a higher incidence of female embryos were observed in the IMSI group [16]. The authors suggested that there could be a bias towards the selection of X chromosome-bearing spermatozoa, possibly because of morphological changes due to alterations in the Y chromosome, therefore preventing their selection [16].

Two studies analyzed the incidence of major congenital malformations among children born from IMSI compared to those born from ICSI (TABLE 3) [24,25]. Both reported a statistically significant lower number of children with major birth defects in the IMSI

Table 3. Comparison of perinatal events and congenital malformations between intracytoplasmic morphologically selected sperm injection and intracytoplasmic sperm injection.

Outcome	Events (n)		Frequency of perinatal problems (%)		p-value	Ref.
	IMSI	ICSI	IMSI	ICSI		
Terminated pregnancies due to fetal malformations	134 P [†]	134 P	3.0	3.7	NS	[24]
Perinatal deaths	185 C [‡]	185 C	1.5	1.5	NS	[24]
Major congenital malformations	181 C [‡]	176 C	2.8	7.9	0.02	[24]
Terminated pregnancies due to fetal malformations	NA [§]	NA	NA	NA	NS	[25]
Major congenital malformations	450 C [‡]	578 C	1.77	4.15	0.031	[25]

[†]IMSI with normal spermatozoa (Bartoov classification).
[‡]IMSI with class I spermatozoa (Cassuto classification).
C: Children; ICSI: Intracytoplasmic sperm injection; IMSI: Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection; NA: Not available; NS: Not significant (p > 0.05); P: Pregnancies.

Table 4. Comparison between intracytoplasmic morphologically selected sperm injection outcomes using the classification of Bartoov.

Cycles (n)	Type of sperm	Outcomes	Ref.
38 each	Normal nucleus, nuclear malformations, mostly large vacuoles [†]	FR: 71.3 vs 50.3% ($p \leq 0.01$) TE: 34.9 vs 19.4% ($p \leq 0.03$) IR: 25.0 vs 5.9% ($p \leq 0.01$) PR: 52.6 vs 18.4% ($p \leq 0.01$) AR: 10.0 vs 57.1% ($p \leq 0.02$)	[26]
70 each	Normal nucleus, nuclear malformations, mostly large vacuoles [†]	FR: 74.1 vs 62.3% ($p < 0.01$) TE: 26.7 vs 16.2% ($p < 0.03$) IR: 26.1 vs 8.3% ($p < 0.01$) PR: 58.6 vs 25.7% ($p < 0.05$) AR: 9.8 vs 33.3% ($p < 0.02$)	[7]
28 each	Normal nucleus, large vacuoles [†]	FR: 72.8 vs 68.7% (NS) TE: 27.1 vs 23.0% (NS) PR: 50 vs 18% ($p < 0.01$) AR: 7 vs 80% ($p < 0.01$)	[27]

[†]Large means >1 standard deviation of $0.78 \pm 0.18 \mu\text{m}$.

AR: Abortion rate; FR: Fertilization rate; IMSI: Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection; IR: Implantation rate; NS: Not significant; PR: Pregnancy rate; TE: Top embryos.

group ($p < 0.05$). However, the number of children included in these two studies is still limited and few data are available on the inclusion criteria.

IMSI versus IMSI: comparison between spermatozoon quality

In 2002, Bartoov *et al.* reported the first prospective study aimed at determining whether subtle sperm morphological characteristics observed in MSOME affected the outcome of ICSI [3]. Using the Pearson correlation analysis, they showed that the morphological normalcy of the sperm had a positive and significant correlation with the fertilization rate ($p \leq 0.01$), but not with pregnancy outcome. Furthermore, they found that the fertilization rate and pregnancy outcome correlated with morphological normalcy of the sperm nucleus (shape and chromatin content).

This first study was followed by many more. However, the questions addressed by the researchers and the use of several classifications in MSOME to categorize the spermatozoa according to their normalcy or not make the comparison between studies very difficult. Therefore, the outcome of ICSI will be analyzed for each classification before trying to extract conclusions.

Three publications used the Bartoov *et al.* classification [4] to search for differences in the outcome of ICSI between normal spermatozoa and those showing nuclear malformations, mostly large vacuoles (TABLE 4) [7,26,27]. All three studies found a statistically significant increase of pregnancy rate and decrease of abortion rate when normal spermatozoa were injected. The fertilization and implantation rates, and the percentage of top embryos were also found to be significantly higher in two studies. However, all three studies were conducted by the same group; and it cannot be excluded that some couples were reported more than once.

Three studies used the classification described by Vanderzwalmen *et al.*, which differentiate spermatozoa into four grades [4,18,19,28]. Vanderzwalmen *et al.* injected sibling oocytes from 25 women

with the four different grades of spermatozoa. They found no significant difference in the fertilization rate, or in the percentages of day-3 embryos or top-quality embryos. Significant differences were observed in the percentages of blastocysts and good-quality blastocysts as well as in the implantation and pregnancy rates. The major differences were seen between grade I and grades III and IV spermatozoa [28].

Knez *et al.* injected oocytes with spermatozoa of different grades (classification of Vanderzwalmen) from males with isolated teratozoospermia. Although no significant difference in blastocyst quality and embryo viability was found according to the grade of injected spermatozoa, all the other parameters, including fertilization rate, number of morphologically normal zygotes, morula rate on day 4, arrested embryos rate at day 5 and blastocyst rate on days 5 and 6, were impacted ($p < 0.01$) when oocytes were injected by spermatozoa of decreasing quality [18].

De Vos *et al.* injected sibling oocytes with spermatozoa of different grades (classification of Vanderzwalmen) from males with isolated oligoasthenoteratozoospermia. Fertilization rates decreased from 78.9% for grade I spermatozoa to 67.4% for grade II and 56.3% for grade III and IV spermatozoa [19].

Using their own classification [4], Cassuto *et al.* selected spermatozoa by MSOME following preselection at 400 \times magnification. They found significant differences in the fertilization rate and in the rate of good-quality blastocysts, but not in the rate of morula and blastocyst formation, depending upon the class of spermatozoa injected. Furthermore, they found a significant difference in the fertilization rate between spermatozoa with and without vacuoles [29,30].

Braga *et al.* used linear regression models to assess the relationship between MSOME defects and ICSI outcomes. They found that the presence of vacuoles negatively influenced fertilization, implantation and pregnancy rates [11].

Sermondade *et al.* tried to determine whether subtle sperm morphological characteristics could predict the outcome of ICSI, and if so, to identify those that were relevant. They analyzed 25 IMSI attempts, six having resulted in pregnancy and 19 not. No significant difference in the frequency of morphological parameters evaluated in MSOME was found according to the issue of ICSI (pregnancy or not). Furthermore, no significant correlation was found between the frequency of abnormal forms or sperm with vacuoles and fertilization rate, cleavage rate and embryo quality [31].

More recently, Tanaka *et al.* compared the fertilization rate and the capacity of blastocyst development between sperm with and without vacuoles. Although the fertilization rate after injection of spermatozoa with large vacuoles was significantly different from the rate following injection with sperm containing small

vacuoles, the rate values were not significantly different from IMSI using a spermatozoon without vacuole. In contrast, more fertilized oocytes developed to the blastocyst stage when they were injected with vacuolated spermatozoa than with normal sperm ($p < 0.05$) [32].

However, in these last two studies, the number of IMSI attempts was very low, ranging from 25 attempts [31] to 106 for three classes of spermatozoa (with large or small or without vacuoles) [33]. Therefore, given the limited number of inclusions, these studies may not have had sufficient statistical power to detect differences.

Because of the extent of the population sizes and the diverse approaches and MSOME classifications used by the studies reported thus far, definite conclusions cannot be drawn. Selection of spermatozoa with morphological nuclear normalcy could be very important for early and late embryo development. On the contrary, the presence of vacuoles in injected spermatozoa could be associated with decreased implantation and pregnancy rates, and with increased abortion rate. Furthermore, the presence of vacuoles could be related to the competence of embryos to develop to blastocysts, being more prone to be arrested at low cell developmental stages.

IMSI: which benefits?

As stated previously, it is difficult to draw definite conclusions regarding the benefits generated by the intracytoplasmic morphologically selected sperm injection. However, it appears that this technique is associated with an increase in the rate of top-quality embryos on days 3 and 5. This could be the result of selecting normal spermatozoa in MSOME and therefore, avoiding injection with spermatozoa having subtle morphological abnormalities. Using top-quality spermatozoa increases the probability of injecting the oocyte with a sperm cell that has a morphologically normal nucleus and no vacuoles. If one assumes that most of the vacuoles observed in MSOME are of nuclear origin and that they are associated with abnormal DNA packaging [4], injection with non-vacuolated spermatozoa should increase the odds of better DNA quality in the sperm cells and the resulting zygotes.

It has been assumed for a long time that embryo development could be compromised by male factor effects and male infertility has been suggested to affect blastocyst formation and quality [34–36]. In infertile men, more spermatozoa with deficient nuclear integrity, such as loosely packed chromatin and DNA breaks, are found [37–39].

The capacity of spermatozoa to fertilize oocytes and produce good-quality embryos with high implantation and development potential depends on its DNA integrity [40]. Although genetically damaged spermatozoa can achieve normal fertilization, the contribution of these abnormal sperm cells could have a negative effect, usually known as ‘late paternal effect’, on the development of the resulting embryos when the embryonic genome, which is a combination of sperm and oocyte contributions, starts to be expressed. This paternal genomic activation starts after day 3 of cleavage, which is reflected in blastocyst culture [41–43].

Therefore, as pointed out by Mauri *et al.*, the stage of embryo development at which comparisons are made must be considered [10]. This could explain why they found that IMSI did not improve the quality of day-2 embryos in comparison with ICSI. Vanderzwalmen *et al.* found that IMSI provided no significant difference in embryo quality up to day 3 but led to a better development of embryos to the blastocyst [28]. It seems that the positive effect of sperm selection at high magnification is expressed at later stages. IMSI could positively affect embryo development after the activation of the embryonic genome via the selection of sperm without vacuoles, and presumably with less DNA damage that can be repaired by the oocyte [14].

IMSI: which indications?

IMSI was proposed in several circumstances to try to achieve better results than those obtained by conventional ICSI. IMSI procedure was thought to be the method of choice in males with severe teratozoospermia or high sperm DNA fragmentation level [14,44]. It was also recommended for couples who experienced lack of blastocysts or implantation failure in previous ICSI attempts [44–46].

However, the superiority of IMSI over ICSI is still a matter of debate since the benefits obtained by IMSI lack consistency.

Expert commentary

IMSI was introduced 12 years ago following the development of MSOME in order to improve the outcome of assisted reproductive technologies.

Some published studies, so far, have shown a promising efficacy of IMSI over ICSI. Nevertheless, all the above-mentioned studies have limitations and their results should be interpreted with caution. The number of patients in each study is usually small. Inclusion and exclusion criteria vary between studies.

Although MSOME appears to be a powerful tool for selecting morphologically normal spermatozoa, presumably with a lower incidence of DNA defects, compared with the classical 400× magnification, several difficulties may hamper its use.

It is not always possible to find and select morphologically normal spermatozoa to be used for IMSI. Indeed, the frequency of strictly morphologically normal spermatozoa, as defined by Bartoov *et al.*, is very low [4]. It should be noted that the criteria used by the WHO to define a morphologically normal spermatozoon varied over the past 30 years. As such, the definition of normal sperm morphology remains unclear, explaining why the frequency of spermatozoa with normal morphology decreased from 80% in 1980 to 4% in 2010. In some patients, no ‘normal’ spermatozoa selected following MSOME can be found. In these cases, the only possibility is to have recourse to ‘second choice’ or ‘second best’ spermatozoa with the least vacuoles and/or abnormal shape.

Technical and organizational aspects should not be underestimated. MSOME is very laborious, requiring highly trained persons. Identifying and selecting spermatozoa suitable for micro-injection is time consuming and can be very long. This increases not only the costs in handling samples and human

Review

Perrin, Nguyen, Douet-Guilbert, Morel & De Braekeleer

resources, not to mention the cost increase in the microscopic equipment.

Five-year view

At present, there are no defined criteria to help us make a therapeutic decision. More randomized controlled studies conducted by independent groups on large series are still needed, not only to identify the populations of patients that could benefit from the IMSI, but also to determine the efficacy of IMSI over ICSI on the improvement of pregnancy outcomes.

Large-scale studies with more patients are needed before conclusions and recommendations can be drawn with confidence.

Financial & competing interests disclosure

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Key issues

- A major challenge faced by most assisted reproduction centers is to improve pregnancy rate.
- Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) was introduced 12 years ago following the development of motile sperm organelle morphology examination.
- The purpose of IMSI was to improve the outcome of intracytoplasmic sperm injection by injecting oocytes with spermatozoa having a normal morphology under magnification ranging from 6000× to 13,000×.
- Conflicting results regarding the rates of fertilization, implantation, top-quality embryos on days 3 and 5, pregnancy and abortion were reported when comparing IMSI and intracytoplasmic sperm injection outcomes.
- Selection of spermatozoa with morphological nuclear normalcy could be very important for early and late embryo development.
- The presence of vacuoles in injected spermatozoa could be associated with decreased implantation and pregnancy rates, and with increased abortion rate.
- Technical and organizational aspects should not be underestimated.
- More randomized controlled studies on large series are needed before conclusions and recommendations can be drawn with any confidence.

References

Papers of special note have been highlighted as:

• of interest

•• of considerable interest

- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340(8810), 17–18 (1992).
- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F. Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection. *N. Engl. J. Med.* 345(14), 1067–1068 (2001).
- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezes Y, Barak Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J. Androl.* 23(1), 1–8 (2002).
- Reports the first positive results using the new technique called intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) based on selection of spermatozoa at high magnification.**
- Perrin A, Nguyen MH, Douet-Guilbert N, Morel F, De Braekeleer M. Motile sperm organelle morphology examination: where do we stand 12 years later? *Expert Rev. Obstet. Gynecol.* 8(3), 249–260 (2013).
- Souza Setti A, Ferreira RC, Paes de Almeida Ferreira Braga D, de Cássia Sávio Figueira R, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Intracytoplasmic sperm injection outcome versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection outcome: a meta-analysis. *Reprod. Biomed. Online* 21(4), 450–455 (2010).
- Although based on a very small number of studies, this is the first and sole meta-analysis on IMSI.**
- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F *et al.* Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil. Steril.* 80(6), 1413–1419 (2003).
- Berkovitz A, Eltes F, Lederman H *et al.* How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection. *Reprod. Biomed. Online* 12(5), 634–638 (2006).
- Bach M, Neyer A, Stecher A *et al.* Morphological integrity of human sperm nuclei and blastocyst formation after intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI). *Hum. Reprod.* 22(Suppl. 1), i108–i109 (2007).
- Nadalini M, Tarozzi N, Distratis V, Scaravelli G, Borini A. Impact of intracytoplasmic morphologically selected sperm injection on assisted reproduction outcome: a review. *Reprod. Biomed. Online* 19(Suppl. 3), 45–55 (2009).
- Reports a review (although not complete) of the studies comparing IMSI and intracytoplasmic sperm injection. The authors concluded that prospective randomized studies are necessary to confirm preliminary results regarding the efficacy of the IMSI technique.**
- Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB, Massaro FC, Baruffi RL, Franco JG Jr. 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(1), 42–46 (2010).
- de Almeida Ferreira Braga DP, Setti AS, Figueira RC *et al.* Sperm organelle morphologic abnormalities: contributing factors and effects on intracytoplasmic sperm injection cycles outcomes. *Urology* 78(4), 786–791 (2011).
- Balaban B, Yakin K, Alatas C, Oktem O, Isiklar A, Urman B. Clinical outcome of intracytoplasmic injection of spermatozoa morphologically selected under high magnification: a prospective randomized

- study. *Reprod. Biomed. Online*. 22, 472–476 (2011).
- **One of the few prospective randomized studies suggesting that IMSI may improve IVF success rates in a selected group of patients with male factor infertility.**
- 13 Oliveira JB, Cavagna M, Petersen CG *et al.* Pregnancy outcomes in women with repeated implantation failures after intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI). *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9, 99 (2011).
 - 14 Knez K, Zorn B, Tomazevic T, Vrtacnik-Bokal E, Virant-Klun I. The IMSI procedure improves poor embryo development in the same infertile couples with poor semen quality: a comparative prospective randomized study. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9, 123 (2011).
 - 15 Wilding M, Coppola G, di Matteo L, Palagiano A, Fusco E, Dale B. Intracytoplasmic injection of morphologically selected spermatozoa (IMSI) improves outcome after assisted reproduction by deselecting physiologically poor quality spermatozoa. *J. Assist. Reprod. Genet.* 28(3), 253–262 (2011).
 - 16 Setti AS, Figueira RC, Braga DP, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Gender incidence of intracytoplasmic morphologically selected sperm injection-derived embryos: a prospective randomized study. *Reprod. Biomed. Online* 24(4), 420–423 (2012).
 - 17 Setti AS, Braga DP, Figueira RC, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. The predictive value of high-magnification sperm morphology examination on ICSI outcomes in the presence of oocyte dysmorphisms. *J. Assist. Reprod. Genet.* 29(11), 1241–1247 (2012).
 - 18 Knez K, Tomazevic T, Zorn B, Vrtacnik-Bokal E, Virant-Klun I. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection improves development and quality of preimplantation embryos in teratozoospermia patients. *Reprod. Biomed. Online* 25(2), 168–179 (2012).
 - 19 De Vos A, Van de Velde H, Bocken G *et al.* Does intracytoplasmic morphologically selected sperm injection improve embryo development? A randomized sibling-oocyte study. *Hum. Reprod.* 28(3), 617–626 (2013).
 - **Reports a randomized sibling-oocyte study leading to the conclusion that IMSI has no benefits over intracytoplasmic sperm injection on embryo development.**
 - 20 Yazbeck C, Delaroché L, Jacquesson L, Ayel JP, Selva J, Rougier N. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI): is it a good choice after two or more IVF or ICSI failures? *Fertil. Steril.* 90(Suppl. 1), S416 (2008).
 - 21 Setti AS, Figueira Rde C, Braga DP, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection benefits for patients with oligoasthenozoospermia according to the 2010 World Health Organization reference values. *Fertil. Steril.* 95(8), 2711–2714 (2011).
 - 22 Figueira Rde C, Braga DP, Setti AS, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Morphological nuclear integrity of sperm cells is associated with preimplantation genetic aneuploidy screening cycle outcomes. *Fertil. Steril.* 95(3), 990–993 (2011).
 - 23 Hazout A, Dumont-Hassan M, Junca AM, Cohen Bacrie P, Tesarik J. High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI. *Reprod. Biomed. Online* 12(1), 19–25 (2006).
 - 24 Berkovitz A, Eltes F, Paul M, Adrian E, Benjamin B. The chance of having a healthy normal child following intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) treatment is higher compared to conventional IVF-ICSI treatment. *Fertil. Steril.* 88(Suppl. 1), S20 (2007).
 - 25 Cassuto NG, Hazout A, Benifla JL, Balet R, Larue L, Viot G. Decreasing birth defect in children by using high magnification selected spermatozoon injection. *Fertil. Steril.* 96, S85 (2011).
 - 26 Berkovitz A, Eltes F, Yaari S *et al.* The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Hum. Reprod.* 20(1), 185–190 (2005).
 - 27 Berkovitz A, Eltes F, Ellenbogen A, Peer S, Feldberg D, Bartoov B. Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? *Hum. Reprod.* 21(7), 1787–1790 (2006).
 - 28 Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P *et al.* Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reprod. Biomed. Online* 17(5), 617–627 (2008).
 - **Addresses the question of whether or not vacuoles have a negative impact on pregnancy outcome.**
 - 29 Cassuto NG, Plouchart JM, Balet R, Larue L, Bouret D. Interest of a new morphological classification of human spermatozoa for ICSI allowing to obtain a better blastocyst score. *Hum. Reprod.* 22(Suppl. 1), i113 (2007).
 - 30 Cassuto NG, Bouret D, Plouchart JM *et al.* A new real-time morphology classification for human spermatozoa: a link for fertilization and improved embryo quality. *Fertil. Steril.* 92(5), 1616–1625 (2009).
 - 31 Sermondade N, Vialard F, Bergère M *et al.* [Evaluation of the contribution of the observation method of sperm in ICSI magnification]. *Andrologie* 17, 212–221 (2007).
 - 32 Tanaka A, Nagayoshi M, Tanaka I, Kusunoki H. Human sperm head vacuoles are physiological structures formed during the sperm development and maturation process. *Fertil. Steril.* 98(2), 315–320 (2012).
 - 33 Buckett WM, Tan SL. Congenital abnormalities in children born after assisted reproductive techniques: how much is associated with the presence of infertility and how much with its treatment? *Fertil. Steril.* 84(5), 1318–1319; discussion 1327 (2005).
 - 34 Janny L, Menezo YJ. Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. *Mol. Reprod. Dev.* 38(1), 36–42 (1994).
 - 35 Jones GM, Trounson AO, Lolatgis N, Wood C. Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following *in vitro* fertilization and embryo transfer. *Fertil. Steril.* 70(6), 1022–1029 (1998).
 - 36 Shoukir Y, Chardonnens D, Campana A, Sakkas D. Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? *Hum. Reprod.* 13(6), 1632–1637 (1998).
 - 37 Sakkas D, Urner F, Bizzaro D *et al.* Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum. Reprod.* 13(Suppl. 4), 11–19 (1998).
 - 38 Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J. Androl.* 21(1), 33–44 (2000).
 - 39 Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum. Reprod.* 15(8), 1717–1722 (2000).

Review

Perrin, Nguyen, Douet-Guilbert, Morel & De Braekeleer

- 40 Miller D, Brinkworth M, Iles D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 139(2), 287–301 (2010).
- 41 Tesarik J. Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. *Reprod. Biomed. Online* 10(3), 370–375 (2005).
- 42 Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D *et al.* Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum. Reprod.* 21(11), 2876–2881 (2006).
- 43 Ménéz YJ. Paternal and maternal factors in preimplantation embryogenesis: interaction with the biochemical environment. *Reprod. Biomed. Online* 12(5), 616–621 (2006).
- 44 Vanderzwalmen P, Fallet C. [IMSI: indications, results and reflexions]. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)* 39(1 Suppl), 22–25 (2010).
- 45 Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP *et al.* Birefringence characteristics in sperm heads allow for the selection of reacted spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* 93(3), 807–813 (2010).
- 46 Montjean D, Belloc S, Benkhalifa M, Dalleac A, Ménéz Y. Sperm vacuoles are linked to capacitation and acrosomal status. *Hum. Reprod.* 27(10), 2927–2932 (2012).
- 47 Antinori M, Licata E, Dani G *et al.* Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reprod. Biomed. Online* 16(6), 835–841 (2008).
- 48 Boldi Cotti P, Chigioni S, Galofre Ballesteros GM, Arcaini L, Vucetich A. Advantages of HM-ICSI for the treatment of different fertility problems. *Hum. Reprod.* 23, i157 (2008).
- 49 Sifer C, Sermondade N, Hafhouf E *et al.* [Effectiveness of IMSI in an infertile population having either a severe isolated male factor or several repeated failures of embryo implantation after ICSI]. *15èmes Journées Nationales de la FFER* 1, 2–3 (2010).