



HAL
open science

Impact des facteurs maternels et paternels sur les résultats de FIV / ICSI et investigations génétiques des spermatozoïdes d'hommes infertiles

Sahar El Fekih

► **To cite this version:**

Sahar El Fekih. Impact des facteurs maternels et paternels sur les résultats de FIV / ICSI et investigations génétiques des spermatozoïdes d'hommes infertiles. Médecine humaine et pathologie. Université de Bretagne occidentale - Brest; Université de Monastir (Tunisie), 2018. Français. NNT : 2018BRES0088 . tel-02163923

HAL Id: tel-02163923

<https://theses.hal.science/tel-02163923v1>

Submitted on 24 Jun 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.



THESE DE DOCTORAT EN CO-TUTELLE DE

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité « Génétique, Génomique, Bioinformatique »

ET L'UNIVERSITE
DE MONASTIR

ECOLE DOCTORALE

Sciences Biologiques Biotechnologie et Santé

Spécialité « Sciences Biologiques et Biotechnologie »

Par

Sahar EL FEKIH

**« Impact des facteurs maternels et paternels sur les résultats de FIV / ICSI
et investigations génétiques des spermatozoïdes d'hommes infertiles »**

Thèse présentée et soutenue à Brest le 20 décembre 2018

Unités de recherche : Laboratoire de Cytogénétique et Biologie de la Reproduction, CHRU Morvan
et INSERM U1078, Brest

Laboratoire de Cytogénétique, Génétique Moléculaire et de Biologie de la Reproduction
Humaines, CHU Farhat Hached, Sousse (LR03SP02)

Rapporteurs avant soutenance : **Composition du Jury :**

Meriem MAHDI Professeur, Université de Monastir
Franck PELLESTOR MCU-PH, Université de Montpellier

Meriem MAHDI Professeur, Université de Monastir
Franck PELLESTOR MCU-PH, Université de Montpellier
Hassen BEN CHEIKH Professeur, Université de Monastir

Présidente du jury
Marie-Bérengère
TROADEC PU-PH, Université de Bretagne
Occidentale

Directeurs de thèse
Frédéric MOREL MCU-PH, Université de Bretagne
Occidentale

Habib BEN ALI Professeur, Université de Sousse

Invitée
Aurore PERRIN MCU-PH, Université de Bretagne
Occidentale

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma reconnaissance aux membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail.

*J'adresse mes remerciements les plus respectueux à **Madame le Professeur Meriem MAHDI** d'avoir accepté d'être l'un des deux rapporteurs de ma thèse.*

Recevez ici le témoignage de ma profonde gratitude.

*J'adresse mes remerciements les plus respectueux à **Monsieur le Docteur Franck PELLESTOR** d'avoir accepté d'être l'un des deux rapporteurs de ma thèse.*

Recevez ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

*J'adresse mes remerciements les plus respectueux à **Monsieur le Professeur Hassen BEN CHEIKH** d'avoir accepté de juger ce travail.*

Recevez ici le témoignage de ma grande reconnaissance.

*J'adresse mes remerciements les plus respectueux à **Madame le Professeur Marie-Bérengère TROADEC** d'avoir accepté de juger ce travail et d'être la présidente de ce jury.*

Recevez ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

*J'adresse mes reconnaissances profondes à **Madame le Docteur Aurore PERRIN** d'avoir accepté de juger ce travail. Je lui adresse mes plus sincères remerciements pour m'avoir chaleureusement encouragée et avoir partagé son expérience scientifique et ses connaissances étendues en biologie de la reproduction. Je la remercie également pour ses conseils et son aide notamment lors de la lecture de mon manuscrit pour sa gentillesse et sa bonne humeur.*

Veillez trouver ici l'expression de ma vive reconnaissance et de mon profond respect.

Je souhaite exprimer ma gratitude et mes remerciements à mes directeurs de thèse :

***Monsieur le Docteur Frédéric MOREL** pour ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa disponibilité permanente, ses encouragements, sa bonne humeur et surtout sa rigueur et le dynamisme qu'il m'a transmis. Je le remercie également pour ses conseils toujours avisés lors de la rédaction de ce manuscrit et d'avoir pris du temps pour le corriger.*

Soyez assuré de ma profonde gratitude et de mon grand respect.

***Monsieur le Professeur Habib BEN ALI**, pour sa disponibilité et la confiance qu'il m'a accordée durant la réalisation de ce travail tout en gardant un œil critique, juste et avisé. Je*

le remercie également pour ses précieux conseils et le temps consacré à corriger mon manuscrit.

Soyez assuré de ma profonde gratitude et de mon grand respect.

La présentation de ce travail est pour moi l'occasion d'exprimer ma reconnaissance à tous ceux qui ont permis sa réalisation. Il a été réalisé au sein du laboratoire de Cytogénétique et Biologie de la Reproduction du CHRU Morvan et de l'Unité INSERM U1078 de Brest et au sein du laboratoire de Cytogénétique, Génétique moléculaire et Biologie de la Reproduction Humaines du CHU Farhat Hached de Sousse.

*Je remercie très sincèrement **Madame le Docteur Nathalie DOUET-GUILBERT** et **Monsieur le Professeur Ali SAAD** de m'avoir accueillie chaleureusement au sein de leur laboratoire. Une pensée respectueuse pour **Monsieur le Professeur Marc DE BRAEKELEER** qui m'a accueillie au sein du laboratoire de Cytogénétique de Brest et a dirigé ce travail durant mes deux premières années de thèse.*

*J'adresse ma profonde reconnaissance à **Madame le Docteur Emmanuelle GENIN**, directrice de l'Unité INSERM U1078 de m'avoir accueillie au sein de son unité.*

*Je tiens à remercier vivement **Madame Christine NEDELEC** pour son aide spontanée à la relecture de mon manuscrit, pour ses conseils et sa bonne humeur.*

Qu'elle soit également assurée de ma sincère reconnaissance.

*J'adresse également mes chaleureux remerciements à **Madame le Docteur Geneviève LEFORT** pour la relecture, la correction des articles en anglais, sa gentillesse et sa bonne humeur.*

Qu'elle soit assurée de ma sincère reconnaissance.

*Je tiens à remercier très sincèrement **Monsieur le Professeur Mounir AJINA**, responsable biologique de l'Unité de Médecine de Reproduction de l'Hôpital Farhat Hached de Sousse, **Monsieur le Docteur Damien BEAUVILLARD**, responsable biologique du laboratoire de Biologie de la Reproduction du CHRU Morvan de Brest, **Madame le Professeur Florence BRUGNON**, du laboratoire de Biologie de la Reproduction du CHU de Clermont Ferrand, **Monsieur le Professeur Louis BUJAN**, du groupe de Recherche en Fertilité Humaine du CHU de Toulouse, et les **personnels** de ces différents laboratoires qui m'ont fourni du matériel biologique et des données nécessaires.*

*Je tiens à adresser mes remerciements aux **patients** intégrés dans les différentes études sans qui cette thèse n'aurait pas pu avoir lieu.*

*Je remercie l'**Agence de la Biomédecine** d'avoir financé une partie de ces travaux.*

*Je souhaite remercier **Hajer** et **Lamia** de m'avoir appris à analyser le spermogramme et le spermocytogramme.*

*Je tiens à remercier **Corinne, Nadia et Kevin** pour leur disponibilité et leur aide sur les études des pools de BACs et du tri magnétique, sur les techniques de biologie moléculaire et dans l'analyse de la ségrégation méiotique.*

*Je remercie également **Jocelyne et Muriel** pour m'avoir montré les techniques d'assistance médicale à la procréation.*

*Je tiens à sincèrement remercier **Madame Virginie SCOTET et Madame Carine L'HOSTIS** de l'Unité INSERM U1078 de m'avoir accueillie avec beaucoup de disponibilité et de m'avoir apporté une aide précieuse dans le traitement des données avec des études biostatistiques qui n'aurait pas pu être réalisées sans elles.*

Veillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

*J'adresse particulièrement mes remerciements **aux personnels du laboratoire de Cytogénétique de Brest** pour leur accueil chaleureux, pour l'esprit familial que vous avez su préserver. Cette ambiance rend tellement agréable de travailler à vos côtés. Merci à chacun d'entre vous de m'avoir toujours soutenue.*

*La réalisation de cette thèse a également été rendue possible grâce à **mes chers parents Fathi et Amel**. Je les remercie pour les sacrifices consentis afin de m'avoir permis d'être toujours dans les meilleures conditions possibles (financement, déménagements...), pour leur soutien tout au long de mon cursus, pour la confiance toujours accordée. J'espère que mon travail aura été à la hauteur de leurs espérances.*

*Je remercie **mon cher frère Mouadh et ma chère sœur Ghada** pour leur grand amour et leur soutien. Merci **Ghada** d'avoir eu le courage de lire ce manuscrit.*

*Je remercie **mon fiancé Hichem**, qui même à l'autre bout du monde m'a énormément encouragée et m'a soutenue. Merci d'être présent dans ma vie et de la colorer si fort !*

*Je remercie **toute ma famille et tous mes amis de Tunisie et de Brest** avec qui j'ai partagé d'agréables moments.*

Table des matières

Abréviations	I
Liste des figures.....	VII
Liste des tableaux	IX
Introduction et objectifs.....	3
Généralités et revue de la littérature	7
A. Rappel anatomique et physiologique.....	9
I. L'appareil génital féminin	9
1. <i>Ovogenèse et folliculogenèse</i>	10
2. <i>Ovulation</i>	13
II. L'appareil génital masculin	14
1. <i>La spermatogenèse</i>	15
a. La spermatocytogenèse	15
b. La spermiogenèse	17
c. Le spermatozoïde	19
2. <i>Remodelage de la chromatine spermatique</i>	20
3. <i>Expression différentielle des gènes du spermatozoïde</i>	21
a. Présence des ARN dans les spermatozoïdes matures	21
b. Fonctions des ARN spermatiques	23
B. Infertilité.....	26
I. Définition.....	26
II. Etiologies.....	26
1. <i>Etiologie de l'infertilité féminine</i>	27
2. <i>Etiologie de l'infertilité masculine</i>	28
C. Les diagnostics de l'infertilité	29
I. Exploration de l'infertilité féminine.....	29
II. Exploration de l'infertilité masculine.....	30
D. Aspects cytogénétique et moléculaire de l'infertilité masculine	33
I. Anomalies chromosomiques et infertilité masculine.....	33
1. <i>Anomalies chromosomiques constitutionnelles</i>	34
a. Anomalies chromosomiques de nombre	34
b. Anomalies chromosomiques de structure.....	35
2. <i>Ségrégation méiotique chez les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique</i>	37
a. Ségrégation méiotique et anomalie chromosomique de nombre	37
b. Ségrégation méiotique et anomalie chromosomique de structure	38
3. <i>Effet inter-chromosomique chez les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique</i>	43

4.	<i>Techniques d'analyse de l'équipement chromosomique dans les spermatozoïdes</i>	43
a.	Hamster-test.....	43
b.	Hybridation <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	44
II.	Fragmentation de l'ADN spermatique et infertilité masculine.....	44
1.	<i>Origines de la fragmentation de l'ADN spermatique</i>	45
a.	Défauts de compaction de la chromatine du spermatozoïde	45
b.	Espèces réactives oxygénées	45
c.	Apoptose abortive.....	48
d.	Autres origines	51
2.	<i>Techniques d'évaluation de la qualité de l'ADN spermatique</i>	51
a.	Test à l'acridine orange (AO).....	51
b.	Bleu d'aniline	51
c.	Bleu de toluidine	52
d.	Chromomycine A3 (CMA3).....	52
e.	Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA).....	52
f.	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL).....	53
g.	Single cell gel electrophoresis assay (SCGE) (ou COMET assay)	53
h.	Sperm Chromatin Dispersion (SCD).....	53
III.	Infertilité masculine et étude du transcriptome dans les spermatozoïdes.....	54
1.	<i>Application pratique des ARN spermatiques</i>	54
2.	<i>Méthodes de détection des ARN dans les spermatozoïdes</i>	56
a.	RT-PCR.....	56
b.	Microarray	56
E.	Les possibilités thérapeutiques	56
I.	Les traitements antioxydants	57
II.	Les techniques de sélection des spermatozoïdes	58
1.	<i>Techniques classiques de séparation des spermatozoïdes dans le cadre de l'AMP</i>	58
a.	Gradient de densité.....	58
b.	Migration ascendante ou swim-up.....	59
2.	<i>Autres techniques de sélection des spermatozoïdes</i>	60
a.	Selon la biréfringence des spermatozoïdes.....	60
b.	Sélection selon la morphologie	60
c.	Sélection selon la morphologie et la mobilité	62
d.	Sélection selon la charge électrique	63
e.	Sélection selon des marqueurs moléculaires	65
III.	Techniques d'assistance médicale à la procréation	67

1. Induction simple de l'ovulation	67
2. Insémination artificielle.....	67
3. Fécondation In Vitro (FIV)	68
4. Injection Intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI).....	68
Matériel et Méthodes.....	69
A. Infertilité du couple et techniques d'aide médicale à la procréation	71
I. Impact des facteurs maternels et paternels sur les résultats de FIV et d'ICSI.....	71
II. Effet de la qualité de l'ADN spermatique sur les résultats obtenus en AMP.....	72
III. Cycle de FIV/ ICSI.....	72
1. Procédure de FIV/ ICSI.....	72
a. Recueil des ovocytes	72
b. Recueil et préparation du sperme	73
c. Mise en fécondation ou micro-injection.....	74
d. Transfert embryonnaire	74
e. Evaluation de la grossesse chimique	75
2. Les paramètres de fécondité	75
IV. Marquage de l'ADN spermatique par technique TUNEL	76
1. Principe	76
2. Technique	78
V. Etudes statistiques	79
B. Tri magnétique sur les spermatozoïdes	82
I. Description de l'étude	82
II. Paramètres évalués	82
1. Marquage Annexine V-FITC	83
a. Principe.....	83
b. Technique	84
2. FISH sur spermatozoïdes	84
a. Sondes commerciales	85
b. Sondes BACs.....	85
c. Réalisation de la technique FISH	88
III. Optimisation et validation du tri des spermatozoïdes à l'aide du kit de recherche	89
1. Optimisation du protocole du tri magnétique : Kit de recherche.....	89
a. Population.....	89
b. Description de l'étude	89
c. Etude préliminaire	90
d. Quantité de microbilles.....	90

e.	Evaluation de la pureté et de la qualité d'ADN avant et après le tri magnétique.....	92
f.	Tests complémentaires	93
g.	Evaluation de la pureté et de la qualité de l'ADN à chaque étape du tri magnétique	97
h.	Test sur deux colonnes	98
i.	Kit recherche adapté <i>versus</i> Kit ART.....	99
2.	<i>Validation du tri magnétique des spermatozoïdes à l'aide du kit de recherche adapté</i>	99
IV.	Apports du tri de spermatozoïdes chez des hommes porteurs d'une anomalie chromosomique constitutionnelle.....	101
V.	Etudes statistiques	103
C.	Expression différentielle des gènes des spermatozoïdes : mise au point de techniques d'étude du transcriptome	104
I.	Population.....	104
II.	Purification des spermatozoïdes	104
1.	<i>Swim-up</i>	105
2.	<i>Lyse des cellules somatiques</i>	105
3.	<i>Gradient de densité</i>	105
4.	<i>Association entre le gradient de densité et la lyse des cellules somatiques</i>	106
III.	Extraction d'ARN spermatique	106
IV.	Evaluation de la pureté.....	108
1.	<i>RT-PCR</i>	108
2.	<i>Bioanalyseur</i>	110
V.	Amplification et marquage	110
VI.	Hybridation et lecture	111
	Résultats	113
A.	Infertilité du couple et techniques d'aide médicale à la procréation	115
I.	Impact des facteurs maternels et paternels sur les résultats de FIV	115
1.	<i>Etude descriptive</i>	115
2.	<i>Echec de fécondation en FIV</i>	116
3.	<i>Transfert d'embryons</i>	117
4.	<i>Echec de grossesse chimique</i>	118
II.	Impact des facteurs maternels et paternels sur les résultats d'ICSI.....	119
1.	<i>Etude descriptive</i>	119
2.	<i>Echec de fécondation en ICSI</i>	120
a.	Comparaison entre échec et succès de fécondation en ICSI	120
b.	Déterminer le lien entre les facteurs maternels / paternels et l'échec de fécondation.....	121
c.	Déterminer les facteurs prédictifs de l'échec de fécondation.....	124

d.	Valeur seuil d'ovocytes matures	126
3.	<i>Qualité embryonnaire</i>	127
4.	<i>Transfert d'embryons</i>	127
5.	<i>Echec de grossesse chimique</i>	129
a.	Comparaison des paramètres maternels/paternels, des paramètres d'ICSI entre le groupe « Echec de grossesse chimique » et « Succès de grossesse chimique »	129
b.	Déterminer le lien entre les facteurs maternels/paternels, paramètres d'ICSI et l'échec de grossesse chimique	131
c.	Effet de l'âge paternel et de la numération en spermatozoïdes sur l'issue de la grossesse chimique	134
III.	Effet de la qualité de l'ADN spermatique sur les résultats obtenus en AMP	135
1.	<i>Etude descriptive</i>	135
2.	<i>Effet de la fragmentation de l'ADN sur le taux de fécondation</i>	136
3.	<i>Relation entre la fragmentation de l'ADN et le taux de grossesse chimique</i>	136
B.	Tri magnétique des spermatozoïdes	137
I.	Optimisation et validation du tri des spermatozoïdes à l'aide du kit de recherche	137
1.	<i>Optimisation du protocole du tri magnétique : Kit de recherche</i>	137
a.	Quantité de microbilles.....	137
b.	Evaluation de la pureté et de la qualité de l'ADN avant et après le tri magnétique	138
c.	Tests complémentaires	139
d.	Evaluation de la pureté et de la qualité de l'ADN à chaque étape du tri magnétique	142
e.	Test sur deux colonnes	143
f.	Kit recherche adapté <i>versus</i> Kit ART.....	144
2.	<i>Validation du tri magnétique des spermatozoïdes à l'aide du kit de recherche adapté</i>	145
a.	Patients	145
b.	Evaluation du taux des spermatozoïdes avec EPS.....	146
c.	Evaluation du taux de fragmentation de l'ADN spermatique	147
d.	Evaluation de l'équipement chromosomique des spermatozoïdes	148
II.	Apport du tri de spermatozoïdes chez les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique constitutionnelle	151
1.	<i>Patients</i>	151
2.	<i>Paramètres spermatiques</i>	152
3.	<i>Evaluation de la concentration totale des spermatozoïdes</i>	153
4.	<i>Evaluation du taux de spermatozoïdes avec EPS</i>	154
5.	<i>Evaluation du taux de fragmentation de l'ADN spermatique</i>	156
6.	<i>Evaluation de l'équipement chromosomique des spermatozoïdes</i>	158

C.	Expression différentielle des gènes des spermatozoïdes : mise au point de technique d'étude du transcriptome	164
I.	Purification des spermatozoïdes	164
1.	<i>Swim-up</i>	164
2.	<i>Lyse des cellules somatiques</i>	164
3.	<i>Gradient de densité</i>	164
4.	<i>Association entre le gradient de densité et la lyse des cellules somatiques</i>	164
II.	Extraction d'ARN spermatique	165
III.	Evaluation de la pureté	165
1.	<i>RT-PCR</i>	165
2.	<i>Bioanalyseur</i>	166
IV.	Hybridation et lecture	167
	Discussion	171
A.	Infertilité du couple et techniques d'aide médicale à la procréation	173
I.	Impact des facteurs maternels et paternels sur les résultats de FIV et d'ICSI	173
1.	<i>Echec de fécondation</i>	173
2.	<i>Qualité embryonnaire</i>	177
3.	<i>Transfert d'embryons</i>	179
4.	<i>Echec de grossesse chimique</i>	180
II.	Effet de la qualité de l'ADN spermatique sur les résultats obtenus en AMP	181
B.	Tri magnétique	183
I.	Optimisation du protocole de tri magnétique : Kit de recherche	183
1.	<i>Quantité de microbilles</i>	183
2.	<i>Tests complémentaires</i>	184
3.	<i>Kit recherche adapté versus Kit ART</i>	185
II.	Apport du tri magnétique chez les patients	185
1.	<i>Evaluation de la concentration totale des spermatozoïdes</i>	186
2.	<i>Evaluation du taux de spermatozoïdes avec EPS</i>	186
3.	<i>Evaluation du taux de fragmentation de l'ADN spermatique</i>	187
4.	<i>Evaluation de l'équipement chromosomique des spermatozoïdes</i>	191
III.	Application de MACS en AMP	199
C.	Expression différentielle des gènes des spermatozoïdes : mise au point de technique d'étude du transcriptome	200
I.	Purification	200
II.	Extraction de l'ARN spermatique	201
III.	Evaluation de la pureté de l'ARN spermatique	205

IV. Validation de base des données de microarray.....	206
Conclusion et perspectives	209
Annexes	215
Annexe 1 : Résultats des taux de fragmentation de l'ADN spermatique chez 31 patients en FIV/ICSI	217
Annexe 2 : Solutions	219
Annexe 3 : Photos des résultats des analyses microscopiques	223
Annexe 4 : Publications.....	227
Annexe 5 : Communications orales et écrites	263
Bibliographie	265

Abréviations

8-OHdG	8-Hydroxy-2'-deoxyGuanosine
Ad	Spermatogonie dark
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
AKAP-4	A-Kinase Anchoring Protein 4
AKT1	AKT Serine / Threonine Kinase 1
AKT2	AKT Serine / Threonine Kinase 2
AMH	Hormone AntiMüllérienne
AMP	Assistance Médicale à la Procréation
AO	Acridine Orange
Ap	Spermatogonie pâle
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique Messenger
ARNt	Acide RiboNucléique de Transfert
ART	Assisted Reproductive Technology
ATP	Adénosine TriPhosphate
AUC	Aire sous la Courbe
β	Coefficient de régression
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
Bak	Bcl2 antagonist/killer
Bax	Bcl2 associated X
BB	Binding Buffer
Bcl2	B-cell lymphoma 2
Bcl-X1	Bcl2 like 1
BET	Bromure d'Ethidium
β HCG	Hormone Chorionique Gonadotrope
BRD2	Hippocalcin
CABYR	Calcium-Binding Tyrosine-Y-Phosphorylation Regulated
CCO	Complexe Cumulo-Ovocytaire

CD45	<i>PTPRC</i> : Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor type, C
CDH1	E-Cadhérine
CEP	Chromosome Enumeration Probe
C-KIT	Kit proto-oncogene receptor tyrosine kinase
CMA3	Chromomycine A3
CO ₂	Dioxyde de Carbone
CREM	cAMP Responsive Element Modulator
CTP	Cystéine TriPhosphate
Cy3	Cyanine 3
DAPI	4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole
DFI	Indice de Fragmentation de l'ADN
DO	Densité Optique
DTT	Dithiothreitol
dTTP	deoxyThymidine TriPhosphate
dUTP	deoxyUridine TriPhosphate
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EPS	Externalisation des Phosphatidylsérines
ERO	Espèces Réactives Oxygénées
Fas	Fas cell surface death receptor
FasL	Fas Ligand
FISH	Hybridation <i>In Situ</i> Fluorescente
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
FIV	Fécondation In Vitro
FOXG1B	Forkhead Box G1B
FSH	Follicle-Stimulating Hormone
GITC	Guanidinium Thiocyanate Phenol Chloroform
GTE	Glucose Tris EDTA
GTP	Guanine TriPhosphate
H ₂ O ₂	Peroxyde d'Hydrogène
HABVIC	Head, Acrosome, Basis, Vacuole, Insertion, Cytoplasmic droplet

HCG	Hormone Chorionique Gonadotrope
HILS1	Histone H1 Like Protein
HLA-E	Human Leukocyte Antigen E
HOS-Test	Hypo-Osmotic Swelling Test
HSG	Hystérosalpingographie
IA	Insémination Artificielle
IAM	Index des Anomalies Multiples
IC	Intervalle de Confiance
ICMART	Comité International pour la Surveillance des Techniques d'Assistance à la Reproduction
ICSI	Injection Intracytoplasmique de spermatozoïde
IUI	Insémination Intra-Utérine
IMC	Indice de Masse Corporelle
ISH	Hybridation <i>In Situ</i>
ISIS	In Situ Imaging System
LB	Luria Bertani
LH	Luteinizing Hormone
LiCl	Chlorure de Lithium
LS	MidiMACS
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MDB	Membrane Desalting Buffer
MiRNA	microARN
MMP	Potentiel de Membrane Mitochondriale
MS	MiniMACS
MSOME	Motile Sperm Organelle Morphology Examination
NaOH	Hydroxyde de Sodium
NK	Natural Killer
NOR	Nucleolus Organizer Region
NP40	Nonidet P40
O ₂ ^{•-}	Superoxyde
OAZ3	Ornithine deCarboxylase antizyme3

OH [*]	Hydroxyle
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OR	Odds Ratio
PBS	Phosphate Buffered Saline
PICSI	Physiological Intracytoplasmic Sperm Injection
piARN	piwi-interacting ARN
PLC-zêta	Phospholipase C zêta
PRM1	Protamine-1
PRM2	Protamine-2
PS	Phosphatidylsérine
PSG1	Pregnancy-Specific Beta-1-Glycoprotein 1
RIN	RNA Integrity Number
ROC	Receiver Operating Characteristic
ROPN1	RhOPhiliN associated tail protein 1
RT	Reverse Transcription
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SCD	Sperm Chromatin Dispersion
SCGE	Single Cell Gel Electrophoresis
SCLB	Somatic Cells Lysis Buffer
SCSA	Sperm Chromatin Structure Assay
SD	Ecart-type
SDS	Sodium Dodecylsulfate
SGP-2	Sulfated Glycoprotein-2
SncARN	Small noncoding RNA
SPARTAN	Simple Periodic ARray for Trapping and isolation
SPATA4	Spermatogenesis associated
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SPZ1	Spermatogenic Leucine Zipper 1
SSC	Sodium Saline Citrate
TA	Température Ambiante

TBE	Tris Borate EDTA
TCEP	Tris 2-carboxyethyl phosphine
TdT	Terminal deoxynucleotidyl Transferase
TE	Tris HCl EDTA
TNP1	Transition Protein 1
TNP2	Transition Protein 2
TSH	Thyroid Stimulating Hormone
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UBE2B	Ubiquitin Conjugating Enzyme E2B
UMR	Unité de Médecine de la Reproduction
VDCA2	Voltage-Dependent Anion Channel 2
VHB	Virus de l'Hépatite B
VHC	Virus de l'Hépatite C
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
WNT5A	Wingless-Type, Member 5A

Liste des figures

Figure 1 : Anatomie des voies génitales féminines	9
Figure 2 : Ovogenèse et folliculogenèse	11
Figure 3 : Anatomie des voies génitales masculines et coupe du testicule	14
Figure 4 : Etapes de la spermatogenèse.....	16
Figure 5 : Etapes de la spermiogenèse	18
Figure 6 : Ultra-structure d'un spermatozoïde humain	19
Figure 7 : Modèle d'organisation de l'ADN spermatique	20
Figure 8 : Relation entre l'ADN, l'ARN et la matrice nucléaire dans les spermatozoïdes	23
Figure 9 : Ségrégation méiotique théorique des trois gonosomes d'un patient ayant un syndrome de Klinefelter (47,XXY)	38
Figure 10 : Equipement chromosomique des gamètes d'un porteur d'une translocation robertsonienne issu des trois modes de ségrégation.....	40
Figure 11 : Formation d'un quadrivalent au stade pachytène de méiose I avec ou sans crossing-over et équipement chromosomique des gamètes selon les 5 modes de ségrégation méiotique chez les porteurs d'une translocation équilibrée	42
Figure 12 : Rôles physiologiques et pathologiques des espèces réactives oxygénées (ERO).....	46
Figure 13 : Représentation schématique des voies apoptotiques hypothétiques présentes dans les spermatozoïdes éjaculés de patients infertiles.....	49
Figure 14 : Apoptose au cours de la spermatogenèse.....	50
Figure 15 : Exemple de sélection des spermatozoïdes par un gradient de densité.....	58
Figure 16 : Exemple de sélection des spermatozoïdes par swim-up	59
Figure 17 : Observation sous microscope à lumière polarisée	60
Figure 18 : Représentation schématique des changements morphologiques typiques des spermatozoïdes humains soumis à un stress hypo-osmotique.....	61
Figure 19 : Diagramme schématique du réseau microfluidique SPARTAN.....	62
Figure 20 : Représentation schématique de sélection des spermatozoïdes par potentiel-zêta.....	63
Figure 21 : Représentations schématiques de la technologie de séparation électrophorétique	64
Figure 22 : Représentation schématique du principe de la technique MACS	65
Figure 23 : Principe de la technique TUNEL.....	77
Figure 24 : Principe du marquage annexine V-FITC	83
Figure 25 : Principe de FISH sur spermatozoïdes	84
Figure 26 : Schéma global de la procédure du test d'effet de la quantité de microbilles sur la pureté .	91
Figure 27 : Schéma global du test pour évaluer la pureté et la qualité de l'ADN avant et après le tri magnétique	92
Figure 28 : Schéma global du test	93
Figure 29 : Schéma global de procédure du test sur l'effet du BB 1X.....	94
Figure 30 : Schéma global du test du lavage avec BB versus incubation avec BB.....	95
Figure 31 : Schéma global du test BB versus Triton.....	96
Figure 32 : Evaluation de la pureté et de la fragmentation à chaque étape du tri magnétique	97
Figure 33 : Schéma global du test sur deux colonnes.....	98
Figure 34 : Plan de l'étude pour le tri magnétique des spermatozoïdes chez des hommes ayant un taux anormal de fragmentation de l'ADN.....	100
Figure 35 : Plan de l'étude pour le tri magnétique des spermatozoïdes chez des hommes porteurs d'une anomalie constitutionnelle.....	101
Figure 36 : Schéma des différentes couches cellulaires après gradient de densité.....	106
Figure 37 : Schéma descriptif de la procédure de FIV	115

Figure 38 : Schéma descriptif de la procédure d'ICSI	119
Figure 39 : Influence du nombre d'ovocytes matures sur l'issue de fécondation avec la courbe ROC	126
Figure 40 : Moyenne du taux de spermatozoïdes avec EPS (%) dans la fraction annexine V- et annexine V+ en fonction de la quantité de microbilles	137
Figure 41 : Moyenne du taux de spermatozoïdes avec EPS après décongélation et après tri dans la fraction annexine V-	138
Figure 42 : Moyenne du taux de fragmentation de l'ADN spermatique après décongélation et après tri dans la fraction annexine V-	138
Figure 43 : Moyenne du taux de fragmentation de l'ADN spermatique après deux lavages avec du PBS 1X ou du BB 1X	139
Figure 44 : Moyenne du taux de fragmentation de l'ADN spermatique après lavage avec du PBS 1X ou du BB 1X et après incubation avec du BB 1X	140
Figure 45 : Moyenne du taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes traités au PBS 1X, au BB 1X ou au Triton X-100	141
Figure 46 : Moyenne du taux de spermatozoïdes avec EPS et moyenne du taux de fragmentation de l'ADN avant et après passage sur 2 colonnes	143
Figure 47 : Moyenne du taux de spermatozoïdes avec EPS en fonction du kit utilisé	144
Figure 48 : Moyenne du taux de fragmentation de l'ADN en fonction du kit utilisé	145
Figure 49 : Moyenne de concentration en spermatozoïdes à chaque étape du tri par MACS chez les porteurs d'une mosaïque gonosomique	154
Figure 50 : Exemples de RT-PCR pour PRM2, CD45, CDH1 et KIT obtenus dans plusieurs échantillons	165
Figure 51 : Exemples de profils obtenus avec le Bioanalyseur 2100	166
Figure 52 : Schéma hypothétique du déroulement de l'apoptose au cours de la spermatogenèse	190
Figure 53 : Schéma du protocole de l'étude du transcriptome dans les spermatozoïdes	207

Liste des tableaux

Tableau 1 : Normes officielles des paramètres du spermogramme selon l'OMS et spermocytogramme selon la classification de David modifiée.....	32
Tableau 2 : Mélange des sondes utilisées pour effectuer la FISH sur spermatozoïdes chez les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure.....	102
Tableau 3 : Protocole de Reverse Transcription pour un échantillon.....	109
Tableau 4 : Cycles d'amplification des séquences des cellules somatiques et des spermatozoïdes....	109
Tableau 5 : Comparaison entre échec et succès de fécondation en cas de FIV.....	116
Tableau 6 : Comparaison entre les différents paramètres maternels, paternels et de FIV selon le jour de transfert embryonnaire	117
Tableau 7 : Comparaison entre échec et succès de grossesse chimique en cas de FIV.....	118
Tableau 8 : Comparaison entre échec et succès de fécondation en cas d'ICSI.....	120
Tableau 9 : Analyse de corrélation entre l'âge maternel, les ovocytes ponctionnés et matures.....	121
Tableau 10 : Relation entre les paramètres maternels / paternels et l'échec de fécondation en ICSI selon la régression logistique univariée	123
Tableau 11 : Modèle complet de la régression logistique multivariée en cas d'échec de fécondation	124
Tableau 12 : Modèle final de la régression logistique multivariée : facteurs prédictifs de l'échec de fécondation en ICSI.....	125
Tableau 13 : Comparaison entre les différents paramètres maternels, paternels et d'ICSI selon le jour de transfert embryonnaire.....	128
Tableau 14 : Comparaison entre échec et succès de grossesse chimique en cas d'ICSI.....	130
Tableau 15 : Relation entre les paramètres maternels, paternels et de fécondité avec l'issue de grossesses en ICSI : régression logistique univariée.....	133
Tableau 16 : Effet de l'âge paternel et de la numération en spermatozoïdes sur l'issue de la grossesse chimique.....	134
Tableau 17 : Corrélation entre fragmentation de l'ADN spermatique et les différents paramètres paternels	135
Tableau 18 : Moyenne du taux de spermatozoïdes avec EPS et moyenne du taux de fragmentation de l'ADN à chaque étape du tri.....	142
Tableau 19 : Taux de fragmentation de l'ADN (%) chez 6 patients	145
Tableau 20 : Taux de spermatozoïdes avec EPS à chaque étape du tri par MACS chez les hommes ayant un taux anormal de fragmentation de l'ADN spermatique.....	146
Tableau 21 : Taux de fragmentation de l'ADN spermatique à chaque étape du tri par MACS chez les hommes ayant un taux anormal de fragmentation de l'ADN spermatique	147
Tableau 22 : Taux de spermatozoïdes normaux pour les chromosomes X, Y et 18 à chaque étape du tri par MACS chez les hommes ayant un taux anormal de fragmentation de l'ADN spermatique	148
Tableau 23 : Taux de spermatozoïdes normaux pour les chromosomes 13 et 21 à chaque étape du tri par MACS chez les hommes ayant un taux anormal de fragmentation de l'ADN spermatique	149
Tableau 24 : Fréquences des différentes anomalies chromosomiques à chaque étape du tri chez les hommes ayant un taux anormal de fragmentation de l'ADN spermatique	150
Tableau 25 : Caryotype des hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure	151
Tableau 26 : Caryotype des hommes porteurs d'une mosaïque gonosomique.....	151
Tableau 27 : Paramètres spermatiques chez les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure.....	152
Tableau 28 : Paramètres spermatiques chez les hommes porteurs d'une mosaïque gonosomique	152
Tableau 29 : Concentration en spermatozoïdes à chaque étape du tri par MACS chez les porteurs d'une anomalie chromosomique de structure.....	153

Tableau 30 : Taux de spermatozoïdes avec EPS à chaque étape du tri par MACS chez les porteurs d'une anomalie chromosomique de structure.....	155
Tableau 31 : Taux de spermatozoïdes avec EPS à chaque étape du tri par MACS chez les porteurs d'une anomalie chromosomique gonosomique.....	155
Tableau 32 : Taux de fragmentation de l'ADN à chaque étape du tri par MACS chez les porteurs d'une anomalie chromosomique de structure.....	156
Tableau 33 : Taux de fragmentation de l'ADN à chaque étape du tri par MACS chez les porteurs d'une mosaïque gonosomique.....	157
Tableau 34 : Données des ségrégations méiotiques par FISH chez les porteurs d'une anomalie chromosomique de structure.....	159
Tableau 35 : Taux de spermatozoïdes normaux pour les chromosomes X, Y et 18 à chaque étape du tri par MACS chez les hommes porteurs d'une mosaïque gonosomique.....	162
Tableau 36 : Taux de spermatozoïdes normaux pour les chromosomes 13 et 21 à chaque étape du tri par MACS chez les hommes porteurs mosaïque gonosomique.....	162
Tableau 37 : Fréquences des disomies et de diploïdies à chaque étape du tri par MACS chez les hommes porteurs d'une mosaïque gonosomique.....	163
Tableau 38 : Gènes identifiés dans les spermatozoïdes et impliqués à différents stades de la spermatogenèse, de la fécondation et du développement embryonnaire.....	168
Tableau 39 : FISH sur spermatozoïdes sélectionnés chez des hommes infertiles.....	193
Tableau 40 : FISH sur spermatozoïdes sélectionnés chez des hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure.....	197
Tableau 41 : Revue de la littérature des étapes utilisées pour la préparation d'ARN spermatique dans le cadre de l'étude transcriptomique.....	203

Introduction et objectifs

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, l'infertilité est définie par l'incapacité d'obtenir une grossesse clinique après au moins 12 mois de rapports sexuels non protégés (Zegers-Hochschild, Adamson et al. 2009, Zegers-Hochschild, Adamson et al. 2017). Dans le monde, elle concerne environ un couple sur dix en âge de procréer. Face aux problèmes d'infertilité, des prises en charge médicales peuvent être proposées comme la fécondation *in vitro* (FIV) et l'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) qui sont des techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP). Le développement de l'AMP a commencé il y a 40 ans avec la première naissance obtenue en fécondation *in vitro* à Londres en 1978 (Steptoe and Edwards 1978). La première injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde a été effectuée en Belgique en 1992 (Palermo, Joris et al. 1992). Néanmoins, les taux d'échec de ces techniques restent relativement élevés. Les causes d'échec peuvent être multiples et sont encore mal connues malgré de nombreuses recherches sur le sujet. L'infertilité du couple n'est plus attribuée uniquement à la femme, l'homme se trouve impliqué dans la moitié des cas. L'infertilité masculine est principalement associée à des perturbations de la spermatogenèse qui peuvent provoquer des anomalies quantitatives et/ou qualitatives dans le sperme. Les causes de ces perturbations peuvent être chromosomiques, génétiques ou liées à des altérations de la qualité de l'ADN spermatique. Les couples dont les hommes infertiles présentent ces facteurs, peuvent avoir un risque augmenté d'échec d'implantation, de fausses couches à répétition, de malformations congénitales voire de cancer chez l'enfant (Munne, Sandalinas et al. 2000, Cho, Jung-Ha et al. 2003, Lewis and Aitken 2005).

Vu l'importance de l'intégrité de l'ADN spermatique et de l'équipement chromosomique pour la reproduction, plusieurs auteurs ont étudié ces deux paramètres afin de mieux comprendre les causes d'infertilité masculine. Certaines équipes ont montré que le taux de fragmentation de l'ADN et le taux d'aneuploïdie sont plus élevés chez des hommes infertiles présentant des paramètres spermatiques perturbés que chez des hommes fertiles ou normozoospermiques (Schmid, Kamischke et al. 2003, Liu, Tsao et al. 2004, Brahem, Mehdi et al. 2011, Perrin, Louanjli et al. 2011, Brahem, Mehdi et al. 2012). Lors de précédentes études de notre équipe brestoise, la ségrégation méiotique et la fragmentation de l'ADN ont été analysées chez des hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure. Ces études ont montré que le taux des gamètes chromosomiquement déséquilibrés et le taux de fragmentation de l'ADN spermatique sont plus élevés chez ces patients par rapport au groupe témoin (Perrin, Caer et al. 2009). De plus, notre équipe a démontré que les gamètes chromosomiquement déséquilibrés ont un ADN plus fragmenté que ceux dont l'équipement

chromosomique est normal ou équilibré (Perrin, Basinko et al. 2011, Perrin, Nguyen et al. 2013). Il apparaît donc prudent de ne pas utiliser ces spermatozoïdes pour l'AMP. Différentes hypothèses sont avancées pour expliquer cette fragmentation de l'ADN telle qu'une exposition aux espèces oxygénées réactives, une sous-protamination ou encore une apoptose abortive. Nos résultats sont en faveur de cette dernière hypothèse. En effet, puisqu'il y a significativement plus de spermatozoïdes avec un ADN fragmenté parmi les gamètes chromosomiquement déséquilibrés, nous pouvons envisager que ces gamètes, entre les stades spermatocytes et spermatides, ont été étiquetés comme devant être éliminés par apoptose en raison de leur équipement chromosomique anormal. Ces gamètes auraient alors subi un processus apoptotique, mais celui-ci n'aurait pas été mené à terme pour un certain nombre d'entre eux. Ainsi, l'apoptose abortive expliquerait la présence de spermatozoïdes vivants et féconds avec un ADN fragmenté dans l'éjaculat de ces patients.

De ce fait, la question qui se pose est : comment sélectionner les spermatozoïdes chromosomiquement normaux ou équilibrés et sans ADN fragmenté ?

Les critères actuels de mobilité et de morphologie utilisés en AMP pour sélectionner un spermatozoïde ne sont pas prédictifs de la qualité de l'équipement chromosomique (Nicolopoulos, Gilling-Smith et al. 2008).

Il existe de nombreuses techniques de séparation des spermatozoïdes. Le tri magnétique à l'aide de microbilles magnétiques (MACS, Magnetic Activated Cell Sorting) est devenu une technique intéressante et a été proposé comme méthode de sélection des spermatozoïdes non apoptotiques (Vendrell, Ferrer et al. 2014, Chi, Kwak et al. 2016, Esbert, Godo et al. 2017).

Par ailleurs, ces dernières années, de nombreuses études ont démontré que les ARNm dans les spermatozoïdes sont une réplique des gènes à l'état actif dans les différentes cellules de la lignée germinale. Ils sont le reflet des événements intervenus lors de la spermatogenèse et peuvent jouer un rôle important dans le développement du zygote. Par conséquent, l'étude du transcriptome dans les spermatozoïdes a deux intérêts majeurs, la compréhension des mécanismes de la spermatogenèse induisant une infertilité et la détermination de profils prédictifs de succès pour les méthodes d'AMP. Dans la littérature, différentes études ont tenté d'expliquer les causes des anomalies révélées par les examens de routine du sperme. Ces travaux ont été réalisés chez des patients présentant une tératozoospermie (Platts, Dix et al. 2007), une asthénozoospermie (Jodar, Kalko et al. 2012) ou encore une oligozoospermie (Montjean, De La Grange et al. 2012). L'étude du transcriptome dans les spermatozoïdes

permet également d'analyser l'impact de divers toxiques ou traitements sur les mécanismes intervenant durant la spermatogenèse (Linschooten, Van Schooten et al. 2009, Metzler-Guillemain, Victorero et al. 2015). Tous ces travaux montrent bien la pertinence des études du transcriptome dans les spermatozoïdes humains et des applications du point de vue fondamental, mais aussi clinique. Néanmoins l'étude du transcriptome par microarray des spermatozoïdes humains éjaculés est plus délicate que l'étude du transcriptome des cellules somatiques. Ceci est dû à la caractéristique spécifique du sperme humain. Les spermatozoïdes sont des cellules haploïdes hyper-différenciées transcriptionnellement inactives (Grunewald, Paasch et al. 2005) et présentant une faible quantité d'ARN (Miller, Ostermeier et al. 2005). De plus, le sperme humain ne contient pas seulement des spermatozoïdes mais également d'autres cellules somatiques (leucocytes, cellules épithéliales) qui présentent une quantité d'ARN 200 fois supérieure à celle présente dans les spermatozoïdes (Jodar, Selvaraju et al. 2013). Ainsi, une étape de purification et un protocole d'extraction d'ARN optimal sont indispensables. Dans la littérature, il n'y a pas de consensus pour les protocoles décrits.

Les principaux objectifs de ma thèse consistent à :

- Déterminer l'effet des paramètres maternels et paternels sur les résultats de FIV et d'ICSI
- Etudier l'apport du tri de spermatozoïdes chez des hommes avec un taux anormal de fragmentation de l'ADN spermatique
- Etudier l'apport du tri de spermatozoïdes chez des hommes porteurs d'une anomalie chromosomique constitutionnelle
- Déterminer la ou les origine(s) de la fragmentation de l'ADN chez ces hommes porteurs d'une anomalie chromosomique constitutionnelle et développer une méthode permettant d'augmenter les chances de grossesse pour ces couples infertiles
- Mettre en place une technique d'étude du transcriptome dans les spermatozoïdes à Brest.

Généralités et revue de la littérature

A. Rappel anatomique et physiologique

I. L'appareil génital féminin

L'appareil génital féminin est constitué des différents organes qui assurent la production des gamètes féminins, l'accueil et l'acheminement des gamètes masculins, la fécondation, le transit et l'implantation de zygote, le développement de l'embryon puis du fœtus pendant la grossesse et son expulsion lors de l'accouchement.

L'appareil génital féminin regroupe (Figure 1) :

- Des organes génitaux internes situés dans la cavité pelvienne :
 - Deux ovaires : ils assurent la production d'ovocytes matures (fonction exocrine) et la sécrétion d'hormones stéroïdes : œstrogènes et progestérone (fonction endocrine).
 - Deux trompes de Fallope : elles sont généralement le siège de la fécondation et le point de départ de la migration du zygote.
 - L'utérus : il joue différents rôles notamment la progression, la sélection et la capacitation des spermatozoïdes, l'implantation de l'embryon et le développement de ce dernier puis du fœtus pendant les neuf mois de gestation ainsi que son expulsion. La sélection des spermatozoïdes est assurée par la glaire cervicale. Elle est sécrétée par des cellules du col de l'utérus (cellules de l'endocol).

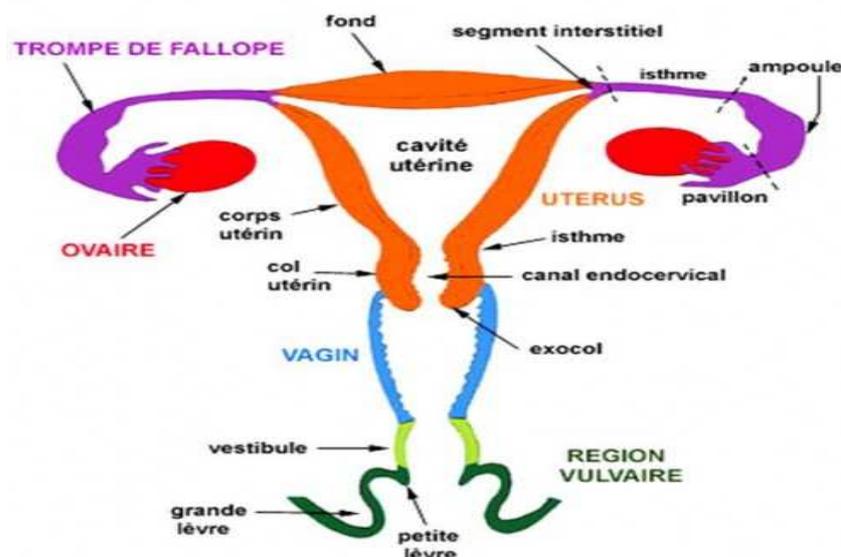


Figure 1 : Anatomie des voies génitales féminines

<http://www.leschroniquesdesonia.com/tag/cancer+du+col+de+1%27ut%C3%A9rus>

- Le vagin : il est doté d'une extrême élasticité qui permet le passage du fœtus et des annexes lors de l'accouchement ainsi que l'écoulement du flux menstruel. C'est également l'organe de la copulation.
- Des organes génitaux externes situés au niveau de la vulve : le vestibule, les petites lèvres, les grandes lèvres et le clitoris.

1. Ovogenèse et folliculogenèse

L'ovogenèse est l'ensemble des phénomènes qui assurent la production des gamètes femelles fécondables. C'est un processus discontinu qui débute dans l'ovaire fœtal, s'interrompt à la fin de la vie fœtale, reprend à la puberté et se termine à la ménopause.

Les cellules germinales du fœtus (appelées ovogonies) se multiplient par mitoses de la 15^{ème} semaine de développement jusqu'au 7^{ème} mois de la vie fœtale. A la fin de la croissance, les ovogonies présentent chacune une couche de cellules folliculeuses aplaties et entament la première division méiotique : ce sont des ovocytes de premier ordre (ovocytes I). L'ensemble constitué par l'ovocyte I et la couche de cellules folliculeuses forme le follicule primordial. Les ovocytes I sont bloqués en prophase I de la première division de méiose jusqu'à la puberté où seuls quelques-uns seront sélectionnés chaque mois pour poursuivre leur maturation.

Cependant un seul ovocyte par cycle de 28 jours en moyenne achèvera la première division méiotique pour donner naissance à un ovocyte de deuxième ordre (ovocyte II) qui sera bloqué de nouveau en métaphase II de deuxième division. L'ovocyte II n'achèvera la méiose que s'il y a fécondation par un spermatozoïde. Les divisions par méiose (I et II) sont très inégales, l'ovocyte conserve tous les nutriments et expulse une petite cellule ne contenant que la moitié du matériel génétique (appelée globule polaire) afin d'obtenir un gamète haploïde (Figure 2).

Le nombre d'ovocytes est d'environ 7 millions à la fin du 7^{ème} mois *in utero*, d'1 million à la naissance, de 400 000 à la puberté, de 8 000 à 45 ans avec absence totale à la ménopause. La diminution du nombre d'ovocytes correspond au processus d'atrésie folliculaire.

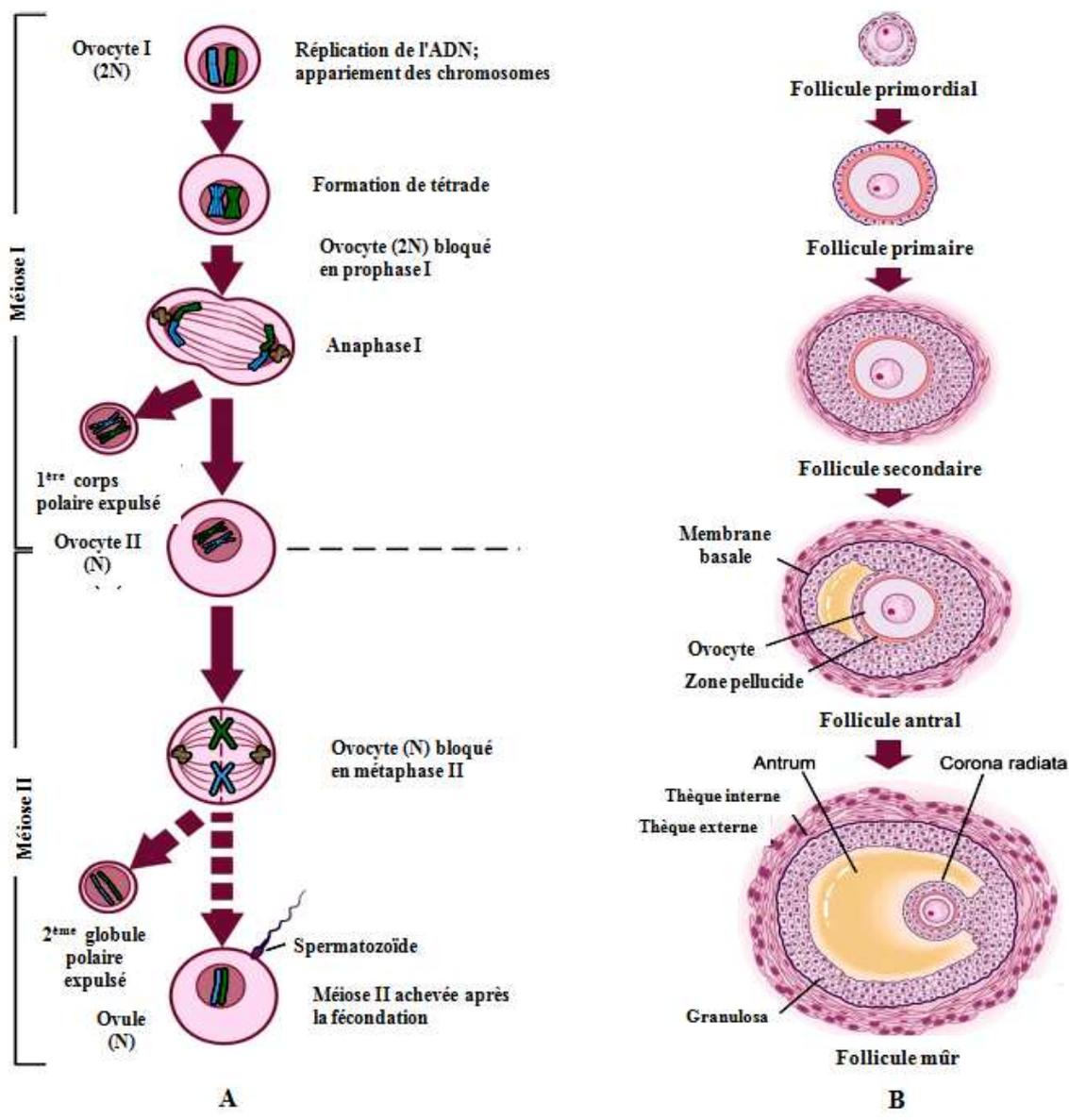


Figure 2 : Ovogenèse et folliculogenèse

(A) Méiose I et II au cours de l'ovogenèse, (B) Représentation des différentes étapes de la folliculogenèse (Desai, Ludgin et al. 2017)

Jusqu'à la puberté, les ovaires contiennent essentiellement des follicules primordiaux. La folliculogénèse est l'ensemble des phénomènes assurant la croissance et la maturation du follicule. Deux types de follicules se distinguent :

- Les follicules évolutifs ou gamétogènes dont un seul par cycle atteindra la maturité et libèrera un ovocyte II
- Les follicules involutifs qui ne dépasseront jamais le stade d'ovocyte I et dégèneront par atresie.

Différents types de follicules évolutifs existent (Figure 2) :

- Les follicules primaires : ils sont caractérisés par une seule couche de cellules folliculeuses, cubiques.
- Les follicules secondaires pré-antraux : les cellules folliculeuses sont formées de deux puis plusieurs couches de cellules cubiques constituant la granulosa. En même temps, l'ovocyte I augmente de volume et s'entoure d'une enveloppe glycoprotéique : la zone pellucide. Les cellules de la granulosa établissent des jonctions communicantes avec l'ovocyte permettant des échanges métaboliques. Les cellules du stroma ovarien qui entoure le follicule se différencient pour former la thèque interne. Les récepteurs de FSH (follicle-stimulating hormone) et de LH (luteinizing hormone) apparaissent respectivement sur les cellules de la granulosa et de la thèque interne.
- Les follicules antraux : les cellules de la granulosa ménagent entre elles des microcavités qui convergeront en une cavité unique appelée antrum contenant le liquide folliculaire. Autour de la thèque interne se forme une enveloppe fibreuse conjonctive appelée thèque externe. La membrane basale sépare toujours la granulosa de la thèque interne.
- Le follicule pré-ovulatoire ou follicule mûr ou follicule de De Graaf : l'ovocyte I, entouré des cellules de la granulosa, fait saillie dans la cavité antrale. L'ovocyte I avec les cellules granuleuses qui l'entourent directement forment le *cumulus oophorus*. La première couche de cellules du cumulus entourant la zone pellucide forme la *corona radiata*. La corona radiata est la plus visible à ce stade.

Du follicule primaire au follicule mûr, le diamètre de l'ovocyte passe d'environ 30 à 120 μm . Le noyau synthétise de grandes quantités d'ARN et le cytoplasme est le siège de nombreuses synthèses protéiques.

2. *Ovulation*

L'ovulation correspond à la rupture de la paroi du follicule et de l'ovaire. Dans les heures suivant le pic ovulatoire de LH et de FSH, l'augmentation rapide de la quantité de liquide folliculaire provoque une augmentation de la tension de la paroi, en coopération avec l'action des enzymes destructrices et lytiques, aboutissant finalement à la rupture du follicule en un endroit bien précis. De plus, sous l'influence de ce pic hormonal, l'ovocyte I, bloqué à la fin de prophase, termine la première division méiotique et produit deux cellules haploïdes : l'ovocyte II et le premier globule polaire. L'ovocyte II débute la seconde division méiotique et se bloque au stade métaphasique.

L'ovocyte II entouré de la *corona radiata* et du cumulus est expulsé avec le liquide folliculaire dans la cavité péritonéale. Il est récupéré par le pavillon de la trompe. Le follicule rompu et vidé de son contenu va former le follicule déhiscent. Il évoluera en corps jaune dans la deuxième partie du cycle : la phase lutéale.

II. L'appareil génital masculin

L'appareil génital masculin est constitué des différents organes qui assurent la production, le transport, la nutrition, le stockage des gamètes mâles (spermatozoïdes) et leur expulsion dans les voies génitales féminines lors d'un rapport sexuel.

Les testicules sont des gonades mâles productrices de spermatozoïdes, situés dans le scrotum en dehors de la cavité abdominale. Après leur production dans les tubes séminifères, les spermatozoïdes sont provisoirement stockés dans l'épididyme où ils subissent leur maturation. Lors de l'éjaculation, les spermatozoïdes parcourent le canal déférent, le canal éjaculateur et l'urètre. Tout au long du tractus génital les spermatozoïdes vont se mélanger au liquide séminal produit principalement par les vésicules séminales ($\approx 70\%$), la prostate ($\approx 30\%$) avec une très faible participation des glandes bulbo-urétrales (Varghese, Deepinder et al. 2014) (Figure 3).

L'éjaculat est composé normalement de 10% de spermatozoïdes et de 90% de liquide séminal pour un volume total de 1,5 ml à 6 ml.

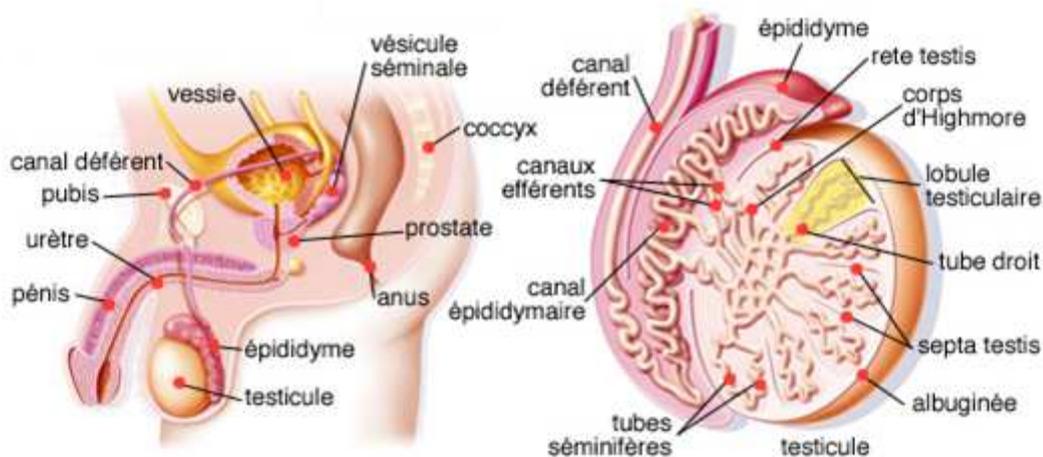


Figure 3 : Anatomie des voies génitales masculines et coupe du testicule

<http://www.arcagy.org/infocancer/localisations/cancers-masculins/cancer-du-testicule/maladie/un-peu-d-anatomie.html>

1. La spermatogenèse

La spermatogenèse est l'ensemble des événements qui aboutissent à la transformation des cellules germinales en spermatozoïdes. C'est un processus continu de la puberté à la mort. La spermatogenèse se déroule dans les tubes séminifères en association avec les cellules de Sertoli. Trois familles de cellules germinales sont impliquées dans la spermatogenèse : les spermatogonies (cellule germinale diploïde), les spermatocytes (primaire (I) et secondaire (II)) et les spermatides. Elles sont superposées entre la membrane basale et la lumière du tube séminifère.

La spermatogenèse se produit en deux étapes successives (Figure 4) :

- La spermatocytogenèse : de la spermatogonie à la spermatide ronde
- La spermiogenèse : de la spermatide au spermatozoïde.

a. La spermatocytogenèse

Elle débute par une phase de multiplication par mitoses des spermatogonies ($2n$ chromosomes/ $2n$ ADN). Cette phase dure 27 jours. Il existe trois types de spermatogonies selon Clermont (Clermont 1963) :

- Spermatogonie Ad (dark) à chromatine finement granuleuse, dense, à aspect sombre
- Spermatogonie Ap (pâle) à chromatine poussiéreuse claire
- Spermatogonie B à chromatine formant des gros grains irréguliers.

Les spermatogonies Ad sont les cellules souches de la spermatogenèse. Chaque cellule se divise par mitose en une spermatogonie Ap et une spermatogonie Ad. La spermatogonie Ad permet le renouvellement du stock des spermatogonies tandis que la spermatogonie Ap se divise par mitose en deux spermatogonies B. Les spermatogonies B sont à l'origine de la formation des spermatocytes I.

Une phase d'accroissement aura lieu après la phase de multiplication.

Durant la phase d'accroissement, le spermatocyte I effectue une réplication d'ADN (cellule à $2n$ chromosomes et 4 ADN), (stade pré-leptotène = phase S) avant d'entrer en prophase I de la méiose I. La prophase I comprend 5 stades : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse.

Lors de la prophase I, les chromosomes homologues s'apparient. Au stade pachytène, ils échangent, par crossing-over, du matériel génétique entre eux. Au cours de la métaphase I, les chromosomes homologues sont disposés de part et d'autre de la plaque équatoriale. Lors de l'anaphase I, les chromosomes homologues se séparent et migrent vers les pôles opposés. Enfin, deux cellules filles se séparent par cytotélerèse au cours de la télophase I. Après la division réductionnelle de la méiose (méiose I), le spermatocyte I donne naissance à deux spermatocytes II (cellules à n chromosomes et $2n$ ADN).

Les spermatocytes II entrent en deuxième division de méiose sans réplication préalable de l'ADN. La deuxième division est une division équationnelle similaire à une mitose somatique normale sauf qu'elle ne porte que sur n chromosomes au lieu de $2n$. La prophase II a une durée très courte. Lors de la métaphase II, les chromosomes s'alignent au niveau de leur centromère sur la plaque équatoriale.

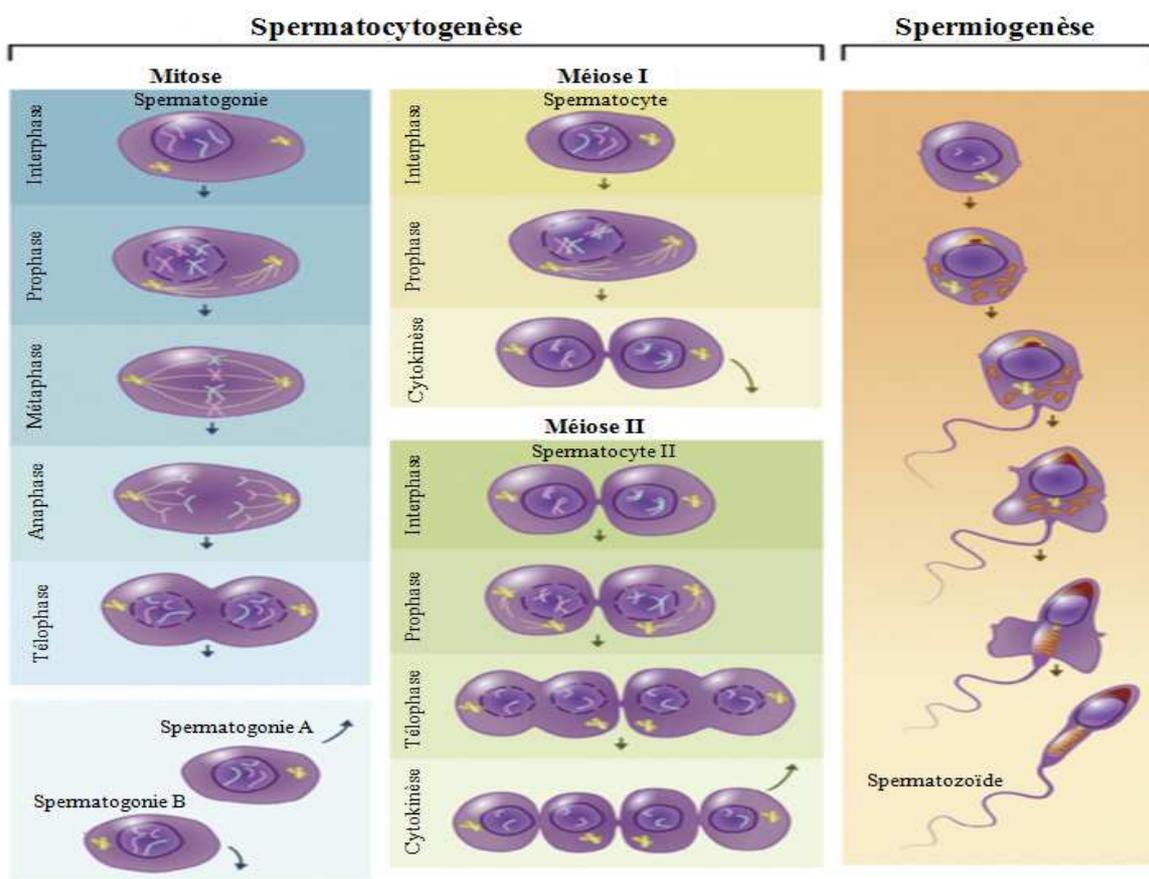


Figure 4 : Etapes de la spermatogenèse (Gunes, Al-Sadaan et al. 2015)

Au cours de l'anaphase II, les chromatides sœurs de chaque chromosome vont migrer vers les pôles cellulaires de façon aléatoire.

Après la division équationnelle de la méiose, le spermatocyte II (n chromosomes et 2n ADN) donne naissance à deux spermatides (n chromosomes et n ADN).

L'évolution des spermatocytes I en spermatocytes II s'effectue en 23 jours, et l'évolution des spermatocytes II en spermatides s'effectue en 1 jour (Czyba and Montella 1993).

b. La spermiogenèse

C'est la phase finale de la spermatogenèse au cours de laquelle les spermatides se différencient en spermatozoïdes. Elle s'effectue en 23 jours. La différenciation est caractérisée par les modifications morphologiques suivantes (Figure 5) :

- La condensation du noyau : la chromatine se condense progressivement et le noyau s'allonge. Lors de cette étape de compaction, la majorité des histones de type somatique est remplacée par des nucléoprotéines plus basiques (protéines de transition TNP1, TNP2) qui sont elles-mêmes remplacées par des nucléoprotéines riches en arginine et cystéine (protamines P1, P2) (cette partie sera détaillée dans « 3. Remodelage de la chromatine spermatique »).
- La formation de l'acrosome : l'appareil de Golgi fournit de nombreuses vésicules qui confluent et fusionnent ensemble afin de former une vésicule pro-acrosomique à l'origine de l'acrosome recouvrant les deux tiers antérieurs du noyau. L'acrosome contient des enzymes hydrolytiques (hyaluronidase, neuraminidase, phosphatase acide, proacrosine) indispensables à la traversée de la zone pellucide de l'ovocyte au moment de la fécondation.
- La formation du flagelle : tout commence par un prolongement du centriole distal en axonème dans le flagelle. Le centriole distal est à l'origine de l'axonème du flagelle, équivalent d'un long cil formé d'un doublet central et d'un cylindre de 9 doublets périphériques. Les microtubules de l'axonème s'allongent et repoussent la membrane plasmique en un doigt de gant.
- La formation du manchon mitochondrial : les mitochondries s'allongent et se disposent en spirales autour de la première partie de l'axonème.

- La réorganisation du cytoplasme : elle se fait par élimination de la majeure partie du cytoplasme via des corps résiduels. Ces corps seront phagocytés par les cellules de Sertoli.

Après la phase de différenciation, les spermatozoïdes formés ne contiennent pas de réticulum endoplasmique, d'appareil de Golgi, de lysosome ou de peroxysoxe ni de ribosome cytosolique.

A ce stade, les spermatozoïdes n'ont pas encore acquis leur mobilité et leur pouvoir fécondant. Au cours du transit épидидymaire, les spermatozoïdes subissent des modifications pour acquérir leur maturation complète. Les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité, sous l'effet des sécrétions épидидymaires. De plus, à ce niveau, des sites de reconnaissance de la zone pellucide et un facteur de décapacitation viennent se fixer sur la membrane des spermatozoïdes pour empêcher l'expression prématurée de leur pouvoir fécondant.

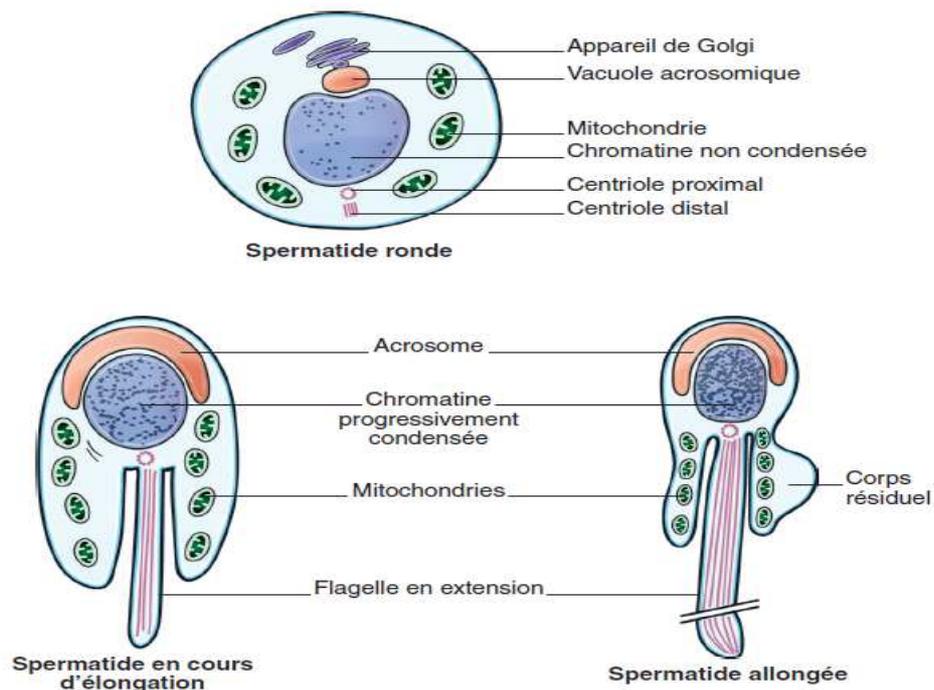


Figure 5 : Etapes de la spermiogenèse
(Guérin 2016)

c. Le spermatozoïde

Le spermatozoïde est une cellule de 60 μm de longueur. Il est formé par (Figure 6) :

- Une tête aplatie qui mesure 4 à 5 μm de longueur sur 2 à 3 μm de largeur. Elle contient le noyau coiffé par l'acrosome.
- Un col qui correspond à la zone de jonction entre la tête et le flagelle. C'est une région très complexe qui renferme l'appareil centriolaire et la pièce connective.
- Un flagelle qui comporte 3 parties : une pièce intermédiaire mesurant 4 à 5 μm très riche en mitochondries qui fournissent l'énergie nécessaire au mouvement flagellaire, une pièce principale (45 μm) et une pièce terminale (1 à 2 μm).

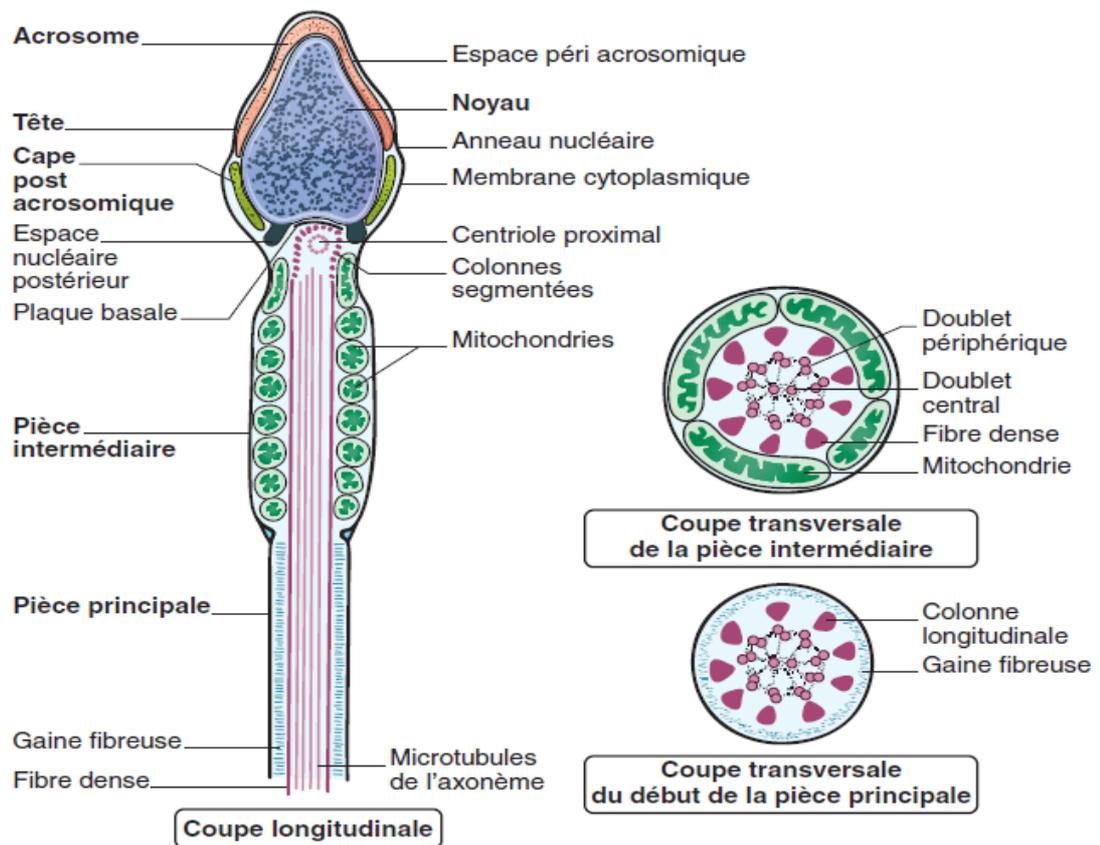


Figure 6 : Ultra-structure d'un spermatozoïde humain (Guérin 2016)

2. Remodelage de la chromatine spermatique

Après la méiose, la chromatine du spermatozoïde subit une série de modifications lui permettant de passer d'une organisation nucléosomale à une organisation très compacte sous forme « doughnut » (Figure 7).

Dans les cellules somatiques, la molécule d'ADN est enroulée autour d'un octamère d'histones ((H2A, H2B, H3 et H4) \times 2) pour former un nucléosome. Dès le début de la spermatogénèse, ces histones somatiques sont remplacées par des variantes d'histones spécifiques des testicules (Govin, Caron et al. 2004, Rousseaux, Caron et al. 2005) puis par des protamines au stade spermiogénèse. Environ 85% des histones seront remplacées par des protamines (Gatewood, Cook et al. 1987, Bench, Friz et al. 1996). Le phénomène de remodelage est facilité par le relâchement coordonné de la chromatine par hyperacétylation des histones et par l'action de l'ADN topoisomérase II.

L'acétylation neutralise les résidus de lysine chargés positivement des extrémités N-terminales de l'histone, diminuant ainsi leur affinité pour l'ADN, ce qui entraînerait le relâchement des nucléosomes (Grunstein 1997).

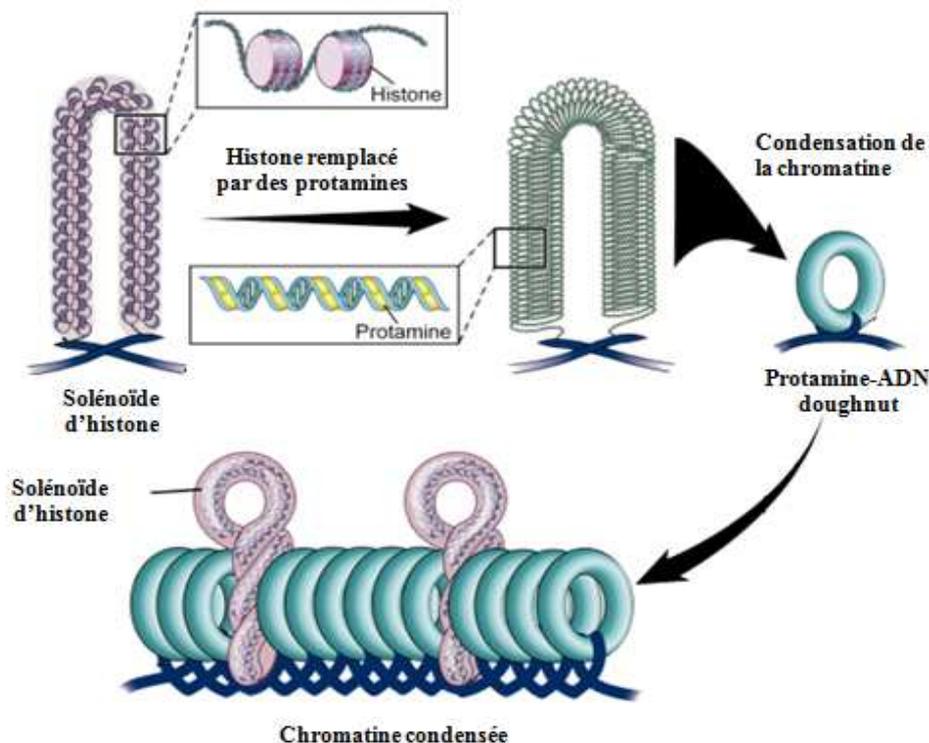


Figure 7 : Modèle d'organisation de l'ADN spermatique
(Ward 2010, Singh and Agarwal 2011)

L'ADN topoisomérase II présente une activité endonucléasique. Elle crée des cassures temporaires dans l'ADN pour libérer les super-enroulements de la chromatine et elle-même ligature normalement ses cassures temporaires avant l'achèvement de la spermiogenèse et de l'éjaculation (McPherson and Longo 1993, McPherson and Longo 1993, Laberge and Boissonneault 2005, Sharma and Agarwal 2011).

La transition entre l'histone et la protamine se produit en deux étapes.

Au stade spermatide ronde, les histones sont remplacées par des protéines de transition (TNP1 et TNP2), nécessaires pour la condensation normale de la chromatine. Elles sont impliquées dans la réduction du nombre des cassures de l'ADN et la perte éventuelle de l'intégrité génomique du spermatozoïde (Sharma and Agarwal 2011).

Au stade d'élongation des spermatides, les protéines de transition sont remplacées par des protamines (PRM1 et PRM2). Les protamines (1 et 2) sont des protéines très basiques caractérisées par un noyau riche en arginine et en résidus de cystéine (Dixon, Aiken et al. 1985). Le taux élevé d'arginine entraîne une charge positive nette, qui facilite une forte liaison à l'ADN (Balhorn, Brewer et al. 2000). Les résidus de cystéine facilitent la formation de plusieurs ponts disulfures inter et intra-protamines responsables de la compaction et de la stabilisation du noyau spermatique (Courtens and Loir 1981, Szczygiel and Ward 2002).

Après le remodelage, la chromatine des spermatozoïdes devient 6 fois plus condensée que celle des cellules somatiques (Sergerie, Bleau et al. 2005). Cette caractéristique de chromatine spermatique a plusieurs avantages : elle permet la réduction du volume nucléaire du spermatozoïde et par conséquent elle lui confère une structure hydrodynamique. De plus, elle assure une protection du génome paternel pendant le transport à travers les organes reproducteurs mâles et femelles et aide à assurer « sa livraison » à l'ovocyte en bon état.

3. Expression différentielle des gènes du spermatozoïde

a. Présence des ARN dans les spermatozoïdes matures

La spermatogenèse est un phénomène biologique complexe régulé par des processus transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel. Des études comparatives d'activités transcriptionnelles entre les différents stades des cellules germinales au cours de la spermatogenèse ont identifié une augmentation spectaculaire des activités transcriptionnelles au niveau du stade spermatogonie jusqu'au stade spermatide ronde. Elles sont ensuite bloquées pendant la différenciation en spermatozoïdes (Monesi 1965, Geremia, D'Agostino et al. 1978, Dadoune, Siffroi et al. 2004). Ces activités permettent de synthétiser des transcrits

indispensables pour la transformation des spermatides en spermatozoïdes matures (Kleene 2003). Les spermatozoïdes sont des cellules hyper-différenciées dépourvues de cytoplasme, avec un ADN condensé. Ils sont considérés transcriptionnellement et traductionnellement inactifs vu l'absence d'ARN ribosomiques intacts (Johnson, Sandler et al. 2011).

Néanmoins, en 1989, Pessot et ses collaborateurs ont mis en évidence la présence d'ARN dans le noyau du spermatozoïde à l'aide d'ARNase couplée à des billes d'or (Pessot, Brito et al. 1989). Quelques années plus tard, de nombreuses études ont confirmé la présence d'ARN messenger (ARNm) dans les spermatozoïdes matures grâce à la RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) et l'hybridation *in situ* (ISH) (Kumar, Patel et al. 1993, Chiang, Steuerwald et al. 1994, Miller, Tang et al. 1994, Wykes, Visscher et al. 1997). Suite à cette découverte, de nombreuses interrogations ont été posées sur le rôle biologique de ces transcrits : ont-ils un rôle dans la fertilité masculine ? Est-ce que les spermatozoïdes jouent simplement le rôle de vecteur de transfert du génome paternel dans l'ovocyte ?

En 2002, une équipe américaine a décrit pour la première fois le profil complet d'expression des gènes dans les spermatozoïdes d'hommes fertiles normaux par microarray (Ostermeier, Dix et al. 2002). En fait, ces auteurs ont étudié et comparé le profil génétique dans le testicule chez des hommes histologiquement normaux, victimes de traumatismes et âgés de 17 à 61 ans et dans le sperme éjaculé chez des volontaires fertiles. Ils ont détecté 7 157 transcrits dans un pool de 19 testicules, 3 281 transcrits dans un pool de 9 spermes éjaculés et 2 780 transcrits dans le sperme éjaculé individuel. De plus, ils ont montré que les transcrits identifiés dans les spermatozoïdes sont retrouvés également dans le tissu testiculaire. Par conséquent, ces auteurs ont supposé que les ARNm sont une réplique des gènes qui sont à l'état actif dans les différentes cellules de la lignée germinale. Ces transcrits sont donc le reflet des événements intervenus lors de la spermatogenèse (Ostermeier, Dix et al. 2002). Plus tard, certaines équipes ont focalisé leurs travaux sur l'étude du transcriptome dans le spermatozoïde par microarray dans le but d'identifier les mécanismes sous-jacents de l'infertilité masculine vraisemblablement dus à des gènes impliqués dans la spermatogenèse (Platts, Dix et al. 2007, Linschooten, Van Schooten et al. 2009, Nguyen, Delaney et al. 2009, Garcia-Herrero, Meseguer et al. 2010b, Garcia-Herrero, Garrido et al. 2011, Bonache, Mata et al. 2012, Jodar, Kalko et al. 2012, Montjean, De La Grange et al. 2012, Metzler-Guillemain, Victorero et al. 2015). D'autres équipes ont réalisé des séquençages de l'ARN spermatique afin d'identifier, qualifier et caractériser la population des transcrits spermatiques (Krawetz, Kruger et al. 2011, Jodar, Selvaraju et al. 2013, Sandler, Johnson et al. 2013, Schuster, Tang et al. 2016).

Dans les spermatozoïdes humains, les ARN sont localisés principalement dans la tête de spermatozoïde (Dadoune, Pawlak et al. 2005) ou dans la pièce intermédiaire (Kumar, Patel et al. 1993). Ces ARN forment une population complexe comprenant des ARN longs codants et non codants et de petits ARN non codants (Jodar, Selvaraju et al. 2013).

b. Fonctions des ARN spermatiques

Dès l'identification de l'ARN au niveau des spermatozoïdes matures, différentes hypothèses ont été émises pour expliquer leurs rôles dans l'infertilité masculine, au cours du développement embryonnaire et leurs impacts sur la progéniture.

L'un des rôles hypothétiques proposé est son implication dans le remodelage de la chromatine spermatique au cours de la spermatogénèse. Puisque les ARN spermatiques sont un composant connu de l'enveloppe nucléaire (Kramer and Krawetz 1997), il est possible qu'ils jouent un rôle passif pour stabiliser les interactions entre l'enveloppe nucléaire et l'ADN lié aux histones (Miller, Ostermeier et al. 2005) (Figure 8).

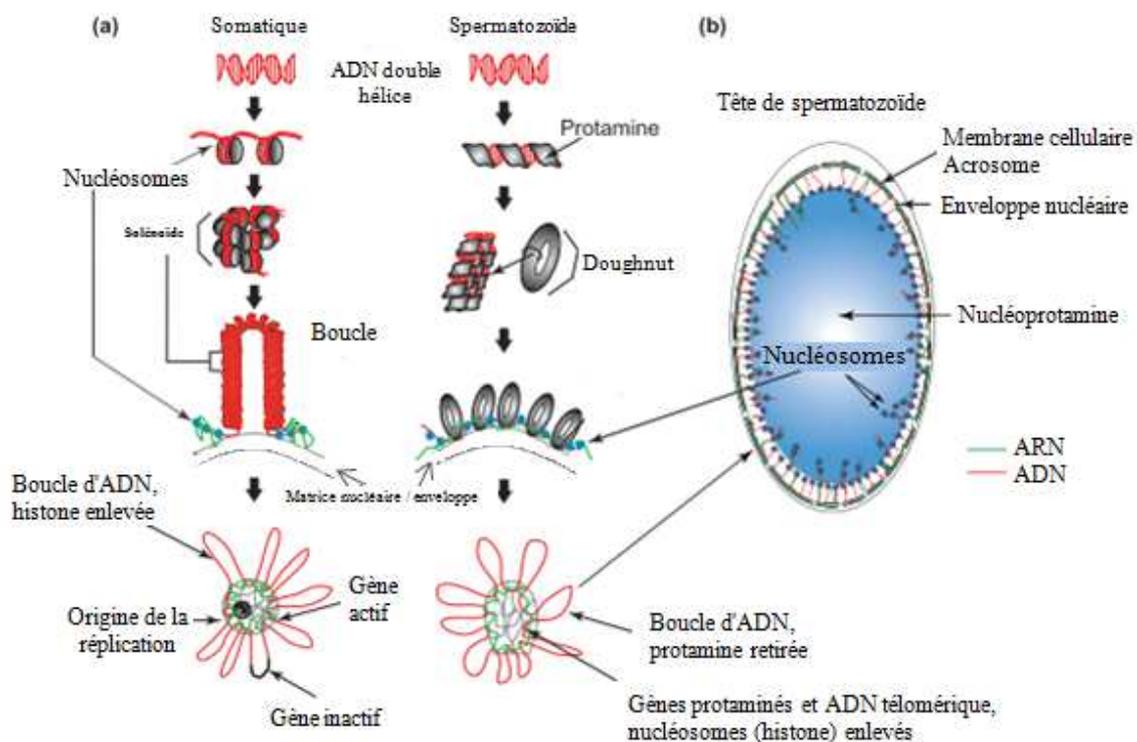


Figure 8 : Relation entre l'ADN, l'ARN et la matrice nucléaire dans les spermatozoïdes
 (a) Comparaison entre l'organisation de l'ADN des cellules somatiques et des spermatozoïdes,
 (b) Répartition de l'ADN, l'ARN et la matrice nucléaire (Miller, Ostermeier et al. 2005)

Ils pourraient avoir également un rôle actif au cours de la protamination (Hamatani 2012). Hammoud et al ont montré que les nucléosomes retenus dans les spermatozoïdes matures n'étaient pas simplement le résultat d'une protamination aléatoire et inefficace, mais étaient significativement enrichis dans de nombreux locus importants pour le développement embryonnaire (Hammoud, Nix et al. 2009). Par conséquent les ARNm du spermatozoïde pourraient faciliter l'échappement sélectif des séquences liées aux histones d'un reconditionnement par les protamines (Hamatani 2012).

D'autres fonctions possibles de l'ARN spermatique comprennent la traduction de *novo* pour remplacer des protéines dégradées ou dénaturées (Miller and Ostermeier 2006) qui pourraient avoir une fonction pendant ou après le processus de fécondation (Gur and Breitbart 2006). L'activité traductionnelle a été démontrée par l'incorporation d'acides aminés marqués dans des polypeptides pendant la capacitation des spermatozoïdes, complètement inhibée par les inhibiteurs de la traduction mitochondriale mais pas par l'inhibiteur de la traduction cytoplasmique (Gur and Breitbart 2006). Ces auteurs ont suggéré que la traduction est maintenue par les ribosomes 55S mitochondriaux pendant la capacitation (Gur and Breitbart 2006).

Par ailleurs un rôle fonctionnel des ARN spermatiques a été démontré puisqu'ils ont été retrouvés dans les ovocytes de souris après fécondation et détectés ensuite dans les zygotes (Hayashi, Yang et al. 2003, Rassoulzadegan, Grandjean et al. 2006). En utilisant la fécondation hétérospécifique de spermatozoïdes humains avec des ovocytes d'hamster doré, les transcrits de clustérine (sulfated glycoprotein-2 ou SGP-2) et de PRM2 ont été détectés de façon constante dans les spermatozoïdes humains et dans les zygotes respectivement à 30 min et à 3 heures après la fécondation, mais pas dans les ovocytes non fécondés (Ostermeier, Miller et al. 2004). De plus, des transcrits de spermatozoïdes tels que PSG1 (pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 1) et HLA-E (human leukocyte antigen E) ont été également détectés 24 heures après la fécondation des ovocytes (Avendano, Franchi et al. 2009). Ces résultats suggèrent que les ARN spermatiques jouent un rôle important dans le développement embryonnaire précoce.

En fait, la clustérine, protéine épидидymaire, possède un rôle majeur dans la maturation des spermatozoïdes et dans l'interaction entre le spermatozoïde et la zone pellucide de l'ovocyte lors de la fécondation (Moura, Chapman et al. 2007). La PSG1 est une glycoprotéine synthétisée en grande quantité par les trophoblastes. Cette protéine peut jouer un rôle crucial dans le soutien de la gestation précoce et la protection du fœtus contre le système immunitaire

maternel (Avendano, Franchi et al. 2009). La protéine de HLA-E permet d'éviter la surveillance des cellules NK (natural Killer Cells) maternelles (Avendano, Franchi et al. 2009). D'autres transcrits détectés dans les spermatozoïdes peuvent avoir une fonction potentielle dans l'ovocyte fécondé telle que AKAP-4 (A-Kinase anchoring protein 4), FOXG1B (forkhead box G1B), WNT5A (wingless-type MMTV integration site family, member 5A). AKAP-4 est une protéine impliquée dans les cascades de signalisation pour l'activation initiale des ovocytes après la fécondation (Miki, Willis et al. 2002). Le transcrit FOXG1B est important pour la structuration embryonnaire précoce et le transcrit WNT5A est impliqué dans la différenciation cellulaire associée à la structuration morphologique (Krawetz 2005). En outre, l'ARN codant PLC-zêta (phospholipase C zêta) a été détecté dans les spermatozoïdes matures et son injection dans les œufs de souris provoque des oscillations Ca^{2+} et l'activation des œufs (Sone, Ito et al. 2005).

Néanmoins, les ARN livrés dans l'ovocyte par le spermatozoïde n'ont pas tous une fonction dans l'ovocyte fécondé et dans le développement précoce de l'embryon, notamment les transcrits spécifiques des spermatozoïdes. La protamine-2 représente un exemple de ces transcrits. Le gène codant la protamine-2 est spécifiquement et uniquement exprimé avant et pendant la phase de condensation de l'ADN dans les spermatides. Son expression dans l'ovocyte fécondé est supposée être délétère et l'ARNm est rapidement dégradé (Ziyyat and Lefevre 2001, Hayashi, Yang et al. 2003).

Suite à la découverte de l'équipe d'Ostermeier (Ostermeier, Dix et al. 2002) et au vu de la complexité des transcrits de la population des ARN spermatiques, certaines équipes ont suggéré un effet épigénétique sur l'embryon engendré notamment par les ARN non codants. Cette hypothèse a été confirmée par certains auteurs indiquant que l'ARN spermatique peut assurer une hérédité génétique non mendélienne (Grandjean, Gounon et al. 2009, Krawetz, Kruger et al. 2011, Gapp, Jawaid et al. 2014). Le niveau d'expression de sncARN (small noncoding RNA) tel que les microARN (miRNA), les piwi-interacting ARN (piARN), les fragments d'ARNt et de petits fragments d'ARN nucléaires a été signalé être modifié dans les spermatozoïdes des hommes obèses (Donkin, Versteijhe et al. 2016). Une altération de l'expression du piARN pourrait moduler de manière coordonnée l'expression des gènes impliqués dans le comportement et la prise alimentaire et pourrait participer à prédisposer la progéniture à l'obésité (Donkin, Versteijhe et al. 2016).

B. Infertilité

I. Définition

Depuis 2009, selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et l'ICMART (Comité International pour la Surveillance des Techniques d'Assistance à la Reproduction) l'infertilité est définie par « l'incapacité d'obtenir une grossesse clinique après au moins 12 mois de rapports sexuels réguliers non protégés » (Zegers-Hochschild, Adamson et al. 2009, Zegers-Hochschild, Adamson et al. 2009). Récemment en 2017, au niveau du dernier glossaire international sur le soin de l'infertilité et de la fertilité, la définition de l'infertilité a été élargie à une « déficience des individus » dans leurs capacités à se reproduire, qu'ils aient ou non un partenaire (Zegers-Hochschild, Adamson et al. 2017, Zegers-Hochschild, Adamson et al. 2017). Elle est considérée comme une maladie qui engendre un handicap comme une altération de la fonction (Zegers-Hochschild, Adamson et al. 2017, Zegers-Hochschild, Adamson et al. 2017). Elle concerne entre 8 et 12% des couples en âge de procréer dans le monde (Inhorn and Patrizio 2015).

L'infertilité peut être primaire ou secondaire : un couple ou un individu avec une infertilité primaire est défini comme n'ayant jamais eu de grossesse, alors que s'il y a eu une grossesse, l'infertilité est secondaire (Zegers-Hochschild, Adamson et al. 2017, Zegers-Hochschild, Adamson et al. 2017).

Le terme de « stérilité » doit être réservé à un état permanent de l'infertilité (Zegers-Hochschild, Adamson et al. 2017, Zegers-Hochschild, Adamson et al. 2017). La proportion de couples réellement stériles est de 3 à 4 % (Spira 1986).

II. Etiologies

L'analyse de la répartition des causes de perturbation de fertilité montre que dans environ 39% des cas l'infertilité est due à des facteurs féminins, dans 20% des cas elle résulte de facteurs masculins, dans 26% des cas elle est causée par une association des facteurs féminins et masculins (mixte) ou alors idiopathique dans 15% des cas (Nieschlag 2010).

1. Etiologie de l'infertilité féminine

Les principales causes de l'infertilité féminine sont représentées par (Keel, May et al. 2000) :

- Des troubles de l'ovulation dans 25 à 30%
- Une endométriose dans 25 à 30%
- Des obstructions tubaires dans 20 à 30%
- Des anomalies utérines dans 5%.

Troubles de l'ovulation :

L'ovulation peut être absente (anovulation) ou présente de façon irrégulière (dysovulation). Un dysfonctionnement des ovaires (origine ovarienne) ou de l'axe hypothalamo-hypophysaire (origine centrale) peut être à l'origine de ces troubles :

- L'origine ovarienne peut être due à :
 - un hypogonadisme ovarien congénital ou acquis : en lien avec des facteurs génétiques (Syndrome de Turner), des maladies auto-immunes, une chimiothérapie, une radiothérapie, des toxiques, une infection par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) (Keel, May et al. 2000, Jin, Yu et al. 2012)...
 - une dysovulation : avec par exemple un syndrome des ovaires polykystiques (Keel, May et al. 2000, Meniru 2004).
 - une tumeur ovarienne.
- L'origine centrale peut être due à :
 - un stress, des exercices intensifs, une diminution brutale du poids corporel (Keel, May et al. 2000), une mauvaise hygiène de vie, le tabac, l'alcool, l'âge...
 - une hyperprolactinémie (Keel, May et al. 2000).

Endométriose :

L'endométriose est caractérisée par des localisations anormales du tissu de l'endomètre (ovaires, trompes, cavité péritonéale). Ce tissu mal placé peut provoquer des lésions tubaires ou ovariennes, voire même une perturbation de l'ovulation (Healy, Trounson et al. 1994, Meniru 2004).

Obstructions tubaires :

Les trompes de Fallope correspondent au site de fécondation. Les obstructions tubaires sont le plus souvent d'origine infectieuse en particulier les infections à Chlamydia (Meniru 2004). Elles peuvent être dues aussi à une malformation congénitale, une intervention chirurgicale (grossesse extra-utérine) ou de l'endométriose (Meniru 2004).

Anomalies utérines :

La cavité utérine est le lieu de nidation. Les pathologies utérines pouvant empêcher l'implantation sont le fibrome, l'endométrite (infection de l'endomètre), les malformations utérines acquises ou congénitales (Meniru 2004).

Les anomalies du cervix peuvent dans certains cas être une cause d'infertilité. La glaire cervicale peut être sécrétée de façon inadéquate : peu ou pas de production de mucus, glaire épaisse, glaire hostile aux spermatozoïdes (présence d'anticorps anti-spermatozoïdes) (Meniru 2004).

2. Etiologie de l'infertilité masculine

Les causes d'infertilité sont multiples et souvent multifactorielles chez un même individu. Dans 61% des cas, elle est associée à des perturbations de la spermatogenèse qui peuvent provoquer des anomalies quantitatives et/ou qualitatives du sperme (Thonneau, Marchand et al. 1991, Schlosser, Nakib et al. 2007).

Causes pré-testiculaires :

Les causes endocriniennes sont rares (Boyer, Ravel et al. 1999), elles sont dues à un dysfonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire par atteinte congénitale génétique, anatomique, tumorale, traumatique, ischémique (drépanocytose) ou toxique (thalassémie, drépanocytose ou hémochromatose). Ces troubles entraînent un hypogonadisme hypogonadotrope (Schlosser, Nakib et al. 2007).

Causes testiculaires :

L'altération de la fonction exocrine du testicule peut être causée par des lésions traumatiques et ischémiques (torsion du cordon spermatique, chirurgie, varicocèle), l'hyperthermie, l'exposition aux rayonnements ionisants ou aux toxiques environnementaux (tabac, alcool...)

ou médicamenteux (Schlosser, Nakib et al. 2007). Elle peut être également d'origine génétique : anomalies chromosomiques ou microdélétions du chromosome Y (Foresta, Moro et al. 2001, Turek and Pera 2002, Schlosser, Nakib et al. 2007).

Causes post-testiculaires :

Les étiologies post-testiculaires se traduisent par l'obstruction des voies génitales. Elle peut être congénitale : agénésie vésiculodéférentielle congénitale (forme génitale de mucoviscidose) (Turek and Pera 2002) ou acquise : obstructions tumorales, infectieuses ou iatrogènes post-chirurgicales (Schlosser, Nakib et al. 2007).

C. Les diagnostics de l'infertilité

Selon l'OMS, les diagnostics de l'infertilité peuvent être initiés en moins d'un an en fonction des antécédents médicaux, sexuels et reproductifs, de l'âge, des résultats physiques et des tests de diagnostic (Zegers-Hochschild, Adamson et al. 2017, Zegers-Hochschild, Adamson et al. 2017). Le diagnostic de l'infertilité chez un couple le concerne dans son ensemble (aussi bien la femme que l'homme). L'exploration de l'infertilité consiste à faire un interrogatoire, un examen clinique, des analyses biologiques et des examens complémentaires pour chacun des partenaires (Khallouk, Tazi et al. 2010, Yazbeck 2016) :

I. Exploration de l'infertilité féminine

L'exploration de la fertilité féminine est souvent plus longue et plus approfondie que celle de l'homme. Parmi les investigations il y a un interrogatoire et de nombreux examens :

Interrogatoire :

- Âge, poids, consommations (tabac, alcool, drogues, certains médicaments) et expositions (toxiques, chimiques, métaux lourds, polluants organiques...)...
- Les antécédents gynéco-obstétricaux : âge des premières règles, longueur du cycle, syndrome prémenstruel, durée des règles, mode de contraception utilisé antérieurement,

grossesses antérieures et leur issue, notion d'infection génitale basse ou haute (salpingite) et explorations chirurgicales utéro-annexielles...

- Les antécédents médicaux : maladie chronique (diabète, hypertension, dysfonctionnement thyroïdien), antécédent de maladie infectieuse (tuberculose) ou cancer traité par chimiothérapie ou radiothérapie...
- Les antécédents chirurgicaux : chirurgie digestive ou pelvienne...

Examens :

- Courbe de température : l'ovulation s'accompagne d'une élévation corporelle de 0,4 à 0,5°C. L'établissement de cette courbe peut permettre d'évaluer la qualité de l'ovulation.
- Bilan hormonal : bilan de réserve ovarienne (FSH, œstradiol et AMH), pour identifier une hyperprolactinémie (dosage de prolactine) et un dysfonctionnement thyroïdien (dosage de TSH (thyroid stimulating hormone)).
- Examens par imagerie des organes génitaux : permettent d'identifier et d'évaluer les anomalies au niveau de l'utérus, des ovaires ou des trompes. Selon les cas, il est possible d'utiliser l'échographie, l'échographie pelvienne, l'hystérosalpingographie (HSG), la cœlioscopie (ou laparoscopie), l'hystérocopie...
- Test post-coïtal de Hühner : permet d'étudier la qualité de la glaire cervicale après un rapport sexuel ainsi que le comportement des spermatozoïdes.
- Examen génétique : un caryotype peut être demandé.
- Sérologie Chlamydiae, dépistage VIH, virus de l'hépatite B (VHB), virus de l'hépatite C (VHC) et syphilis.

II. Exploration de l'infertilité masculine

L'exploration de la fertilité masculine s'accompagne également d'un interrogatoire et divers examens.

Interrogatoire :

- Âge, poids, fertilité personnelle et familiale, consommations (tabac, alcool, drogues, certains médicaments) et les expositions professionnelles (chaleur, toxiques chimiques, métaux lourds, polluants organiques...).
- Les antécédents médicaux : développement de la puberté, notion de traumatisme testiculaire, de cryptorchidie, antécédents d'infections urinaires ou génitales (modalités de diagnostic et traitement)...
- Les antécédents chirurgicaux : intervention chirurgicale sur les testicules ...

Examens :

- Spermogramme-spermocytogramme : c'est l'examen de première intention à réaliser chez l'homme en cas d'infertilité du couple. Il fournit :
 - Des informations indirectes sur l'état des voies génitales et des glandes associées, prostate et vésicules séminales (leurs sécrétions constituent le liquide séminal qui se mélange aux spermatozoïdes lors de l'éjaculation).
 - Une évaluation globale sur les aspects qualitatifs et quantitatifs concernant les spermatozoïdes et les autres cellules présentes dans le sperme.

Le spermogramme représente tous les tests macro et microscopiques du sperme réalisés à l'état frais. Après liquéfaction du sperme, une analyse des principaux paramètres spermatiques est effectuée selon les normes proposées par l'organisation mondiale de la santé (WHO 2010) (Tableau 1).

Le spermocytogramme représente l'analyse morphologique des spermatozoïdes humains comprenant l'évaluation du pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux, l'analyse de la fréquence des diverses anomalies morphologiques et le calcul de l'index des anomalies multiples ($IAM = \text{Nombre total d'atypies recensées} / \text{Nombre de spermatozoïdes atypiques}$). En se basant sur la classification de David modifiée (Auger, Eustache et al. 2000), différentes anomalies sont constatées : 7 anomalies de la tête, 3 anomalies de la pièce intermédiaire et 5 anomalies du flagelle (Auger, Eustache et al. 2000) (Tableau 1).

Tableau 1 : Normes officielles des paramètres du spermogramme selon l'OMS et spermocytogramme selon la classification de David modifiée

(Auger, Eustache et al. 2000, WHO 2010)

Paramètres	Normes	Définition de l'anomalie
Volume	[1,5ml, 6ml]	< 1,5ml = hypospermie > 6ml = hyperspermie
Numération	[15 millions/ml, 200 millions/ml] ≥ 39 millions (au total)	0 = azoospermie < 15 millions/ml = oligozoospermie > 200 millions/ml = polyzoospermie
Mobilité	Mobilité progressive de type (a+b) : ≥ 32% Mobilité de type (a+b+c) : ≥ 40%	(a+b) < 32% = asthénozoospermie (a+b+c) < 40% = asthénozoospermie
Vitalité	≥ 58%	< 58% = nécrozoospermie
Leucocytes	≤ 1 million/ml	> 1 million/ml = leucospermie
Formes normales classification David modifiée	≥ 15%	< 15% = tératozoospermie

Si ces analyses de la quantité et/ou de la qualité des spermatozoïdes mettent en évidence une anomalie spermatique, d'autres examens peuvent être prescrits :

- Bilan hormonal : FSH, testostérone, inhibine B
- Dosage des marqueurs du liquide séminal
- Spermoculture : réalisée à la recherche d'une infection
- Examens d'imagerie : l'échographie permet de visualiser les testicules, la prostate et les vésicules séminales
- Bilan immunologique : permet d'identifier la présence d'anticorps anti-spermatozoïdes, par exemple à la suite d'un traumatisme au niveau de l'appareil génital
- Examens génétiques : caryotype, évaluation de la fragmentation de l'ADN, recherche de microdélétion du chromosome Y, etc.

Cependant, environ 15% des hommes infertiles ont des spermogrammes normaux (Agarwal and Allamaneni 2005). De plus, certains auteurs ont rapporté que les spermatozoïdes de morphologie apparemment normale peuvent présenter des dommages au niveau de l'ADN (Avendano, Franchi et al. 2009), pouvant affecter la qualité embryonnaire et l'évolution de la grossesse (Avendano, Franchi et al. 2010). Par conséquent, un diagnostic définitif de l'infertilité masculine ne peut souvent pas être donné à la suite de l'analyse de routine du sperme (Schulte, Ohl et al. 2010).

Dans la partie suivante nous nous intéresserons plus particulièrement aux causes cytogénétiques et moléculaires de l'infertilité masculine.

D. Aspects cytogénétique et moléculaire de l'infertilité masculine

I. Anomalies chromosomiques et infertilité masculine

Une anomalie chromosomique est une anomalie qui touche un ou plusieurs chromosomes. La relation entre ces anomalies et l'infertilité a été suspectée pour la première fois par Ferguson-Smith, Lennox et al. (1957). Ils ont identifié des corpuscules de Barr chez 10 des 91 hommes ayant une azoospermie ou une oligozoospermie sévère (Ferguson-Smith, Lennox et al. 1957). Deux ans plus tard, Jacobs et Strong ont identifié chez ces hommes présentant un syndrome de Klinefelter, la présence d'une constitution chromosomique 47,XXY (Jacobs and Strong 1959). Depuis cette découverte, plusieurs études ont rapporté que les anomalies chromosomiques pouvaient être associées à des troubles de la spermatogenèse et à l'infertilité masculine (Kjessler 1966, Plymate, Bremner et al. 1976, De Braekeleer and Dao 1991, Miharu 2005, Sun, Ko et al. 2006, Yatsenko, Yatsenko et al. 2010, Pylyp, Spinenko et al. 2013). Une méta-analyse des études des anomalies chromosomiques chez les hommes infertiles a montré que chez 8 952 patients infertiles, 600 (6,7%) présentent une anomalie chromosomique (De Braekeleer, Perrin et al. 2006), tandis que sur 10 202 caryotypes de donneurs fertiles, une anomalie chromosomique est présente seulement sur 38 caryotypes (0,37%) (Ravel, Berthaut et al. 2006). De plus, dans la population des hommes infertiles, la forte prévalence des anomalies chromosomiques est retrouvée chez les hommes atteints de troubles sévères de la spermatogenèse. Elles sont identifiées chez 4,2% des patients avec oligozoospermie et chez 13,48% des patients présentant une azoospermie (De Braekeleer, Perrin et al. 2006). Elles consistent principalement en une constitution XXY, ou une translocation robertsonienne, ou réciproque équilibrée (De Braekeleer and Dao 1991, De Braekeleer, Perrin et al. 2006).

1. Anomalies chromosomiques constitutionnelles

Les anomalies chromosomiques chez les hommes infertiles sont classées en deux grands groupes :

- Les anomalies de nombre des chromosomes (aneuploïdies) : le syndrome de Klinefelter 47,XXY (3,8%) ou en mosaïque 47,XXY/46,XY (0,5%), les autres anomalies de nombre des gonosomes dont la formule 47,XXY (0,5%) ou encore la formule chromosomique 46,XX (0,1%) et la formule chromosomique 45,X/46,XY (rare) (Chang, Clark et al. 1990, De Braekeleer, Perrin et al. 2006).
- Les anomalies de structure des chromosomes : anomalie de structure du chromosome Y (0,5%), translocation robertsonienne (0,6%), translocation réciproque équilibrée (0,3%), marqueurs chromosomiques surnuméraires (0,2%) ou inversion (0,1%) (De Braekeleer, Perrin et al. 2006).

a. Anomalies chromosomiques de nombre

Une anomalie chromosomique de nombre est définie par un nombre anormal de chromosomes d'une même paire. Un chromosome entier d'une paire peut être absent (monosomie) ou en excès (trisomie) chez un individu. Ces anomalies numériques sont plus souvent dues à un défaut de ségrégation (non disjonction méiotique) au cours de la méiose et rarement dues à une erreur mitotique postzygotique. Elles peuvent également être le résultat d'un retard chromosomique au cours de l'anaphase (anaphase lag) entraînant une perte chromosomique (Smyth and Bremner 1998, May-Panloup, Malinge et al. 2001, Flannigan and Schlegel 2017). Leur incidence est estimée à 35% des avortements, 4% des morts-nés et 0,3% des enfants nés (Hassold, Abruzzo et al. 1996).

Le syndrome de Klinefelter est l'anomalie la plus fréquente, elle représente plus de 60% des anomalies de nombre touchant les gonosomes (May-Panloup, Malinge et al. 2001). Il a une prévalence de 3% chez les hommes infertiles, 11% chez les hommes azoospermiques (Piomboni, Stendardi et al. 2014) et 5% chez les hommes oligozoospermiques sévères (Foresta, Garolla et al. 2005). Le syndrome provoque généralement l'arrêt de la spermatogenèse au stade primaire des spermatocytes, mais occasionnellement, des stades plus tardifs du développement des gamètes sont identifiés (Georgiou, Syrrou et al. 2006). Les hommes infertiles atteints par ce syndrome présentent une constitution chromosomique

homogène 47,XXY dans la plupart des cas mais elle peut être aussi en mosaïque 47,XXY/46,XY. Chez 25 % des hommes présentant la formule 47,XXY, des spermatozoïdes sont retrouvés dans l'éjaculat (Ferlin, Raicu et al. 2007, O'Flynn O'Brien, Varghese et al. 2010), les hommes avec formule en mosaïque peuvent avoir une spermatogenèse résiduelle dans leurs tubes séminifères (Foresta, Garolla et al. 2005). Il a été rapporté qu'à l'aide des techniques d'AMP, ces hommes peuvent avoir des enfants avec caryotype normal (Ferlin, Garolla et al. 2005, Ferlin, Raicu et al. 2007), mais le risque d'avoir une progéniture avec des anomalies chromosomiques pourrait être important (Reubinoff, Abeliovich et al. 1998, Ron-El, Strassburger et al. 2000), puisque ces hommes peuvent produire des gamètes avec un taux élevé d'aneuploïdies (Georgiou, Syrrou et al. 2006).

D'autres aneuploïdies gonosomiques sont également détectées chez les hommes infertiles telles que le syndrome 47,XYY (ou syndrome de Jacob) (Jacobs, Brunton et al. 1965) qui concerne de 1 à 4 hommes sur 1 000 (May-Panloup, Malinge et al. 2001). Plusieurs études ont montré la présence d'un taux élevé de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés dans l'éjaculat de ces hommes (Blanco, Rubio et al. 1997, Wong, Ferguson et al. 2008). L'anomalie 45,X/46,XY est une anomalie numérique des chromosomes sexuels résultant d'un mosaïcisme du chromosome Y. Elle est identifiée chez 1,7/10 000 nouveaux-nés (Chang, Clark et al. 1990).

b. Anomalies chromosomiques de structure

Plusieurs études ont rapporté la relation entre les anomalies chromosomiques de structure et l'infertilité masculine. Ces anomalies sont : les translocations robertsoniennes, les translocations réciproques équilibrées (simples ou complexes), les inversions. Seules les translocations robertsoniennes et les translocations réciproques équilibrées seront développées dans cette thèse.

Une méta-analyse chez 15 242 hommes infertiles a montré que les translocations robertsoniennes sont 9 fois plus fréquentes et les translocations réciproques sont 6 fois plus fréquentes dans cette population que chez les nouveaux-nés (De Braekeleer, Perrin et al. 2006).

Translocation robertsonienne :

La translocation robertsonienne est le résultat d'une fusion généralement centromérique de deux chromosomes acrocentriques (13, 14, 15, 21, 22) homologues ou non homologues (Ferlin, Raicu et al. 2007). Elle aboutit à la formation d'un chromosome dérivé composé des bras longs de deux chromosomes acrocentriques avec perte des deux bras courts. Cette perte est sans conséquence pour le porteur car les bras courts des acrocentriques ne contiennent que des séquences répétées en tandem des gènes d'ARN ribosomiaux (NOR : *nucleolus organizer region*) et par effet de dose, leur perte n'a pas de conséquence phénotypique pour le porteur. En conséquence de cette fusion, le porteur d'une translocation robertsonienne a un caryotype à 45 chromosomes. Cette anomalie concerne environ une naissance sur 1 000 (May-Panloup, Malinge et al. 2001, Ferlin, Raicu et al. 2007). Elle est l'anomalie chromosomique de structure la plus fréquente chez les hommes infertiles en particulier chez les hommes ayant une oligozoospermie (1,8% des cas contre 0,1% chez les hommes azoospermiques et 0,05 % dans la population générale) (Veld, Weber et al. 1997, Ogawa, Araki et al. 2000, May-Panloup, Malinge et al. 2001, De Braekeleer, Perrin et al. 2006). Par ailleurs, Baccetti, Capitani et al. (2002) ont montré qu'une immaturité spermatique structurelle inhabituelle (gros noyau non condensé, acrosome absent ou réduit) est associée à la translocation robertsonienne (Baccetti, Capitani et al. 2002).

Translocation réciproque équilibrée :

La translocation réciproque consiste en l'échange du matériel chromosomique entre les bras de deux chromosomes sans perte ni gain de matériel. Elle aboutit à la formation de 2 chromosomes dérivés. Elle concerne environ une naissance sur 1 175 (De Braekeleer and Dao 1991). La fréquence de ce réarrangement chromosomique chez les hommes infertiles est 10 fois plus élevée que dans la population générale (Van Assche, Bonduelle et al. 1996). Cette anomalie concerne 1% des hommes oligozoospermiques et 0,62% des hommes azoospermiques (De Braekeleer, Perrin et al. 2006).

2. Ségrégation méiotique chez les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique

Les problèmes de fertilité chez les porteurs des anomalies chromosomiques sont dus non seulement à divers défauts spermatogéniques mais également au pourcentage de gamètes chromosomiquement déséquilibrés produits par ces hommes. La fécondation d'un ovocyte normal par ces gamètes augmente le risque de la formation de fœtus chromosomiquement déséquilibré. Ces anomalies chromosomiques sont les principales causes de fausses couches (Egozcue, Blanco et al. 2000), de mortalité périnatale, de malformations congénitales, de retard mental et de retard d'acquisitions (Hook 1985, Hecht and Hecht 1987). Elles concernent de 0,8 à 1% des naissances vivantes (Gardner and Sutherland 2004).

a. Ségrégation méiotique et anomalie chromosomique de nombre

Chez les hommes porteurs du syndrome de Klinefelter (XXY), théoriquement la ségrégation méiotique se déroule comme indiqué dans la figure 9. 50% des gamètes produits sont chromosomiquement normaux (X ou Y) et 50% des gamètes sont chromosomiquement déséquilibrés avec une disomie gonosomique (XX ou XY). Tandis que, en pratique, la fréquence de l'aneuploïdie des chromosomes sexuels varie de 2,69% à 25% (Guttenbach, Michelmann et al. 1997, Estop, Munne et al. 1998, Morel, Roux et al. 2000, Templado, Vidal et al. 2011). Pour expliquer ce taux d'aneuploïdie deux hypothèses ont été proposées : la première indique que les cellules germinales 47,XXY peuvent entrer et terminer la méiose induisant l'augmentation du taux d'aneuploïdie (Morel, Roux et al. 2000, Ferlin, Garolla et al. 2005) ; dans la seconde hypothèse, seules les spermatogonies normales 46,XY sont capables d'achever la spermatogenèse mais dans un environnement testiculaire défavorable induisant une augmentation des aneuploïdies (Mroz, Hassold et al. 1999).

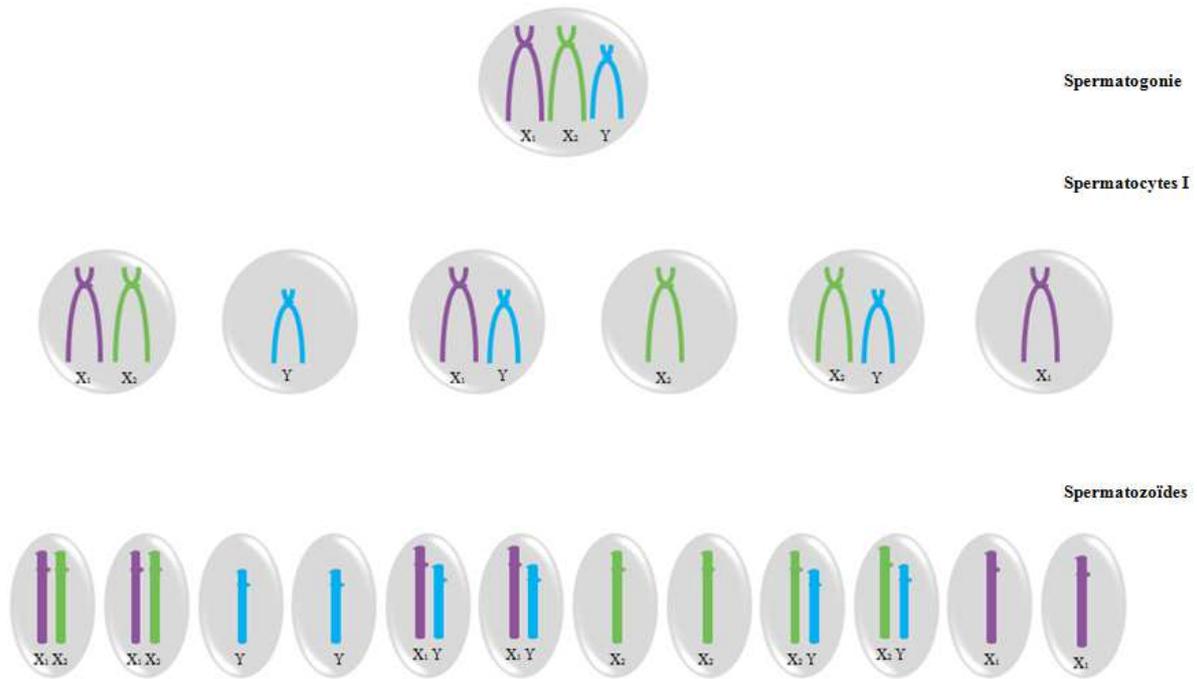


Figure 9 : Ségrégation méiotique théorique des trois gonosomes d'un patient ayant un syndrome de Klinefelter (47,XXY)

b. Ségrégation méiotique et anomalie chromosomique de structure

Chez les hommes porteurs d'une translocation robertsonienne, la fréquence des spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés varie de 8,78% à 30,13% tandis que chez les porteurs d'une translocation réciproque équilibrée, ce taux varie de 9,03% à 65,8%. De plus, concernant les translocations réciproques équilibrées, le risque des 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 dans les segments impliqués dans la translocation (Nguyen, Morel et al. 2014).

Translocation robertsonienne :

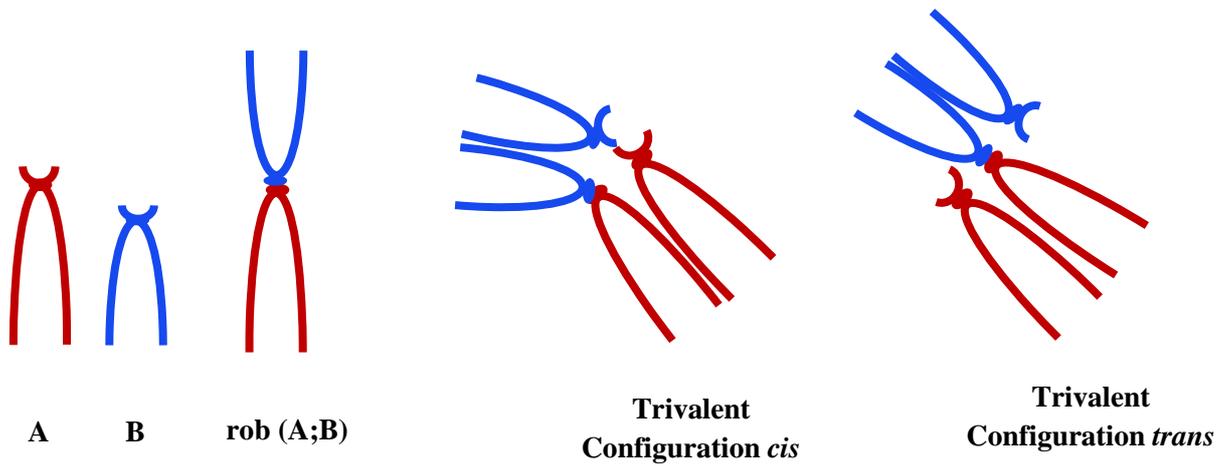
Pendant la méiose I, se forme dans les spermatocytes au stade pachytène, un trivalent entre le chromosome dérivé et les deux chromosomes acrocentriques normaux de même paire. Théoriquement la formation de ce trivalent se produit en configuration *cis* ou *trans* mais en pratique seule la configuration *cis* est observée (Vidal, Templado et al. 1982, Templado, Vidal et al. 1984). La translocation robertsonienne génère 3 modes de ségrégation méiotique : le mode alterne, le mode adjacent et le mode 3:0 (Figure 10). La ségrégation selon le mode alterne est le comportement méiotique le plus courant avec une fréquence de 70 à 91,2% tandis que la ségrégation selon le mode adjacent a une fréquence de 8,9 à 23,3% (Escudero, Lee et al. 2000, Ogawa, Araki et al. 2000, Ogur, Van Assche et al. 2006, Perrin, Morel et al. 2010, Cassuto, Hazout et al. 2011).

Dans le mode alterne (Figure 10-A), le chromosome dérivé migre dans un spermatocyte II et les deux chromosomes acrocentriques normaux migrent dans un autre spermatocyte II, produisant respectivement des spermatozoïdes équilibrés et normaux. Un porteur de translocation avec 45 chromosomes ou un fœtus chromosomiquement normal est le résultat de ce mode de ségrégation.

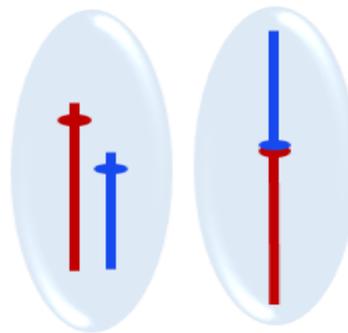
Dans le mode adjacent (Figure 10-B), quatre combinaisons sont possibles. Le chromosome dérivé migre dans un spermatocyte II avec un chromosome acrocentrique normal, et le deuxième chromosome acrocentrique migre dans un autre spermatocyte II. Deux types de gamètes sont obtenus avec 23 ou 22 chromosomes.

Dans le mode de ségrégation 3:0 (Figure 10-C), il y a production d'un gamète avec 21 chromosomes et d'un gamète avec 24 chromosomes, Ce mode de ségrégation est très rare.

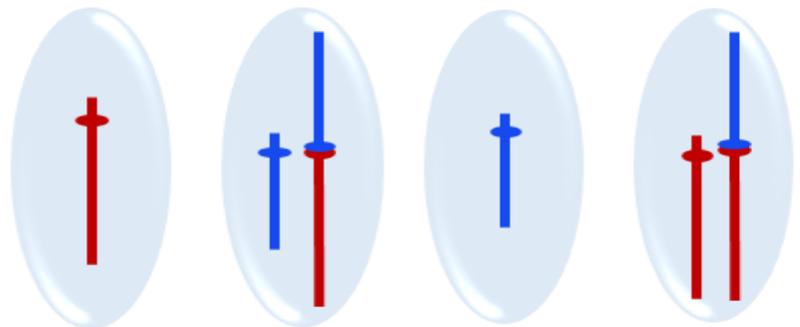
Ces deux derniers modes (adjacent et 3:0) ne produisent que des gamètes chromosomiquement déséquilibrés.



A- Equipement chromosomique des spermatozoïdes issu du mode alterne



B- Equipement chromosomique des spermatozoïdes issu du mode adjacent



C- Equipement chromosomique des spermatozoïdes issu du mode 3:0

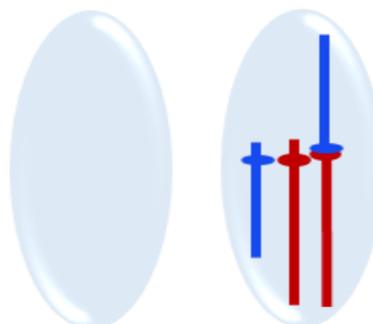


Figure 10 : Equipement chromosomique des gamètes d'un porteur d'une translocation robertsonienne issu des trois modes de ségrégation

Translocation réciproque équilibrée :

Chez les porteurs d'une translocation réciproque équilibrée, dans les spermatocytes I au stade pachytène, pendant la méiose, un quadrivalent entre les chromosomes dérivés et leurs homologues normaux est formé. La translocation réciproque équilibrée génère 5 modes de ségrégation méiotique : le mode alterne, le mode adjacent I, le mode adjacent II, le mode 3:1 et le mode 4:0 (Figure 11).

La ségrégation selon le mode alterne est le comportement méiotique le plus courant avec une fréquence moyenne de 44% à 51% ; la ségrégation selon le mode adjacent I a une fréquence de 16% à 40% ; la ségrégation selon le mode adjacent II a une fréquence d'environ 9% et la ségrégation selon le mode 3:1 se produit à une fréquence moyenne de 2% à 40% (Shi and Martin 2001).

Dans le mode alterne, les chromosomes dérivés migrent dans un spermatocyte II et leurs homologues normaux migrent dans un autre spermatocyte II, produisant respectivement des spermatozoïdes chromosomiques équilibrés et normaux. C'est le seul mode de ségrégation qui permet une production de gamètes sans déséquilibre chromosomique.

Cependant, au cours de la méiose I, un crossing-over peut se produire entre le centromère et le point de cassure sur le segment impliqué dans la translocation. Si le nombre de recombinaisons est impair, le mode alterne produit 50% de spermatozoïdes déséquilibrés et 50% de spermatozoïdes avec équipement chromosomique normal (25%) ou équilibré (25%) (Perrin, Morel et al. 2010).

Dans le mode adjacent I, un chromosome dérivé migre avec un chromosome normal non homologue dans un spermatocyte II. Les gamètes obtenus présentent un équipement chromosomique déséquilibré. Cependant des gamètes chromosomiquement normaux ou équilibrés en plus des gamètes déséquilibrés peuvent être produits en cas de crossing-over entre le centromère et le point de cassure.

Dans le mode adjacent II, un chromosome dérivé migre avec son homologue normal dans un spermatocyte II. Ce mode de ségrégation avec ou sans recombinaison interstitielle produit des gamètes chromosomiquement déséquilibrés.

Dans le mode 3:1, trois chromosomes migrent dans un spermatocyte II et un chromosome migre dans un autre spermatocyte II. Les gamètes obtenus sont chromosomiquement déséquilibrés à 22 ou 24 chromosomes.

Le dernier mode de ségrégation 4:0, produit un gamète avec 21 chromosomes et un autre avec 25 chromosomes. Ce mode de ségrégation est très rare.

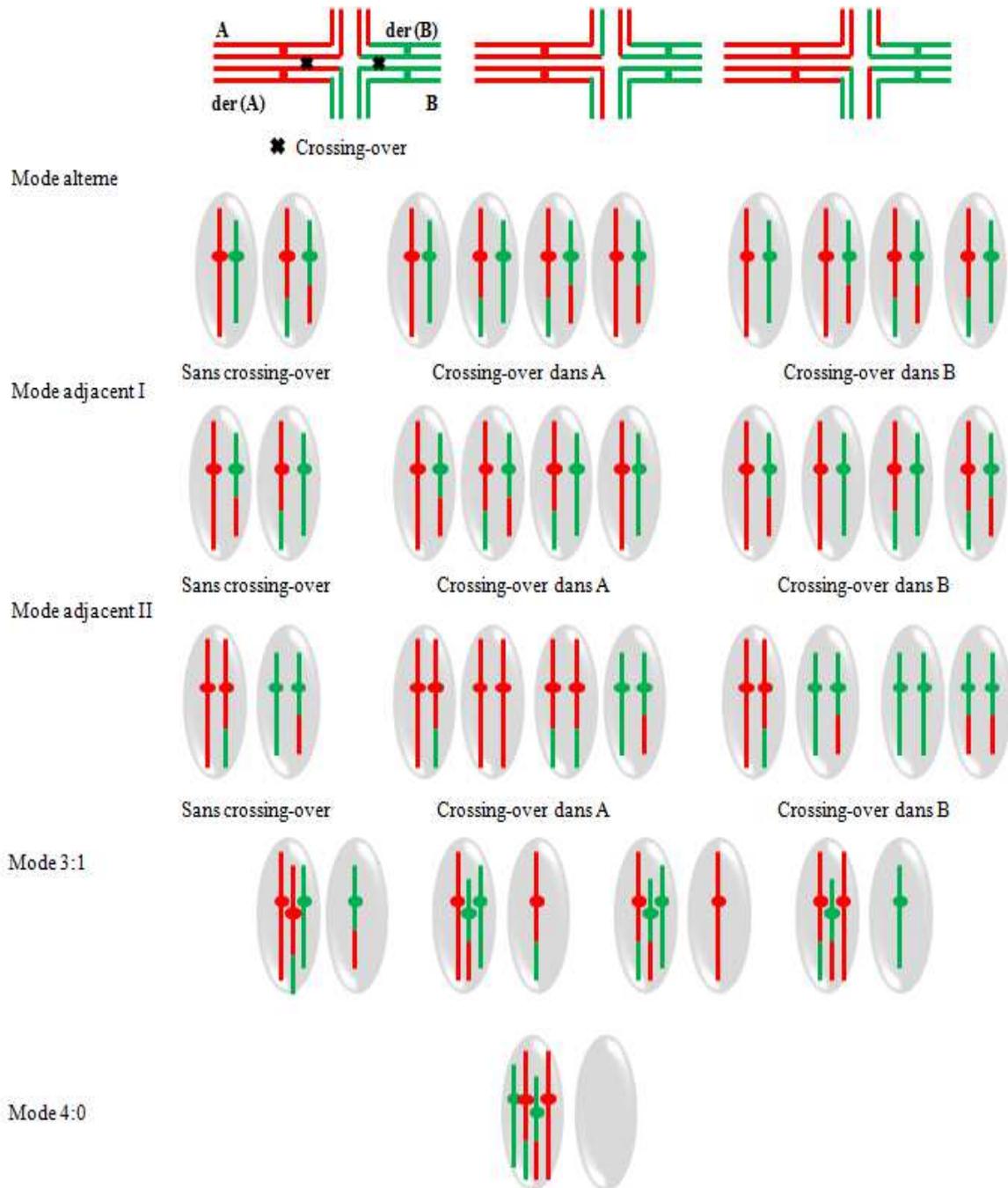


Figure 11 : Formation d'un quadrivalent au stade pachytène de méiose I avec ou sans crossing-over et équipement chromosomique des gamètes selon les 5 modes de ségrégation méiotique chez les porteurs d'une translocation équilibrée

3. Effet inter-chromosomique chez les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique

La possibilité que les réarrangements chromosomiques puissent interférer avec le comportement méiotique des chromosomes non impliqués dans la translocation conduit au phénomène appelé effet inter-chromosomique. Ce phénomène a été décrit pour la première fois par Lejeune (1965). Plusieurs études ont analysé les taux d'aneuploïdie dans les spermatozoïdes chez des hommes ayant des anomalies chromosomiques de structure. Ces études ont montré un effet inter-chromosomique chez 58% des porteurs de translocation robertsonienne et chez 64% des porteurs de translocation réciproque (revue par Martin 2008). Afin d'étudier les fréquences de la non-disjonction des chromosomes non impliqués dans les translocations au cours de la méiose, Douet-Guilbert, Le Bris et al. (2005) ont analysé le taux d'aneuploïdies de 7 chromosomes (7, 9, 13, 21, X, Y, 18) au niveau des spermatozoïdes chez 6 patients ayant une anomalie de structure et 4 témoins (hommes avec un caryotype 46,XY et des paramètres spermatiques normaux). Ils ont identifié la présence d'un effet inter-chromosomique sur certains chromosomes spécifiques chez les hommes porteurs d'une translocation. Par conséquent ce phénomène peut augmenter le taux des gamètes aneuploïdies chez ces hommes (Douet-Guilbert, Le Bris et al. 2005). D'autres études ont montré qu'un éventuel effet inter-chromosomique est généralement limité aux porteurs de translocation avec des paramètres spermatiques anormaux (Rousseaux, Chevret et al. 1995, Blanco, Egozcue et al. 2000, Vegetti, Van Assche et al. 2000, Morel, Roux et al. 2001, Anton, Blanco et al. 2004).

4. Techniques d'analyse de l'équipement chromosomique dans les spermatozoïdes

a. Hamster-test

Le principe du hamster-test consiste en une fécondation *in vitro* hétérosécifique entre des spermatozoïdes humains et des ovocytes dépellucidés de hamster doré. Le caryotype spermatique est analysé ensuite grâce aux marquages en bandes de la cytogénétique conventionnelle. Cette technique a été décrite pour la première fois par Yanagimachi, Yanagimachi et al. (1976). Une grande variété d'anomalies chromosomiques a été identifiée

par cette technique. Cependant, la méthode du hamster-test est difficile à mettre en œuvre et la possibilité analytique est limitée par le nombre des cellules fécondées.

b. Hybridation *in situ* fluorescente (FISH)

Le principe de la FISH consiste en l'identification des chromosomes dans des cellules fixées par l'utilisation de sondes marquées directement avec un fluorochrome (vert, rouge ou bleu) ou indirectement avec une haptène (biotine ou digoxigénine). Dans ce dernier cas, une détection immunocytochimique est nécessaire avec de l'anti-avidine ou de l'anti-digoxigénine marqués par un fluorochrome. Cette technique a été largement utilisée depuis les années 1990 afin d'étudier le contenu chromosomique sur un grand nombre des spermatozoïdes. Cette technique sur spermatozoïde sera détaillée dans la partie « Matériel et méthodes ».

II. Fragmentation de l'ADN spermatique et infertilité masculine

La fragmentation de l'ADN spermatique est le résultat de toute modification de la structure moléculaire de l'ADN, y compris une base chimiquement modifiée comme la 8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine), une base absente de l'ADN ou bien des cassures d'ADN du simple ou double brin (Gunes and Sertyel 2018). Dans les cellules germinales mâles, la réparation de l'ADN est très efficace pendant la mitose et la méiose jusqu'aux trois dernières semaines de la spermatogenèse (Gunes and Sertyel 2018). Cependant, les mécanismes de réparation ne sont plus actifs lors de la spermiogenèse (noyau haploïde et compacté). En conséquence, les spermatozoïdes n'ont aucun mécanisme pour réparer les dommages de l'ADN qui surviennent pendant leur transit et leur stockage dans l'épididyme ou après l'éjaculation (Gonzalez-Marin, Gosalvez et al. 2012), alors que ces cellules différenciées sont très sensibles aux dommages de l'ADN. Les spermatozoïdes à ADN fragmenté sont capables de féconder un ovocyte (Aitken, Gordon et al. 1998, Lopes, Sun et al. 1998). La possibilité de réparation de l'ADN spermatique se fait alors par l'ovocyte en premier lieu et par l'embryon au stade précoce en deuxième lieu (Wells, Bermudez et al. 2005, Gasca, Pellestor et al. 2007). L'appareil ovocytaire peut contribuer à la réparation sous réserve que les dommages soient en proportion raisonnable, ainsi elle dépend de la qualité cytoplasmique et génomique de l'ovocyte (Sakkas and Alvarez 2010). Des erreurs dans la réparation maternelle de la fragmentation de l'ADN spermatique pourraient conduire à des altérations au niveau du

contenu chromosomique chez les zygotes (Menezo, Dale et al. 2010, Gunes and Sertyel 2018).

La fragmentation de l'ADN spermatique a été observée dans les spermatozoïdes testiculaires, épидидymaires et éjaculés. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer l'origine de ces dommages.

1. Origines de la fragmentation de l'ADN spermatique

a. Défauts de compaction de la chromatine du spermatozoïde

La présence de brèches dans l'ADN de spermatozoïdes éjaculés peut être révélatrice d'une maturation inachevée pendant la spermiogenèse (McPHERSON and Longo 1992, McPherson and Longo 1993, McPherson and Longo 1993). Des cassures simples ou doubles brin d'ADN du gamète mâle se produisent pendant la spermiogenèse (Cf : 3. Remodelage de la chromatine). Ces cassures permettent la libération des super-enroulements de la chromatine pour faciliter le remplacement des histones par les protamines. Ce processus nécessite des activités endonucléasiques comme la topoisomérase II pour créer et ligaturer les cassures. Un défaut au niveau de ce processus entraîne un risque accru d'altération de l'ADN de type dénaturation, cassure et fragmentation (McPherson and Longo 1993).

Par ailleurs, les protamines sont les protéines clés responsables de la compaction de l'ADN spermatique. Cette compaction permet la mise en place d'une protection physique du noyau du gamète aux différentes agressions, stress oxydatifs, nucléases et sonication, auxquels il va être soumis tout au long de son trajet, du tube séminifère jusqu'au cytoplasme ovocytaire (Kosower, Katayose et al. 1992, Tateno, Kimura et al. 2000, Agarwal and Said 2003, Sotolongo, Lino et al. 2003). Au cours de la spermatogenèse, deux types de protamines sont exprimés en quantité presque égale : la protamine 1 (P1) et la famille des protéines protamine 2 (P2) (P2, P3 et P4) (Oliva 2006). Plusieurs études ont identifié une corrélation entre l'altération du rapport P1/P2 et le taux de fragmentation de l'ADN spermatique (Carrell and Liu 2001, Garcia-Peiro, Martinez-Heredia et al. 2011, Simon, Castillo et al. 2011).

b. Espèces réactives oxygénées

Les espèces réactives oxygénées (ERO) sont des atomes ou des molécules possédant un ou plusieurs électrons non appariés, formés lors du métabolisme de l'oxygène. Ils sont très

instables et réagissent avec les molécules voisines en leur arrachant un électron, les transformant à leur tour en espèces radicalaires (Pons-Rejraji, Sion et al. 2009).

En 1943, MacLeod a prouvé qu'il y avait des radicaux libres dans le sperme (MacLeod 1943). L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) sont les radicaux libres communs dans le sperme humain.

La présence de concentrations modérées et contrôlées des ERO au niveau du sperme est indispensable à l'acquisition du pouvoir fécondant des spermatozoïdes et au niveau des mécanismes de la transduction de signal en tant que second messager (de Lamirande and O'Flaherty 2008, Pons-Rejraji, Sion et al. 2009, Benedetti, Tagliamonte et al. 2012) (Figure 12). L'acquisition du pouvoir fécondant implique toujours des processus successifs, y compris la maturation des spermatozoïdes, la capacitation, l'hyperactivation, la réaction de l'acrosome et la fusion spermatozoïde-ovocyte. Au cours de la maturation des spermatozoïdes, les espèces réactives oxygénées modifient par oxydation les qualités structurales et biochimiques de l'ADN, des protéines et des lipides du spermatozoïde. Elles contribuent ainsi à la condensation nucléaire, au remodelage des membranes et à l'acquisition d'une mobilité rectiligne (Pons-Rejraji, Sion et al. 2009, Chen, Allam et al. 2013).

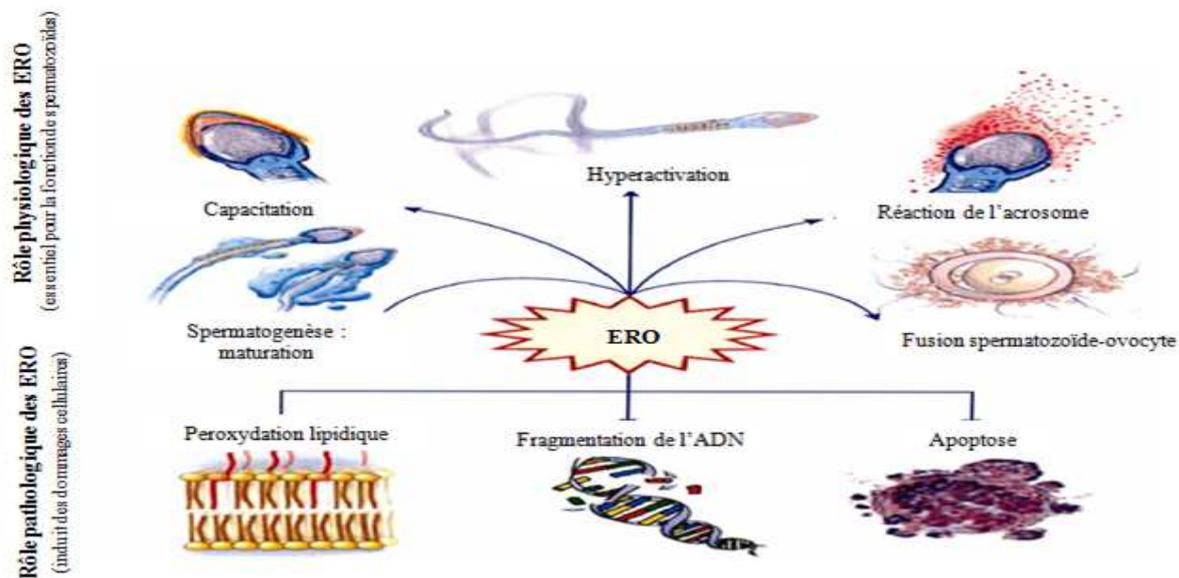


Figure 12 : Rôles physiologiques et pathologiques des espèces réactives oxygénées (ERO) (Kothari, Thompson et al. 2010)

Dans le tractus génital féminin, l' H_2O_2 et l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ interviennent dans différentes voies de signalisation intracellulaire de la capacitation, les espèces réactives oxygénées stimulent l'activation de tyrosine kinase, la réaction acrosomique et l'acquisition d'une mobilité hyperactive (Agarwal and Said 2003, O'Flaherty, de Lamirande et al. 2006, Pons-Rejraji, Sion et al. 2009, Chen, Allam et al. 2013).

L'excès d'ERO peut induire des dommages à l'échelle cellulaire (spermatozoïdes) et à l'échelle moléculaire (peroxydation lipidique, modifications structurales et fonctionnelles des protéines membranaires et/ou nucléaires et fragmentation de l'ADN) (Figure 12).

Lors d'un stress oxydatif et suite à une peroxydation lipidique, l'ADN spermatique devient la cible majeure des attaques des espèces réactives oxygénées et l'organisation super-enroulée de l'ADN spermatique devient incapable de protéger l'information génétique paternelle. De nombreuses études montrent que l'augmentation du taux de malondialdéhyde (résultat de la peroxydation lipidique) est liée à l'immaturité et la décondensation de la chromatine (Menezo, Entezami et al. 2012) et à des altérations de l'ADN au niveau des spermatozoïdes (Aktan, Dogru-Abbasoglu et al. 2013, Wright, Milne et al. 2014, Atig, Kerkeni et al. 2017). L'augmentation du taux d'ERO séminales peut endommager l'ADN spermatique de deux façons :

- Directe : par l'oxydation des bases azotées. Plusieurs études montrent que l'augmentation du taux de 8-OHdG (produit de l'oxydation de la guanine par le radical hydroxyle OH^{\bullet}) est corrélée positivement à l'augmentation du taux de la fragmentation de l'ADN spermatique (Aitken, De Iuliis et al. 2010, Wright, Milne et al. 2014). L'augmentation du taux d'ERO séminales peut endommager directement l'ADN spermatique par la génération des adduits oxydés à l'ADN (par exemple : 8-OHdG, 1, N6-ethenoadénosine, 1, N6-ethenoguanosine), conduisant à la formation de sites abasiques qui déstabilisent la structure de l'ADN et provoquent ultérieurement des cassures du simple brin (Badouard, Menezo et al. 2008, Wright, Milne et al. 2014).
- Indirecte : suite à la perturbation de la membrane interne et externe de la mitochondrie, qui provoque la libération du cytochrome c et des radicaux libres par la mitochondrie, il y a activation des caspases (3 et 9) conduisant ainsi à des dommages de l'ADN via l'activation de l'endonucléase (Agarwal, Makker et al. 2008, Sakkas and Alvarez 2010, Aitken and Koppers 2011, Wright, Milne et al. 2014).

Les dommages exercés par les ERO sur l'ADN sont nombreux. En effet, des bases azotées peuvent être modifiées, des liaisons covalentes inter/intra-brins et avec les protéines

chromatiniennes peuvent être mises en place, et des cassures de l'ADN peuvent survenir (Agarwal, Makker et al. 2008, Jena 2012).

c. Apoptose abortive

L'apoptose ou la mort cellulaire programmée est un mécanisme physiologique critique impliqué dans le développement et l'homéostasie des tissus. Cinq rôles fonctionnels possibles ont été rapportés dans la littérature pour la présence de l'apoptose au cours de la spermatogenèse normale (revue par Sakkas et El-Fakahany, 2018) :

- Régulation du nombre de cellules germinales par rapport à la capacité de support des cellules de Sertoli
- Elimination des cellules germinales anormales en particulier les cellules germinales chromosomiquement anormales
- Maintien de la barrière hémato-testiculaire, en éliminant les cellules germinales en excès
- Avant la puberté, une vague apoptotique facilite le développement fonctionnel éventuel de la spermatogenèse mature
- Elimination sélective des parties du cytoplasme des spermatozoïdes.

Deux voies d'apoptose ont été identifiées au niveau des cellules germinales masculines : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque (Figure 13).

La voie intrinsèque est déclenchée suite à un stress oxydatif généré par les espèces réactives d'azote ou d'oxygène. Cette voie implique principalement des protéines mitochondriales qui se traduisent par l'activation des facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux (Bax et Bak) et des facteurs anti-apoptotiques (Bcl2, Bcl-X1). Les protéines pro-apoptotiques activées vont stimuler l'activation du cytochrome c mitochondrial, suivie par une cascade d'activations des caspases (caspase 9 ...) qui, à leur tour, conduisent à la fragmentation de l'ADN (Shaha, Tripathi et al. 2010, Gunes, Al-Sadaan et al. 2015).

La voie extrinsèque est déclenchée via l'activation des récepteurs Fas (exprimés par les cellules germinales engagées dans l'apoptose) par leur ligand FasL (exprimés par les cellules de Sertoli) (Lee, Richburg et al. 1997, Francavilla, D'Abrizio et al. 2000, Agarwal and Said 2003). La liaison Fas/FasL induit l'activation de la caspase 8, suivie par l'activation de la caspase 3 qui précède la fragmentation de l'ADN. Cette voie provoque également la libération

des facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux pour conduire à l'activation de la caspase 3, qui à son tour conduit à la fragmentation de l'ADN (Gunes, Al-Sadaan et al. 2015) (Figure 13).

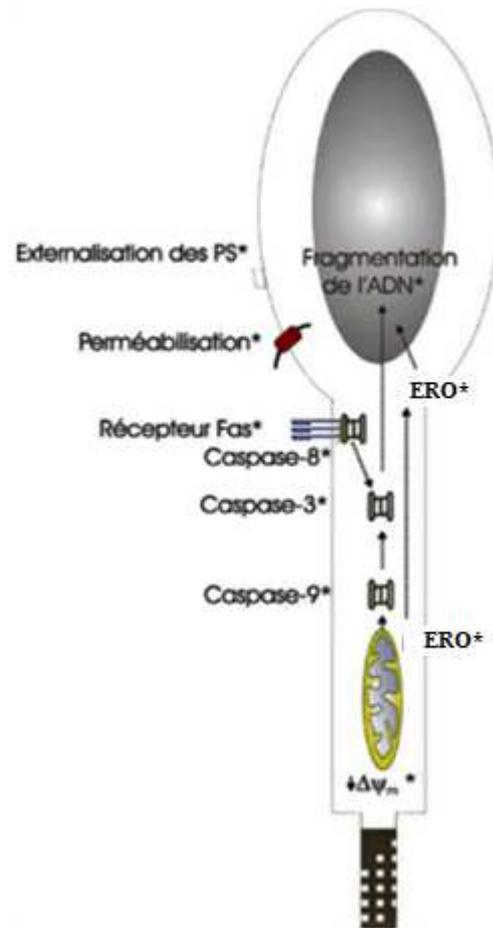


Figure 13 : Représentation schématique des voies apoptotiques hypothétiques présentes dans les spermatozoïdes éjaculés de patients infertiles

ERO : Espèces réactives oxygénées, $\Delta\psi_m$: potentiel membranaire mitochondrial, *PS* : phosphatidylsérine (Marchetti and Marchetti 2005)

Ce processus apoptotique induit l'apparition de nombreux marqueurs à l'échelle cellulaire et moléculaire, comme la chute du potentiel de membrane mitochondriale (MMP), l'activation des caspases et du cytochrome c, l'activation des facteurs pro-apoptotiques et anti-apoptotiques, l'externalisation des phosphatidylsérines (PS) et la fragmentation de l'ADN. Environ 75% des cellules germinales meurent par apoptose au cours de la spermatogénèse (Huckins 1978).

Parfois, les cellules destinées à être éliminées échappent au processus d'apoptose. Au lieu de s'engager dans une réponse apoptotique complète menant à la mort cellulaire, ces cellules germinales haploïdes en différenciation subissent une forme restreinte de ce processus conduisant à la fragmentation d'ADN dans le noyau tandis qu'elles maintiennent la capacité de se différencier en spermatozoïdes matures fonctionnels (Figure 14). Ce phénomène est appelé apoptose abortive (Sakkas, Mariethoz et al. 1999, Sakkas, Mariethoz et al. 1999). De plus, les spermatozoïdes sont des cellules hautement différenciées qui perdent leur capacité à subir l'apoptose (Barratt, Aitken et al. 2010).

Cependant, de nombreuses études ont montré une augmentation significative de spermatozoïdes exprimant des marqueurs apoptotiques dans l'éjaculat chez les hommes infertiles par rapport aux hommes fertiles (Weng, Taylor et al. 2002, Le-du, Lelorc'h et al. 2004, Said, Paasch et al. 2004, Brugnon, Janny et al. 2010). De plus, Sakkas et al, ont évalué le taux d'expression du récepteur Fas des spermatozoïdes éjaculés dans 31 échantillons d'hommes normozoospermiques et 24 échantillons d'hommes oligozoospermiques. Ces auteurs ont montré que le récepteur Fas est exprimé dans 10% des échantillons des normozoospermiques et dans 50% des échantillons des oligozoospermiques (Sakkas, Mariethoz et al. 1999).

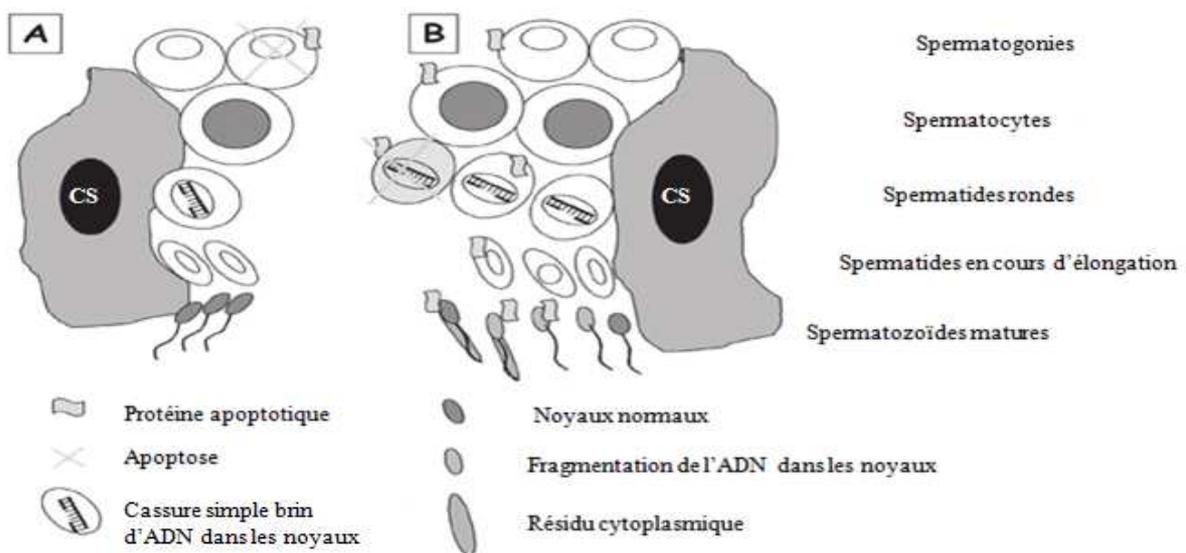


Figure 14 : Apoptose au cours de la spermatogenèse

(A) Apoptose au cours d'une spermatogenèse normale, (B) Apoptose abortive au cours d'une spermatogenèse anormale (CS = cellule de Sertoli) (Sakkas, Seli et al. 2004)

d. Autres origines

Des facteurs externes peuvent également avoir une influence et entraîner une augmentation du taux d'ADN fragmenté dans les spermatozoïdes. Les comportements liés au mode de vie, les radiations anticancéreuses, les agents alkylants, l'exposition à la chaleur, les médicaments et la toxicomanie sont des exemples de ces facteurs (Favier 2006, Sepaniak, Forges et al. 2006, Menezo, Dale et al. 2010, O'Flaherty, Chan et al. 2012, Bujan, Walschaerts et al. 2013).

2. Techniques d'évaluation de la qualité de l'ADN spermatique

Une grande variété de tests a été développée pour évaluer la qualité de l'ADN spermatique. Des analyses directes ou indirectes de l'intégrité de l'ADN peuvent être réalisées. Tous les tests sont différents les uns des autres, par conséquent leurs résultats sont difficilement comparables.

a. Test à l'acridine orange (AO)

L'acridine orange est un colorant fluorescent cationique qui interagit avec l'ADN double brin, ou l'ADN simple brin par intercalation ou attraction électrostatique, respectivement. Les spermatozoïdes avec un ADN simple brin émettent une fluorescence rouge et les spermatozoïdes avec un ADN double brin émettent une fluorescence verte. L'analyse des résultats se fait par microscopie à fluorescence. Cette technique est rapide simple et peu coûteuse. Néanmoins l'analyse microscopique des résultats est difficile à cause d'une coloration hétérogène avec de multiples couleurs intermédiaires (Chohan, Griffin et al. 2006, Agarwal, Majzoub et al. 2016).

b. Bleu d'aniline

Le bleu d'aniline est un colorant acide permettant l'évaluation de la maturité de la chromatine du spermatozoïde. Ce colorant présente une grande affinité pour les histones riches en lysine dans les noyaux des spermatozoïdes immatures qui se colorent en bleu, tandis que les noyaux riches en protamine des spermatozoïdes matures restent non colorés (Dadoune, Mayaux et al. 1988, Auger, Mesbah et al. 1990). L'analyse des résultats se fait par microscope optique.

c. Bleu de toluidine

Le bleu de toluidine est un colorant basique qui permet l'évaluation de l'intégrité de la chromatine du spermatozoïde. Ce colorant présente une forte affinité pour les résidus de phosphate de l'ADN. Au niveau des spermatozoïdes, les résidus phosphate de l'ADN sont accessibles seulement en cas d'altération de la chromatine et/ou de l'ADN. Les noyaux des spermatozoïdes avec altération présenteront une coloration bleu-violet, tandis que les noyaux des spermatozoïdes sans altération ne seront pas colorés (Mello 1982, Hammadeh, Stieber et al. 1998). L'analyse des résultats se fait par microscopie optique.

d. Chromomycine A3 (CMA3)

CMA3 est un fluorochrome spécifique de la guanine-cytosine. Il entre en compétition avec les protamines pour les mêmes sites de liaison au niveau de l'ADN. Par conséquent, l'intensité de la fluorescence indique le degré de protamination (Manicardi, Bianchi et al. 1995). L'analyse des résultats se fait sur microscope à fluorescence.

e. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)

Le SCSA a été décrit pour la première fois il y a plus de 35 ans (Evenson, Darzynkiewicz et al. 1980). Ce test est basé sur l'hypothèse que l'ADN des spermatozoïdes présentant une structure de chromatine anormale est plus sensible à la dénaturation par l'acide ou par la chaleur (Darzynkiewicz, Traganos et al. 1975, Evenson, Jost et al. 1999). Après la dénaturation, une coloration par orange acridine a lieu. L'AO assure une coloration différentielle de l'ADN simple brin et double brin grâce à ses propriétés métachromatiques. L'analyse des résultats se fait par cytométrie de flux. Le SCSA détermine le taux de dénaturation de l'ADN spermatique en mesurant le passage métachromatique de la fluorescence verte à la fluorescence rouge (Darzynkiewicz, Traganos et al. 1975, Evenson, Darzynkiewicz et al. 1980). Le protocole de SCSA est standardisé, ce qui minimise les variations inter-laboratoires. Le seuil clinique du DFI (Indice de Fragmentation de l'ADN) est à 30%, c'est-à-dire que les échantillons présentant un $DFI \leq 30\%$ peuvent être considérés comme normaux (Agarwal, Majzoub et al. 2016).

f. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)

La technique TUNEL permet une révélation directe des cassures simples ou doubles brins au niveau de l'ADN par une réaction de polymérisation des nucléotides (dUTP) marqués (Sun, Jurisicova et al. 1997). Le marquage des nucléotides peut être réalisé par fluorochrome ou par enzyme-substrat (Perrin, Caer et al. 2009, Brahem, Mehdi et al. 2011). La fragmentation de l'ADN peut être analysée par cytométrie de flux, par microscopie à fluorescence ou par microscope optique. Le protocole de cette technique n'est pas strictement standardisé, ce qui justifie l'existence de nombreux seuils cliniques.

Cette technique sur spermatozoïdes sera détaillée dans la partie « Matériel et méthodes ».

g. Single cell gel electrophoresis assay (SCGE) (ou COMET assay)

La technique COMET permet aussi une révélation directe des cassures de l'ADN. Après une lyse des spermatozoïdes, une électrophorèse sur gel d'agarose est réalisée et l'ADN est révélé par un colorant fluorescent. L'ADN de faible poids moléculaire (simple ou double brin) migre au cours de l'électrophorèse donnant l'aspect d'une comète, tandis que les segments d'ADN intacts ne migrent pas (Klaude, Eriksson et al. 1996).

h. Sperm Chromatin Dispersion (SCD)

La technique SCD est connue également par le nom « test de Halo ». Elle permet d'évaluer la dispersion des fragments d'ADN après dénaturation. Les spermatozoïdes sont traités avec une solution acide puis par un tampon de lyse. Une contre-coloration par Wright ou par un colorant fluorescent est réalisée et l'analyse des résultats (selon le type de contre-colorant) se fait sous microscope optique ou à fluorescence. Les spermatozoïdes à ADN non fragmenté libèrent leurs boucles d'ADN formant de grands halos, tandis que les spermatozoïdes à ADN fragmenté produisent peu ou aucun halo (Fernandez, Muriel et al. 2005).

III. Infertilité masculine et étude du transcriptome dans les spermatozoïdes

1. Application pratique des ARN spermatiques

L'étude du transcriptome dans les spermatozoïdes présente deux intérêts majeurs, la compréhension des mécanismes de la spermatogenèse induisant une infertilité et la détermination de profils prédictifs de succès pour les méthodes d'AMP. La comparaison des profils transcriptomiques entre hommes fertiles et hommes infertiles permet d'identifier des transcrits sous ou sur-exprimés chez les hommes infertiles et de révéler les voies biologiques spécifiques.

Les transcrits sous ou sur exprimés correspondent en grande partie à des gènes impliqués dans la spermatogenèse, la motilité spermatique, le processus anti-apoptotique et la voie ubiquitine-protéasome (PRM2, SPZ1, SPATA4, CREM, UBE2B) chez les hommes oligozoospermiques (Montjean, De La Grange et al. 2012).

Chez les hommes asthénozoospermiques, des études à l'aide de la RT-PCR ont révélé des altérations des ARN associés à la maturation des spermatozoïdes ou au métabolisme spermatique dans les derniers stades de la spermatogenèse. Par exemple, certains transcrits codent des protéines nucléaires telles que PRM1 et PRM2 (Kempisty, Depa-Martynow et al. 2007), les protéines de transition (1 et 2) et la HILS1 (Histone H1 like protein) (Jedrzejczak, Kempisty et al. 2007). Le changement dans l'expression de ces protéines nucléaires spermatiques peut induire une condensation anormale de la chromatine spermatique et provoquer des altérations au niveau de l'ADN. Celles-ci pourraient déclencher l'apoptose, inactiver les mitochondries et affecter ainsi la mobilité des spermatozoïdes (Miyagawa, Nishimura et al. 2005). L'expression des transcrits impliqués dans des processus de régulation du métabolisme énergétique et de la mobilité des spermatozoïdes est également altérée chez les hommes asthénozoospermiques (VDCA2 (Voltage-Dependent Anion Channel 2), CABYR (Calcium-Binding Tyrosine-(Y)-Phosphorylation Regulated) et ROPN1 (RhOPhiliN associated tail protein 1)) (Liu, Wang et al. 2010, Shen, Wang et al. 2015, Pelloni, Paoli et al. 2018). L'étude du transcriptome chez ces hommes à l'aide de microarray a confirmé certains résultats révélés par RT-PCR (Jodar, Kalko et al. 2012, Bansal, Gupta et al. 2015). De plus, l'analyse du profil d'expression génétique par microarray a permis d'identifier des perturbations au niveau des transcrits associés au développement des cellules germinales (exemple : OAZ3 et BRD2) (Jodar, Kalko et al. 2012, Bansal, Gupta et al. 2015).

Comme les asthénozoospermiques, les hommes tératozoospermiques présentent une déficience des transcrits associée aux spermatocytes et spermatozoïdes, ce qui indique une perturbation des stades tardifs de la spermatogenèse (Platts, Dix et al. 2007). En particulier, ces transcrits codent principalement les protéines associées au protéasome. La déficience de ces transcrits affecte probablement la mobilité hyperactive, la capacitation et la capacité de réaliser la réaction acrosomique des spermatozoïdes (Kong, Diaz et al. 2009).

L'analyse de l'expression génétique chez les hommes exposés à des toxines a été réalisée par certaines études. Ils ont identifié une perturbation importante de la voie apoptotique avec une sous-expression des gènes pro-apoptotiques et une sur-expression des gènes anti-apoptotiques chez les hommes fumeurs (Linschooten, Van Schooten et al. 2009, Metzler-Guillemain, Victorero et al. 2015).

L'étude du transcriptome pourrait présenter un intérêt dans l'établissement des profils prédictifs pour les méthodes d'AMP. Les profils d'expression des gènes des spermatozoïdes des donneurs normozoospermiques, utilisés pour des inséminations intrautérines (IIU) ont été analysés par microarray (Bonache, Mata et al. 2012). Les comparaisons des profils d'expression des gènes ont été réalisées selon le taux de grossesse après IIU : taux de grossesse de 0% à 15,7% (groupe 1), taux de grossesse de 15,71% à 23% (groupe 2) et taux de grossesse de 23,01% à 45% (groupe 3). Les auteurs ont montré une différence significative du profil transcriptomique entre le groupe 1 et le groupe 3. Ils ont suggéré que le profil d'expression des spermatozoïdes peut être un marqueur de la qualité de fécondation des spermatozoïdes et un marqueur prédictif des résultats de l'IIU chez les normozoospermiques (Bonache, Mata et al. 2012). Par ailleurs, Garcia-Herrero et al, à l'aide de microarray ont comparé le profil transcriptomique des spermatozoïdes conduit à une grossesse après un cycle d'ICSI dans un programme de don d'ovocytes avec le profil de ceux qui n'ont pas eu de grossesse. Les résultats ont révélé de profondes différences entre les profils transcriptomiques des deux groupes (Garcia-Herrero, Garrido et al. 2011). Cette même équipe a constaté que les exigences moléculaires pour un spermatozoïde pour obtenir une grossesse aboutissant à un bébé en bonne santé ne sont pas les mêmes pour toutes les techniques de reproduction assistée (Garcia-Herrero, Meseguer et al. 2010b, Garcia-Herrero, Garrido et al. 2011, Garrido, Garcia-Herrero et al. 2013). Ainsi, les résultats de microarray sont utilisés uniquement pour la recherche fondamentale, mais pourraient aussi l'être pour des applications cliniques (Garrido, Garcia-Herrero et al. 2013).

2. Méthodes de détection des ARN dans les spermatozoïdes

a. RT-PCR

La RT-PCR est la première méthode utilisée pour détecter la présence de l'ARN dans les spermatozoïdes (Miller, Tang et al. 1994, Miller, Briggs et al. 1999). Le principe de cette technique consiste à extraire de l'ARN spermatique et synthétiser de l'ADN complémentaire (ADNc). Une étape d'amplification est effectuée par PCR avec des amorces courtes. Les produits de PCR migrent ensuite sur un gel de séquençage.

b. Microarray

Le microarray est une technique de biologie moléculaire qui permet l'analyse de milliers de gènes à la fois, en offrant une vue globale des processus biologiques. Cette technologie a permis, pour la première fois en 2002, une détection rapide de milliers de transcrits dans les spermatozoïdes humains (Ostermeier, Dix et al. 2002). Le principe du microarray repose sur l'hybridation simultanée et compétitive d'ARN marqués (ADNc marqués) par des fluorochromes sur une puce renfermant des petits fragments d'ARN (ou d'ADNc) représentatifs de tout le transcriptome humain. L'intensité fluorescente et sa localisation sont ensuite analysées par des outils bioinformatiques et statistiques.

Cette technique sur spermatozoïdes sera détaillée dans la partie « Matériel et méthodes ».

E. Les possibilités thérapeutiques

Face aux problèmes d'infertilité, des prises en charge médicales peuvent être proposées aux couples comme des traitements antioxydants, des stimulations hormonales, des interventions chirurgicales, une sélection des spermatozoïdes de bonne qualité, des inséminations artificielles (IA)/ inséminations intra-utérines, une fécondation *in vitro*...

Dans cette partie, les solutions proposées pour l'homme (traitements antioxydants et techniques de sélection des spermatozoïdes) seront tout d'abord présentées, suivies des solutions proposées pour le couple (AMP).

I. Les traitements antioxydants

Les antioxydants peuvent être des traitements de choix pour les hommes infertiles comme la vitamine E, la vitamine C, le sélénium, l'acide folique, le coenzyme Q10, le glutathion...

Certains auteurs recommandent ces traitements antioxydants pour améliorer le dysfonctionnement spermatique et diminuer l'altération de la spermatogenèse (Suleiman, Ali et al. 1996, Keskes-Ammar, Feki-Chakroun et al. 2003, Ciftci, Verit et al. 2009). D'autres préconisent, chez les patients présentant un taux élevé de fragmentation de l'ADN spermatique, la mise en place d'un traitement antioxydant trois mois avant l'ICSI (Greco, Romano et al. 2005).

Des combinaisons appropriées d'antioxydants ont été recommandées par de nombreuses recherches, dont la plupart présente un effet synergique (Rolf, Cooper et al. 1999, Greco, Romano et al. 2005, Tremellen, Miari et al. 2007, Tunc, Thompson et al. 2009), contrairement à d'autres (Gharagozloo and Aitken 2011). Cependant, ces études se différencient par les populations étudiées et le type, la dose et la durée d'antioxydants utilisés.

L'efficacité d'une supplémentation en antioxydants a été démontrée par de nombreuses études, en particulier chez les hommes ayant un taux élevé de radicaux libres au niveau du sperme. Cependant, d'autres études, n'ont montré aucun effet bénéfique de ces traitements, des effets délétères peuvent même apparaître dans le cas de traitements de longue durée ou à forte dose (Faure, Dupont et al. 2011, Lombardo, Sansone et al. 2011, Menezo, Entezami et al. 2012, Menezo, Evenson et al. 2014).

D'autres solutions pourraient être proposées comme une sélection des spermatozoïdes de bonne qualité.

II. Les techniques de sélection des spermatozoïdes

1. Techniques classiques de séparation des spermatozoïdes dans le cadre de l'AMP

a. Gradient de densité

La migration de sperme sur un gradient de densité par centrifugation permet une séparation des spermatozoïdes en fonction de leur densité, et donc de leur morphologie. Cette technique a pour but d'éliminer les débris cellulaires ou acellulaires, les spermatozoïdes morphologiquement anormaux, les germes contenus dans le sperme, ainsi que les agglutinats. Les spermatozoïdes morphologiquement normaux sont concentrés dans le culot. Le gradient de densité induit également la capacitation des spermatozoïdes (Figure 15).

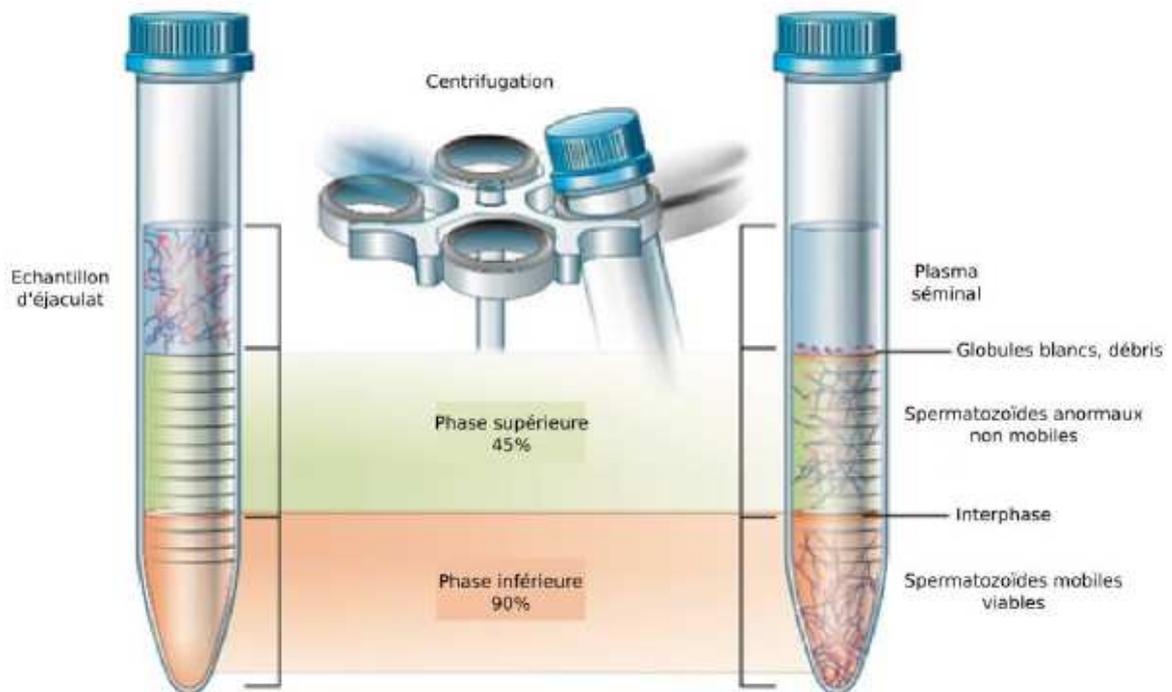


Figure 15 : Exemple de sélection des spermatozoïdes par un gradient de densité (Tahir and Sharma Rakesh K 2014)

b. Migration ascendante ou swim-up

Le swim-up permet la sélection des spermatozoïdes les plus mobiles suite à une migration ascendante dans un milieu de culture capacitant, éliminant ainsi les bactéries, le liquide séminal, les cellules somatiques et d'autres spermatozoïdes anormaux et/ou peu mobiles. Après un temps d'incubation à 37°C, un nuage cellulaire de spermatozoïdes les plus mobiles apparaît à la surface du milieu de culture (Figure 16).

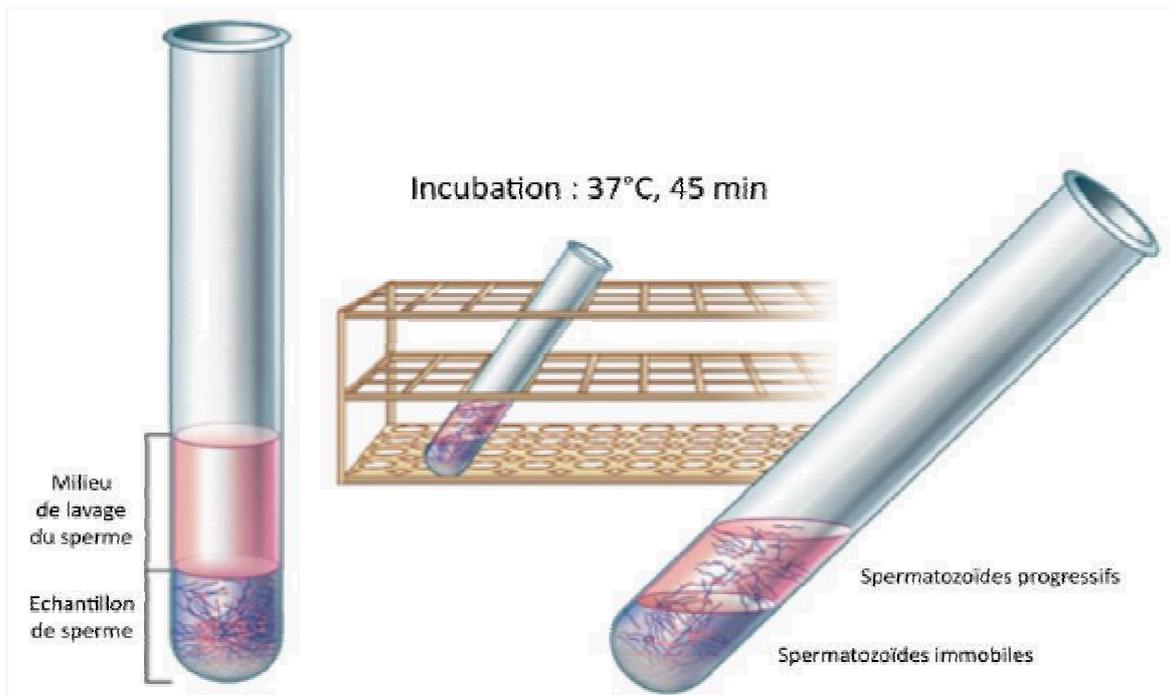


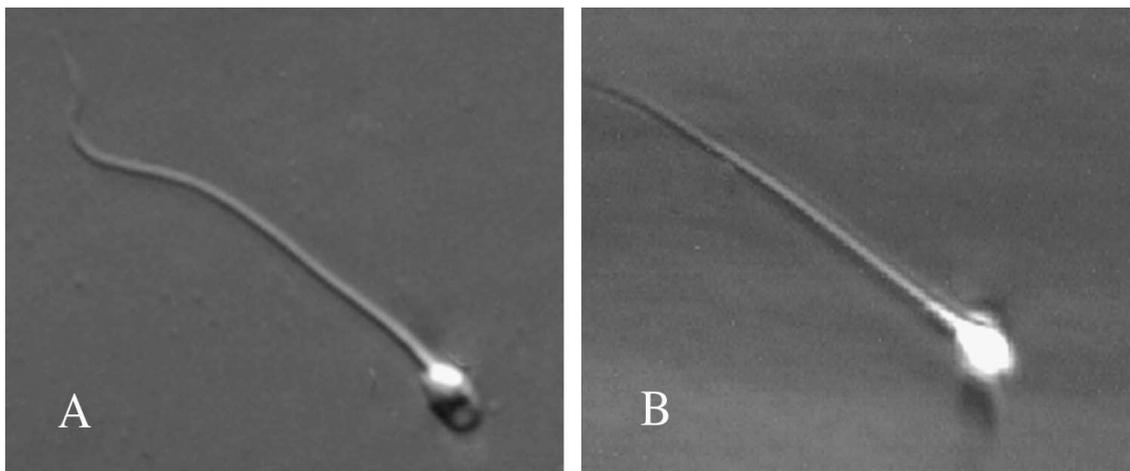
Figure 16 : Exemple de sélection des spermatozoïdes par swim-up (Tahir and Sharma Rakesh K 2014)

2. *Autres techniques de sélection des spermatozoïdes*

a. **Selon la biréfringence des spermatozoïdes**

Microscope à lumière polarisée :

Cette technique sélectionne les spermatozoïdes en fonction de leurs structures, en se basant sur la propriété de biréfringence (Gianaroli, Magli et al. 2010, Petersen, Vagnini et al. 2011). Les spermatozoïdes ayant cette propriété présentent une texture compacte et organisée sous microscope à lumière polarisée. De plus, la propriété de biréfringence permet de distinguer les spermatozoïdes ayant un acrosome intact (biréfringence uniforme sur l'ensemble de la tête et de la pièce intermédiaire), et ceux ayant achevé la réaction acrosomique (biréfringence localisée uniquement au niveau de la région post-acrosomique) (Figure 17).



*Figure 17 : Observation sous microscope à lumière polarisée
(A) Spermatozoïde qui a déjà accompli sa réaction acrosomique (B) Spermatozoïde avec un acrosome intact (Gianaroli, Magli et al. 2010)*

b. **Sélection selon la morphologie**

MSOME (Motile Sperm Organelle Morphology Examination) :

La technique MSOME a été décrite par Bartoov, Berkovitz et al. (2001). Elle consiste à examiner la morphologie des spermatozoïdes à fort grossissement ($\times 6\ 000$). A ce grossissement, la normalité morphologique des cinq organites des spermatozoïdes peut être

analysée (acrosome, région post-acrosomale, noyau, pièce intermédiaire et mitochondrie). Le MSOME permet également d'identifier la présence et la taille des vacuoles dans le noyau. En utilisant cette technique, plusieurs classifications morphologiques des spermatozoïdes ont été proposées : selon les anomalies nucléaires (Vanderzwalmen, Hiemer et al. 2008) et selon le système HABVIC (head, acrosome, basis, vacuole, insertion, cytoplasmic droplet) (Cassuto, Bouret et al. 2009).

HOS-test (Hypo-Osmotic Swelling Test) :

Le HOS-test permet d'évaluer l'intégrité de la membrane spermatique en se basant sur sa propriété de semi-perméabilité dans les spermatozoïdes intacts. Le spermatozoïde est exposé à un milieu hypo-osmotique qui induit un gonflement de la cellule et une courbure du flagelle. En fonction de l'aspect de cette courbure, le spermatozoïde est classé en 7 grades (Figure 18).

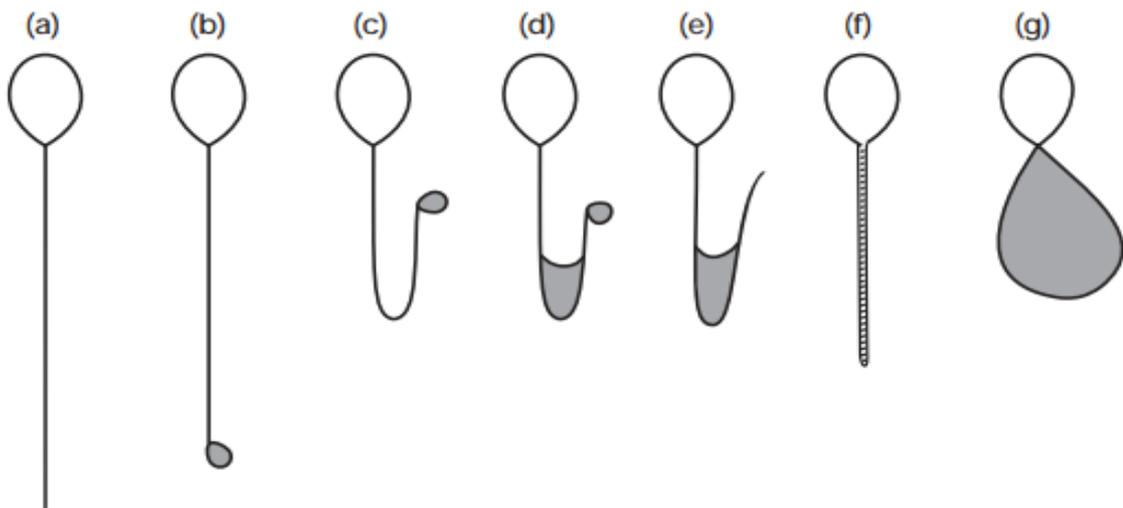


Figure 18 : Représentation schématique des changements morphologiques typiques des spermatozoïdes humains soumis à un stress hypo-osmotique (a) aucun changement : spermatozoïde non vivant, (b à g) différents types de changement du flagelle, la zone grisée correspond au gonflement flagellaire : spermatozoïde vivant (WHO 2010)

c. Sélection selon la morphologie et la mobilité

Technologie microfluidique :

La technologie microfluidique représente une modélisation des conditions biophysiques et biochimiques rencontrées par les spermatozoïdes lors de leurs déplacements dans l'appareil génital féminin. Cette technologie utilise des microcanaux pour sélectionner des spermatozoïdes en fonction de leur morphologie et de leur mobilité. Seuls les spermatozoïdes les plus mobiles et avec une morphologie normale peuvent traverser les obstacles (Asghar, Velasco et al. 2014).

SPARTAN (Simple Periodic ARray for Trapping and isolation) :

La technologie SPARTAN a été développée récemment par Chinnasamy, Kingsley et al. (2018). Elle correspond à un dispositif microfluidique. Selon les auteurs, ce dispositif augmente la séparation spatiale entre les populations de spermatozoïdes avec une mobilité progressive et celles de spermatozoïdes avec une mobilité non progressive dans un temps de test de 10 min (Chinnasamy, Kingsley et al. 2018) (Figure 19).

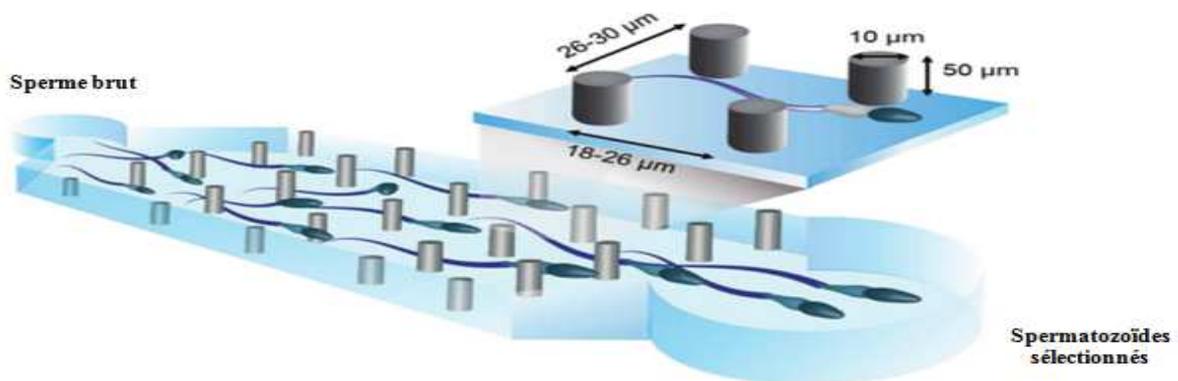


Figure 19 : Diagramme schématique du réseau microfluidique SPARTAN (Chinnasamy, Kingsley et al. 2018)

d. Sélection selon la charge électrique

Potentiel-zêta :

La charge électrique (de -16 mV à -20 mV) de la membrane plasmique du spermatozoïde mature est appelée «potentiel zêta», elle correspond au potentiel électrique dans le plan de glissement entre la membrane du spermatozoïde et l'environnement (Ishijima, Okuno et al. 1991). Les spermatozoïdes acquièrent ce potentiel pendant la maturation épидидymaire.

Le principe de cette technique consiste à sélectionner des cellules chargées négativement (comme les spermatozoïdes) par adhérence à une surface chargée positivement (tube à essai chargé positivement) (Chan, Jacobson et al. 2006) (Figure 20).

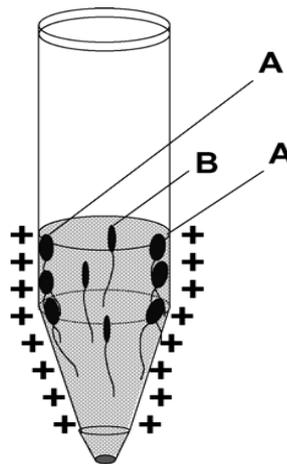


Figure 20 : Représentation schématique de sélection des spermatozoïdes par potentiel-zêta
(A) Spermatozoïde normal, (B) Spermatozoïde anormal (Said and Land 2011)

Electrophorèse :

Ainsworth, Nixon et al. (2005) ont mis au point une méthode électrophorétique afin de séparer les spermatozoïdes en fonction de leur taille et de leur charge, en utilisant un microflux cellulaire.

Le dispositif Microflow® à base d'électrophorèse se compose de deux chambres internes (chambre d'inoculation et chambre de collecte) séparées par une membrane en polycarbonate avec des pores de 5 μm . Ces deux chambres internes sont placées dans un champ électrique (Figure 21). Les spermatozoïdes matures peuvent traverser les pores alors que les spermatozoïdes anormaux et les débris cellulaires restent bloqués par les pores (Ainsworth, Nixon et al. 2005).

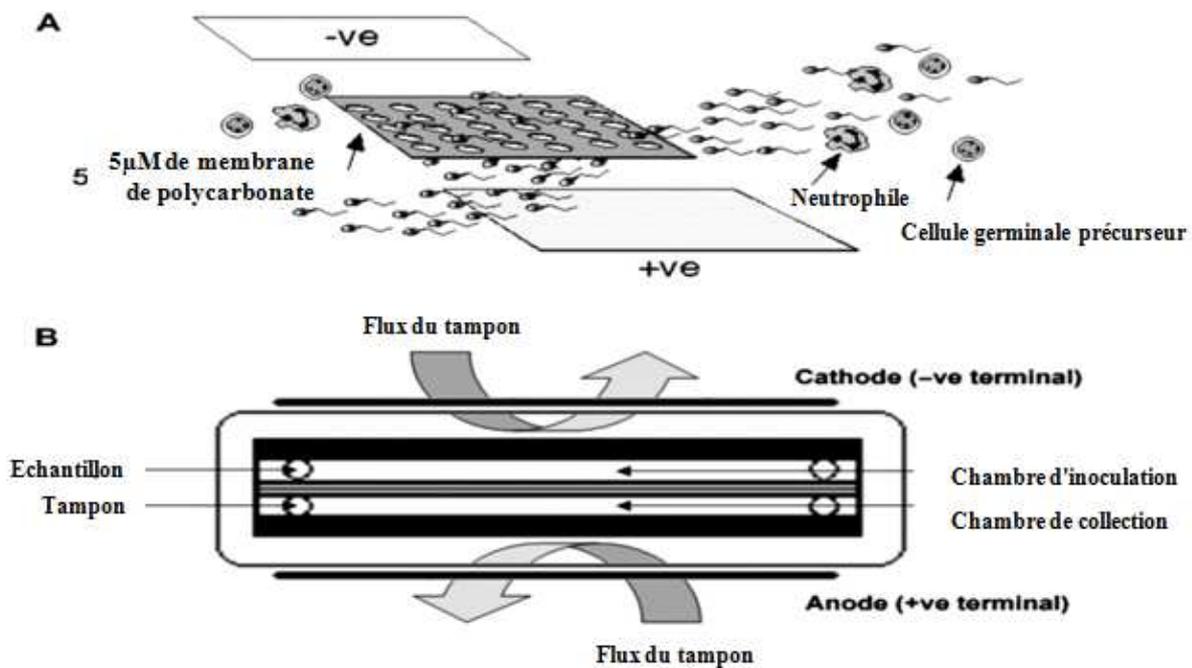


Figure 21 : Représentations schématiques de la technologie de séparation électrophorétique (A) Illustration schématique de sélection des spermatozoïdes par électrophorèse (B) Topographie de la configuration de Microflow® à base d'électrophorèse (Ainsworth, Nixon et al. 2005).

e. Sélection selon des marqueurs moléculaires

MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) :

Le tri cellulaire à l'aide des microbilles magnétiques conjuguées à l'annexine V a été initialement développé par l'équipe de Glander à Leipzig, en Allemagne (Grunewald, Paasch et al. 2001, Glander, Schiller et al. 2002). En cas d'apoptose, les spermatozoïdes ont la capacité d'externaliser leurs phosphatidylsérines (PS) (marqueur précoce d'apoptose). La technique MACS consiste à incuber les spermatozoïdes (avec et sans externalisation des PS) avec des microbilles magnétiques conjuguées à l'annexine V. L'annexine V possède une forte affinité pour la PS. Après l'incubation, la sélection des spermatozoïdes se fait suite à un passage sur colonne placée dans un champ magnétique (Figure 22). Le tri cellulaire à l'aide de microbilles magnétiques conjuguées à l'annexine V permet de séparer le prélèvement de sperme en deux populations : une population de spermatozoïdes annexine V+ (spermatozoïdes avec externalisation des PS) et une population annexine V- (spermatozoïdes sans externalisation des PS).

Cette technique sur spermatozoïdes sera détaillée dans la partie « Matériel et méthodes ».

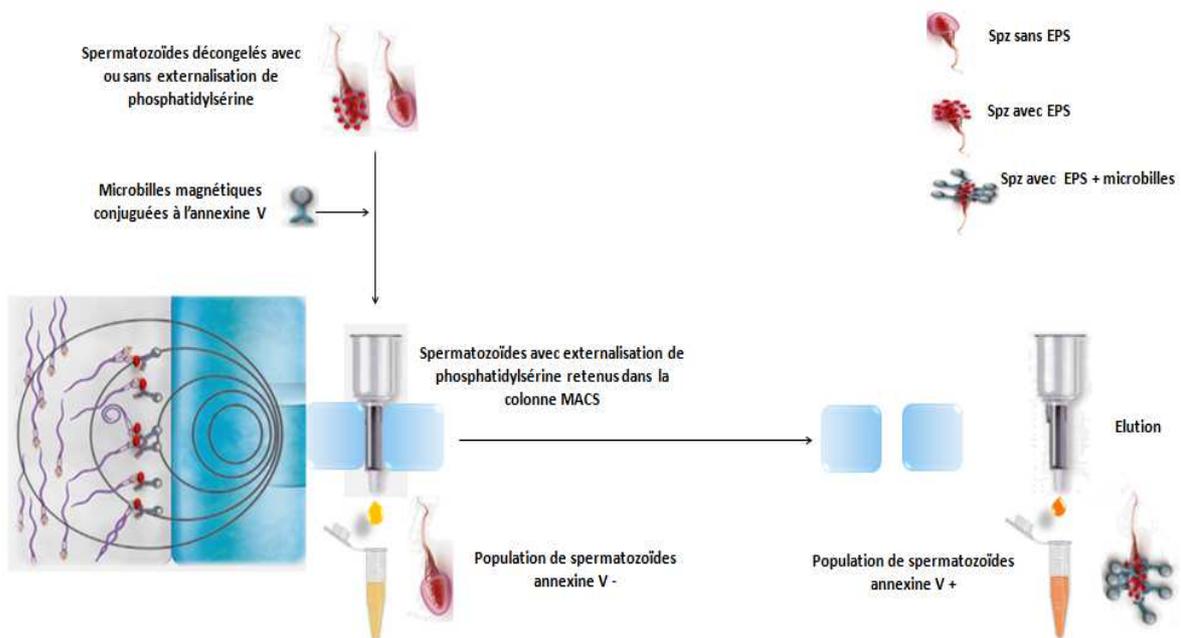


Figure 22 : Représentation schématique du principe de la technique MACS

Tri cellulaire par cytométrie de flux :

La technique de tri des cellules par cytométrie de flux a été développée par Hoogendijk, Kruger et al. (2009). Elle présente le même principe que la technique MACS et assure la sélection des spermatozoïdes en fonction d'un marqueur apoptotique (PS). Le tri de cellules par cytométrie de flux se base sur l'utilisation de l'annexine V couplée à un fluorochrome pour marquer les spermatozoïdes ayant externalisé leurs PS.

Cette technique est expérimentale et les données cliniques restent à générer. De plus, les cytomètres de flux peuvent ne pas être abordables pour de nombreuses unités de reproduction assistée (Henkel 2012).

Liaison à l'acide hyaluronique :

Le principe de cette technique de sélection se base sur un phénomène physiologique au cours de l'interaction gamétique : seuls les spermatozoïdes matures ayant la capacité de se fixer à l'acide hyaluronique contenu dans le *cumulus oophorus*, peuvent franchir le cumulus et féconder l'ovocyte (Ranganathan, Ganguly et al. 1994). Cette fixation à l'acide hyaluronique est une indication de la maturité des spermatozoïdes (remodelage de la membrane plasmique et maturation nucléaire) (Yudin, Vandervoort et al. 1999, Cayli, Jakab et al. 2003, Huszar, Ozenci et al. 2003).

Cette technique consiste à mettre des spermatozoïdes en contact avec l'acide hyaluronique, par l'une des méthodes suivantes :

- Un liquide hyper visqueux contenant l'acide hyaluronique : c'est la méthode « sperm slow procedure ». Dans ce cas, les spermatozoïdes matures présenteront un mouvement ralenti.
- Des gouttes d'hydrogel d'acide hyaluronique : c'est la méthode « PICSI (Physiological Intracytoplasmic Sperm Injection). Dans ce cas, les spermatozoïdes matures sont fixés par leur tête et leur flagelle reste mobile.

III. Techniques d'assistance médicale à la procréation

Les techniques d'assistance médicale à la procréation ou les procréations médicalement assistées sont l'ensemble des techniques médicales et biologiques qui comportent la manipulation des gamètes (ovocyte et/ou spermatozoïde) ou d'embryons, avec ou sans FIV ou transfert d'embryon, dans le but d'obtenir une grossesse chez un couple qui, sans cela, risquerait de demeurer infécond (Breart and De Mouzon 1995, Zegers-Hochschild, Adamson et al. 2017, Zegers-Hochschild, Adamson et al. 2017).

1. Induction simple de l'ovulation

L'induction simple de l'ovulation consiste à stimuler la production de follicules par les ovaires chez les femmes ayant un trouble ovulatoire (congénital ou acquis) afin d'obtenir 1 ou 2 ovocytes. Des rapports sexuels ciblés sur cette période d'ovulation permettent d'optimiser les chances de grossesse. Ce type de stimulation utilise des médicaments inducteurs de l'ovulation sans être suivi d'une fécondation *In Vitro*.

2. Insémination artificielle

L'insémination artificielle avec le sperme du conjoint est la plus ancienne des techniques d'AMP. Elle consiste à déposer des spermatozoïdes à l'intérieur des voies génitales féminines, et donc de faciliter la rencontre des gamètes masculins avec les gamètes féminins. Il existe deux techniques d'insémination artificielle :

- Insémination intra-cervicale : le sperme est déposé sans préparation dans le col de l'utérus. Cette technique présente de mauvais résultats, elle est donc abandonnée par la majorité des équipes médicales.
- Insémination intra-utérine : l'IUI consiste à déposer à l'aide d'un cathéter les spermatozoïdes mobiles du conjoint au fond de la cavité utérine au cours d'un cycle stimulé et monitoré, afin de court-circuiter l'obstacle de la glaire et d'augmenter d'une manière significative le nombre de spermatozoïdes dans l'utérus et les trompes (sites naturels de la fécondation) (Soffer 2000, Khallouk, Tazi et al. 2010).

L'insémination intra-utérine est la méthode de choix dans le traitement de l'infertilité d'origine masculine et/ou d'origine féminine : infertilité cervicale, hypofertilité masculine, troubles (physiques ou psychiques) empêchant les rapports sexuels (vaginisme, troubles de l'éjaculation, malformations ou troubles neurologiques et autres troubles sexologiques), infertilité inexplicée, endométriose modérée, conversion d'une FIV en IUI proposée en cas de réponse ovarienne insuffisante (Splingart, Catteau et al. 2016).

3. Fécondation In Vitro (FIV)

La fécondation *In Vitro* consiste après induction d'une multifolliculogénèse à prélever les ovocytes par ponction folliculaire échoguidée, à inséminer les ovocytes avec les spermatozoïdes du conjoint capacités in vitro et à transférer les embryons obtenus dans l'utérus de la patiente après en moyenne 3 à 5 jours de culture (Barrière and Jean 1995).

La FIV s'est révélée efficace pour le traitement d'infertilité en rapport avec une pathologie tubaire (trompes douteuses, endométriose), infertilité masculine modérée, stérilité immunologique ou inexplicée et aussi en cas d'échec d'IUI (Hamamah, Corcia et al. 2000).

4. Injection Intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI)

L'ICSI consiste à assurer l'interaction ovocyte-spermatozoïde en supprimant les obstacles mécaniques constitués par la zone pellucide et la membrane plasmique ovocytaire. Le spermatozoïde sélectionné est injecté dans le cytoplasme ovocytaire, le transfert d'embryon se fait après en moyenne 3 à 5 jours de culture.

L'ICSI est réservée aux infertilités masculines sévères et aux échecs de FIV. Elle peut être réalisée avec des spermatozoïdes frais, congelés, ponctionnés au niveau épидидymaire ou testiculaire (Khallouk, Tazi et al. 2010).

Matériel et Méthodes

A. Infertilité du couple et techniques d'aide médicale à la procréation

I. Impact des facteurs maternels et paternels sur les résultats de FIV et d'ICSI

Cette étude rétrospective a concerné les couples ayant subi une FIV ou une ICSI dans notre centre d'AMP à l'Unité de Médecine de la Reproduction (UMR) du CHU Farhat Hached Sousse (Tunisie). Au total, 586 cycles d'ICSI et 194 cycles de FIV ont été étudiés entre janvier et décembre 2015. En se basant sur les données biologiques du jour de la tentative, les critères d'exclusion pour FIV et ICSI étaient : les cycles avec ponction blanche, les cycles avec absence d'ovocyte mature et les cycles avec hyperstimulation. Le critère d'inclusion pour FIV et ICSI était insémination ou injection réalisée avec du sperme frais éjaculé.

Pour chaque cycle, un ensemble de données biologiques a été recueilli :

- Concernant le couple :
 - Âge maternel et paternel
 - Nombre d'ovocytes ponctionnés et/ou matures
 - Paramètres spermatisques (volume, numération, mobilité)
 - Nombre de cycles avec injection de spermatozoïdes présentant une tératozoospermie

- Concernant les techniques d'AMP (FIV/ICSI) :
 - Nombre de zygotes à J1
 - Nombre et qualité des embryons à J2
 - Nombre de blastocystes à J5
 - Jour de transfert
 - Nombre d'embryons transférés
 - Dose de β HCG (hormone chorionique gonadotrope) 15 jours après le transfert

Certaines données non renseignées de façon systématique dans le dossier du couple n'ont pu être étudiées.

II. Effet de la qualité de l'ADN spermatique sur les résultats obtenus en AMP

Dans cette étude prospective, nous nous sommes intéressés aux couples qui ont bénéficié de l'une des techniques d'AMP au sein de l'UMR du CHU-Farhat Hached Sousse. Ces patients ont eu au moins un échec de FIV/ICSI, c'est-à-dire pas de grossesse biologique ou clinique après une tentative d'AMP. Le critère d'exclusion pour ces couples était l'infertilité d'origine féminine : endocrinologique, pathologie utérine, dysfonctionnements métaboliques et/ou présence d'avortements spontanés à répétition. Au total, 31 couples en FIV/ICSI sont inclus dans notre cohorte, depuis février 2016.

Afin de tenter de trouver une explication à ces échecs, la fragmentation de l'ADN spermatique est analysée par la technique TUNEL et plusieurs données sont également collectées : informations sur le couple (âge, durée d'infertilité...), antécédents (consommation de tabac/alcool, varicocèle, chimiothérapie...), résultats de la tentative (taux de maturation, taux de fécondation, taux de segmentation, nombre d'embryons et grossesse chimique).

III. Cycle de FIV/ ICSI

1. Procédure de FIV/ ICSI

Le déroulement de FIV ou ICSI se fait en 5 étapes :

a. Recueil des ovocytes

Cette étape s'effectue en deux temps :

- Stimuler l'ovaire de façon à permettre la croissance de plusieurs follicules
- Ponctionner les follicules afin de recueillir le contenu de chacun de ces follicules.

La stimulation ovarienne suit un protocole hyper-ovulant et elle se réalise sous une surveillance stricte. La ponction des follicules s'effectue juste avant l'ovulation, 36 heures après l'injection d'HCG. Elle est réalisée par voie endo-vaginale sous contrôle échographique et anesthésie locale, parfois sous anesthésie générale. Elle consiste, grâce au repérage échographique, à introduire successivement, dans chaque follicule ovarien, l'extrémité d'une fine aiguille pour en aspirer le contenu. Celui-ci est examiné grâce à une loupe binoculaire, les ovocytes repérés sont transférés dans une boîte contenant un milieu de culture adapté.

Toutes les boîtes contenant les milieux de culture sont préparées la veille de leur utilisation et disposées à l'étuve à 37°C et 5% de CO₂ afin de permettre un bon gazage des différents milieux de culture et équilibrage de l'huile minérale.

Le jour de la ponction, à J0 : la manipulation sous hotte à flux laminaire nécessite le port de gants non stériles lavés à l'eau et essuyés, ainsi que le port d'un masque. Les seringues préalablement rincées au milieu de rinçage à 37°C avant l'aspiration des follicules, contiennent le liquide folliculaire prélevé au bloc opératoire. Elles sont déposées sur un champ stérile dans le sas bloc-labo, sur une platine thermostatée à 37°C. Les liquides folliculaires déposés dans des boîtes de Pétri sont observés immédiatement sous la loupe binoculaire. Les complexes cumulo-ovocytaires (CCO) sont recherchés et leur taille est appréciée au microscope optique avant le prélèvement, à l'aide de pointes de pipettes automatiques stériles. Les CCO sont déposés dans une petite boîte de Pétri, contenant 2 ml de milieu de culture, maintenue à 37°C sur une platine chauffante sous la hotte.

Un peu de liquide folliculaire de chaque seringue, prélevé stérilement dans un tube à hémolyse stérile, est gardé jusqu'à J2 à température ambiante (TA) en vue d'une culture bactérienne en cas de suspicion d'infection des milieux de culture. La boîte de Pétri est mise à l'étuve à 37°C et 5% de CO₂ dès la fin de la ponction.

En cas d'ICSI, une étape de décoronisation est réalisée suite à l'incubation des ovocytes ponctionnés durant 1 min dans un milieu contenant de la hyaluronidase. Cette étape permet la dissociation des cellules folliculaires entourant l'ovocyte. Les ovocytes débarrassés des cellules du cumulus sont ensuite observés au microscope inversé afin de sélectionner les matures (avec un globule polaire).

b. Recueil et préparation du sperme

Le recueil du sperme du conjoint se fait le jour de la ponction des ovocytes par masturbation.

La préparation de sperme pour FIV/ICSI a pour but d'obtenir une concentration maximale de spermatozoïdes fécondants. Après 30 min de liquéfaction à l'étuve à CO₂ à 37°C, le volume du recueil de sperme est noté et une évaluation de la mobilité et une numération sont effectuées.

- Si le pourcentage de spermatozoïdes fléchant est supérieur à 20% et/ou la numération de spermatozoïdes est supérieure à 1 million/ml, la technique du gradient de densité est utilisée.
- Si le pourcentage de spermatozoïdes fléchant est inférieur à 20% et/ou la numération de spermatozoïdes est inférieure à 1 million/ml, la technique dite de « lavage » est effectuée.

Pour la technique de lavage, la totalité du recueil est centrifugée à 360 g pendant 15 min avec 4 ml de Sperm Medium, dans un tube conique.

Le surnageant est éliminé. Le culot est récupéré dans un milieu de culture de 0,1 à 1 ml selon la densité du culot. Si le nombre de spermatozoïdes du sperme frais est inférieur à 500 000/ml et/ou la mobilité de classe (a) est inférieure à 5% sur le sperme frais, 2,5 ml de pentoxifylline sont ajoutés au maximum 1 h avant l'ICSI. Un test de mobilité est également effectué après la préparation du sperme.

c. Mise en fécondation ou micro-injection

- En cas de FIV : les ovocytes et les spermatozoïdes sélectionnés sont mis en contact dans un milieu de culture favorable à leur survie et conservés dans un incubateur à 37°C.
- En cas d'ICSI : juste avant la micro-injection, les spermatozoïdes sont mis en présence de polyvinylpyrrolidone afin de ralentir leur mouvement et faciliter leur aspiration. Un spermatozoïde de morphologie normale et vivant est aspiré et injecté dans le cytoplasme de l'ovocyte à l'aide d'une micropipette d'injection.

Quelle que soit la technique d'AMP utilisée, la fécondation et le développement embryonnaire sont évalués pendant la culture.

d. Transfert embryonnaire

Il a généralement lieu quelques jours après la ponction folliculaire à J2/J3 ou occasionnellement à J4/J5 au stade de morula/blastocyste (les blastocystes sont classés selon Gardner (Gardner, Lane et al. 2000)). Il s'agit d'un geste médical rapide et indolore ne nécessitant pas d'anesthésie. Il est effectué sous contrôle échographique par voie vaginale à l'aide d'un cathéter très fin.

Le choix du nombre d'embryons à transférer dépend de plusieurs paramètres : âge de la patiente, nombre de tentatives, qualité embryonnaire, présence ou non de contre-indication pour une grossesse gémellaire et bien sûr souhait de la patiente.

Après le transfert, la phase lutéale est soutenue par l'administration par voie vaginale de 400 mg/j de progestérone micronisée (Utrogéstan200®) pendant une durée de 2 semaines. En cas de grossesse évolutive, ce traitement sera poursuivi jusqu'à l'issue du 3^{ème} mois de la grossesse.

e. Evaluation de la grossesse chimique

Un dosage plasmatique quantitatif de la β HCG est réalisé 15 jours après le transfert embryonnaire. Une grossesse chimique est affirmée par un taux sérique de β HCG positif (>10 UI/ml).

2. Les paramètres de fécondité

Plusieurs paramètres sont évalués au cours de la procédure de FIV et ICSI :

- La maturation ovocytaire : elle est évaluée le jour de la ponction (J0) en cas d'ICSI. Les ovocytes matures sont identifiés par la présence d'un globule polaire dans l'espace périvitellin. Ce paramètre nous permet de déterminer le taux de maturation :

$$\text{Taux de maturation (\%)} = \frac{\text{Nombre d'ovocytes en métaphase II}}{\text{Nombre total d'ovocytes ponctionnés}} \times 100$$

- La fécondation : elle est évaluée entre 16 et 20 heures après l'insémination ou l'injection (J1). La fécondation est contrôlée par l'observation de deux pronuclei au centre de l'ovocyte et de deux globules polaires dans l'espace périvitellin.

Ce paramètre nous permet de déterminer le taux de fécondation :

$$\text{Taux de fécondation (\%)} = \frac{\text{Nombre d'ovocytes fécondés}}{\text{Nombre total d'ovocytes ponctionnés}} \times 100$$

- La segmentation : elle est évaluée entre 40 à 42 heures après l'insémination ou l'injection (J2). Les embryons sont au stade 4 blastomères en moyenne. Les embryons sont classés selon Van Royen, Mangelschots et al. (1999). L'embryon de bonne qualité est qualifié de type I et l'embryon de mauvaise qualité, de type III. Ce paramètre nous permet de déterminer le taux de segmentation :

$$\text{Taux de segmentation (\%)} = \frac{\text{Nombre d'embryons}}{\text{Nombre total d'ovocytes fécondés}} \times 100$$

- La qualité embryonnaire :

$$\text{Taux d'embryons de bonne qualité (\%)} = \frac{\text{Nombre d'embryons de type I}}{\text{Nombre total d'embryons}} \times 100$$

IV. Marquage de l'ADN spermatique par technique TUNEL

1. Principe

En cas de fragmentation de l'ADN spermatique, des extrémités 3'-OH sont libérées. Le principe de la technique TUNEL repose sur l'utilisation d'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. Des anticorps couplés à un

fluorochrome et dirigés contre la digoxigénine sont ajoutés. 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 (Figure 23). L'analyse s'effectue au microscope à fluorescence (Zeiss, Le Pecq, France) couplé à une caméra CCD couplée à ISIS (In Situ Imaging System) (Metasystems, Altlusheim, Allemagne).

Les spermatozoïdes à ADN fragmenté présentent une fluorescence bleue et rouge, alors que les spermatozoïdes à ADN non fragmenté ne présentent qu'une fluorescence bleue.

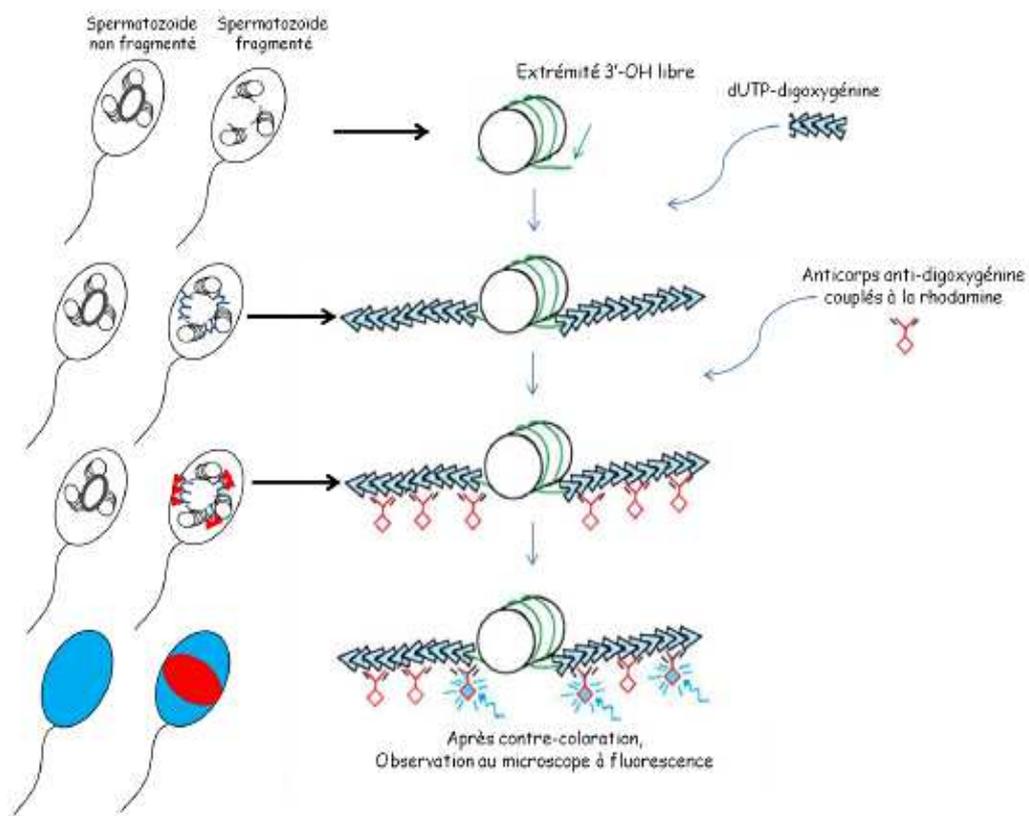


Figure 23 : Principe de la technique TUNEL

2. Technique

L'étude de la fragmentation de l'ADN spermatique est effectuée à l'aide du kit ApopTag (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Les principales étapes de ce test sont détaillées comme suit :

Fixation des spermatozoïdes

Des frottis des spermatozoïdes sont réalisés sur des lames et séchés à l'air libre. La fixation des spermatozoïdes se fait ensuite dans une solution de Carnoy (1 volume d'acide acétique pour 3 volumes de méthanol) toute une nuit.

La perméabilisation

La perméabilisation des spermatozoïdes est réalisée à l'aide d'une solution de 2X SSC/0,4% NP40 (SSC : sodium saline citrate ; NP40 : Nonidet P40) dans laquelle les lames sont immergées pendant 30 min à 37°C. Elles sont ensuite déshydratées par une série de bains successifs d'éthanol 70% / 90% / 100% pendant 3 min chacun.

L'élongation de l'ADN

Sur une lame, 43 µl de tampon d'équilibration (Equilibration Buffer) sont déposés et incubés durant environ 30 s à température ambiante. L'élongation de l'ADN s'effectue par incubation des spermatozoïdes avec un mélange de tampon de réaction et d'enzyme TdT (44 µl par lame) pendant une heure à 37°C et dans une chambre humide. Les lames sont recouvertes par des lamelles en plastique, ce qui permet à la fois d'éviter l'évaporation et de s'assurer que la solution recouvre bien toute la surface des spermatozoïdes à marquer. Cette étape permet d'incorporer les nucléotides dont certains sont couplés à la digoxygénine, sur les extrémités 3'-OH d'ADN libre. Les lames sont ensuite plongées dans un tampon d'arrêt d'élongation (Stop Reaction) pendant 10 min à température ambiante, puis elles sont lavées deux fois dans deux bains de PBS 1X (Phosphate Buffered Saline) pendant 1 min 30 à température ambiante.

La révélation de l'élongation

La révélation de l'élongation de l'ADN se fait par incubation des cellules avec l'anticorps anti-digoxygénine conjugué à la rhodamine (44 µl par lame), pendant 30 min à 37°C, dans une chambre humide, à l'abri de la lumière. Ensuite, les lames sont lavées deux fois pendant 3 min à température ambiante dans du PBS 1X.

Contre-coloration

Une fois les lames séchées à l'air libre, une contre-coloration de l'ADN avec du DAPI est effectuée. Les frottis peuvent alors être conservés à l'obscurité à +4°C jusqu'à la lecture. La lecture se fait à l'aide d'un microscope à fluorescence à l'obscurité.

Pour chaque patient, 500 spermatozoïdes ont été comptés au minimum. Selon le taux d'ADN fragmenté, le sperme peut être classé en deux catégories :

- inférieur à 7% : sperme de bonne qualité.
- supérieur ou égal à 7% : sperme altéré.

V. Etudes statistiques

• Impact des facteurs maternels et paternels sur les résultats de FIV et d'ICSI

- Exploitation des résultats de FIV :

L'analyse des données recueillies a été réalisée avec le logiciel SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) version 16.0. Les données recueillies dans notre étude ne suivent pas une distribution normale selon le test Kolmogorov-Smirnov. C'est pourquoi concernant les comparaisons entre des variables quantitatives, nous avons utilisé le test non paramétrique : test U de Mann-Whitney. Pour les variables qualitatives, nous avons utilisé le test du χ^2 d'indépendance ou le test de Fisher exact selon les possibilités d'application.

Pour tous ces tests, le seuil de signification a été fixé à $p < 0,05$.

- Exploitation des résultats d'ICSI :

L'analyse des données recueillies a été réalisée avec le logiciel SPSS version 16.0. Toutes les variables ont été initialement testées afin de déterminer la normalité des données par le test Kolmogorov-Smirnov. Pour les comparaisons entre des variables qualitatives, nous avons utilisé le test du χ^2 d'indépendance ou le test de Fisher exact selon les possibilités d'application. Pour les variables quantitatives, nous avons utilisé un test paramétrique, le test de Student d'indépendance. Pour déterminer la corrélation entre plusieurs variables quantitatives, le test de Pearson a été utilisé. La courbe ROC (Receiver Operating Characteristic) a été utilisée pour déterminer le seuil optimal du paramètre étudié.

La régression linéaire a permis d'étudier l'effet des paramètres maternels et paternels sur la qualité embryonnaire. Les résultats sont représentés par la valeur de coefficient de régression (β) et la valeur de p .

La régression logistique a été réalisée afin d'étudier la relation entre les paramètres maternels et paternels, les paramètres d'ICSI et l'échec (codé 1) ou succès (codé 0) de fécondation ou de grossesse chimique. Les résultats sont représentés par la valeur odds ratio (OR), l'intervalle de confiance à 95 % (95% IC) et la valeur de p .

Afin de déterminer les facteurs prédictifs de l'échec de fécondation ou de grossesse chimique et les facteurs ayant une influence sur la qualité embryonnaire, la régression linéaire ou la régression logistique a été également utilisée selon la stratégie suivante :

- Analyse univariée : elle permet d'estimer l'association de chaque variable d'intérêt avec la variable à expliquer. A ce stade l'OR est non ajusté.
- Analyse multivariée : toutes les variables dont le degré de signification est inférieur à 0,20 ($p < 0,20$) lors de l'analyse univariée sont incluses dans le modèle initial (modèle complet) de régression. Ce seuil de 0,20 permet de prendre en compte des variables qui pourraient être des facteurs de confusion possibles ou des facteurs d'interaction.
- Modèle final : ce modèle est le résultat de plusieurs ajustements et représente les variables qui ont un degré de significativité inférieur à 0,05.

Pour tous ces tests, le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$.

• Effet de la qualité de l'ADN spermatique sur les résultats obtenus en AMP

L'analyse des données recueillies a été étudiée avec le logiciel SPSS version 16.0. Après avoir fait une analyse descriptive, la corrélation entre plusieurs variables quantitatives a été étudiée par le test Spearman.

La régression linéaire a été réalisée afin d'étudier l'effet de la fragmentation de l'ADN sur le taux de fécondation après ajustement de l'âge maternel, du nombre d'ovocytes ponctionnés et matures. Le résultat est représenté par la valeur de coefficient de régression (β) et la valeur de p .

La régression logistique a été utilisée afin d'étudier la relation entre la fragmentation de l'ADN spermatique et le taux de grossesse chimique après ajustement de l'âge maternel, du

nombre d'ovocytes ponctionnés et matures, du nombre d'embryons transférés et du jour de transfert d'embryons. Ces tests sont réalisés après vérification de la normalité des données. Pour tous ces tests, le seuil de signification a été fixé à $p < 0,05$.

B. Tri magnétique sur les spermatozoïdes

I. Description de l'étude

Le tri cellulaire à l'aide de microbilles magnétiques conjuguées à l'annexine V est une technique qui permet de sélectionner les cellules en fonction de leur propriété d'externalisation des phosphatidylsérines (EPS), en assurant la séparation des cellules apoptotiques (fraction annexine V+) et des cellules non apoptotiques (fraction annexine V-).

Dans notre travail, le tri magnétique sur les spermatozoïdes est réalisé à l'aide de deux kits différents :

- kit recherche (kit MACS® Technology, Miltenyi Biotec SAS, Paris, France) : il est normalement utilisé pour sélectionner tout type de cellules somatiques. L'application du protocole du fournisseur n'a pas permis d'obtenir une amélioration significative du taux de pureté après le tri pour les échantillons spermatisés. C'est pour cela qu'une étape d'optimisation du protocole du tri magnétique des spermatozoïdes avec le kit de recherche est réalisée en premier lieu. Une validation de ce protocole optimisé a ensuite été effectuée pour sélectionner les spermatozoïdes chez les hommes avec un taux anormal de fragmentation d'ADN.
- kit ART (Assisted Reproductive Technology) (kit MACS® Technology, Miltenyi Biotec SAS) : en France, il est apparu récemment. Contrairement au kit recherche, le kit ART est dédié à la sélection des spermatozoïdes. Aucune étape d'optimisation n'est réalisée. Néanmoins, il est beaucoup plus onéreux que le kit recherche. Nous avons utilisé ce kit pour sélectionner les spermatozoïdes chez :
 - des hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure (projet financé par l'Agence de la Biomédecine),
 - des hommes porteurs d'une mosaïque gonosomique.

II. Paramètres évalués

Plusieurs paramètres sont évalués avant, durant et après le tri par MACS :

- L'externalisation des phosphatidylsérines (EPS) : ce paramètre nous permet de déterminer le taux de pureté de nos échantillons. L'EPS est évaluée grâce à un marquage avec de l'annexine V-FITC (technique détaillée au § 1. *Marquage Annexine V-FITC*).

- La qualité de l'ADN spermatique : ce paramètre nous permet d'évaluer le taux de fragmentation de l'ADN spermatique. Ceci est étudié grâce à la technique TUNEL (technique détaillée précédemment au § IV. Marquage de l'ADN spermatique par technique TUNEL).
- L'équipement chromosomique : ce paramètre nous permet d'évaluer le contenu chromosomique des spermatozoïdes (anomalie chromosomique ou aneuploïdie dans les gamètes) et d'étudier la ségrégation méiotique dans les spermatozoïdes. Ceci est analysé grâce à la technique FISH (technique détaillée au § 2. *FISH sur spermatozoïdes*).

1. Marquage Annexine V-FITC

a. Principe

Dans un spermatozoïde non apoptotique, les phosphatidylsérines membranaires ne sont situées qu'à la face interne de la membrane. Dès lors qu'un gamète entre en apoptose, les PS sont externalisées (Figure 24).

L'annexine présente une propriété de liaison Ca^{2+} -dépendant aux membranes contenant des phospholipides chargés négativement comme la PS (Klee 1988, Swairjo and Seaton 1994). Grâce à la forte affinité entre annexine V et PS, les spermatozoïdes en apoptose sont marqués. L'annexine V est couplée à un fluorochrome (FITC) (fluorescence verte). Une contre-coloration de l'ADN spermatique est également réalisée avec du DAPI. L'analyse s'effectue sur un microscope à fluorescence (Zeiss AxioPlan Microscope). Les spermatozoïdes avec EPS présentent une fluorescence bleue et verte, alors que les spermatozoïdes sans EPS ne présentent que de la fluorescence bleue.

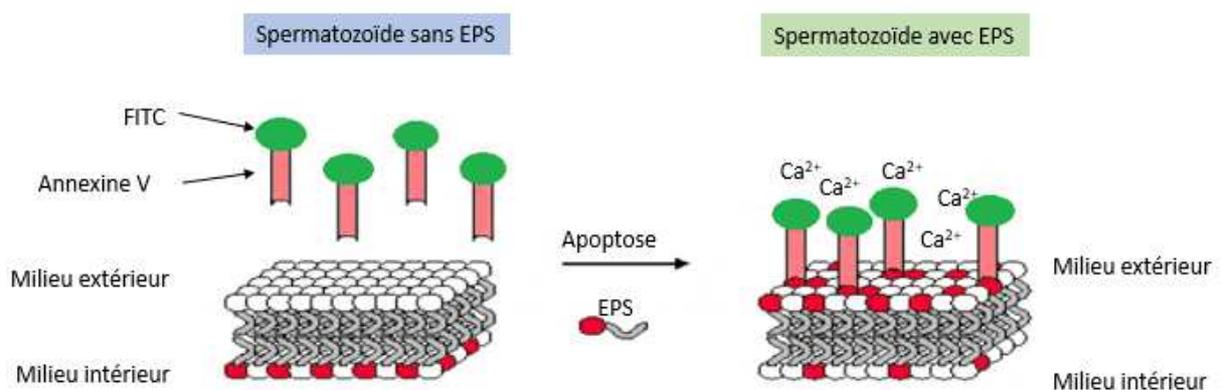


Figure 24 : Principe du marquage annexine V-FITC
(EPS : externalisation des phosphatidylsérines)

b. Technique

Le marquage se fait dans un aliquot contenant $0,2 \times 10^6$ de spermatozoïdes. Ces derniers sont incubés dans 10 μ l d'annexine V-FITC, le volume est complété à 100 μ l avec du BB 1X (Binding Buffer 1X) pendant 15 min à l'obscurité et à TA. Puis, 1 ml de BB 1X est ajouté. Après une homogénéisation de l'ensemble, une centrifugation à 400 g pendant 10 min est effectuée. Le culot final est mis en suspension dans 10 μ l de BB IX avant d'être étalé sur une lame. Le frottis spermatique est ensuite contre-coloré avec du DAPI et observé au microscope à fluorescence. Les spermatozoïdes avec EPS ont une fluorescence bleue et verte, et ceux sans EPS ont une fluorescence bleue. Le frottis est conservé à l'obscurité à +4°C jusqu'à la lecture. Cinq cents spermatozoïdes sont analysés pour chaque lame.

2. FISH sur spermatozoïdes

Le principe de la FISH repose sur l'hybridation de sondes sur un ADN cible. Les sondes utilisées pour nos manipulations sont des séquences d'ADN marquées par un fluorochrome (vert, rouge ou bleu). Ces sondes sont des sondes commerciales ou des Bacterial Artificial Chromosomes (BACs) (Figure 25).

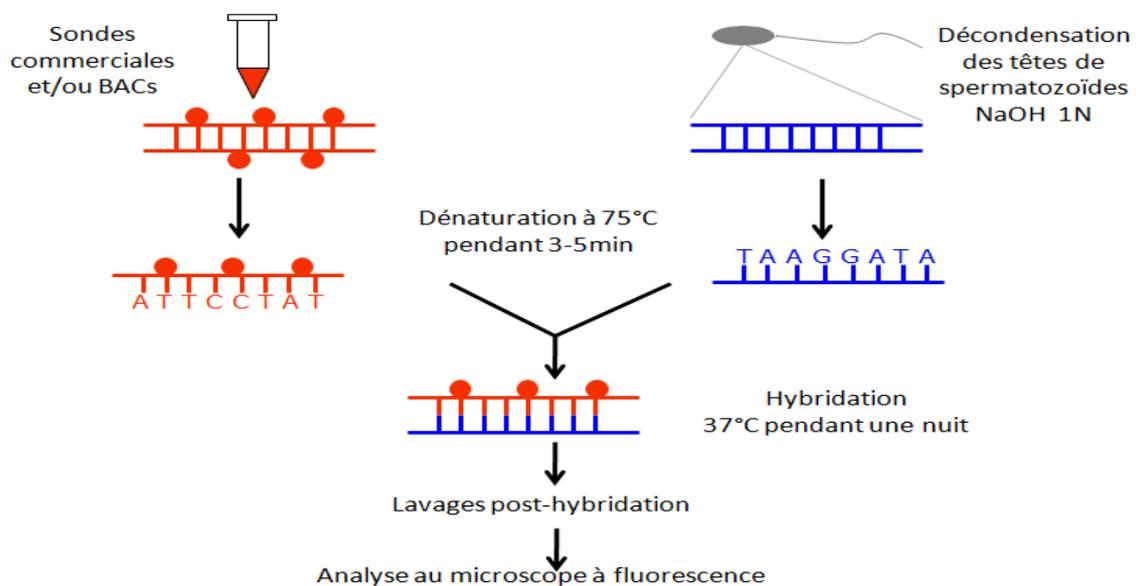


Figure 25 : Principe de FISH sur spermatozoïdes
BAC : Bacterial Artificial Chromosome

a. Sondes commerciales

Les sondes commercialisées sont prêtes à l'emploi. Elles sont déjà marquées directement par un fluorochrome. Seule une dilution avant l'hybridation est nécessaire. Nous avons utilisé des sondes centromériques (CEP : chromosome enumeration probe), spécifiques des régions α satellites (séquences répétées en tandem) d'un chromosome donné.

Par ailleurs, l'analyse du contenu chromosomique et de la ségrégation méiotique dans les spermatozoïdes a nécessité la fabrication de sondes BACs complémentaires de régions d'intérêt, lorsqu'il n'existe pas des sondes commercialisées adaptées à nos besoins.

b. Sondes BACs

Les sondes BACs sont des séquences d'ADN du génome humain, intégrées dans des plasmides des bactéries *E. coli*. Ces séquences de taille, en moyenne, de 100 à 300 Kb, sont complémentaires aux séquences chromosomiques d'intérêt. Le plasmide contient également un gène de résistance à un antibiotique (le chloramphénicol) pour les sélectionner lors de la culture. Les BACs sont utilisés comme des sondes spécifiques d'ADN et sont marqués par des fluorochromes.

Afin d'obtenir un signal analysable lors de la lecture au microscope, un pool de BACs marqué par un même fluorochrome est préférable pour une FISH sur spermatozoïdes. Un pool de BACs est constitué par un ensemble de 5 à 6 BACs contigus de façon à atteindre une longueur moyenne de 500 000 pb (de préférence une longueur d'une mégabase).

Les sondes BACs ont été choisies à partir d'un site internet public UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu>) en fonction du réarrangement chromosomique à étudier. Contrairement aux sondes commerciales, les sondes BACs nécessitent différentes étapes de préparation avant l'hybridation. Ces étapes sont réalisées dans notre laboratoire et sont détaillées ci-dessous :

- **Culture cellulaire :**

Après sélection des BACs d'intérêt, chaque clone est mis en pré-culture dans 2 ml du milieu Luria Bertani (milieu LB), en présence de l'antibiotique de sélection (10 mg/ml de chloramphénicol), à l'étuve à 37°C pendant une nuit. Le lendemain, 30 μ l du mélange de la

pré-culture (diluée au 100^{ème}) sont ensemencés sur un milieu de culture LB-Agar/Chloramphénicol préparé à l'avance dans une boîte de Pétri. Ces boîtes sont déposées à l'étuve à 37°C pendant une nuit. Une colonie individualisée est prélevée et transférée dans 5 ml de milieu LB/Chloramphénicol puis mise à l'étuve à 37°C. Cette étape a pour but de cultiver un clone unique et d'éviter des recombinaisons entre plusieurs clones. Ensuite 1 ml de celui-ci est mélangé à 25 ml de milieu LB/Chloramphénicol. Le tout est incubé une nuit à 37°C sous agitation. Après une centrifugation (25 min, 3 000 g à 4°C), le surnageant est éliminé et le culot est conservé à -20°C jusqu'à l'étape d'extraction.

- **Extraction de l'ADN :**

Le culot est repris dans 0,8 ml de GTE 1X / lysozyme (glucose Tris EDTA : ethylene diamine tetraacetic acid), vortexé et incubé pendant 15 min dans la glace. Le glucose permet de maintenir une bonne osmolarité ; l'EDTA déstabilise la membrane bactérienne (chélate les ions divalents) et inactive les DNases ; le Tris stabilise le pH à 8,0 et le lysozyme dégrade les constituants de la paroi bactérienne.

Ensuite 1,6 ml de SDS (sodium dodecylsulfate) (1%) / NaOH (hydroxyde de sodium) (0,2 N) sont ajoutés en agitant délicatement à la main et incubés 5 min au maximum dans la glace. Le SDS dénature les protéines et le NaOH dénature les acides nucléiques. Après l'incubation, 1,2 ml d'acétate de potassium 3 M sont ajoutés et incubés 15 min dans la glace. Deux phases se forment après cette étape. L'acétate de potassium neutralise le pH à 5,5 et permet aux brins d'ADN de se ré-apparier de façon complémentaire. De plus, le potassium précipite le SDS, les protéines et les lipides. L'ADN et l'ARN se trouvent dans la solution aqueuse. Une centrifugation pendant 25 min à 3 000 g à 4°C est réalisée. Le surnageant est ensuite filtré et récupéré auquel 1,8 ml d'isopropanol sont ajoutés et incubés 15 min dans la glace. Ce dernier précipite les acides nucléiques. Après une centrifugation pendant 15 min à 3 000 g à 4°C, le surnageant est éliminé. Le culot est remis en suspension avec 0,5 ml de TE 1X (Tris HCl + EDTA) et 0,5 ml de chlorure de lithium (LiCl 5M) (précipite l'ARN). Après incubation de 15 min dans la glace, une centrifugation de 15 min à 3 000 g à 4°C est réalisée. Le surnageant est récupéré, 3 ml d'éthanol absolu y sont ajoutés et incubés 1 heure à -20°C afin de précipiter l'ADN. Après une centrifugation pendant 25 min à 3 000 g à 4°C, le surnageant est encore éliminé. Le culot est repris dans 300 µl de TE 1X, et 7 µl de RNases A (10 mg / ml) et incubé 1 heure au bain-marie à 37°C pour éliminer complètement les ARN restants. Puis 8 µl de

protéinase K (10 mg / ml) sont ajoutés et incubés une nuit à 37°C pour éliminer toutes les protéines.

Le lendemain 400 µl de Phénol-chloroforme sont ajoutés et une centrifugation pendant 10 min à 11 000 g à TA) est réalisée. Le phénol est un déprotéinisant puissant et le chloroforme permet d'extraire le phénol. Après centrifugation de 10 min à 11 000 g, cette solution permet l'obtention des deux phases : une phase organique (phase inférieure) contenant les lipides et les protéines et une phase aqueuse (phase supérieure) contenant l'ADN ; 250 µl sont prélevés (phase supérieure) auxquels 100 µl d'acétate d'ammonium 7,5 M sont ajoutés avec 600 µl d'éthanol absolu pour précipiter l'ADN.

Une incubation d'une heure à -20°C ainsi qu'une centrifugation de 15 min à 11 000 g à TA sont ensuite réalisées. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 500 µl d'éthanol à 70°, puis centrifugation (10 min, 11 000 g, TA). Le surnageant est encore éliminé, un volume de 50 à 100 µl de TE 1X est ajouté en fonction de la taille des culots. Pour finir, la quantité d'ADN extraite et le degré de pureté sont évalués grâce à la mesure de l'absorption de la lumière à 260 nm et 280 nm. Une valeur entre 1,8 et 2 correspond à une préparation pure d'ADN.

Une fois l'ADN récupéré, une étape de marquage par des fluorochromes sera réalisée. Le marquage se fait par nick-translation.

- **Marquage par nick-translation**

Le marquage de l'ADN s'effectue grâce à l'activité exonucléase 5'-3' de la DNase I qui crée des cassures aléatoires simple brin de l'ADN et grâce à l'activité polymérase 5'-3' de la DNA polymérase I qui assure la repolymérisation en incorporant des bases nucléotidiques au niveau de ces cassures dont un nucléotide est couplé à un fluorochrome. Les BACs sont ainsi marqués directement par un fluorochrome (vert ou rouge ou aqua).

Pour un BAC, un mélange de 1 µl d'ADN, 0,7 µl de dUTP (nucléotides couplés à un fluorochrome) à 1 mM, 0,42 µl de dTTP à 0,3 mM, 2,52 µl du mélange (0,84 µl de ATP, 0,84 µl de CTP, 0,84 µl de GTP), 1,2 µl du tampon 10X, 1,8 µl d'enzymes, le volume d'eau distillée nécessaire pour un volume final de 10 µl est laissé une nuit à 15°C. Le lendemain, la réaction enzymatique est stoppée en incubant les microtubes au bain-marie 10 min à 72°C. Ils sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation. L'ensemble de la manipulation doit être réalisé à l'abri de la lumière.

Une étape de précipitation est ensuite réalisée afin de concentrer les sondes à utiliser.

- **Précipitation des sondes**

La précipitation peut être réalisée BAC par BAC ou par pool des BACs en une seule réaction. Pour un BAC, 5 µl de BAC préalablement marqué sont mis dans un tube avec 1 µl d'ADN cot-1 (1 mg/ml). Ce dernier limite les hybridations non spécifiques par saturation des séquences répétées de l'ADN. De plus, 4 µl d'eau distillée, 1 µl d'acétate de sodium 3 M et 35 µl d'éthanol à 100° sont ajoutés. L'acétate de sodium permet une meilleure précipitation des sondes. Après homogénéisation, le mélange est placé 15 min à -20°C, puis une centrifugation est réalisée pendant 30 min à 17 000 g à 4°C. Le surnageant est éliminé, 5 µl de tampon Locus Specific Identifier (Abbott, Rungis, France) sont ajoutés et après homogénéisation, les pools de BACs ainsi préparés, sont conservés à -20°C.

c. Réalisation de la technique FISH

Des frottis des spermatozoïdes sont réalisés et fixés par la solution de Carnoy comme indiqué précédemment au § IV. Marquage de l'ADN spermatique par technique TUNEL. Une étape de décondensation de la chromatine des spermatozoïdes est ensuite nécessaire.

- **Décondensation et perméabilisation**

Chaque frottis est placé 2 min dans une solution de NaOH 1N à TA afin de décondenser la chromatine. Ils sont ensuite lavés dans un bain de SSC 2X pendant 5 min à TA.

Une étape de perméabilisation et une étape de déshydratation sont ensuite réalisées comme indiqué au § IV. Marquage de l'ADN spermatique par technique TUNEL, avant de procéder à l'hybridation.

- **Co-dénaturation/hybridation**

Avant la co-dénaturation, nous déposons 5 µl de sondes par lame. La co-dénaturation s'effectue à l'aide d'un appareil automatique d'hybridation, le ThermoBrite (Abbott). La co-dénaturation est effectuée simultanément sur les spermatozoïdes et les sondes pendant une durée de 3 à 5 min à 75°C. L'hybridation est réalisée ensuite sur une nuit à l'étuve à 37°C en chambre humide.

- **Lavages post-hybridation et contre-coloration**

Le lendemain, les frottis sont plongés dans une solution de 0,4X SSC/0,3% NP40 pendant 30 s à 72°C puis dans une solution de 2X SSC /0,1% NP40 à une TA pendant 15 s. Les lames sont ensuite séchées et contre-colorées avec du DAPI.

Les frottis marqués par FISH sont ensuite conservés à +4°C jusqu'à la lecture. L'équipement chromosomique des spermatozoïdes est déterminé selon la combinaison des signaux fluorescents observés. Au moins 1 000 spermatozoïdes sont analysés par frottis.

III. Optimisation et validation du tri des spermatozoïdes à l'aide du kit de recherche

1. Optimisation du protocole du tri magnétique : Kit de recherche

a. Population

Trente quatre échantillons de sperme cryoconservés dans un milieu Sperm Freezing Medium (Irvine Scientific, Paris, France) sont inclus dans notre étude. Aucune étape de préparation (lavage, gradient de densité, swim-up...) n'est réalisée avant la congélation.

Nous avons travaillé sur des paillettes de sperme cryoconservées provenant de la banque du sperme dédiée à la recherche au sein du laboratoire de Cytogénétique et Biologie de la Reproduction INSERM U1078 Brest.

b. Description de l'étude

Afin d'adapter le protocole du tri magnétique du kit de recherche pour la sélection des spermatozoïdes ayant externalisé leurs PS, plusieurs stratégies et tests sont effectués.

Le tri magnétique nécessite une étape de marquage magnétique par des microbilles magnétiques couplées à l'annexine V et une étape de séparation par colonne. Ces deux étapes se réalisent en présence d'un réactif fourni par Miltenyi Biotec SAS : BB 1X. Les tests et les stratégies développés ont comme but de déterminer les meilleures conditions de marquage magnétique, de savoir le type de colonne le plus adapté aux échantillons spermatiques, d'étudier l'effet et le rôle du BB 1X.

L'optimisation du protocole du kit de recherche est détaillée ci-dessous selon l'ordre chronologique de réalisation.

c. Etude préliminaire

Selon le protocole du fournisseur du kit de recherche, le marquage magnétique (incubation des spermatozoïdes avec des microbilles magnétiques) doit être réalisé à une température basse (entre 2°C et 8°C), tandis que la séparation sur colonne se fait à TA. Ce changement brusque de température peut stresser les spermatozoïdes et peut fausser nos résultats. De plus, suite à des échanges avec le fournisseur, nous avons choisi de faire le marquage magnétique à TA (condition idéale pour les spermatozoïdes). Concernant le temps d'incubation des spermatozoïdes avec les microbilles, nous avons respecté les recommandations du fournisseur. Le marquage magnétique est réalisé pendant 15 min.

Par ailleurs, deux colonnes de séparation sont présentes sur le marché. Des grandes colonnes LS (MidiMACS) avec une capacité au maximum de 2 000 M de cellules dont 100 M de cellules marquées et des petites colonnes MS (MiniMACS) avec une capacité au maximum de 200 M de cellules dont 10 M de cellules marquées. Puisque nous travaillons toujours avec des petites quantités de spermatozoïdes, nous avons choisi la colonne MS pour le reste de nos tests.

d. Quantité de microbilles

Selon le fournisseur, le marquage magnétique se base sur l'adaptation de la quantité de microbilles à la concentration des cellules. Pour déterminer la meilleure quantité des microbilles, 3 quantités croissantes ont été testées.

Tout d'abord les paillettes de spermatozoïdes sont décongelées à l'abri de la lumière pendant 30 min à température ambiante (TA). Le sperme est récupéré à l'aide d'une pipette Pasteur®, en expulsant le volume dans un microtube. Un lavage est ensuite effectué en ajoutant 1 ml de PBS 1X afin d'éliminer le milieu de cryoconservation. Cette procédure de lavage est une procédure de routine utilisée dans notre laboratoire pour les spermatozoïdes congelés. Après une centrifugation de 10 min à 400 g et à TA, le culot est repris avec 100 µl de BB 1X. Une numération des spermatozoïdes de l'échantillon est ensuite réalisée à l'aide de cellule de Malassez. Puis, 3 aliquots sont préparés à raison de 10 M de spermatozoïdes par aliquot.

La quantité de microbilles d'annexine V à tester (20 µl, 50 µl et 100 µl) est ajoutée à l'échantillon et le volume est complété jusqu'à 500 µl par du BB 1X. Le mélange est incubé ensuite pendant 15 min à TA. C'est l'étape de marquage magnétique.

Après avoir humidifié la colonne MS sur le support aimanté, la suspension cellulaire est passée dans cette colonne. Tout d'abord, la fraction annexine V- est obtenue par élution. Puis après avoir effectué 3 rinçages de 500 µl de BB 1X, la colonne MS est retirée du support aimanté, 500 µl de BB 1X sont ajoutés, et, à l'aide d'un piston fourni dans le kit, la fraction annexine V+ est récupérée.

A la suite du tri magnétique, un test de pureté des populations annexine V- et annexine V+ est réalisé à l'aide du marquage annexine V-FITC (Figure 26). Ce test est réalisé sur 5 échantillons du sperme.

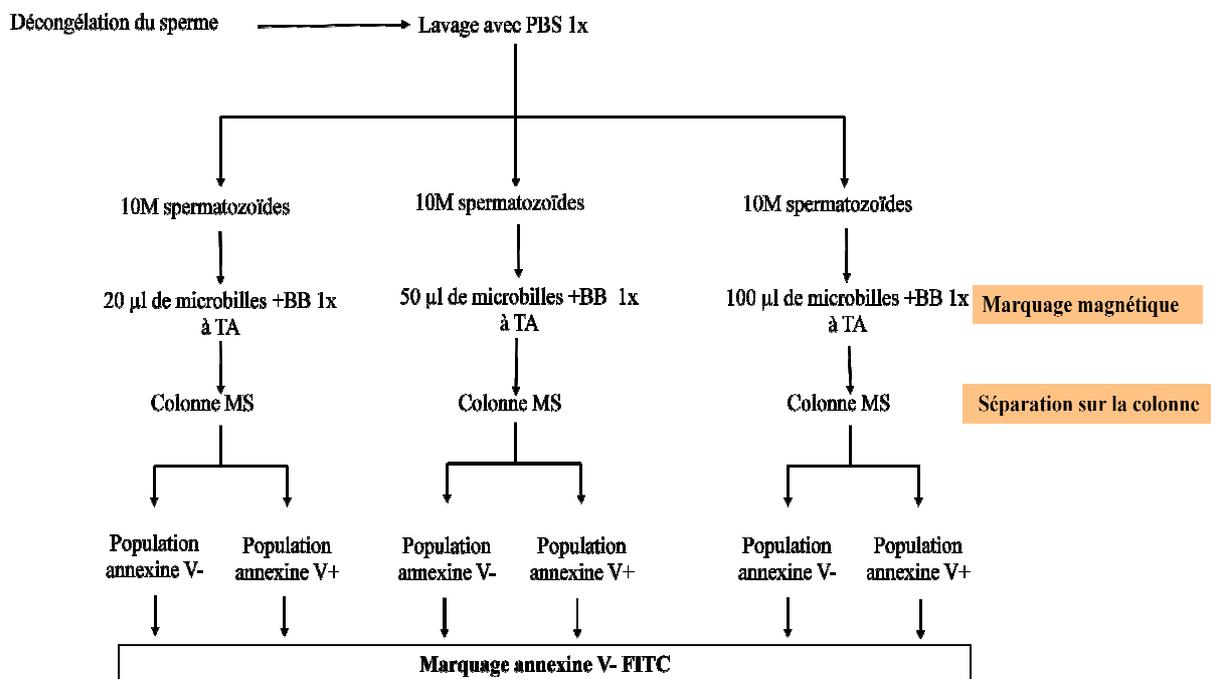


Figure 26 : Schéma global de la procédure du test d'effet de la quantité de microbilles sur la pureté (TA : température ambiante)

e. Evaluation de la pureté et de la qualité d'ADN avant et après le tri magnétique

Pour cette partie, et en tenant compte des résultats du test précédent (quantité de microbilles), le tri magnétique est réalisé avec une quantité de 100 µl de microbilles. Le protocole de tri utilisé est le même que celui du test précédent. La procédure de ce test est détaillée dans la Figure 27.

Afin d'évaluer l'efficacité du tri magnétique avec les meilleures conditions de marquage magnétique, l'analyse du taux de la pureté et de la fragmentation de l'ADN est effectuée avant le tri (après décongélation) et après le tri dans la fraction annexine V- .

L'EPS est évaluée grâce au marquage annexine V-FITC et la fragmentation de l'ADN spermatique est analysée grâce à la technique TUNEL.

Ces tests sont réalisés sur 5 échantillons du sperme.

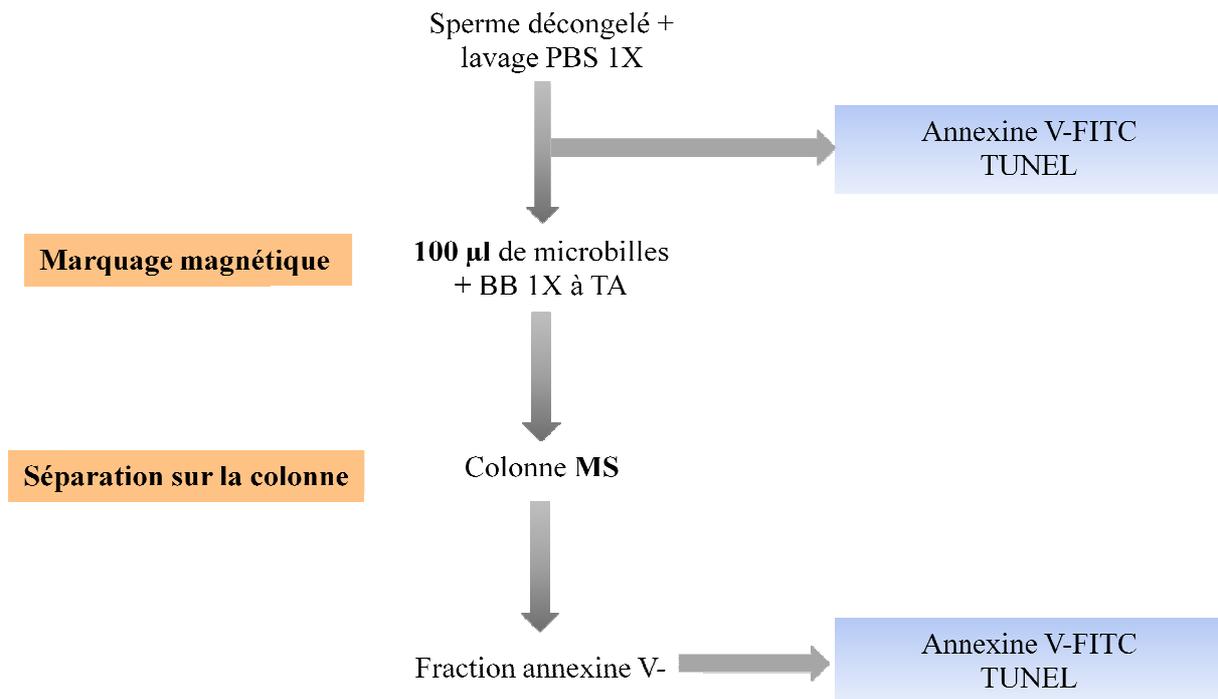


Figure 27 : Schéma global du test pour évaluer la pureté et la qualité de l'ADN avant et après le tri magnétique

f. Tests complémentaires

Des tests complémentaires ont été réalisés afin d'expliquer l'incohérence des résultats obtenus concernant l'augmentation du taux de fragmentation après le tri magnétique.

La remise en question sur l'étape de lavage du sperme congelé avec du PBS 1X est abordée, bien qu'elle représente une procédure de routine utilisée dans notre laboratoire. De plus, l'effet sur la fragmentation de l'ADN, du marquage magnétique, de la séparation sur colonne et/ou du réactif utilisé (BB 1X) au cours du tri sont également abordés. Est-ce que l'un de ces paramètres crée un marquage de l'ADN spermatique lors de la technique TUNEL et par conséquent produit des faux positifs ?

Pour tenter de répondre à ces différentes questions et élucider ces résultats incohérents plusieurs tests ont été effectués.

- **Effet des paramètres de la technique**

Afin d'identifier quel(s) paramètre(s) de la technique influe(nt) sur les résultats obtenus, nous avons évalué le marquage de l'ADN spermatique par TUNEL en présence et absence de l'enzyme TdT. L'évaluation est réalisée sur un sperme congelé lavé soit par PBS 1X soit par BB 1X (sperme non trié) et sur un échantillon d'une fraction annexine V- d'un sperme déjà trié (Figure 28).

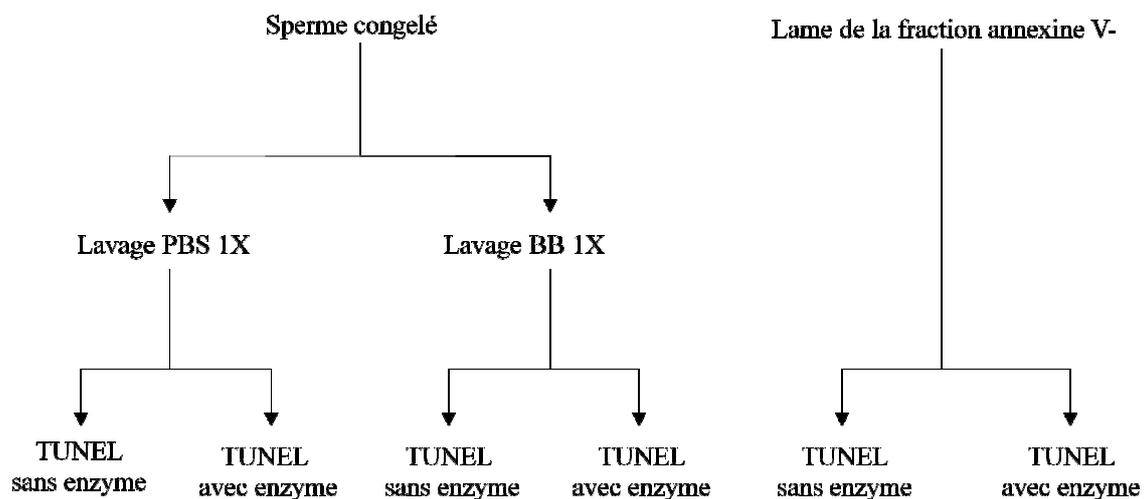


Figure 28 : Schéma global du test

- **Effet du BB 1X**

Afin d'identifier l'influence du BB 1X sur la qualité de l'ADN spermatique, nous avons réalisé différentes expérimentations. En effet au cours du tri magnétique, le tampon utilisé n'est pas le PBS 1X mais le BB 1X, alors que le lavage du sperme après la décongélation est réalisé avec du PBS 1X. C'est pour cette raison que nous avons émis l'hypothèse que le BB pourrait être l'un des facteurs pouvant expliquer l'augmentation du taux de fragmentation après le tri.

Nous avons analysé la fragmentation de l'ADN après deux types de traitement avec du BB 1X :

- **PBS versus BB :**

Un sperme décongelé est divisé en deux aliquots. L'un est lavé avec du PBS 1X (contrôle négatif) et l'autre avec du BB 1X. Ce lavage est réalisé deux fois. Des frottis spermatiques sont ensuite réalisés pour chaque lavage afin de procéder à la technique TUNEL (Figure 29). Ce test est réalisé sur 7 échantillons du sperme.

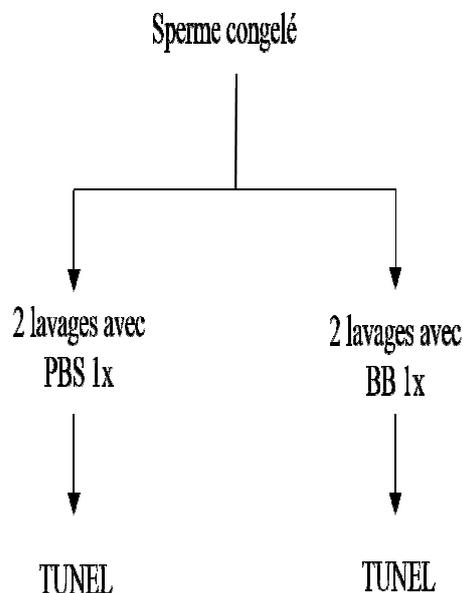


Figure 29 : Schéma global de procédure du test sur l'effet du BB 1X

○ **Lavage avec BB versus incubation avec BB**

Pour ce test, un sperme décongelé est divisé en deux aliquots. Un aliquot est lavé avec du PBS 1X (contrôle négatif) et l'autre avec du BB 1X. Les spermatozoïdes lavés avec du BB sont incubés ensuite dans ce tampon pendant 15 min à TA (temps d'incubation nécessaire pour le marquage magnétique en cas de tri). L'analyse de la fragmentation de l'ADN est réalisée sur un frottis de spermatozoïdes lavés avec du PBS 1X, lavés avec du BB 1X et incubés 15 min avec du BB 1X (Figure 30). Ce test est réalisé sur 5 échantillons de sperme.

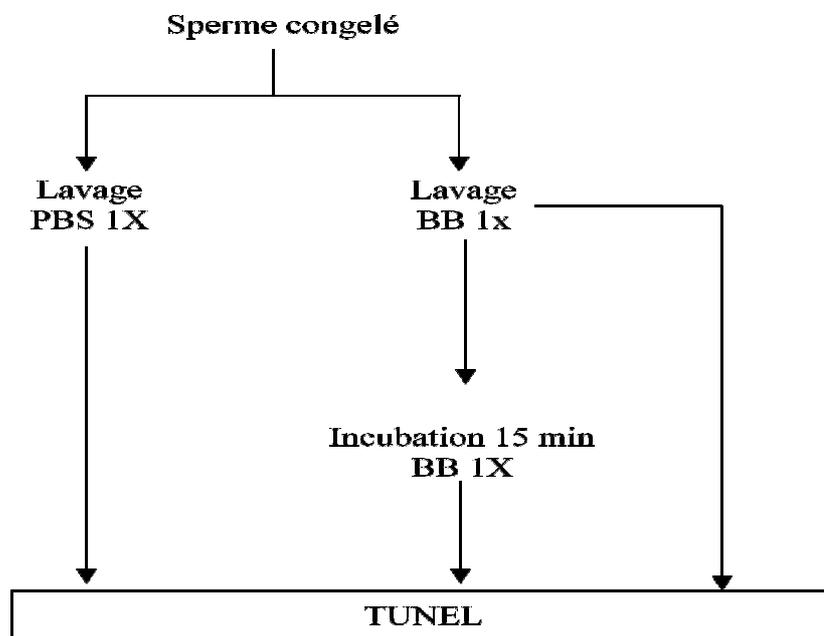


Figure 30 : Schéma global du test du lavage avec BB versus incubation avec BB

- **Rôle du BB : Test BB versus Triton**

Afin de comprendre le rôle du BB au cours du marquage de l'ADN spermatique à l'aide de la technique TUNEL, nous avons réalisé le test BB *versus* Triton (Figure 31). Ce test nous permet de voir si le BB et le Triton ont le même effet sur les spermatozoïdes. Le triton est un détergent, il permet la perméabilisation des membranes cellulaires.

Un sperme décongelé est divisé en trois aliquots. Le premier est lavé avec du PBS 1X (contrôle négatif), le deuxième est lavé avec du BB 1X et le troisième avec du Triton X-100. Après une incubation de 15 min à TA, des frottis spermatiques sont réalisés pour chaque type de lavage afin de procéder à la technique TUNEL (Figure 31). Ce test est réalisé sur 6 échantillons de sperme.

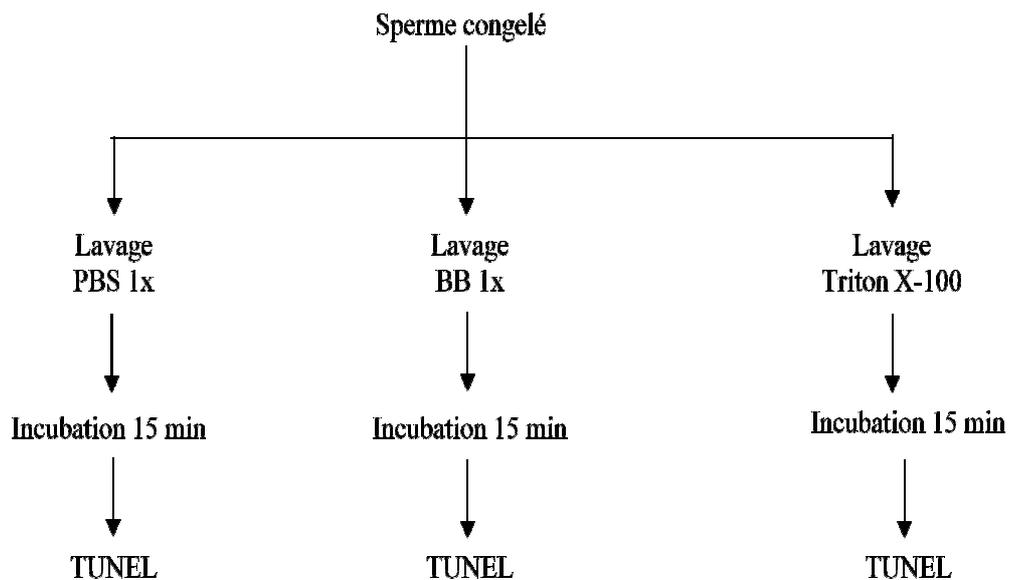


Figure 31 : Schéma global du test BB versus Triton

g. Evaluation de la pureté et de la qualité de l'ADN à chaque étape du tri magnétique

Dans cette partie, nous avons procédé à l'évaluation des spermatozoïdes avec EPS par le marquage annexine V-FITC, et des spermatozoïdes avec une fragmentation de l'ADN par la technique TUNEL à chaque étape du tri magnétique : après décongélation, après incubation avec des microbilles et BB 1X et après le tri, dans la fraction annexine V-.

Ce test est réalisé afin de voir si les résultats suivent le cheminement attendu (baisse du taux de fragmentation dans la fraction annexine V-).

Cette fois-ci, le lavage du sperme congelé est réalisé avec du BB 1X afin d'avoir des résultats comparables avant et après le tri. Le marquage magnétique est réalisé avec 100 µl des microbilles à TA pendant 15 min en présence du BB 1X et la séparation de spermatozoïdes (avec ou sans EPS) est effectuée suite à un passage sur colonne MS. Des frottis spermatiques sont réalisés à chaque étape du tri pour évaluer le taux de pureté et la qualité de l'ADN (Figure 32). Ce test est effectué sur 5 échantillons de sperme.

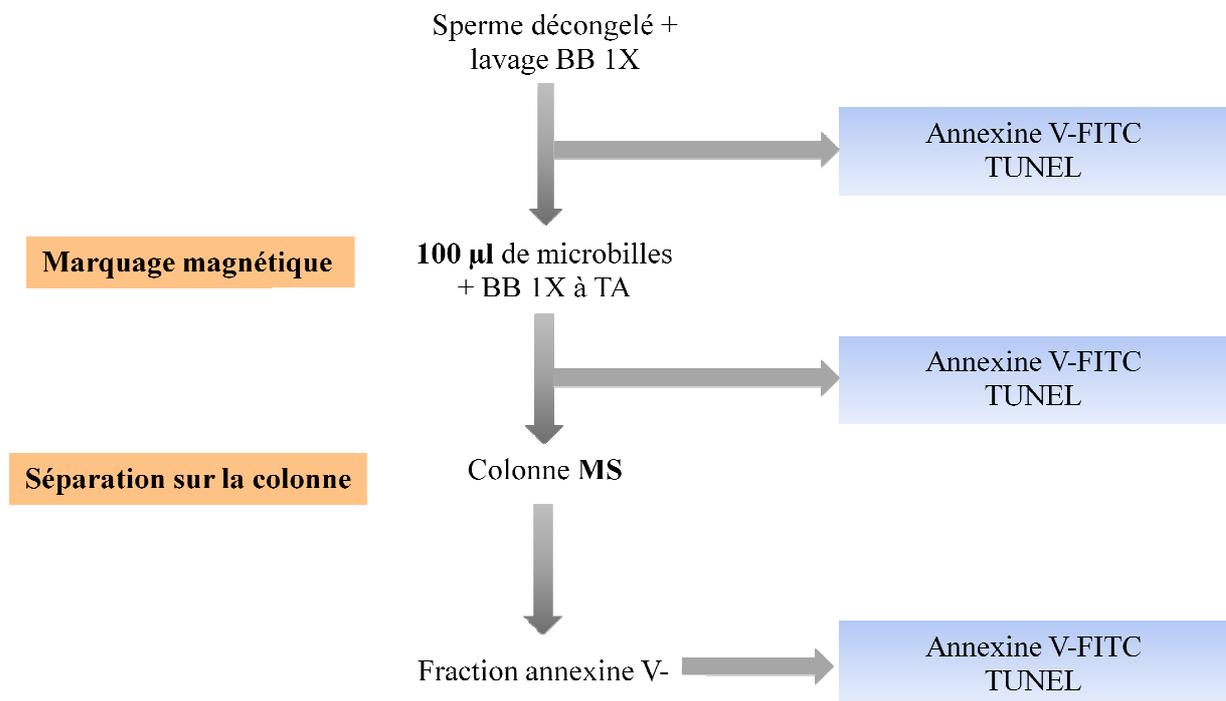


Figure 32 : Evaluation de la pureté et de la fragmentation à chaque étape du tri magnétique

h. Test sur deux colonnes

Afin de savoir si le tri sur deux colonnes améliore la qualité des spermatozoïdes récupérés du point de vue EPS et fragmentation de l'ADN, nous avons procédé à ce test.

Le lavage et le protocole du tri utilisés sont les mêmes que celui du test précédent. Après le passage sur une première colonne MS et récupération de la fraction annexine V-, cette dernière est passée sur une deuxième colonne MS afin d'assurer un 2^{ème} tri.

L'évaluation du taux de spermatozoïdes avec EPS et l'étude de la fragmentation de l'ADN sont réalisées à chaque étape : après décongélation, incubation avec les microbilles et le BB, passage dans une première colonne et passage dans une deuxième colonne (Figure 33).

Ce test est réalisé sur les 5 mêmes échantillons de sperme et au cours des mêmes manipulations que le test précédent (Evaluation de la pureté et de la fragmentation de l'ADN à chaque étape du tri magnétique).

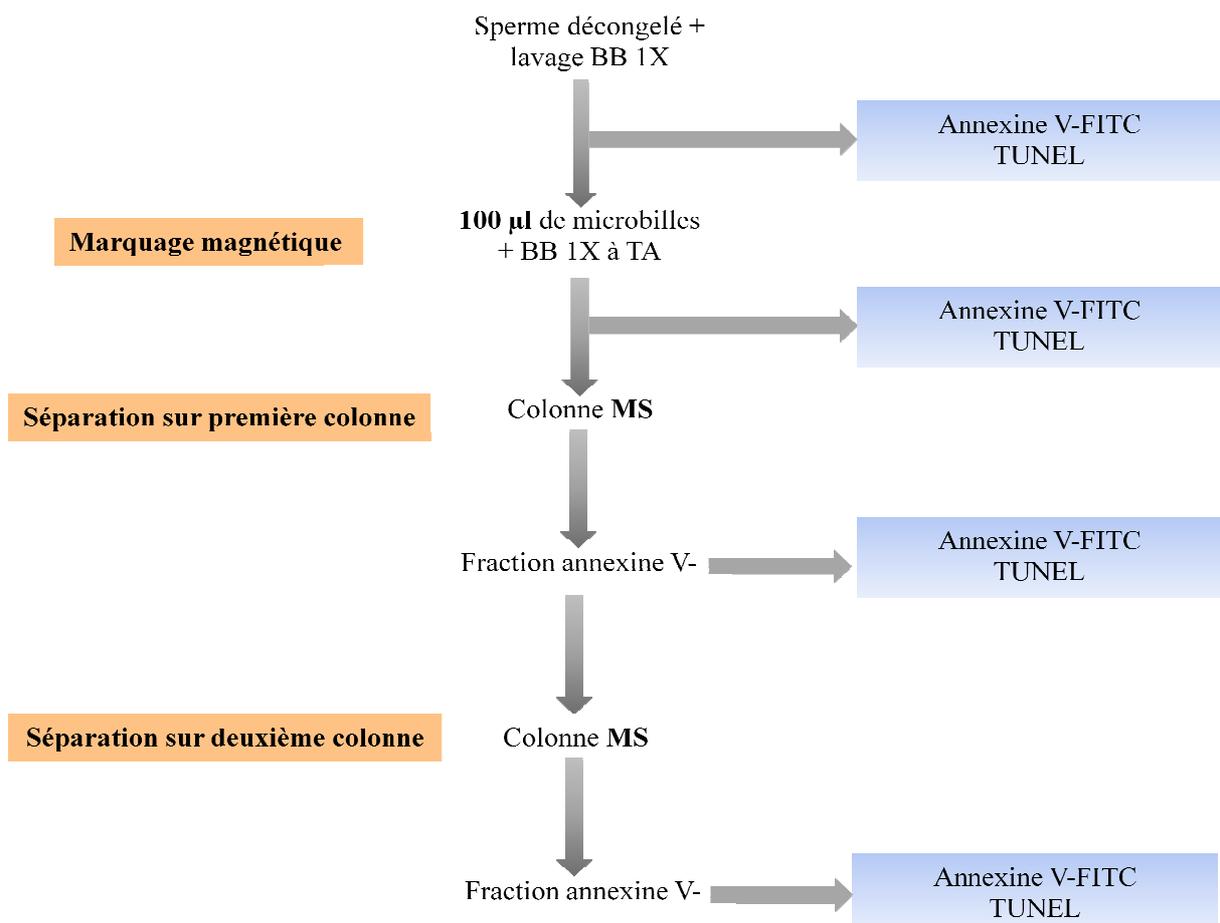


Figure 33 : Schéma global du test sur deux colonnes

i. Kit recherche adapté *versus* Kit ART

Ce test est réalisé, dans le but de savoir si la sélection des spermatozoïdes est améliorée avec un des deux kits.

Quel que soit le kit utilisé, nous avons suivi la même procédure. Après décongélation, le sperme est lavé avec du BB 1X. Les spermatozoïdes sont ensuite incubés avec 100 µl de microbilles à TA en présence de BB 1X. La séparation est réalisée par passage sur colonne MS afin de récupérer les deux fractions annexine V- et annexine V+.

L'évaluation du taux de spermatozoïdes avec EPS et l'étude de la fragmentation de l'ADN sont réalisées après décongélation et après tri, dans la fraction annexine V- et annexine V+. Une étape supplémentaire de l'étude de la fragmentation de l'ADN est réalisée après incubation avec les microbilles et le BB 1X.

Ce test est réalisé sur 10 échantillons du sperme : 5 échantillons sont triés à l'aide du kit recherche et 5 échantillons sont triés à l'aide du kit ART.

2. *Validation du tri magnétique des spermatozoïdes à l'aide du kit de recherche adapté*

Six hommes ayant un taux anormal de fragmentation de l'ADN spermatique (par rapport au seuil du laboratoire) sont inclus dans notre étude. Ces échantillons ont été sélectionnés parmi des paillettes de sperme éjaculé cryoconservé provenant de la banque de sperme dédiée à la recherche au sein du laboratoire de Cytogénétique et Biologie de la Reproduction INSERM U1078 Brest. L'analyse de la fragmentation de l'ADN de ces patients a été réalisée à l'aide de la technique TUNEL utilisée en routine au laboratoire c'est à dire sur des frottis de spermatozoïdes lavés par PBS 1X.

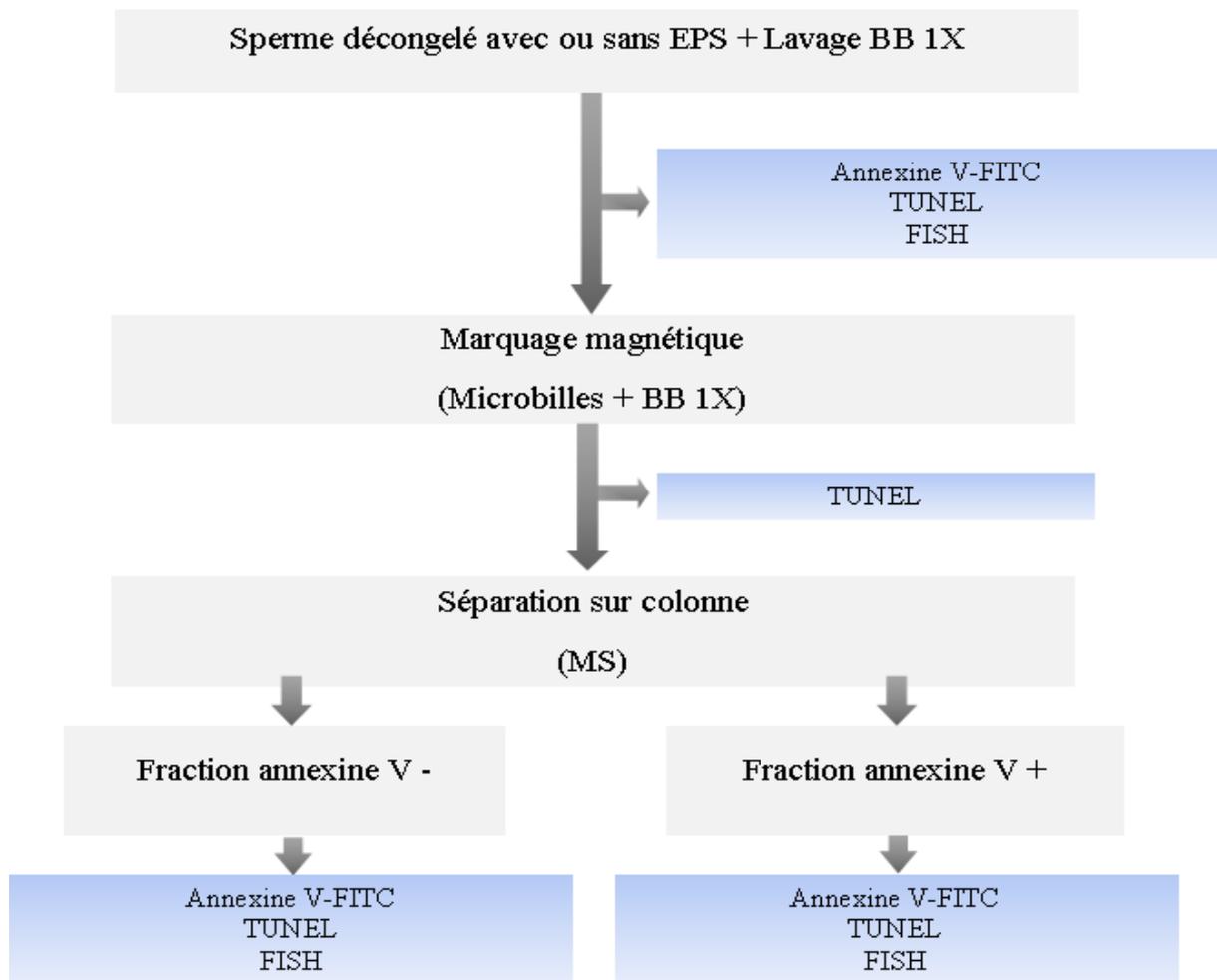
Les spermatozoïdes des 6 patients ont été séparés avec le kit de recherche après optimisation du protocole. L'analyse est faite selon le plan de l'étude (Figure 34).

Avant et après tri, trois paramètres ont été analysés : l'externalisation des phosphatidylsérines, la fragmentation de l'ADN et l'équipement chromosomique.

Une étape supplémentaire de l'étude de la fragmentation de l'ADN est réalisée après incubation avec les microbilles et le BB 1X.

Pour l'analyse de l'équipement chromosomique chez ces patients, nous avons étudié le taux d'aneuploïdies des chromosomes 13, 18, 21, X et Y.

Une FISH X-Y-18 est réalisée en utilisant des sondes centromériques spécifiques des régions α satellites du chromosome X (DXZ1, SpectrumGreen, Abbott), Y (DYZ3, SpectrumOrange, Abbott) et 18 (D18Z1, SpectrumAqua, Abbott). Une FISH 13-21 a également été réalisée en utilisant un pool des BACs en 13q33.3 et un pool des BACs en 21q22.11 (SpectrumGreen / SpectrumOrange, respectivement).



*Figure 34 : Plan de l'étude pour le tri magnétique des spermatozoïdes chez des hommes ayant un taux anormal de fragmentation de l'ADN
(BB : Binding Buffer, FISH : Hybridation in situ Fluorescente, TUNEL : TdT-mediated-dUTP nick-end labeling, FITC : Fluorescein IsoThioCyanate)*

IV. Apports du tri de spermatozoïdes chez des hommes porteurs d'une anomalie chromosomique constitutionnelle

Au total, 14 hommes porteurs d'une anomalie chromosomique constitutionnelle sont inclus dans cette étude :

- 12 porteurs d'une anomalie de structure (Projet financé par l'Agence de la Biomédecine),
- 2 porteurs d'une anomalie de nombre.

Le caryotype de ces patients a été réalisé à partir de lymphocytes issus d'un prélèvement de sang périphérique. Les paramètres spermatiques ont été évalués selon les recommandations de l'OMS (WHO 2010).

Nous avons travaillé sur des paillettes de sperme éjaculé cryocongelé sans aucune étape de préparation (lavage, gradient de densité, swim-up...) avant la congélation du sperme. Pour cette étude, les paillettes ont été obtenues grâce à la participation de différents centres en France (CHU de Clermont Ferrand et de Toulouse).

Les patients avaient reçu une information claire et avaient donné leur consentement écrit pour l'utilisation des paillettes de sperme cryocongelé dans le cadre de la recherche.

Les spermatozoïdes de chaque échantillon ont été séparés avec le kit ART et l'analyse est faite selon le plan de l'étude (Figure 35).

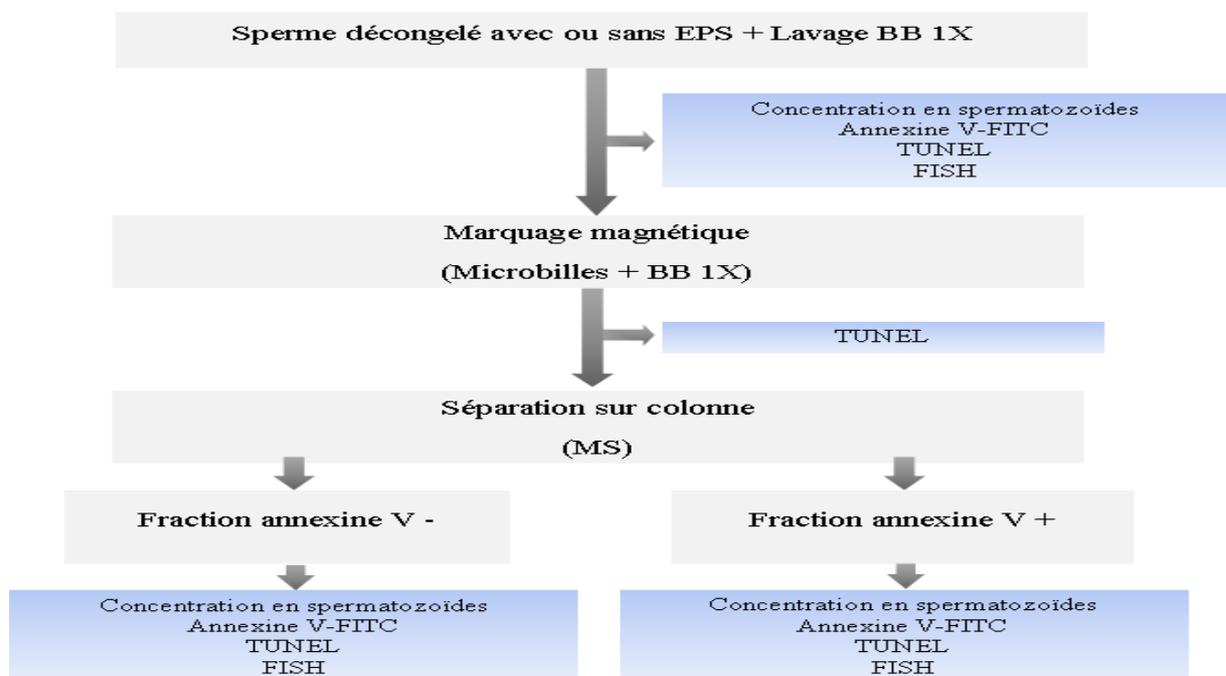


Figure 35 : Plan de l'étude pour le tri magnétique des spermatozoïdes chez des hommes porteurs d'une anomalie constitutionnelle

Avant et après le tri, quatre paramètres ont été analysés : la concentration en spermatozoïdes, l'externalisation des phosphatidylsérines, la fragmentation de l'ADN et l'équipement chromosomique.

La concentration totale des spermatozoïdes est évaluée à chaque étape du tri afin d'étudier le rendement de MACS.

- Pour les hommes porteurs d'une anomalie de structure, la ségrégation méiotique est analysée par FISH avec un mélange de sondes (commerciales et BACs). Le choix des sondes est réalisé d'après les points de cassure impliqués dans le remaniement identifié par cytogénétique conventionnelle. Le mélange des sondes utilisées chez ces hommes est résumé dans le tableau 2.
- Pour les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique gonosomique, nous avons étudié le taux d'aneuploïdies des chromosomes 13, 18, 21, X et Y (comme détaillé précédemment).

Tableau 2 : Mélange des sondes utilisées pour effectuer la FISH sur spermatozoïdes chez les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure

Patient	Mélange des sondes utilisées pour l'analyse par FISH
P1	BACs en 13q33.3 (Green), BACs en 14q32.33 (Orange), CEP18 (Aqua)
P2	BACs en 14q32.33 (Green), BACs en 15q26.3 (Orange), CEP8 (Aqua)
P3	BACs en 13q33.3 (Green), BACs en 14q32.33 (Orange), CEP8 (Aqua)
P4	BACs en 13q33.3 (Green), BACs en 14q32.33 (Orange), CEP8 (Aqua)
P5	BACs en 4q22.1 (Aqua), BACs en 4q34.1 (Green), CEP12 (Orange)
P6	BACs en 9q34 (Green), BACs en 12p13.33 (Aqua), CEP12 (Orange)
P7	BACs en 1p36.33 (Orange), BACs en 1q24.1-24.2 (Aqua), BACs en 15q26.3 (Green)
P8	BACs en 11q25 (Orange), BACs en 13q14.3 (Green), BACs en 13q33.3 (Aqua)
P9	BACs en 13q33.3 (Green), BACs en 19p12-p13.11 (Orange), BACs en 19q13.41 (Aqua)
P10	BACs en 1p36.33 (Orange), BACs en 1q24.1-24.2 (Aqua), BACs en 22q11.23 (Green)
P11	BACs en 2p25.3 (Green), BACs en 2q37.3 (Orange), BACs en 9q34.12-q34.13 (Aqua)
P12	BACs en 2p21 (Orange), BACs en 2q35 (Aqua), BACs en 15q26.3 (Green)

V. Etudes statistiques

Concernant l'optimisation du protocole du tri magnétique avec le kit de recherche, l'analyse des données recueillies a été réalisée avec le logiciel SPSS version 16.0. Les taux de spermatozoïdes avec fragmentation de l'ADN et ceux avec EPS ont été comparés avant et après le tri par MACS ou selon les différentes conditions testées à l'aide du test Wilcoxon. La comparaison entre le tri avec le kit de recherche ou le kit ART du point de vue du taux de spermatozoïdes avec fragmentation de l'ADN et du taux de spermatozoïdes avec EPS a été réalisée à l'aide du test U de Mann-Whitney. Pour ce test, le seuil de signification a été fixé à $p < 0,05$.

Par ailleurs, un test de χ^2 a été utilisé pour comparer le nombre de spermatozoïdes avec EPS avant et après le tri par MACS pour chaque patient. Ce même test a été utilisé pour comparer :

- Le nombre de spermatozoïdes avec fragmentation de l'ADN
- Le nombre de spermatozoïdes avec un contenu chromosomiquement déséquilibré à celui avec un contenu chromosomique normal ou équilibré
- Les différentes anomalies chromosomiques (disomie et diploïdie)
- Le nombre de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés produits par les différents modes de ségrégation méiotique.

Un test Fisher exact a été également utilisé si les nombres attendus étaient inférieurs à 5.

Pour comparer la concentration totale des spermatozoïdes avant et après le tri nous avons utilisé le test Wilcoxon.

Pour tous ces tests, le seuil de signification a été fixé à $p < 0,05$.

C. Expression différentielle des gènes des spermatozoïdes : mise au point de techniques d'étude du transcriptome

I. Population

Dans cette partie, 70 échantillons de sperme éjaculé ont été utilisés. Les différents tests ont été réalisés sur des :

- Spermés frais d'hommes ayant des problèmes de fertilité et venant consulter au laboratoire de Cytogénétique et Biologie de la Reproduction CHRU Morvan, Brest. Ces patients ont donné leur consentement pour utiliser la partie restante de l'éjaculat après la réalisation des examens de routine (spermogramme/spermocytogramme).
- Spermés congelés provenant de la banque du sperme dédiée à la recherche au sein du laboratoire de Cytogénétique et Biologie de la Reproduction, INSERM U1078 Brest.

II. Purification des spermatozoïdes

La première étape consiste à déterminer une méthode de purification des spermatozoïdes permettant l'élimination totale des cellules somatiques (leucocytes, cellules épithéliales et germinales) tout en préservant le plus possible les gamètes. Pour cela quatre méthodes sont testées : le swim-up, la lyse des cellules somatiques, le gradient de densité et l'association gradient de densité et lyse des cellules somatiques. L'efficacité des méthodes de purification est évaluée par un comptage sur cellule de Malassez, avant et après l'application de chaque méthode. Ce comptage nous permet de calculer le pourcentage de perte en spermatozoïdes et de vérifier l'absence des cellules somatiques. La perte est calculée selon la formule suivante :

$$\begin{aligned} & \text{La perte en spermatozoïdes (\%)} \\ & = 100 - \frac{\text{Quantité totale de spermatozoïdes (M) après purification}}{\text{Quantité totale de spermatozoïdes (M) avant purification}} \times 100 \end{aligned}$$

1. Swim-up

Le swim-up est réalisé sur 5 échantillons de sperme frais. Pour chaque échantillon, le liquide séminal est éliminé par un lavage avec du PBS 1X. Ensuite, le culot cellulaire est resuspendu avec 1 500 µl de BM1 (Ellios Bio Tek, Paris, France) et une centrifugation de 530 g est réalisée pendant 10 min afin de concentrer les cellules au fond du tube.

Après centrifugation, le tube est incubé à l'étuve à 37°C pendant 30 min à une heure. Le nuage formé à la surface par des spermatozoïdes est ensuite récupéré.

2. Lyse des cellules somatiques

La solution de lyse (SCLB-Somatic Cells Lysis Buffer) est une solution hypotonique composée de 0,1% de SDS (Euromedex, Strasbourg, France) et de 0,5% de Triton X-100 (Euromedex, Strasbourg France) (Goodrich, Johnson et al. 2007). La lyse est effectuée sur 5 échantillons de sperme frais et 5 échantillons de sperme congelé.

Les échantillons de sperme frais ou sperme congelé (après décongélation) sont lavés avec du PBS 1X avant la lyse. Le culot cellulaire est repris dans 800 µl de PBS 1X (afin de faire un comptage avant purification). Quelle que soit l'origine du sperme utilisé, l'échantillon spermatique est mis en suspension avec la solution de lyse puis le tube est incubé dans la glace pendant 30 min. Après incubation, une centrifugation à 400 g pendant 10 min est réalisée et les spermatozoïdes sont récupérés.

3. Gradient de densité

Le gradient de densité utilisé est composé de deux fractions d'Isolate[®] 90% et 47,5% (Irvine Scientific, Paris, France). Ce gradient est préparé dans un tube de 10 ml en déposant doucement et successivement 1,5 ml de chacune des fractions. Ensuite, l'échantillon de sperme frais ou de sperme congelé (après décongélation et lavage avec du PBS 1X), est déposé au-dessus de ces deux couches. Le tube est centrifugé à 1 000 g pendant 20 min. Le gradient de densité est testé sur 5 échantillons de sperme frais et 5 échantillons de sperme congelé. Selon l'origine du sperme (frais ou congelé) et après centrifugation, différentes couches sont obtenues (Figure 36).

Concernant le sperme frais, le liquide séminal, le gradient 47,5% ainsi que l'anneau de cellules somatiques (dans l'interphase du gradient 90%-47,5%) sont éliminés complètement. Le culot de spermatozoïdes et un peu de gradient 90% sont récupérés.

Concernant le sperme congelé, le PBS, l'anneau de cellules somatiques (dans l'interphase PBS-47,5%) et le gradient 47,5% sont éliminés complètement. L'anneau de spermatozoïdes le gradient 90% et le culot sont récupérés.

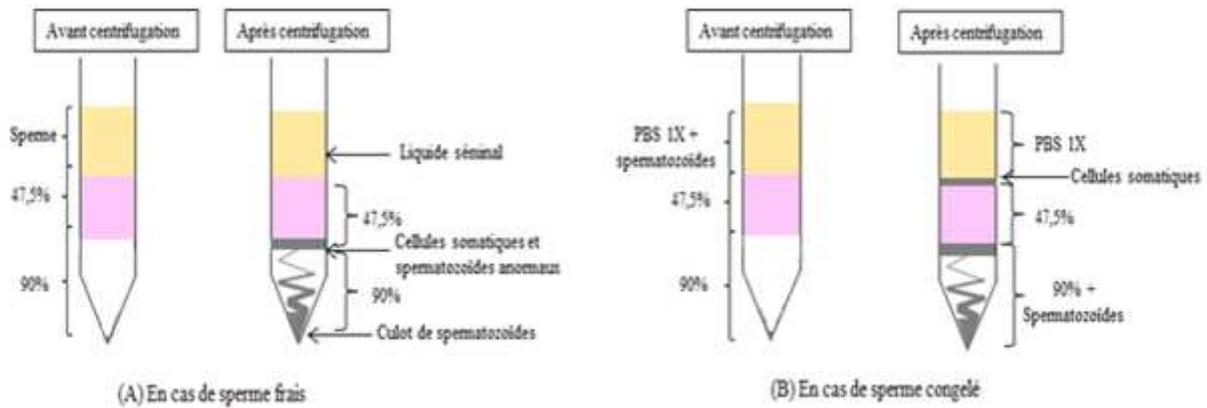


Figure 36 : Schéma des différentes couches cellulaires après gradient de densité

4. Association entre le gradient de densité et la lyse des cellules somatiques

La purification par combinaison du gradient de densité et de la lyse est réalisée. Après le gradient 90%-47,5%, les spermatozoïdes récupérés sont mis en contact avec la solution de lyse. Une centrifugation à 400 g pendant 10 min est effectuée afin d'obtenir un culot spermatique purifié. L'association des deux méthodes est testée sur 5 échantillons de sperme frais et 12 échantillons de sperme congelé.

III. Extraction d'ARN spermatique

La deuxième étape consiste à déterminer une méthode permettant une extraction efficace de la petite quantité d'ARN spermatique. Nous comparons le rendement de deux kits d'extraction d'ARN. Le rendement correspond au rapport entre la quantité d'ARN extrait en nanogrammes et le nombre de spermatozoïdes en millions.

L'extraction d'ARN est réalisée par RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) et NucleoSpin RNA XS (Macherey-Nagel, Hoerd, France).

Après la purification du sperme frais ou du sperme congelé, un même échantillon est divisé en deux fractions égales dont les ARN spermatiques sont extraits selon les deux kits d'extraction. La comparaison est réalisée sur 5 échantillons de sperme frais et 5 échantillons de sperme congelé.

Concernant le kit RNeasy Plus Mini, un volume de 600 µl de la solution RLT Plus (composée de guanidine isothiocyanate qui assure la lyse cellulaire) complété avec un volume de 100 µl de DTT 0,1M (Dithiothreitol) (inactive les RNases et permet une lyse efficace), sont ajoutés au culot de spermatozoïdes. Le lysat est bien homogénéisé par le vortex et transféré dans la colonne puis centrifugé à 10 000 g à 4°C pendant 30 s afin d'éliminer l'ADN génomique. Après centrifugation la colonne est jetée et le lysat gardé pour le reste de la manipulation.

Un volume de 600 µl d'éthanol 70% est ajouté au lysat et bien homogénéisé, ceci permet aux ARN de bien s'attacher sur la membrane silica-gel. Ensuite, 600 µl de ce mélange sont transférés dans une colonne montée sur un tube de 2 ml, et centrifugés à 10 000 g pendant 15 s. Le filtrat est éliminé et cette étape est répétée avec le volume restant. Plusieurs lavages sont réalisés avec 700 µl de tampon RW1 (RNeasy Minikit, Qiagen) puis avec 500 µl du tampon RPE (RNeasy Minikit, Qiagen). Chaque lavage est suivi d'une centrifugation à 1 000 g pendant 15 s. Après ces deux lavages, le filtrat est éliminé et un troisième lavage est réalisé avec 500 µl du tampon RPE, suivi par une centrifugation à 1 000 g pendant 2 min. L'ARN est récupéré suite à l'ajout de 30 µl de RNase Free Water sur la membrane de la colonne et une centrifugation à 1 000 g pendant 2 min.

Concernant le NucleoSpin RNA XS, la lyse cellulaire est réalisée à l'aide d'un mélange de 100 µl de Buffer RA1 et 2 µl de TCEP (Buffer RA1 composé de guanidine thiocyanate qui assure la lyse ; TCEP (Tris 2-carboxyethyl phosphine) : inactive l'ARNase). Un volume de Carrier RNA est ajouté, permettant une bonne rétention de l'ARN sur la colonne. Ce mélange est transféré ensuite sur une colonne et centrifugé à 11 000 g pendant 30 s. Les nucléotides sont ensuite précipités par 100 µl d'éthanol 70°, le mélange est transféré dans une colonne et centrifugé à 11 000 g pendant 30 s. Un lavage de colonne est réalisé à l'aide de 100 µl de MDB (Membrane Desalting Buffer). Après centrifugation, l'ADN génomique est éliminé par l'ADNase (3 µl de ADNase + 27 µl de Reaction Buffer for rDNase). Trois lavages sont réalisés ensuite avec 100 µl de Buffer RA2, 400 µl de Buffer RA3 et 200 µl de Buffer RA3. L'ARN est récupéré suite à l'ajout de 20 µl de RNase Free Water sur la membrane de la colonne et une centrifugation à 11 000 g pendant 1 min.

Suite à l'extraction d'ARN, un dosage est réalisé au Nanophotomètre (Implen, Munich, Allemagne). Ce dosage permet de déterminer la concentration d'ARN (ng/μl) et d'estimer la pureté de l'échantillon (absence de contamination par de l'ADN, des protéines ou des solvants) à l'aide des ratios de densité optique (DO) 260/280 et 230/260.

IV. Evaluation de la pureté

La troisième étape est consacrée à évaluer l'absence de contamination par les ARN des cellules somatiques après l'étape de purification et l'extraction de l'ARN. La pureté est évaluée à l'aide de RT-PCR et/ou du Bioanalyseur (Agilent, Bioanalyser 2100).

1. RT-PCR

Différentes contaminations peuvent être détectées suite à une amplification des marqueurs spécifiques par RT-PCR, notamment CD45 (alias *PTPRC*—protein tyrosine phosphatase, receptor type, C) à 847 pb, E-Cadhérine (CDH1) à 476 pb, C-Kit (Kit proto-oncogene receptor tyrosine kinase) à 780 pb, protamine 2 à 310 pb, respectivement spécifiques pour les leucocytes, les cellules épithéliales, les cellules germinales et l'ADN génomique. La présence de l'amplicon de protamine 2 à 149 pb valide la présence de l'ARN spermatique. La RT-PCR comprend deux étapes :

- **Reverse Transcription (RT)**

Cette étape permet d'obtenir, à partir de l'ARN, de l'ADN complémentaire simple brin. La transcription inverse est faite grâce au SuperScript™ II (Invitrogen™, California, USA). Le contenu et le protocole sont décrits dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Protocole de Reverse Transcription pour un échantillon

Oligi dT Amorce (µl)	1
dNTP Mélange (µl)	1
ARN (µl)	10
Incubation à 65°C pendant 5 min puis dans la glace	
5X First-Strand Buffer (µl)	4
0,1 M DTT (µl)	2
RNasin (µl)	1
SuperScript TM II RT (µl)	1
Incubation à 42°C pendant 50 min	
Inactivation de la réaction à 70°C pendant 15 min	

- **PCR :**

La PCR est réalisée grâce au PhusionTM High-Fidelity DNA Polymerases (Finnzyme, Boston, USA). Cette étape consiste à amplifier les séquences d'ADNc (produit de RT) à partir d'amorces spécifiques choisies.

Pour chaque amorce, un mélange composé par 1 µl de l'amorce Reverse, 1 µl de l'amorce Forward à 10 µM, 10 µl de Phusion HF Master Mix 2X et 4 µl d'eau a été réalisé. Les conditions retenues pour les cycles de PCR sont indiquées dans le Tableau 4. 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.

Tableau 4 : Cycles d'amplification des séquences des cellules somatiques et des spermatozoïdes

Température	Etape	Durée	Nombre de cycles
98°C	Dénaturation initiale / Activation enzyme	30s	
98°C	Dénaturation	10s	35 cycles
60°C / 57°C	Hybridation	30s	
72°C	Elongation	30s	
72°C	Extension finale	7min	

Le produit de PCR fait ensuite l'objet d'une migration électrophorétique sur gel d'agarose à 1% dans du TBE 1X (tris borate EDTA). Un voltage de 110 Volts est appliqué pendant 1h15. L'agent intercalant utilisé est le BET (Bromure d'éthidium). Le marqueur de taille utilisé s'échelonne de 10 pb à 1 000 pb (SmartLadder®, Eurogenetec, Seraing, Belgique).

2. Bioanalyseur

Le Bioanalyseur permet d'évaluer la quantité (intensité de fluorescence) et la qualité d'ARN totale. L'interprétation du profil du résultat du Bioanalyseur est basée sur le fait que les spermatozoïdes purs sont dépourvus d'ARN ribosomiaux et par conséquent la présence des pics correspondant aux 18S ou 28S au niveau de l'électrophérogramme est considérée comme des ARN d'origine somatique.

L'analyse de la pureté par Bioanalyseur est réalisée à l'aide du kit « RNA 6000 Nano Kit » et le protocole utilisé est celui de Agilent.

La première étape consiste à préparer :

- Les échantillons à évaluer : dénaturation de 1,2 µl de chaque échantillon à 70°C pendant 2 min.
- Le marqueur de taille : dénaturation à 70°C pendant 2 min et dilution au demi avec l'eau RNase-free.
- Le Gel-Dye : filtration de Gel-matrix à l'aide d'une colonne-filtre et une centrifugation à 1 500 g pendant 10 min. Après filtration, 1 µl de RNA-dye Concentrate est ajouté dans 65 µl de Gel-matrix filtré. Ce mélange forme le Gel-Dye.

Ce gel est ensuite diffusé au fond du puits de la puce (nanochip), puis 5 µl de « RNA 6 000 Nano Marker » sont déposés dans chaque puits. Ce dernier est un ARN avec une concentration bien définie. Il sert à titrer les échantillons d'ARN et sa détection représente le point de départ de la mesure.

Le marqueur de taille est ensuite déposé dans son puits spécifique et les échantillons d'ARN à tester sont déposés dans les puits attribués. La lecture est réalisée par le scanner puis la migration est analysée par le logiciel.

V. Amplification et marquage

Une fois la quantité et la qualité 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).

Pour cela une transcription inverse est effectuée grâce à l'Affinity Script (Agilent) afin de synthétiser l'ADNc. Sous l'action de la T7 RNA polymérase, cet ADNc va servir de matrice à la synthèse de l'ARNc. Durant cette réaction, la cyanine 3 est incorporée au niveau des bases

cystéine. De plus au cours de cette étape, le « spike-in » est ajouté à chaque échantillon d'ARN. Le spike-in est un ARN messenger utilisé pour calibrer les mesures d'hybridation lors de la lecture de puce à ARN.

Une fois le marquage terminé, une purification est réalisée afin de récupérer les ARNc marqués à l'aide du kit RNeasy Mini. Après précipitation dans l'éthanol 100°, l'échantillon est placé sur une colonne afin de retenir l'ARNc marqué par la membrane de cette colonne. Après plusieurs étapes de lavage, l'ARNc marqué et amplifié est récupéré dans 30 µl d'eau RNase-Free.

La quantité d'ARNc et la concentration de la cyanine 3 sont ensuite mesurées à l'aide du NanoDrop. La concentration de la cyanine 3 (pmol/µl), la DO 260/280 et la concentration d'ARN complémentaire (ng/µl) permettent de mesurer le rendement en ARNc et l'activité spécifique de chaque réaction selon les formules suivantes :

$$\mu g \text{ d'ARNc} = \frac{\text{Concentration d'ARNc} \times \text{Volume d'élution (30 } \mu\text{l)}}{1\ 000}$$

$$\text{Activité spécifique (pmol Cy3/} \mu\text{g d'ARNc)} = \frac{\text{Concentration de la Cy3}}{\text{Concentration d'ARNc}} \times 1\ 000$$

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

VI. Hybridation et lecture

Cette étape consiste à hybrider les ARNc marqués sur la puce qui renferme des séquences d'oligonucléotides.

Pour cela, des quantités égales d'ARNc marqué avec la cyanine 3 et purifié ont été hybridées pendant 17 heures à 65°C sur le microarray SurePrint G3 Human GE 8x60K V2 (Agilent Technologies). Une étape de lavage de la puce est réalisée après par un tampon fourni dans le kit (Gene Expression Wash Buffer Kit). La puce est scannée en utilisant un scanner à haute résolution. Les données sont traitées à l'aide du logiciel Feature Extraction et analysées à l'aide du logiciel GeneSpring GX version 12.5 (Agilent). Sept échantillons de sperme ont été hybridés.

Résultats

A. Infertilité du couple et techniques d'aide médicale à la procréation

I. Impact des facteurs maternels et paternels sur les résultats de FIV

1. Etude descriptive

Au total 194 cycles de FIV avec insémination ont été inclus dans notre étude (Figure 37). L'âge maternel variait de 19 ans à 45 ans, avec une moyenne de $34,78 \text{ ans} \pm 5,28 \text{ ans}$. L'âge paternel variait de 24 ans à 65 ans, avec une moyenne de $39,65 \text{ ans} \pm 6,27 \text{ ans}$. Les données spermatisques étaient disponibles pour 194 cycles concernant la numération et la mobilité initiale.

Après la fécondation *in vitro*, un transfert d'embryon était réalisé pour 179 cycles soit à J2/3 soit à J4/5 (Figure 37). En moyenne, $1,95 \pm 0,92$ embryon était transféré par cycle : un seul embryon transféré pour 42 cycles, deux embryons transférés pour 74 cycles et trois embryons transférés pour 63 cycles.

L'étude de l'impact des facteurs maternels et paternels sur les résultats de FIV est réalisée à plusieurs stades : fécondation, transfert d'embryons (jour de transfert) et grossesse chimique.

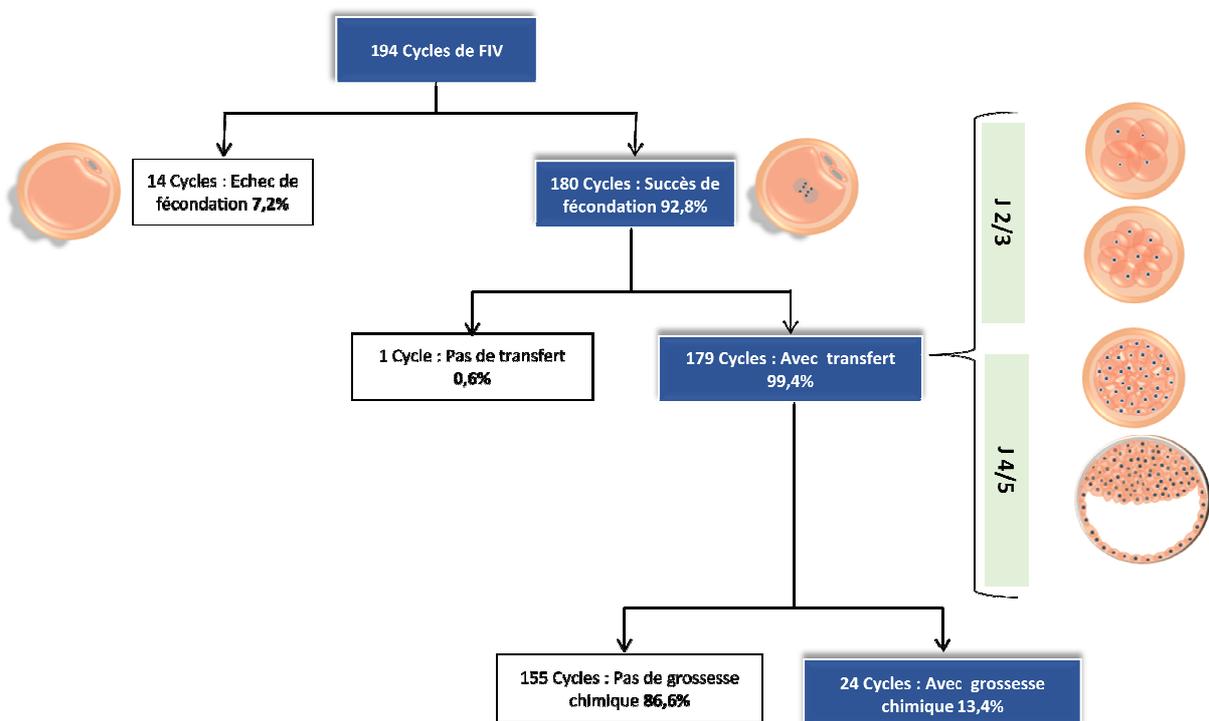


Figure 37 : Schéma descriptif de la procédure de FIV

2. *Echec de fécondation en FIV*

Afin d'étudier l'échec de la fécondation en FIV, notre population de 194 cycles avec injection a été divisée en deux groupes :

- « Echec de fécondation », comprenant 14 cycles ne présentant aucun signe de fécondation
- « Succès de fécondation », comprenant 180 cycles ayant au moins un embryon avec ou sans transfert embryonnaire.

Le taux d'échec complet de fécondation était de 7,2% et le taux moyen de fécondation dans le groupe « Succès de fécondation » était de 84,72 % \pm 22,74%.

Aucune différence significative n'a été identifiée en comparaison des deux groupes « Echec de fécondation » et « Succès de fécondation » concernant les paramètres : âge maternel et paternel, nombre d'ovocytes ponctionnés et matures, taux de maturation, numération et mobilité des spermatozoïdes (Tableau 5).

Tableau 5 : Comparaison entre échec et succès de fécondation en cas de FIV

	Echec de fécondation 14 Cycles	Succès de fécondation 180 cycles	<i>p</i>
Age maternel	33,78 \pm 5,49	34,84 \pm 5,27	0,41
Ovocytes ponctionnés	4,57 \pm 3,71	4,80 \pm 3,01	0,52
Ovocytes matures	3,35 \pm 3,67	3,67 \pm 3,01	0,06
Taux de maturation (%)	76,07 \pm 48,44	88,22 \pm 19,41	0,13
Age paternel	38,35 \pm 7,28	39,75 \pm 6,19	0,50
Numération (M/ml)	76,07 \pm 48,44	80,72 \pm 38,64	0,52
Mobilité (a+b+c) %	36,42 \pm 4,12	36,9 \pm 5,93	0,50

3. Transfert d'embryons

Les comparaisons entre les paramètres maternels et paternels, les paramètres embryonnaires (zygotes (2PN), embryons, embryons de bonne qualité) et le taux de grossesse chimique selon le jour de transfert sont résumées dans le Tableau 6. Dans notre centre d'AMP de Sousse en Tunisie, le transfert embryonnaire était réalisé le plus souvent à J2/3 (73,7%).

Pour notre population, plus la femme était jeune et présentait une bonne réserve ovocytaire (ovocytes ponctionnés) et une bonne qualité ovocytaire (ovocytes matures), plus le transfert était réalisé à J4/5 ($p < 0,05$). Le choix du jour de transfert ne dépendait pas des paramètres paternels ($p > 0,05$).

En comparaison à un transfert à J2/3, les cycles avec un transfert embryonnaire à J4/5 présentaient un plus grand nombre de zygotes (2 PN) ($2,37 \pm 1,47$ vs $6,68 \pm 2,30$), un plus grand nombre d'embryons ($2,34 \pm 1,43$ vs $6,63 \pm 2,28$), un plus grand nombre d'embryons de bonne qualité ($1,31 \pm 0,91$ vs $4,29 \pm 1,78$), un plus grand nombre d'embryons transférés ($1,99 \pm 0,79$ vs $2,46 \pm 0,5$) et un taux de maturation plus élevé ($84,92 \pm 21,42$ vs $97,27 \pm 6,48$). Concernant le taux de grossesse chimique, il était significativement plus élevé en cas de transfert à J4/5 (25,5%) en comparaison à celui de transfert à J2/3 (9,1%).

Tableau 6 : Comparaison entre les différents paramètres maternels, paternels et de FIV selon le jour de transfert embryonnaire

	Transfert J2/3 132 cycles	Transfert J4/5 47 cycles	<i>p</i>
Age maternel (ans)	35,34 ± 5,28	33,4 ± 5,1	0,04
Ovocytes ponctionnés	3,8 ± 2,39	7,59 ± 2,87	0,000
Ovocytes matures	3,8 ± 1,85	7,59 ± 2,87	0,000
Age paternel (ans)	39,85 ± 6,62	39,31 ± 4,81	0,88
Numération (M/ml)	80,74 ± 41,59	80,27 ± 29,6	0,43
Mobilité (a+b+c) (%)	36,56 ± 6,24	37,76 ± 4,97	0,33
Zygotes	2,37 ± 1,47	6,68 ± 2,30	0,000
Embryons	2,34 ± 1,43	6,63 ± 2,28	0,000
Embryons de bonne qualité	1,31 ± 0,91	4,29 ± 1,78	0,000
Nombre d'embryons transférés	1,99 ± 0,79	2,46 ± 0,5	0,000
Taux de maturation (%)	84,92 ± 21,42	97,27 ± 6,48	0,000
Taux de fécondation (%)	82,34 ± 24,89	92,38 ± 11,11	0,128
Taux de segmentation (%)	99,03 ± 6,35	99,46 ± 2,55	0,705
Taux d'embryons de bonne qualité (%)	60,60 ± 37,29	66,97 ± 21,45	0,465
Taux de grossesse chimique (%)	9,1	25,5	0,000

4. Echec de grossesse chimique

Afin d'étudier l'échec de grossesse chimique en FIV, notre population de 179 cycles avec transfert embryonnaire a été divisée en deux groupes :

- « Echec de grossesse chimique », comprenant 155 cycles ayant un taux sérique de β -HCG négatif (≤ 10 UI/ml)
- « Succès de grossesse chimique », comprenant 24 cycles ayant un taux sérique de β -HCG positif (>10 UI/ml).

Le taux de succès de grossesse chimique pour notre population était de 13,4%.

La comparaison entre ces deux groupes montrait que l'âge maternel était significativement plus élevé en cas d'échec de grossesse chimique ($p < 0,05$). De plus, le nombre d'ovocytes ponctionnés et matures, le nombre de zygotes, le nombre d'embryons, le nombre d'embryons de bonne qualité, le nombre d'embryons transférés et le taux d'embryons de bonne qualité étaient significativement plus faibles dans ce groupe « Echec de grossesse chimique ».

Toutefois, aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été détectée entre les deux groupes concernant l'âge paternel, les paramètres spermatiques, le nombre de blastocystes et les taux de maturation, de fécondation, de segmentation, d'embryons de bonne qualité et de blastulation (Tableau 7).

Tableau 7 : Comparaison entre échec et succès de grossesse chimique en cas de FIV

	Echec de grossesse chimique 155 cycles	Succès de grossesse chimique 24 cycles	<i>p</i>
Age maternel (ans)	35,16 \pm 5,38	32,66 \pm 4,15	0,023
Ovocytes ponctionnés	4,51 \pm 2,93	6,62 \pm 3,06	0,001
Ovocytes matures	3,87 \pm 2,59	6,29 \pm 3,12	0,000
Âge paternel (ans)	39,78 \pm 6,14	39,29 \pm 6,56	0,747
Numération (M/ml)	79,58 \pm 40,33	87,29 \pm 25,66	0,156
Mobilité (a+b+c) (%)	37,04 \pm 6,1	35,83 \pm 4,81	0,186
Zygotes	3,2 \pm 2,34	5,45 \pm 3,12	0,000
Embryons	3,17 \pm 2,31	5,41 \pm 3,09	0,000
Embryons de bonne qualité	1,86 \pm 1,62	3,62 \pm 1,97	0,000
Blastocystes (Nombre de cycles)	3,65 \pm 2,02 (32)	4,58 \pm 1,67 (12)	0,067
Nombre d'embryons transférés	2,06 \pm 0,76	2,45 \pm 0,65	0,018
Taux de maturation (%)	87,25 \pm 20,29	93,96 \pm 11,32	0,19
Taux de fécondation (%)	84,6 \pm 22,81	87,39 \pm 20,90	0,798
Taux de segmentation (%)	99,09 \pm 5,94	99,47 \pm 2,55	0,823
Taux d'embryons de bonne qualité (%)	60,59 \pm 34,82	73,12 \pm 25,31	0,127
Taux de blastulation (%) (Nombre de cycles)	60,24 \pm 23,94 (32)	53,54 \pm 23,08 (12)	0,524

II. Impact des facteurs maternels et paternels sur les résultats d'ICSI

1. Etude descriptive

Au total 586 cycles d'ICSI avec injection ont été inclus dans notre étude (Figure 38). L'âge maternel variait de 20 ans à 49 ans, avec une moyenne de $33,79 \text{ ans} \pm 4,99 \text{ ans}$. L'âge paternel variait de 24 ans à 70 ans, avec une moyenne de $39,72 \text{ ans} \pm 6,60 \text{ ans}$. Les données spermatiques étaient disponibles pour 586 cycles concernant la numération (M/ml), pour 579 cycles concernant la numération totale (M) et pour 577 cycles concernant la mobilité initiale.

Après l'injection, un transfert d'embryons était réalisé pour 515 cycles soit à J2/3 ou à J4/5 (Figure 38). En moyenne, $2,087 \pm 0,812$ embryons étaient transférés par cycle : un seul embryon transféré pour 143 cycles, deux embryons transférés pour 190 cycles, trois embryons transférés pour 176 cycles et quatre embryons transférés pour 6 cycles.

L'étude de l'impact des facteurs maternels et paternels sur les résultats d'ICSI est réalisée à plusieurs stades : fécondation, transfert d'embryons (jour de transfert), qualité embryonnaire et grossesse chimique.

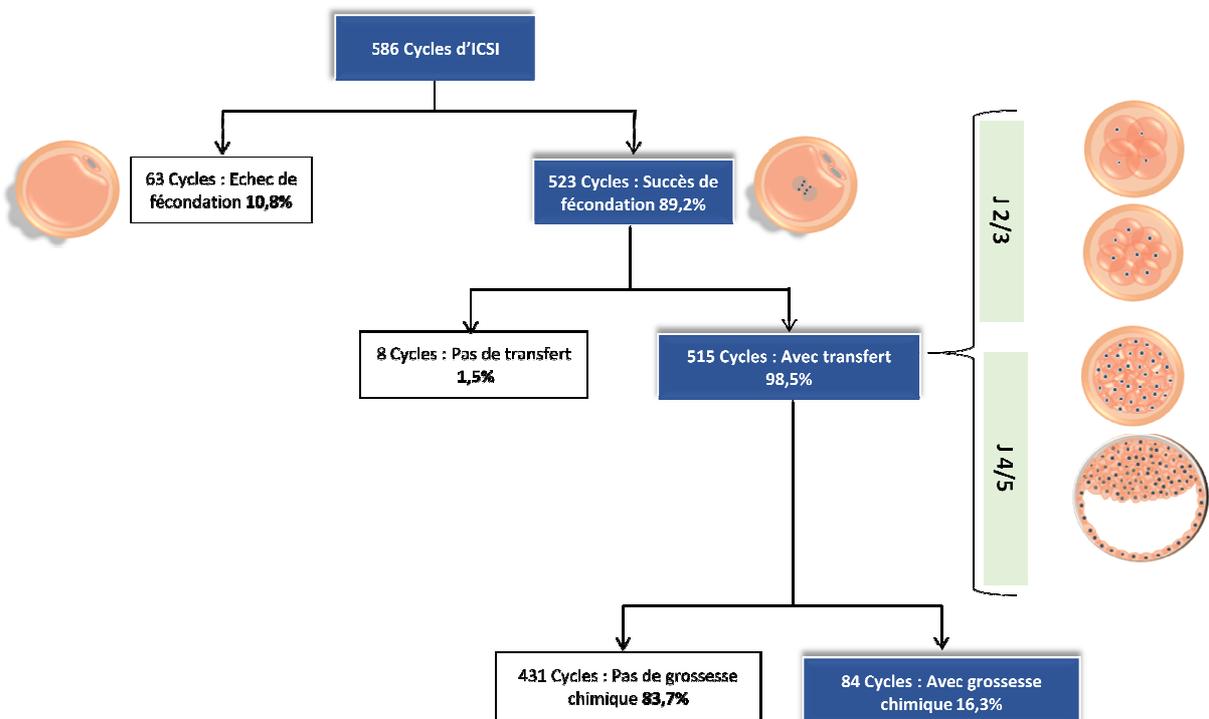


Figure 38 : Schéma descriptif de la procédure d'ICSI

2. Echec de fécondation en ICSI

a. Comparaison entre échec et succès de fécondation en ICSI

Afin d'étudier l'échec de fécondation en ICSI, notre population de 586 cycles avec injection a été divisée en deux groupes :

- « Echec de fécondation », comprenant 63 cycles ne présentant aucun signe de fécondation
- « Succès de fécondation », comprenant 523 cycles ayant au moins un embryon avec ou sans transfert embryonnaire.

Le taux d'échec complet de fécondation était de 10,8% et le taux moyen de fécondation dans le groupe « Succès de fécondation » était de 70,52 % \pm 24,73%.

La comparaison entre ces deux groupes montrait que l'âge maternel et l'injection d'ovocyte avec un spermatozoïde présentant une tératozoospermie étaient significativement plus élevés en cas d'échec de fécondation. Tandis que le nombre d'ovocytes ponctionnés et matures étaient significativement plus faible dans ce groupe « Echec de fécondation ». Toutefois, aucune différence significative n'a été identifiée entre les deux groupes concernant l'âge paternel, les paramètres spermatiques (numération, mobilité) et le taux de maturation ovocytaire (Tableau 8).

Tableau 8 : Comparaison entre échec et succès de fécondation en cas d'ICSI

	Echec de fécondation 63 cycles	Succès de fécondation 523 cycles	<i>p</i>
Age paternel (ans)	41,03 \pm 7,00	39,56 \pm 6,55	0,118
Age maternel (ans)	35,28 \pm 4,60	33,61 \pm 35,28	0,008
Ovocytes ponctionnés	3,06 \pm 1,92	6,05 \pm 3,55	0,000
Ovocytes matures	2 \pm 1,3	4,40 \pm 2,64	0,000
Numération (M/ml)	39,57 \pm 43,26	32,76 \pm 36,13	0,234
Numération (M)	111,37 \pm 208,99	93,45 \pm 122,63	0,50
Mobilité (a+b+c) (%)	21,66 \pm 14,01	20,47 \pm 14,11	0,531
Spermatozoïde injecté avec tératozoospermie (% (Nombre de cycles))	11,11% (7)	2,48% (13)	0,003
Taux de maturation (%)	73,08 \pm 27,19	75,53 \pm 19,00	0,359

De plus, l'analyse de corrélation entre l'âge maternel, les ovocytes ponctionnés et matures avec le test de Pearson (Tableau 9) montrait la :

- Présence d'une faible corrélation négative entre l'âge maternel et le nombre d'ovocytes ponctionnés ($R = |0,328|$).
- Présence d'une faible corrélation négative entre l'âge maternel et le nombre d'ovocytes matures ($R = |0,286|$).
- Présence d'une forte corrélation positive entre le nombre d'ovocytes ponctionnés et le nombre d'ovocytes matures ($R = 0,893$).

Tableau 9 : Analyse de corrélation entre l'âge maternel, les ovocytes ponctionnés et matures

	Ovocytes ponctionnés	Ovocytes matures
Age maternel	$ 0,328 ^*$	$ 0,286 ^*$
Ovocytes ponctionnées	1	0,893*

* $p < 0,05$

b. Déterminer le lien entre les facteurs maternels / paternels et l'échec de fécondation

Afin d'évaluer le lien entre les paramètres maternels / paternels et l'issue de fécondation en ICSI, nous avons réalisé une régression logistique univariée sur l'âge maternel, le nombre d'ovocytes ponctionnés et matures, l'âge paternel, les paramètres spermatiques et l'injection d'ovocyte avec un spermatozoïde présentant une tératozoospermie. Une analyse selon les tranches d'âges maternel et paternel a été également réalisée. Les résultats sont résumés dans le Tableau 10.

Concernent les tranches d'âge maternel :

- le groupe de femmes inférieures à 30 ans comprenait 21 femmes âgées entre 20 et 24 ans et 98 femmes âgées entre 25 et 29 ans
- le groupe de femmes entre 30 et 34 ans comprenait 193 femmes
- le groupe de femmes entre 35 et 39 ans comprenait 194 femmes

- le groupe de femmes supérieures ou égales à 40 ans comprenait 78 femmes âgées entre 40 et 44 ans et 2 femmes âgées entre 45 et 49 ans.

Concernent les tranches d'âge paternel :

- le groupe des hommes inférieurs à 35 ans comprenait 26 hommes âgés entre 24 et 29 ans et 108 hommes âgés entre 30 et 34 ans
- le groupe des hommes entre 35 et 39 ans comprenait 173 hommes
- le groupe des hommes entre 40 et 44 ans comprenait 151 hommes
- le groupe des hommes les plus âgés incluait 89 hommes âgés entre 45 et 49 ans et 39 hommes âgés entre 50 et 70 ans.

Selon la régression logistique univariée, l'âge maternel (OR = 1,07, IC 95% [1,01; 1,13], $p = 0,01$), le nombre d'ovocytes ponctionnés (OR = 0,64, IC 95% [0,55 ; 0,74], $p = 0,000$), le nombre d'ovocytes matures (OR = 0,46, IC 95% [0,37 ; 0,59], $p = 0,000$), l'âge paternel à partir de 45 ans (OR = 2,96 , IC 95% [1,19 ; 7,37], $p = 0,01$) et spermatozoïde injecté avec tératozoospermie (OR = 4,90, IC 95% [1,87 ; 10,79], $p = 0,001$) étaient significativement associés à l'échec de fécondation en ICSI.

Néanmoins aucune différence significative n'a été identifiée concernant le risque d'échec de fécondation entre les différentes tranches d'âge maternel ($p > 0,05$) (Tableau 10).

Tableau 10 : Relation entre les paramètres maternels / paternels et l'échec de fécondation en ICSI selon la régression logistique univariée

	OR Non ajusté	IC 95%	p
Age maternel (ans)	1,07	[1,01 ; 1,13]	0,01
Age maternel (ans) (classe)			
< 30 (n = 119)	1		
[30-35[(n = 193)	1,42	[0,60 ; 3,39]	0,42
[35-40[(n = 194)	2,14	[0,93 ; 4,91]	0,07
≥ 40 (n = 80)	2,21	[0,84 ; 5,77]	0,10
Ovocytes ponctionnés	0,64	[0,55 ; 0,74]	0,000
Ovocytes matures	0,46	[0,37 ; 0,59]	0,000
Age paternel (ans)	1,03	[0,99 ; 1,07]	0,09
Age paternel (ans) (classe)			
< 35 (n = 134)	1		
[35-40[(n = 173)	2,37	[0,97 ; 5,78]	0,05
[40-45[(n = 151)	2,45	[0,99 ; 6,07]	0,05
≥ 45 (n = 128)	2,96	[1,19 ; 7,37]	0,01
Numération (M/ml)	1,00	[0,99 ; 1,01]	0,16
Mobilité (a+b+c) (%)	1,00	[0,98 ; 1,02]	0,53
Spermatozoïde injecté avec térazoospermie			
Non	1		
Oui	4,90	[1,87 ; 10,79]	0,001

c. Déterminer les facteurs prédictifs de l'échec de fécondation

Afin de déterminer les facteurs prédictifs de l'échec de fécondation, nous avons réalisé une régression logistique multivariée. Les résultats sont résumés dans le Tableau 11. Seul le nombre d'ovocytes matures et l'injection d'ovocyte avec un spermatozoïde présentant une tératozoospermie étaient des facteurs associés à l'issue de fécondation. Pour notre population l'âge maternel et paternel, le nombre d'ovocytes ponctionnés et la numération (M/ml) ne permettaient pas de prédire l'issue de la fécondation pour notre population ($p > 0,05$).

Tableau 11 : Modèle complet de la régression logistique multivariée en cas d'échec de fécondation

	OR ajusté	IC 95%	p
Age maternel (ans)	0,43	[0,90 ; 1,04]	0,97
Ovocytes ponctionnés	0,98	[0,76 ; 1,25]	0,88
Ovocytes matures	0,45	[0,31 ; 0,66]	0,000
Age paternel (ans) (classe)			
< 35 (n = 134)	1		
[35-40[(n = 173)	1,75	[0,65 ; 4,74]	0,26
[40-45[(n = 151)	1,93	[0,69 ; 5,35]	0,20
≥ 45 (n = 128)	2,15	[0,72 ; 6,43]	0,16
Numération (M/ml)	1,00	[0,99 ; 1,01]	0,22
Spermatozoïde injecté avec tératozoospermie			
Non	1		
Oui	10,67	[2,92 ; 38,96]	0,000

Le Tableau 12 représente le modèle final des facteurs prédictifs de l'échec de fécondation. L'âge maternel et le nombre d'ovocytes ponctionnés étaient des variables forcées dans ce modèle à cause de la présence d'une corrélation significative entre elles et avec le nombre d'ovocytes matures.

Concernant le nombre d'ovocytes matures, le risque d'échec de fécondation était 2 fois moins élevé à chaque fois que le nombre d'ovocytes matures récupéré augmentait (OR = 0,45, IC 95% [0,35 ; 0,57], $p = 0,000$). Tandis que l'injection d'ovocyte avec un spermatozoïde ayant une tératozoospermie présentait un risque d'échec de fécondation 10 fois plus élevé que lorsque l'injection était réalisée avec un spermatozoïde sans tératozoospermie (OR = 10,27, IC 95% [2,91 ; 36,20], $p = 0,000$).

Tableau 12 : Modèle final de la régression logistique multivariée : facteurs prédictifs de l'échec de fécondation en ICSI

	OR ajusté	IC 95%	<i>p</i>
Age maternel (ans)	0,99	[0,94 ; 1,06]	0,98
Ovocytes ponctionnés	1,00	[0,79 ; 1,27]	0,97
Ovocytes matures	0,45	[0,31 ; 0,66]	0,000
Spermatozoïde injecté avec tératozoospermie			
Non	1		
Oui	10,27	[2,91 ; 36,20]	0,000

d. Valeur seuil d'ovocytes matures

Afin de déterminer une valeur seuil optimale de nombre d'ovocytes matures à partir duquel il y aurait plus de chance d'avoir un succès de fécondation, nous avons utilisé la courbe ROC (Figure 39).

Pour notre population, le seuil était fixé à 3 ovocytes matures par cycle : l'aire sous la courbe (AUC) était de 0,806 avec une spécificité de 71,4% et une sensibilité de 74%.

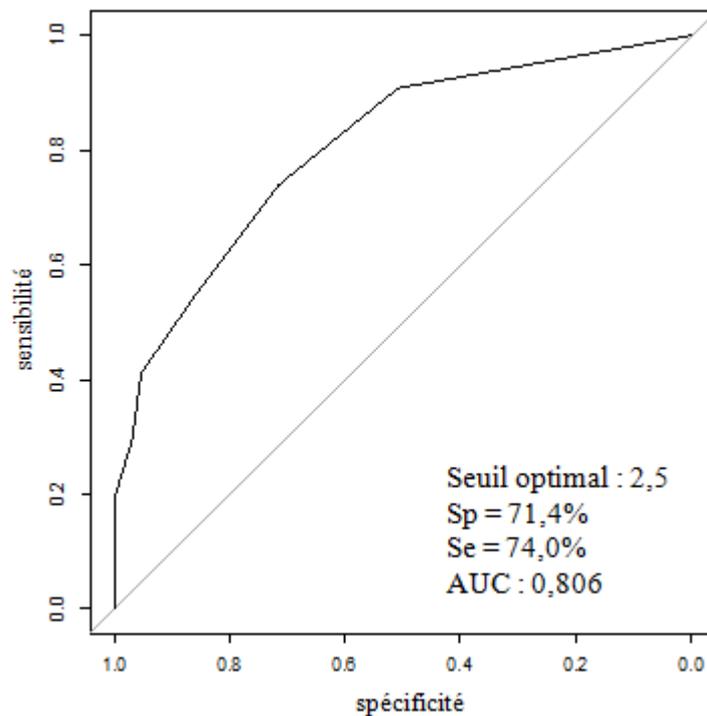


Figure 39 : Influence du nombre d'ovocytes matures sur l'issue de fécondation avec la courbe ROC

3. Qualité embryonnaire

Dans cette partie de l'étude, nous avons étudié l'effet des paramètres maternels et paternels (âge de la femme et de l'homme, nombre d'ovocytes ponctionnés et matures et paramètres spermatiques) sur le taux de segmentation et le taux d'embryons de bonne qualité à l'aide de la régression linéaire.

Une analyse univariée a été réalisée en premier lieu afin de déterminer le lien entre chaque paramètre avec le taux de segmentation et le taux d'embryons de bonne qualité comme indiqué dans la partie « Matériels et méthodes ». Une analyse multivariée a été réalisée en deuxième lieu afin d'identifier les facteurs qui ont une influence sur le taux de segmentation et le taux d'embryons de bonne qualité.

Après plusieurs étapes d'ajustement, seul l'âge maternel ($\beta = -0,12$ $p = 0,023$) et le nombre d'ovocytes matures ($\beta = -0,29$, $p = 0,004$) ont une influence négative sur le taux de segmentation. Les facteurs paternels n'ont aucune influence sur le taux de segmentation ($p > 0,05$).

Par ailleurs, aucun paramètre étudié (paternel ou maternel) ne présente une association avec le taux d'embryons de bonne qualité ($p > 0,05$).

4. Transfert d'embryons

Les comparaisons entre les paramètres maternels et paternels, les paramètres embryonnaires (zygotes (2PN), embryons, embryons de bonne qualité) et le taux de grossesse chimique selon le jour de transfert sont résumées dans le Tableau 13.

Dans notre centre d'AMP en Tunisie (Sousse), le transfert embryonnaire était réalisé le plus souvent à J2/3 (83,5%).

Pour notre population, plus la femme était jeune et présentait une bonne réserve ovocytaire (ovocytes ponctionnés) et une bonne qualité ovocytaire (ovocytes matures), plus le transfert était réalisé à J4/5 ($p < 0,05$). Concernant les paramètres spermatiques, la numération totale était significativement plus élevée en cas de transfert à J4/5 en comparaison à celle en cas de transfert à J2/3.

En comparaison à un transfert à J2/3, les cycles avec un transfert embryonnaire à J4/5 présentaient un plus grand nombre de zygotes (2 PN) ($2,42 \pm 1,36$ vs $5,84 \pm 1,82$), un plus grand nombre d'embryons ($2,35 \pm 1,32$ vs $5,84 \pm 1,82$), un plus grand nombre d'embryons de bonne qualité ($1,32 \pm 0,94$ vs $3,69 \pm 1,39$), un plus grand nombre d'embryons transférés ($2,01 \pm 0,83$ vs $2,43 \pm 0,5$) et un taux de fécondation plus élevé ($68,69 \pm 25,14$ vs $82,82 \pm 16,89$). Concernant le taux de grossesse chimique, il était significativement plus élevé en cas de transfert à J4/5 (30,58%) en comparaison à celui en cas de transfert à J2/3 (13,51%).

Tableau 13 : Comparaison entre les différents paramètres maternels, paternels et d'ICSI selon le jour de transfert embryonnaire

	Transfert J2/3 430 cycles	Transfert J4/5 85 cycles	P
Age maternel (ans)	33,95 ± 5,08	31,65 ± 4,08	0,000
Ovocytes ponctionnés	5,36 ± 3,13	9,70 ± 3,42	0,000
Ovocytes matures	3,85 ± 2,22	7,4 ± 2,65	0,000
Age paternel (ans)	39,76 ± 6,69	38,64 ± 5,89	0,120
Numération (M/ml)	31,82 ± 35,68	38,53 ± 38,55	0,141
Numération (M)	89,01 ± 108,86	119,54 ± 177,2	0,037
Mobilité (a+b+c) (%)	20 ± 14,28	23,04 ± 12,73	0,053
Sperme injecté avec tératozoospermie (% (Nombre de cycles))	2,56% (11)	1,17% (1)	0,70
Zygotes	2,42 ± 1,36	5,85 ± 1,82	0,000
Embryons	2,35 ± 1,32	5,84 ± 1,82	0,000
Nombre d'embryons transférés	2,01 ± 0,83	2,43 ± 0,5	0,000
Embryons de bonne qualité	1,32 ± 0,94	3,69 ± 1,39	0,000
Taux de maturation (%)	75,26 ± 19,89	77,86 ± 12,99	0,247
Taux de fécondation (%)	68,69 ± 25,14	82,82 ± 16,89	0,000
Taux de segmentation (%)	98,47 ± 8,83	99,80 ± 1,80	0,169
Taux d'embryons de bonne qualité (%)	58,58 ± 37,66	65,88 ± 22,94	0,086
Taux de grossesse chimique (%)	13,51%	30,58%	0,000

5. *Echec de grossesse chimique*

a. **Comparaison des paramètres maternels/paternels, des paramètres d'ICSI entre le groupe « Echec de grossesse chimique » et « Succès de grossesse chimique »**

Afin d'étudier l'échec de grossesse chimique en ICSI, notre population de 515 cycles avec transfert embryonnaire a été divisée en deux groupes :

- « Echec de grossesse chimique », comprenant 431 cycles ayant un taux sérique de β -HCG négatif (≤ 10 UI/ml)
- « Succès de grossesse chimique », comprenant 84 cycles ayant un taux sérique de β -HCG positif (>10 UI/ml).

Le taux de succès de grossesse chimique pour notre population était de 16,3%.

La comparaison entre ces deux groupes montrait que l'âge maternel, l'âge paternel, la numération en spermatozoïdes (M/ml) étaient significativement plus élevés en cas d'échec de grossesse chimique. Tandis que le nombre d'ovocytes ponctionnés et matures, la numération totale en spermatozoïdes (M), le nombre de zygotes, le nombre d'embryons, le nombre d'embryons de bonne qualité, le nombre d'embryons transférés et le taux d'embryons de bonne qualité étaient significativement plus faibles dans ce groupe « Echec de grossesse chimique ».

Toutefois, aucune différence significative n'a été identifiée entre les deux groupes concernant la mobilité spermatique, la morphologie du spermatozoïde injecté, le nombre de blastocystes et les taux de maturation, fécondation, segmentation et blastulation (Tableau 14).

Par ailleurs, l'analyse de corrélation entre l'âge paternel et les paramètres spermatiques avec le test de Pearson montrait la présence d'une faible corrélation positive ($p < 0,05$) entre l'âge paternel et la :

- Numération (M/ml) ($R = 0,16$)
- Numération totale (M) ($R = 0,11$)
- Mobilité (a+b+c) (%) ($R = 0,09$).

Tableau 14 : Comparaison entre échec et succès de grossesse chimique en cas d'ICSI

	Echec de grossesse chimique 431 cycles	Succès de grossesse chimique 84 cycles	<i>p</i>
Age maternel (ans)	33,85 ± 5,01	32,22 ± 4,80	0,005
Ovocytes ponctionnés	5,86 ± 3,50	7,23 ± 3,63	0,002
Ovocytes matures	4,28 ± 2,62	5,22 ± 2,65	0,004
Age paternel (ans)	39,89 ± 6,84	38,04 ± 4,73	0,018
Numération (M/ml)	34,37 ± 37,56	25,22 ± 27,10	0,034
Numération (M)	72,46 ± 94,03	98,14 ± 127,85	0,035
Mobilité (a+b+c) (%)	20,57 ± 14,41	20,17 ± 12,03	0,814
Spermatozoïde injecté avec térazoospermie (% (Nombre de cycles))	1,19% (1)	2,78% (12)	0,704
Embryons	2,80 ± 1,85	3,69 ± 2,059	0,000
Zygotes	2,85 ± 1,87	3,73 ± 2,04	0,000
Embryons de bonne qualité	1,58 ± 1,31	2,39 ± 1,37	0,000
Blastocystes (Nombre de cycles)	3,05 ± 1,51 (59)	3,26 ± 1,45 (26)	0,532
Nombre d'embryons transférés	2,04 ± 0,82	2,30 ± 0,72	0,003
Taux de maturation (%)	75,97 ± 18,88	74,15 ± 19,18	0,426
Taux de fécondation (%)	70,57 ± 25,06	73,29 ± 21,44	0,352
Taux de segmentation (%)	98,65 ± 8,32	98,92 ± 6,94	0,751
Taux d'embryons de bonne qualité (%)	57,87 ± 36,44	69,52 ± 29,97	0,006
Taux de blastulation (%) (Nombre de cycles)	55,22 ± 24,16 (59)	54,48 ± 19,23 (26)	0,880

b. Déterminer le lien entre les facteurs maternels/paternels, paramètres d'ICSI et l'échec de grossesse chimique

En se basant sur les précédents résultats des analyses statistiques, nous avons réalisé des tests de régression logistique univariée sur les paramètres féminins (âge maternel, nombre d'ovocytes ponctionnés et matures), sur les paramètres masculins (âge paternel, numération en spermatozoïdes (M/ml) et numération totale en spermatozoïdes (M)) et sur les paramètres d'ICSI (nombre d'embryons transférés et jour de transfert), afin d'évaluer le lien entre ces paramètres et l'issue de grossesse chimique en ICSI. Une analyse selon les tranches d'âges maternels, les tranches d'âges paternels, les différents groupes de numération en spermatozoïdes était également réalisée. Les résultats sont résumés dans le Tableau 15.

Concernent les tranches d'âge paternel :

- le groupe des hommes inférieurs à 35 ans comprenait 23 hommes entre 24 et 29 ans et 100 hommes âgés entre 30 et 34 ans.
- le groupe des hommes entre 35 et 39 ans comprenait 151 hommes
- le groupe des hommes entre 40 et 44 ans comprenait 133 hommes
- le groupe des hommes les plus âgés incluant 73 hommes âgés entre 45 et 49 ans et 35 hommes âgés entre 50 et 70 ans.

Selon la régression logistique univariée, toutes les variables analysées étaient associées à l'issue de grossesse chimique en ICSI sauf la numération totale en spermatozoïdes (M).

Concernant les paramètres féminins, l'âge maternel était associé à l'échec de grossesse (OR = 1,06, IC 95% [1,01 ; 1,11], $p = 0,007$). Le risque d'échec de grossesse chimique à partir de 40 ans était 5 fois plus élevé chez ces femmes que chez les femmes dont l'âge est inférieur à 30 ans. Le nombre d'ovocytes ponctionnés (OR = 0,9, IC 95% [0,85 ; 0,96], $p = 0,001$) et le nombre d'ovocytes matures (OR = 0,88, IC 95% [0,81 ; 0,96], $p = 0,003$) étaient également associés à l'échec de grossesse.

Concernant les paramètres masculins, l'âge paternel était associé à l'échec de grossesse (OR = 1,04, IC 95% [1,00 ; 1,08], $p = 0,019$). Le risque d'échec de grossesse chimique à partir de 45 ans était 3 fois plus élevé chez ces hommes par rapport aux hommes âgés de moins de 35 ans. Concernant la numération (M/ml) (OR = 1,00, IC 95% [0,98 ; 0,99], $p = 0,03$), elle était également associée à l'issue de grossesse. De plus, l'analyse selon les différents groupes de numération montrait la présence de différence significative de risque

d'échec entre les hommes avec une numération normale ($\geq 15\text{M/ml}$) et les hommes avec une numération entre $[10\text{ M/ml} - 15\text{ M/ml}]$.

Concernant les paramètres d'ICSI, le jour de transfert en J2/3 (OR = 2,81, IC 95% [1,64 ; 4,82], $p = 0,000$) et le nombre d'embryons transférés (OR = 0,66, IC 95% [0,49 ; 0,89], $p = 0,007$) étaient associés à l'échec de grossesse.

Selon les résultats de ce dernier test et les tests précédents, l'effet des facteurs maternels sur le résultat de fécondation, la qualité embryonnaire et la grossesse chimique persistaient. C'est pour cela que dans le test suivant nous avons focalisé notre étude sur l'effet des facteurs paternels (âge paternel et numération (M/ml)) sur l'issue de la grossesse chimique. Afin de simplifier l'analyse de l'effet de la numération sur l'issue de la grossesse, nous avons regroupé le groupe avec une numération $< 5\text{M/ml}$ et le groupe dont la numération est comprise entre $[5\text{ M/ml} - 10\text{ M/ml}]$ (pas de différence significative de risque d'échec de grossesse entre ces deux groupes $p > 0,05$).

Tableau 15 : Relation entre les paramètres maternels, paternels et de fécondité avec l'issue de grossesses en ICSI : régression logistique univariée

Variabes	OR	IC 95%	p
Age maternel (ans)	1,06	[1,01 ; 1,11]	0,007
Age maternel (classe)			
< 30 (n =109)	1		
[30-35[(n =174)	1,37	[0,76 ; 2,48]	0,29
[35-40[(n =165)	1,74	[0,96 ; 3,25]	0,07
≥ 40 (n =67)	4,68	[1,55 ; 14,15]	0,006
Ovocytes ponctionnés	0,90	[0,85 ; 0,96]	0,001
Ovocytes matures	0,88	[0,81 ; 0,96]	0,003
Age paternel (ans)	1,04	[1,00 ; 1,08]	0,019
Age paternel (classe)			
< 35 (n =123)	1		
[35-40[(n =151)	0,86	[0,46 ; 1,61]	0,65
[40-45[(n =133)	0,80	[0,43 ; 1,52]	0,50
≥ 45 (n =108)	2,97	[1,20 ; 7,29]	0,01
Numération (M/ml)	1,00	[0,98 ; 0,99]	0,03
Numération (M/ml) (classe)			
< 5 M/ml (n = 93)	0,80	[0,42 ; 1,53]	0,50
[5 M/ml -10 M/ml [(n = 67)	0,70	[0,35 ; 1,43]	0,34
[10 M/ml-15 M/ml [(n =49)	0,31	[0,44 ; 1,29]	0,001
≥ 15 M/ml (n =306)	1		
Numération (M)	1,00	[1,00 ; 1,00]	0,085
Numération (M) (classe)			
< 39M (n =214)	0,05	[0,16 ; 0,63]	0,05
≥ 39M (n =294)	1		
Jour de transfert			
J2/3	2,81	[1,64 ; 4,82]	0,000
J4/5	1		
Nombre d'embryons transférés	0,66	[0,49 ; 0,89]	0,007

c. Effet de l'âge paternel et de la numération en spermatozoïdes sur l'issue de la grossesse chimique

Afin d'évaluer la relation entre l'âge paternel, la numération en spermatozoïdes (M/ml) et l'issue de grossesse chimique en ICSI, une régression logistique multivariée a été réalisée avec ajustement de l'âge maternel, du nombre d'ovocytes ponctionnés et matures, du nombre d'embryons transférés et du jour de transfert d'embryons. Les résultats sont résumés dans le Tableau 16.

L'âge paternel, n'avait pas d'effet sur l'échec de grossesse chimique quelle que soit la tranche d'âge ($p > 0,05$). Néanmoins, une association entre le groupe avec numération entre [10 M/ml – 15 M/ml] et l'échec de grossesse a été observée. Pour ce groupe le risque d'échec de grossesse chimique était 3 fois moins élevé par rapport au groupe avec une numération ≥ 15 M/ml.

Tableau 16 : Effet de l'âge paternel et de la numération en spermatozoïdes sur l'issue de la grossesse chimique

Variables	OR ajusté	IC 95%	p
Age paternel (classe)			
< 35 (n =123)	1		
[35-40[(n =151)	0,83	[0,42 ; 1,62]	0,58
[40-45[(n =133)	0,67	[0,33 ; 1,37]	0,28
≥ 45 (n =108)	2,05	[0,74 ; 5,69]	0,16
Numération (M/ml) (classe)			
< 10 M/ml (n =160)	0,83	[0,47 ; 1,45]	0,52
[10 M/ml-15 M/ml [(n =49)	0,30	[0,14 ; 0,63]	0,001
≥ 15 M/ml (n =306)	1		

III. Effet de la qualité de l'ADN spermatique sur les résultats obtenus en AMP

1. Etude descriptive

Un total de 31 couples de FIV/ICSI avec insémination/injection a été inclus dans notre étude. L'âge maternel variait de 16 ans à 42 ans, avec une moyenne de 33,74 ans \pm 5,47 ans. L'âge paternel variait de 28 ans à 85 ans, avec une moyenne de 41,35 ans \pm 11,07 ans. Les données spermatiques étaient disponibles pour 31 couples concernant le volume, la numération (M/ml) et la mobilité et pour 29 couples concernant la tératozoospermie. La fragmentation de l'ADN variait de 1,4% à 22%, avec une moyenne de 10,83% \pm 5,21% (7 hommes présentaient un sperme de bonne qualité et 24 hommes présentaient un sperme altéré) (Annexe 1).

Après l'insémination ou l'injection, le transfert d'embryons était réalisé soit à J2/3 (58,6%) soit à J4/5 (41,4%). En moyenne, 1,58 \pm 0,72 embryons était transférés par cycle : un seul embryon transféré pour 14 couples, deux embryons transférés pour 15 couples et trois embryons transférés pour 2 couples.

Le taux de succès de grossesse chimique pour notre population était de 16,12% (5/31).

- **Relation entre la qualité d'ADN, l'âge paternel et les paramètres spermatiques**

Pour notre population, la fragmentation de l'ADN spermatique n'était pas corrélée ni avec l'âge paternel ni avec les paramètres spermatiques ($p > 0,05$) (Tableau 17).

Tableau 17 : Corrélation entre fragmentation de l'ADN spermatique et les différents paramètres paternels

	Age paternel	Numération	Mobilité	Tératozoospermie
Fragmentation de l'ADN	-0,01	-0,01	-0,18	0,17
P	0,95	0,95	0,33	0,37

2. Effet de la fragmentation de l'ADN sur le taux de fécondation

Afin d'analyser l'effet de la qualité de l'ADN spermatique sur le taux de fécondation, une régression linéaire multivariée a été réalisée avec ajustement de l'âge maternel, du nombre d'ovocytes ponctionnés et matures.

La fragmentation de l'ADN n'était pas associée au taux de fécondation ($\beta = -0,097$, $p = 0,61$).

3. Relation entre la fragmentation de l'ADN et le taux de grossesse chimique

Afin d'analyser l'effet de la qualité de l'ADN spermatique sur le taux de grossesse chimique, une régression logistique multivariée a été réalisée avec ajustement de l'âge maternel, du nombre d'ovocytes ponctionnés et matures, du nombre d'embryons transférés et du jour de transfert d'embryons.

La fragmentation de l'ADN, n'était pas associée au taux de grossesse chimique (OR = 0,80, IC 95% [0,60 ; 1,07], $p = 0,13$).

B. Tri magnétique des spermatozoïdes

I. Optimisation et validation du tri des spermatozoïdes à l'aide du kit de recherche

1. Optimisation du protocole du tri magnétique : Kit de recherche

a. Quantité de microbilles

La moyenne du taux de spermatozoïdes avec externalisation des phosphatidylsérines (%) dans les fractions annexine V- et annexine V+ en fonction de la quantité de microbilles est représentée par la Figure 40. Après le tri magnétique, une augmentation de la pureté des deux populations de spermatozoïdes a été observée. Elle est proportionnelle aux quantités croissantes en microbilles magnétiques couplées à l'annexine V.

Pour la fraction annexine V- et avec 100 µl de microbilles, nous avons remarqué une diminution significative de la moyenne du taux de spermatozoïdes avec EPS ($32,4\% \pm 9,26\%$) en comparaison à celle avec 20 µl et 50 µl de microbilles ($44,8\% \pm 12,02\%$ et $38\% \pm 6,96\%$ respectivement).

Pour la fraction annexine V+, une augmentation non significative proportionnelle aux quantités croissantes en microbilles de la moyenne du taux de spermatozoïdes avec EPS a été observée, $76\% \pm 6,85\%$ avec 20 µl de microbilles, $78\% \pm 5,38\%$ avec 50 µl de microbilles et $82,8\% \pm 7,08\%$ avec 100 µl de microbilles.

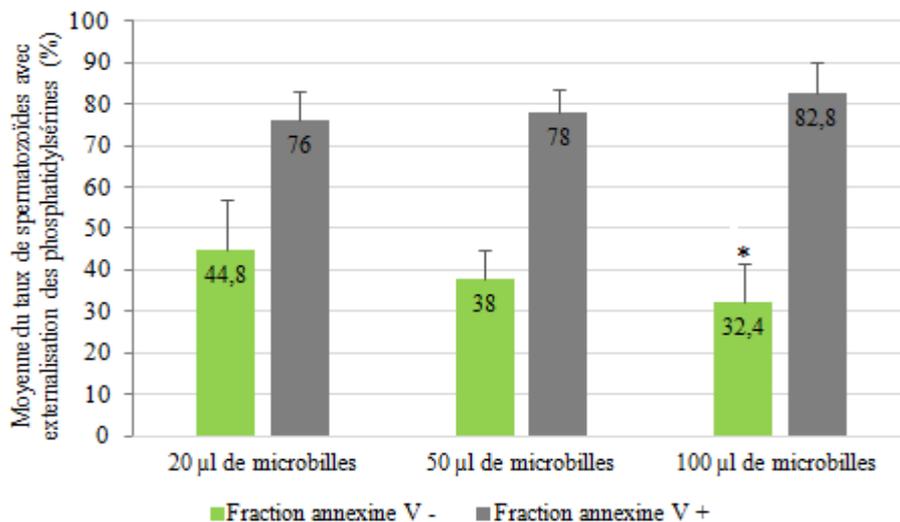


Figure 40 : Moyenne du taux de spermatozoïdes avec EPS (%) dans la fraction annexine V- et annexine V+ en fonction de la quantité de microbilles

* $p < 0,05$

b. Evaluation de la pureté et de la qualité de l'ADN avant et après le tri magnétique

Les résultats du taux d'EPS et de la fragmentation de l'ADN spermatique après la décongélation et après tri, dans la fraction annexine V- sont représentés respectivement dans la Figure 41 et la Figure 42.

La moyenne du taux des spermatozoïdes avec EPS, après décongélation, est de $43\% \pm 11,33\%$. Après le passage dans la colonne, nous avons observé une diminution significative de ce taux dans la fraction annexine V- ($31,8\% \pm 4,08\%$).

La moyenne du taux de fragmentation de l'ADN spermatique, après décongélation est de $7,36\% \pm 3,45\%$. Après le passage dans la colonne, nous avons observé une augmentation significative de ce taux dans la fraction annexine V- ($14,12\% \pm 4,64\%$).

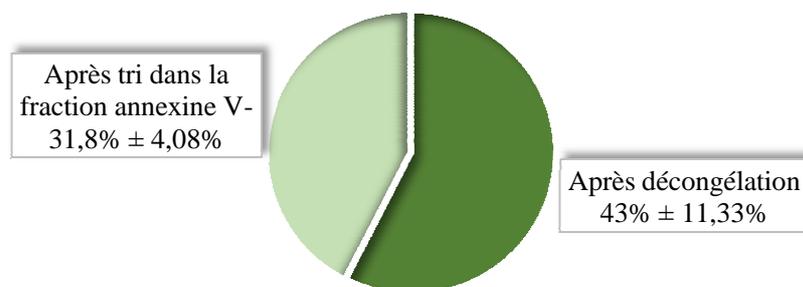


Figure 41 : Moyenne du taux de spermatozoïdes avec EPS après décongélation et après tri dans la fraction annexine V-
 $p < 0,05$

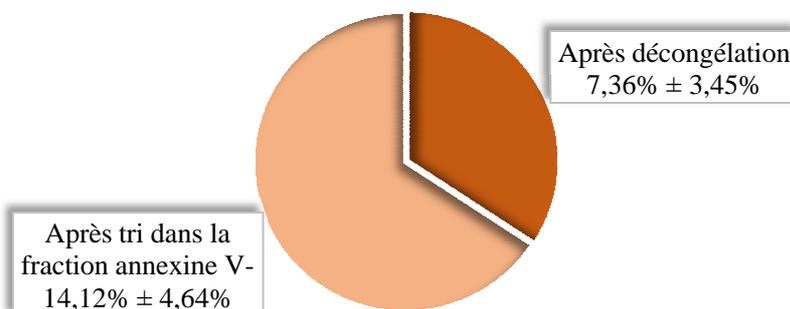


Figure 42 : Moyenne du taux de fragmentation de l'ADN spermatique après décongélation et après tri dans la fraction annexine V-
 $p < 0,05$

c. Tests complémentaires

- **Effet des paramètres de la technique**

L'évaluation de la fragmentation de l'ADN spermatique montre qu'en présence de l'enzyme TdT, l'ADN est marqué par la technique TUNEL, alors qu'en absence de l'enzyme, l'ADN n'est pas marqué. Ces résultats sont identifiés quelles que soient la procédure de lavage et l'origine du sperme (trié ou non).

- **Effet du BB 1X**

- **PBS versus BB :**

La moyenne du taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes lavés deux fois avec du PBS 1X ou du BB 1X est représentée dans la Figure 43.

Nous avons remarqué une augmentation significative du pourcentage de spermatozoïdes avec un ADN fragmenté entre les spermatozoïdes lavés deux fois avec le PBS 1X et les spermatozoïdes lavés 2 fois avec le BB 1X. Ce taux est triplé, il passe de $6,77\% \pm 4,27\%$ à $19,3\% \pm 12,19\%$.

Le lavage avec le BB induit une augmentation significative du taux de fragmentation de l'ADN spermatique par rapport au lavage avec du PBS.

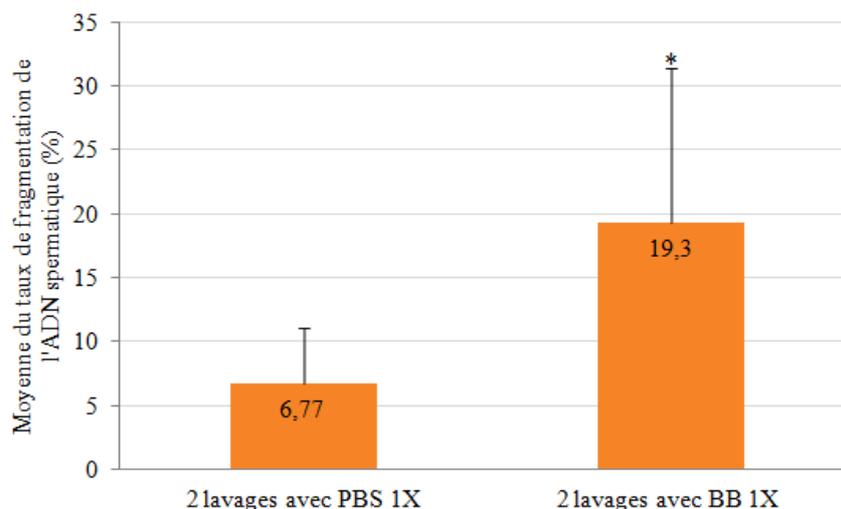


Figure 43 : Moyenne du taux de fragmentation de l'ADN spermatique après deux lavages avec du PBS 1X ou du BB 1X

* comparaison par rapport à 2 lavages avec PBS 1X, $p < 0,05$

○ **Lavage avec BB versus incubation avec BB**

La moyenne du taux de fragmentation de l'ADN spermatique après lavage avec du PBS 1X ou du BB 1X et après incubation avec du BB 1X est représentée par la Figure 44.

Nous avons remarqué une différence significative entre la moyenne du taux de fragmentation de l'ADN spermatique après lavage avec du PBS 1X et celle après lavage avec du BB 1X ($8,98\% \pm 6,25\%$ vs $34,2\% \pm 13,82\%$). Cette différence significative confirme les résultats du test précédent (PBS versus BB).

De plus, nous avons remarqué une augmentation significative du pourcentage de spermatozoïdes avec un ADN fragmenté entre les spermatozoïdes lavés avec le BB 1X et les spermatozoïdes incubés 15 minutes avec le BB 1X ($34,2\% \pm 13,82\%$ contre $45,6\% \pm 16,33\%$).

Le BB est le facteur qui influence le résultat du taux de fragmentation après le tri.

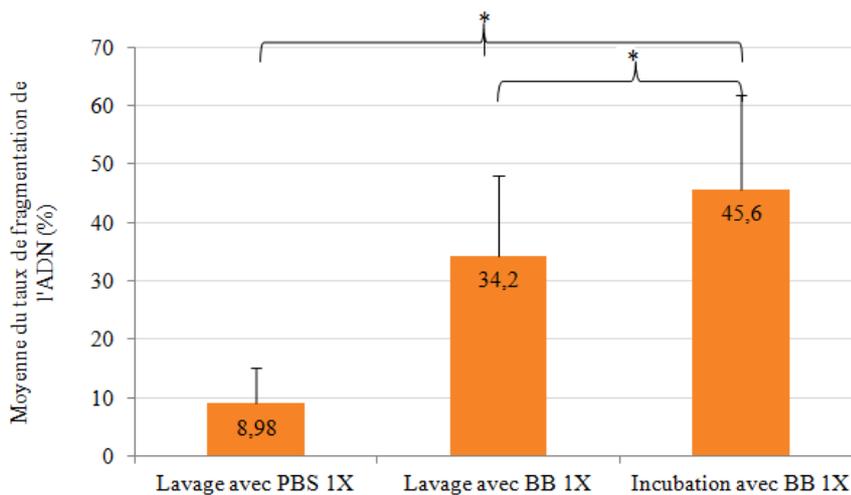


Figure 44 : Moyenne du taux de fragmentation de l'ADN spermatique après lavage avec du PBS 1X ou du BB 1X et après incubation avec du BB 1X

* $p < 0,05$

- **Rôle du BB : Test BB versus Triton**

La moyenne du taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes traités au PBS 1X, au BB 1X ou au Triton X-100 est représentée dans la Figure 45.

La comparaison entre ces taux montre que le pourcentage de spermatozoïdes à ADN fragmenté après traitement au BB ou au triton est le même ($p < 0,05$).

La comparaison de la moyenne du taux de fragmentation de l'ADN après traitement par PBS 1X ($8,51\% \pm 4,54\%$) montre :

- une augmentation significative de ce taux après traitement par BB1X ($16,7\% \pm 8,78\%$)
- une augmentation significative de ce taux après traitement par Triton X-100 ($17,73\% \pm 7,02\%$).

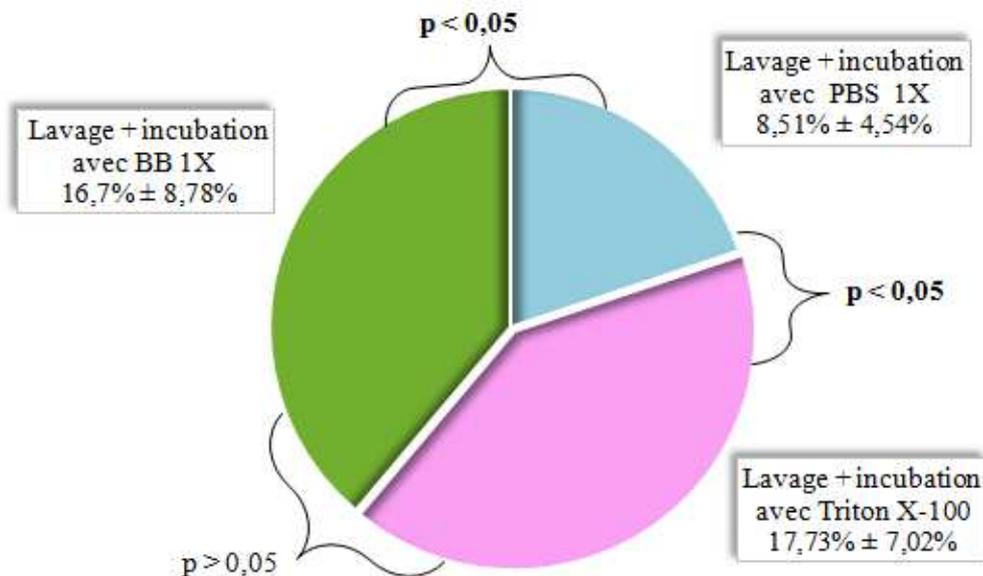


Figure 45 : Moyenne du taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes traités au PBS 1X, au BB 1X ou au Triton X-100

d. Evaluation de la pureté et de la qualité de l'ADN à chaque étape du tri magnétique

La moyenne du taux de spermatozoïdes avec EPS et la moyenne du taux de fragmentation de l'ADN, à chaque étape du tri, sont répertoriées dans le Tableau 18.

Concernant la pureté, la moyenne du taux de spermatozoïdes avec EPS est identique après décongélation et après incubation avec les microbilles ($41,6\% \pm 7,02\%$ vs $42,6\% \pm 6,87\%$). Après le passage dans la colonne, ce taux diminue significativement dans la fraction annexine V- et passe à $24,4\% \pm 4,03\%$.

Concernant la fragmentation de l'ADN, la fréquence de spermatozoïdes avec un ADN fragmenté est significativement plus élevée après incubation avec les microbilles ($35,4\% \pm 12,28\%$) qu'après décongélation ($20\% \pm 6,40\%$). Après passage dans la colonne, elle diminue significativement dans la fraction négative et passe à $20\% \pm 6,44\%$.

Après passage dans la colonne, le tri cellulaire à l'aide de microbilles conjuguées à l'annexine V permet d'éliminer une majorité de spermatozoïdes déjà en voie d'apoptose et/ou avec un ADN fragmenté.

Tableau 18 : Moyenne du taux de spermatozoïdes avec EPS et moyenne du taux de fragmentation de l'ADN à chaque étape du tri

	Décongélation	Incubation	Fraction annexine V-
Moyenne du taux de spermatozoïdes avec EPS \pm SD (%)	$41,6 \pm 7,02$	$42,6 \pm 6,87$	$24,4 \pm 4,03^{\psi}$
Moyenne du taux de fragmentation de l'ADN \pm SD (%)	$20 \pm 6,40$	$35,4 \pm 12,28^*$	$20 \pm 6,44^{\psi}$

*comparaison par rapport à la décongélation ψ comparaison par rapport à l'incubation $p < 0,05$

e. Test sur deux colonnes

La moyenne du taux de spermatozoïdes avec EPS et la moyenne du taux de fragmentation de l'ADN avant et après passage sur 2 colonnes sont représentées dans la Figure 46.

Après passage sur la première colonne les fréquences de spermatozoïdes avec EPS et avec un ADN fragmenté diminuent significativement. En revanche, après passage dans la deuxième colonne, ces fréquences restent inchangées.

La deuxième colonne n'améliore pas la sélection spermatique et est donc inutile.

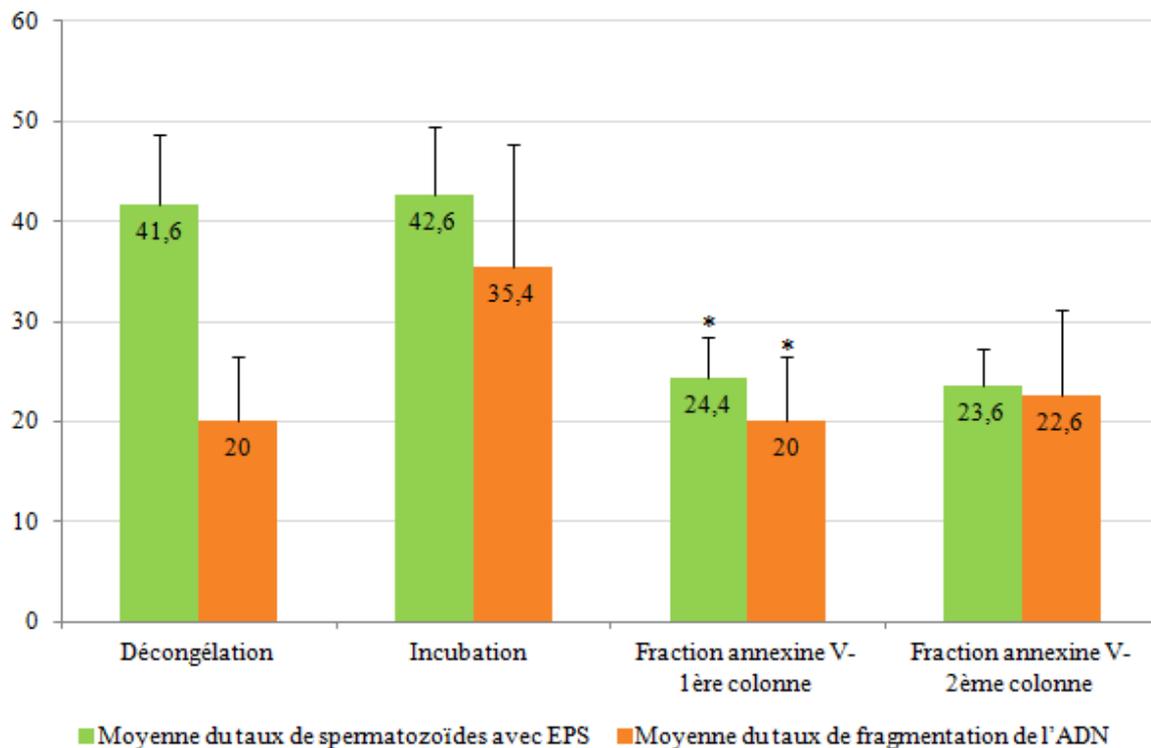


Figure 46 : Moyenne du taux de spermatozoïdes avec EPS et moyenne du taux de fragmentation de l'ADN avant et après passage sur 2 colonnes

*comparaison par rapport à l'incubation $p < 0,05$

f. Kit recherche adapté *versus* Kit ART

La moyenne du taux de spermatozoïdes avec EPS et du taux de fragmentation de l'ADN avant et après le tri à l'aide de kit recherche et du kit ART sont représentées respectivement dans la Figure 47 et la Figure 48.

Concernant la pureté, la moyenne du taux de spermatozoïdes avec EPS est identique après décongélation et dans la fraction annexine V- pour les deux kits (kit ART et kit recherche) ($50,84\% \pm 15,09\%$ vs $42,16\% \pm 7,45\%$ et $24,16\% \pm 8,18\%$ vs $24,52\% \pm 3,5\%$). Cependant dans la fraction annexine V+ cette moyenne est significativement plus élevée après un tri avec le kit ART en comparaison avec le kit recherche ($87,16\% \pm 5,4\%$ vs $71,4\% \pm 6,18\%$) (Figure 47).

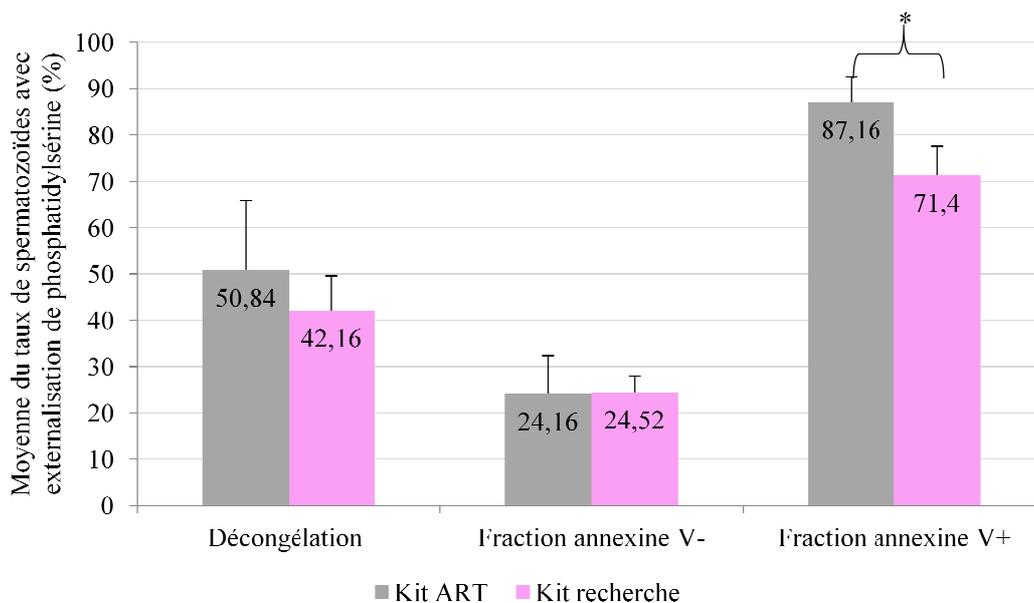


Figure 47 : Moyenne du taux de spermatozoïdes avec EPS en fonction du kit utilisé
* $p < 0,05$

Concernant la fragmentation de l'ADN : la comparaison de la fréquence de spermatozoïdes avec un ADN fragmenté ne montre aucune différence significative entre les résultats obtenus avec le kit ART et le kit de recherche (Figure 48).

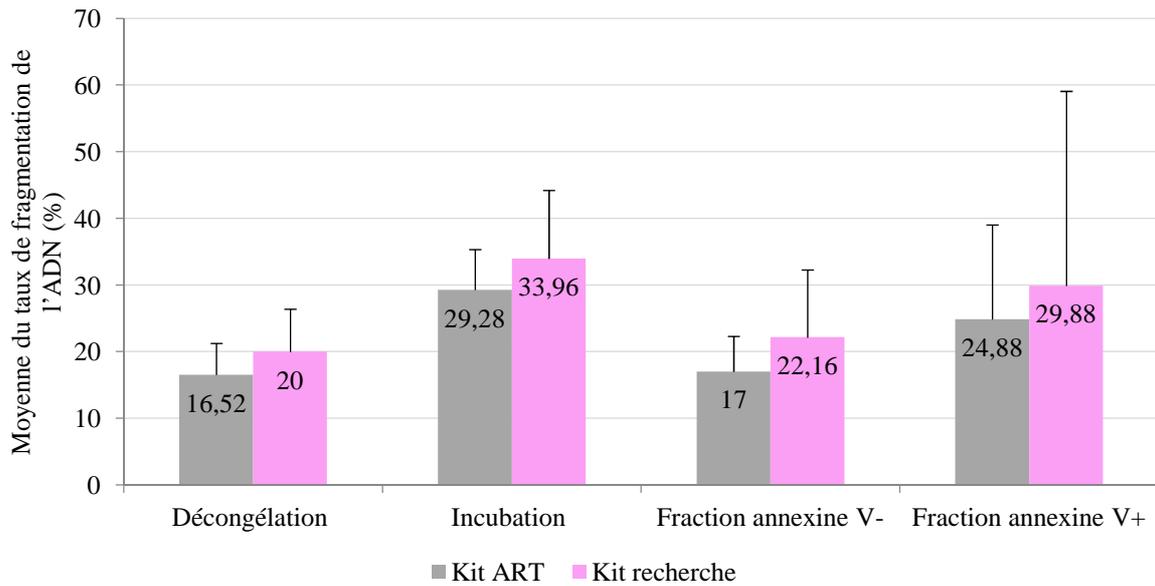


Figure 48 : Moyenne du taux de fragmentation de l'ADN en fonction du kit utilisé

2. Validation du tri magnétique des spermatozoïdes à l'aide du kit de recherche adapté

a. Patients

Six hommes ayant un taux anormal de fragmentation de l'ADN spermatique (par rapport au seuil du laboratoire) sont inclus dans notre étude (Tableau 19). Les taux de fragmentation de l'ADN spermatique s'échelonnent de 14,6% (P6) à 26% (P5).

Tableau 19 : Taux de fragmentation de l'ADN (%) chez 6 patients

Patient	Taux de fragmentation de l'ADN (%)
P1	17
P2	19,4
P3	15,4
P4	15,2
P5	26
P6	14,6

b. Evaluation du taux des spermatozoïdes avec EPS

Les taux de spermatozoïdes avec EPS avant tri et après tri dans la fraction annexine V- et annexine V+ sont résumés dans le Tableau 20.

Par rapport à la décongélation, nous avons observé une diminution significative du taux de spermatozoïdes avec EPS dans la fraction annexine V- (5/6 patients) et une augmentation significative de ce taux dans la fraction annexine V+ (5/6 patients). Nous avons observé également une différence significative entre les deux fractions annexine V- et annexine V+ (5/6 patients).

La moyenne du taux de spermatozoïdes avec EPS, après décongélation est de $36,13\% \pm 10,14\%$. Après séparation par colonne, la moyenne du taux de spermatozoïdes avec EPS diminue significativement dans la fraction annexine V- ($19,4\% \pm 1,69\%$) et augmente significativement dans la fraction de l'annexine V+ ($64,96\% \pm 12,99\%$). Une différence significative entre les deux fractions annexine V- et V+ est également observée.

Tableau 20 : Taux de spermatozoïdes avec EPS à chaque étape du tri par MACS chez les hommes ayant un taux anormal de fragmentation de l'ADN spermatique

Patient	Décongélation (%)	Fraction annexine V- (%)	Fraction annexine V+ (%)	Comparaison entre fraction annexine V- et V+
P1	29	20*	68*	ψ
P2	41	17,8*	86,1*	ψ
P3	21	17	NR	-
P4	47,8	21,6*	61*	ψ
P5	33,6	19,8*	55,2*	ψ
P6	44,4	20,2*	54,54*	ψ
<i>Moyenne ± SD</i>	$36,13 \pm 10,14$	$19,4 \pm 1,69^*$	$64,96 \pm 12,99^*$	ψ

*comparaison par rapport à la décongélation $p < 0,05$ ψ comparaison entre fraction annexine V- et V+ $p < 0,05$, NR : Non réalisé (problème technique)

c. Evaluation du taux de fragmentation de l'ADN spermatique

Les taux de fragmentation de l'ADN spermatique à chaque étape du tri sont résumés dans le Tableau 21.

Par rapport à la décongélation, nous avons observé une augmentation significative du taux de fragmentation de l'ADN après incubation avec les microbilles et le BB 1X (3/6 patients). Après séparation sur colonne, une tendance de diminution du taux de fragmentation de l'ADN dans la fraction annexine V- chez la majorité des patients et une augmentation significative de ce taux dans la fraction annexine V+ (3/6 patients) sont identifiées. Nous avons observé également une différence significative entre les deux fractions annexine V- et annexine V+ (6/6 patients).

Concernant la moyenne de fragmentation de l'ADN spermatique, le taux de fragmentation après décongélation est de $24,8\% \pm 5,56\%$. Après incubation avec les microbilles et le BB 1X, il est significativement plus élevé $30,67\% \pm 7,83\%$.

Après le passage dans la colonne, le taux de fragmentation de la fraction annexine V- passe en moyenne à $27,43\% \pm 7,83\%$. Ce taux augmente significativement dans la fraction annexine V+ et passe à $44,1\% \pm 11,31\%$.

Tableau 21 : Taux de fragmentation de l'ADN spermatique à chaque étape du tri par MACS chez les hommes ayant un taux anormal de fragmentation de l'ADN spermatique

Patient	Décongélation (%)	Incubation (%)	Fraction annexine V- (%)	Fraction annexine V+ (%)	Comparaison entre fraction annexine V- et V+
P1	31	29	32	46 ^α	ψ
P2	17,3	22,6*	18	57,6 ^α	ψ
P3	25,5	35*	33	53 ^α	ψ
P4	29	43,8*	37,8	46,4	ψ
P5	27,2	29,83	27,8	33,6	ψ
P6	18,8	23,8	16 ^α	28	ψ
Moyenne ± SD	24,8 ± 5,56	30,67 ± 7,83*	27,43 ± 7,83	44,1 ± 11,31 ^α	ψ

*comparaison par rapport à la décongélation $p < 0,05$, α comparaison par rapport à l'incubation $p < 0,05$, ψ comparaison entre fraction annexine V- et V+ $p < 0,05$.

d. Evaluation de l'équipement chromosomique des spermatozoïdes

Les résultats obtenus suite à l'analyse par FISH des chromosomes X, Y, 18 et 13, 21 sont résumés dans les Tableaux 22, 23 et 24.

Les résultats concernant la FISH X, Y et 18 sont présentés dans le tableau 22 :

La moyenne du taux de spermatozoïdes normaux après décongélation est de $97,08\% \pm 0,99\%$, alors qu'elle est de $97,49\% \pm 1,14\%$ dans la fraction annexine V-. Cette moyenne est de $95,77\% \pm 1,36\%$ dans la fraction annexine V+. Aucune différence significative n'a été notée entre avant et après tri par MACS. Cependant, nous avons observé une différence significative entre les deux fractions annexine V- et annexine V+, avec une majorité de spermatozoïdes normaux dans la fraction annexine V- et de spermatozoïdes déséquilibrés dans la fraction annexine V+.

Tableau 22 : Taux de spermatozoïdes normaux pour les chromosomes X, Y et 18 à chaque étape du tri par MACS chez les hommes ayant un taux anormal de fragmentation de l'ADN spermatique

Patient	Décongélation (%)	Fraction annexine V- (%)	Fraction annexine V+ (%)	Comparaison entre fraction annexine V- et V+
P1	97,2	98,03	96,5	ψ
P2	98,7	99,01	97,2*	ψ
P3	96,1	95,59	93,7*	NS
P4	96,2	97,23	94,9	ψ
P5	96,6	97,14	95,3	ψ
P6	97,7	97,92	97	NS
Moyenne ± SD	97,08 ± 0,99	97,49 ± 1,14	95,77 ± 1,36	ψ

*comparaison par rapport à la décongélation $p < 0,05$

ψ comparaison entre fraction annexine V- et V+ $p < 0,05$ et NS : non significative.

Les résultats concernant la FISH 13 et 21 sont présentés dans le Tableau 23.

La moyenne du taux de spermatozoïdes normaux après décongélation est de $96,95\% \pm 1,91\%$. Après passage par colonne et par rapport à la décongélation, il y avait une augmentation significative de la moyenne du taux de spermatozoïdes normaux dans la fraction annexine V- ($98,37\% \pm 0,88\%$). En revanche, nous n'avons observé aucune différence significative dans la fraction annexine V+ ($96,07\% \pm 1,95\%$). Cependant, nous avons observé une différence significative entre les deux fractions annexine V- et annexine V+, avec une majorité de spermatozoïdes normaux dans la fraction annexine V- et de spermatozoïdes déséquilibrés dans la fraction annexine V+.

Tableau 23 : Taux de spermatozoïdes normaux pour les chromosomes 13 et 21 à chaque étape du tri par MACS chez les hommes ayant un taux anormal de fragmentation de l'ADN spermatique

Patient	Décongélation (%)	Fraction annexine V- (%)	Fraction annexine V+ (%)	Comparaison entre fraction annexine V- et V+
P1	97,8	98,72	96,5	ψ
P2	97,9	98,9	98,2	NS
P3	97,7	98,72	97,3	ψ
P4	95,5	97,91*	93,6	ψ
P5	93,8	96,81*	93,7	ψ
P6	99	99,21	97,1*	ψ
<i>Moyenne ± SD</i>	$96,95 \pm 1,91$	$98,37 \pm 0,88^*$	$96,07 \pm 1,95$	ψ

*comparaison par rapport à la décongélation $p < 0,05$

ψ comparaison entre fraction annexine V- et V+ $p < 0,05$ et NS : non significative.

Les résultats concernant les fréquences des disomies et de diploïdie sont présentés dans le Tableau 24.

Les données de tous les patients ont été regroupées par type d'anomalies chromosomiques de nombre. A l'exception de la disomie 13 et de la disomie 21, les fréquences des anomalies chromosomiques de nombre sont significativement plus élevées dans la fraction annexine V+ en comparaison à la décongélation.

Par rapport à la décongélation, il y avait une augmentation significative de la somme des disomies et de la somme des diploïdies dans la fraction annexine V+ ((1,07% vs 1,57%) et (0,58% vs 1,1%) respectivement).

De plus, nous avons observé une différence significative entre les deux fractions annexine V- et annexine V+, avec une majorité de spermatozoïdes normaux dans la fraction annexine V- et de spermatozoïdes déséquilibrés dans la fraction annexine V+ concernant la disomie Y, la disomie XY, la disomie 21, la diploïdie (18, X, Y), la diploïdie (13, 21), la somme des disomies et la somme des diploïdies.

Tableau 24 : Fréquences des différentes anomalies chromosomiques à chaque étape du tri chez les hommes ayant un taux anormal de fragmentation de l'ADN spermatique

Anomalie chromosomique	Décongélation	Fraction annexine V-	Fraction annexine V+	Comparaison entre fraction annexine V- et V+
Disomie 18	9/6216 (0,14%)	13/6144 (0,21%)	20/6317 (0,32%)*	NS
Disomie X	5/6216 (0,08%)	6/6144 (0,09%)	14/6317 (0,22%)*	NS
Disomie Y	3/6216 (0,05%)	2/6144 (0,03%)	17/6317 (0,27%)*	ψ
Disomie XY	41/6216 (0,66%)	46/6144 (0,74%)	69/6317 (1,09%)*	ψ
Disomie 13	29/6115 (0,47%)	13/6092 (0,21%)*	17/5978 (0,28%)	NS
Disomie 21	45/6115 (0,73%)	30/6092 (0,5%)	57/5978 (0,95%)	ψ
Diploïdie (18, X et Y)	33/6216 (0,53%)	26/6144 (0,42%)	56/6317 (0,88%)*	ψ
Diploïdie (13 et 21)	39/6115 (0,64%)	36/6092 (0,6%)	78/5978 (1,3%)*	ψ
Somme des disomies	132/12331 (1,07% ± 5,68%)	110/12236 (0,89% ± 4,56%)	194/12295 (1,57% ± 9,25%)*	ψ
Somme des diploïdies	72/12331 (0,58% ± 11,79%)	62/12236 (0,5% ± 7,43%)	134/12295 (1,1% ± 13%)*	ψ

*comparaison par rapport à la décongélation $p < 0,05$

ψ comparaison entre fraction annexine V- et V+ $p < 0,05$ et NS : non significative.

II. Apport du tri de spermatozoïdes chez les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique constitutionnelle

1. Patients

Quatorze hommes porteurs d'une anomalie chromosomique constitutionnelle ont été inclus dans l'étude. Les caryotypes des patients sont présentés dans les Tableaux 25 et 26.

Nous avons :

- Douze hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure (Tableau 25) :
 - Quatre porteurs d'une translocation robertsonienne (P1 à P4).
 - Huit porteurs d'une translocation réciproque équilibrée (P5 à P12).
- Deux hommes porteurs d'une mosaïque gonosomique (Tableau 26).

Tableau 25 : Caryotype des hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure

Patient	Caryotype
P1	45,XY,rob(13;14)(q10;q10)
P2	45,XY,rob(14;15)(q10;q10)
P3	45,XY,rob(13;14)(q10;q10)
P4	45,XY,rob(13;14)(q10;q10)
P5	46,XY,t(4;12)(q31;q23)
P6	46,XY,t(9;12)(q31;p12)
P7	46,XY,t(1;15)(p22.2;q21.1)
P8	46,XY,t(11;13)(q22.1;q21.2)
P9	46,XY,t(13;19)(q12;q13.3)
P10	46,XY,t(1;22)(p11;p11.2)
P11	46,XY,t(2;9)(p24;p21)
P12	46,XY,t(2;15)(p13;q15)

Tableau 26 : Caryotype des hommes porteurs d'une mosaïque gonosomique

Patient	Caryotype
P1	mos 45,X[20%]/47,XXY[10%]/46,XY[70%]
P2	mos 45,X[67%]/46,XY[33%]

2. Paramètres spermatiques

- **Hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure**

Les paramètres spermatiques de base des échantillons de sperme avant congélation sont résumés dans le Tableau 27. Les concentrations de spermatozoïdes sont comprises entre 1,1 M/ml (P4) et 151 M/ml (P2). Le pourcentage de mobilité totale varie de 20% (P4) à 60% (P9).

Tableau 27 : Paramètres spermatiques chez les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure

Patient	Volume (ml)	Concentration (M/ml)	Mobilité (a+b+c) (%)
P1	3,2	50	55
P2	2,1	151	45
P3	3,2	19,6	35
P4	1,9	1,1	20
P5	3,2	117	41
P6	5,3	50	55
P7	2,8	108	40
P8	4,2	42	35
P9	2,5	49	60
P10	8,1	14,4	35
P11	3,5	15	35
P12	0,75	10,5	35

- **Hommes porteurs d'une mosaïque gonosomique**

Les paramètres spermatiques de base des échantillons de sperme avant congélation sont résumés dans le Tableau 28. La concentration de spermatozoïdes est de 225 M/ml pour P1 et de 53 M/ml pour P2. Le pourcentage de mobilité totale est de 50% pour P1 et de 45% pour P2.

Tableau 28 : Paramètres spermatiques chez les hommes porteurs d'une mosaïque gonosomique

Patient	Volume (ml)	Concentration (M/ml)	Mobilité (a+b+c) (%)
P1	3,5	225	50
P2	6,3	53	45

3. Evaluation de la concentration totale des spermatozoïdes

- **Hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure**

La concentration totale des spermatozoïdes à chaque étape de l'étude est représentée dans le Tableau 29.

Après décongélation des paillettes de sperme, la concentration totale en spermatozoïdes varie de 1,13 M (P4) à 36,9 M (P10) avec une moyenne de $11,36 \text{ M} \pm 9,37 \text{ M}$.

Après incubation avec les microbilles et le BB, la concentration totale est significativement diminuée et passe à une moyenne de $10,7 \text{ M} \pm 9,1 \text{ M}$.

De même, le nombre de spermatozoïdes est significativement diminué après le tri dans les fractions annexine V- + annexine V+ ($8,15 \text{ M} \pm 8,14 \text{ M}$) par rapport au nombre de spermatozoïdes après incubation ($10,7 \text{ M} \pm 9,1 \text{ M}$).

Tableau 29 : Concentration en spermatozoïdes à chaque étape du tri par MACS chez les porteurs d'une anomalie chromosomique de structure

Patient	Décongélation (M)	Incubation (M)	Fraction annexine V- (M)	Fraction annexine V+ (M)
P1	6,55	5,55	1,16	2,73
P2	17,92	17	5,05	4,95
P3	4,62	4,27	1,29	1,9
P4	1,13	0,98	0,06	0,31
P5	12	11,3	6,68	3,43
P6	9,81	9,10	1,16	3,99
P7	12,9	12,2	5,26	1,98
P8	11,21	10,2	2,4	5,36
P9	17,47	16,57	4,99	10
P10	36,9	36	21,9	8,5
P11	4	3,6	1	2,1
P12	1,92	1,72	0,82	0,90
<i>Moyenne ± SD</i>	$11,36 \pm 9,37$	$10,7 \pm 9,1^*$	$4,31 \pm 5,7$	$3,84 \pm 2,82$

Fractions annexine V- + annexine V+ = $8,15 \text{ M} \pm 8,14 \text{ M}$ ψ

*comparaison par rapport à la décongélation $p < 0,05$

ψ comparaison par rapport à l'incubation $p < 0,05$

- **Hommes porteurs d'une mosaïque gonosomique**

Après décongélation des paillettes de sperme, la moyenne de concentration totale en spermatozoïdes est de 19,95 M. Elle est légèrement diminuée après l'incubation avec les microbilles 18,85 M et après le tri (annexine V- et annexine V+) 18,75 M (Figure 49).

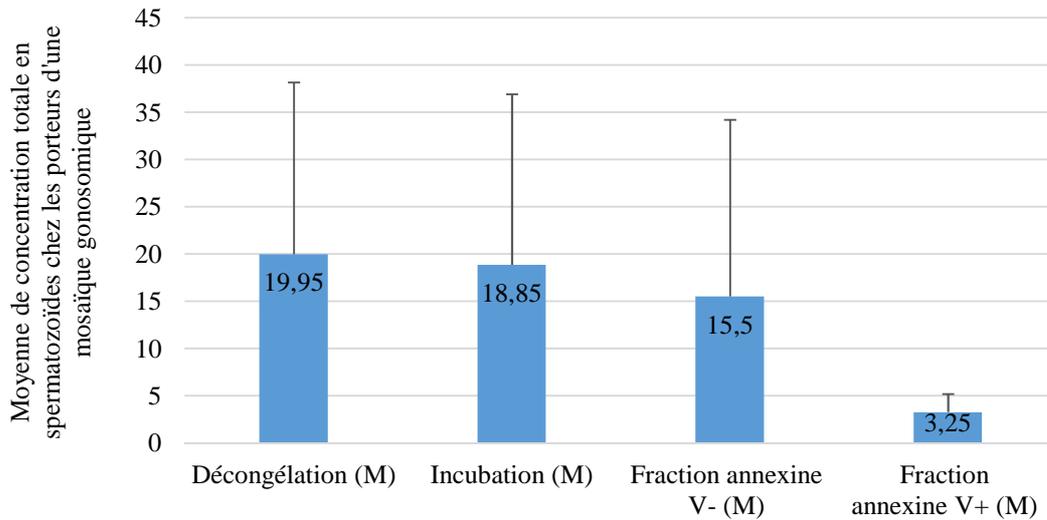


Figure 49 : Moyenne de concentration en spermatozoïdes à chaque étape du tri par MACS chez les porteurs d'une mosaïque gonosomique

4. Evaluation du taux de spermatozoïdes avec EPS

- **Hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure**

Les taux de spermatozoïdes avec EPS avant tri et après tri dans la fraction annexine V- et annexine V+ sont résumés dans le Tableau 30.

Pour tous les patients, le taux de spermatozoïdes avec EPS est significativement plus faible dans la fraction annexine V- ($28,06\% \pm 8,11\%$) et plus élevé dans la fraction annexine V+ ($78,94\% \pm 9,27\%$) par rapport à la décongélation ($58,35\% \pm 8,86\%$).

Tableau 30 : Taux de spermatozoïdes avec EPS à chaque étape du tri par MACS chez les porteurs d'une anomalie chromosomique de structure

Patient	Décongélation (%)	Fraction annexine V- (%)	Fraction annexine V+ (%)
P1	57,4	19,6*	84,2*
P2	56,0	32,6*	83,6*
P3	54,6	33,2*	71,4*
P4	50,2	14,2*	82,7*
P5	38,0	14,2*	85,6*
P6	72,8	36*	88*
P7	67,2	35,4*	83,4*
P8	58,0	30,6*	69,8*
P9	63,2	28,4*	84,8*
P10	64,8	37,6*	86,2*
P11	61,2	29,2*	68,8*
P12	56,8	25,8*	58,8*
Moyenne \pm SD	58,35 \pm 8,86	28,06 \pm 8,11*	78,94 \pm 9,27*

*diminution significative du taux de spermatozoïdes avec EPS dans la fraction annexine V- et annexine V+ par rapport à la décongélation ($p < 0,05$)

- **Hommes porteurs d'une mosaïque gonosomique**

Les taux de spermatozoïdes avec EPS avant tri et après tri dans la fraction d'annexine V- et annexine V+ sont résumés dans le Tableau 31.

Pour les deux patients, le taux de spermatozoïdes avec EPS est significativement plus faible dans la fraction annexine V- (25,9% \pm 11,17%) et plus élevé dans la fraction annexine V+ (78,6% \pm 7,07%) par rapport à la décongélation (50,7% \pm 3,81%).

Tableau 31 : Taux de spermatozoïdes avec EPS à chaque étape du tri par MACS chez les porteurs d'une anomalie chromosomique gonosomique

Patient	Décongélation (%)	Fraction annexine V- (%)	Fraction annexine V+ (%)
P1	48	18*	83,6*
P2	53,4	33,8*	73,6*
Moyenne \pm SD	50,7 \pm 3,81	25,9 \pm 11,17*	78,6 \pm 7,07*

*diminution significative du taux de spermatozoïdes avec EPS dans la fraction annexine V- et annexine V+ par rapport à la décongélation ($p < 0,05$)

5. Evaluation du taux de fragmentation de l'ADN spermatique

- **Hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure**

Les taux de fragmentation d'ADN à chaque étape de l'étude pour chaque patient sont résumés dans le Tableau 32.

Pour les 12 hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure, le taux de fragmentation d'ADN après décongélation varie entre 7,2% (P2) et 43,2% (P4).

Par rapport à la décongélation, nous avons observé une augmentation significative du taux de fragmentation de l'ADN après incubation avec les microbilles et le BB 1X (6/12 patients). Après séparation sur colonne, le taux de fragmentation de l'ADN diminue significativement dans la fraction annexine V- (11/12 patients). A l'inverse, il augmente significativement dans la fraction annexine V+ (7/12 patients). Nous avons observé également une différence significative entre les deux fractions annexine V- et annexine V+ (11/12 patients).

Tableau 32 : Taux de fragmentation de l'ADN à chaque étape du tri par MACS chez les porteurs d'une anomalie chromosomique de structure

Patient	Décongélation (%)	Incubation (%)	Fraction annexine V- (%)	Fraction annexine V+ (%)	Comparaison entre fraction annexine V- et V+
P1	15	23*	9,2 ^α	28	ψ
P2	7,2	21,8*	7,4 ^α	31,2 ^α	ψ
P3	18,8	20,6	14 ^α	34,8 ^α	ψ
P4	43,2	43	28,4 ^α	48,2	ψ
P5	16,2	23,4*	16,2 ^α	36,2 ^α	ψ
P6	18,4	37*	18,6 ^α	25,4 ^α	ψ
P7	20,6	23,8	20	23,4	NS
P8	18,2	22,8	9,4 ^α	34 ^α	ψ
P9	15	21,2*	10 ^α	24	ψ
P10	14,8	25,4*	13 ^α	37,6 ^α	ψ
P11	14	17,2	9,4 ^α	32,8 ^α	ψ
P12	17,6	21,8	10,6 ^α	33,5 ^α	ψ
<i>Moyenne ± SD</i>	18,25 ± 8,56	25,08 ± 7,36*	13,85 ± 6,07 ^α	32,42 ± 6,88 ^α	ψ

*comparaison par rapport à la décongélation $p < 0,05$, ^α comparaison par rapport à l'incubation $p < 0,05$, ψ comparaison entre fraction annexine V- et V+ $p < 0,05$ et NS : non significative.

Concernant la moyenne de la fragmentation de l'ADN spermatique, le taux de fragmentation après décongélation est de 18,25% ± 8,56%. Après l'incubation avec les microbilles, il est significativement plus élevé 25,08% ± 7,36%.

Après tri, le taux de fragmentation dans la fraction annexine V- diminue significativement et passe en moyenne à $13,85\% \pm 6,07\%$. Ce taux augmente significativement dans la fraction annexine V+ et passe à $32,42\% \pm 6,88\%$.

- **Hommes porteurs d'une mosaïque gonosomique**

Les taux de fragmentation d'ADN à chaque étape de l'étude pour chaque patient sont résumés dans le Tableau 33.

Concernant P1, après décongélation, le taux de fragmentation d'ADN est de 6,2%. Après incubation avec les microbilles et le BB, il passe à 8,8%. Après tri par MACS et par rapport à l'incubation, aucune différence significative du taux de fragmentation d'ADN n'a été identifiée dans la fraction annexine V- (11,6%), tandis qu'une augmentation significative de ce taux dans la fraction annexine V+ a été observée (30,8%). Nous avons remarqué une différence significative entre les deux fractions annexine V- et annexine V+.

Concernant P2, après décongélation, le taux de fragmentation est de 14,2%. Après incubation avec les microbilles et le BB, ce taux augmente significativement et passe à 20,4%. Après tri par MACS, nous n'avons pas observé de différence significative du taux de fragmentation d'ADN dans la fraction annexine V- (16,8%) et dans la fraction annexine V+ (17%) par rapport à l'incubation.

Tableau 33 : Taux de fragmentation de l'ADN à chaque étape du tri par MACS chez les porteurs d'une mosaïque gonosomique

Patient	Décongélation (%)	Incubation (%)	Fraction annexine V- (%)	Fraction annexine V+ (%)	Comparaison entre fraction annexine V- et V+
P1	6,2	8,8	11,6	30,8 ^α	ψ
P2	14,2	20,4*	16,8	17	NS
<i>Moyenne ± SD</i>	$10,2 \pm 4$	$14,6 \pm 5,8^*$	$14,2 \pm 2,6$	$23,9 \pm 6,9^α$	ψ

*comparaison par rapport à la décongélation $p < 0,05$, α comparaison par rapport à l'incubation $p < 0,05$, ψ comparaison entre fraction annexine V- et V+ $p < 0,05$ et NS : non significative.

6. Evaluation de l'équipement chromosomique des spermatozoïdes

- **Hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure**

Les résultats obtenus suite à l'analyse par FISH sont résumés dans le Tableau 34.

Le taux de spermatozoïdes normaux ou équilibrés, produits par le mode de ségrégation alterne, après décongélation varie de 41,47% (P4) à 83,37% (P2) pour les patients porteurs d'une translocation robertsonienne et de 36,39% (P11) à 48,36% (P6) pour les patients porteurs une translocation réciproque équilibrée.

Par rapport à la décongélation, après passage par colonne, il y avait une augmentation significative du taux de spermatozoïdes normaux ou équilibrés dans la fraction annexine V- pour tous les patients. A l'inverse, nous avons observé une diminution significative de ce taux dans la fraction annexine V+ pour P1, P4, P5, P7, P8, P9, P10 et P11.

Pour tous les patients, nous avons observé une différence significative entre les deux fractions annexine V- et annexine V+ avec une majorité de spermatozoïdes normaux ou équilibrés dans la première et une majorité de spermatozoïdes déséquilibrés dans la seconde.

Intéressons-nous maintenant plus spécifiquement aux populations de spermatozoïdes déséquilibrés. Pour les patients porteurs d'une translocation robertsonienne, le mode de ségrégation majoritaire donnant des spermatozoïdes déséquilibrés est le mode adjacent. Après décongélation, le taux de spermatozoïdes déséquilibrés produits par ce mode de ségrégation varie de 14,4% (P2) à 29,69% (P4).

Pour les patients porteurs d'une translocation réciproque équilibrée, le mode de ségrégation majoritaire donnant des spermatozoïdes déséquilibrés est le mode adjacent I pour P5, P7, P8, P10 et P11, ou le mode 3:1 pour P6, P9 et P12.

Après MACS, la majorité des proportions de spermatozoïdes déséquilibrés issus de chacun de ces différents modes de ségrégation diminue significativement dans la fraction annexine V-, et augmente significativement dans la fraction annexine V+.

Tableau 34 : Données des ségrégations méiotiques par FISH chez les porteurs d'une anomalie chromosomique de structure

	Mode de ségrégation méiotique	Décongélation	Fraction annexine V- (%)	Fraction annexine V+ (%)	Comparaison entre fraction annexine V- et V+
P1	Alterne (%)	79,99	88,03*	75*	ψ
	Adjacent (%)	18,82	11,14*	21,77*	ψ
	3:0 (%)	0,47	0,43	1,87*	ψ
	Diploïde (%)	0,47	0,2*	1,1*	ψ
	Autres (%)	0,24	0,2	0,26	NS
<i>Nombre de spermatozoïdes analysés</i>		2534	2531	2728	
P2	Alterne (%)	83,37	90,2*	82,43	ψ
	Adjacent (%)	14,4	8,5*	14,23*	NS
	3:0 (%)	0,2	0,1	0,15	NS
	Diploïde (%)	1,29	1,05	2,1*	ψ
	Autres (%)	0,74	0,15*	1,1	ψ
<i>Nombre de spermatozoïdes analysés</i>		2021	2002	2003	
P3	Alterne (%)	78,06	88,64*	80,93*	ψ
	Adjacent (%)	19,55	10,72*	16,72*	ψ
	3:0 (%)	0,4	0,4	0,83	NS
	Diploïde (%)	1,74	0,1*	1,03	ψ
	Autres (%)	0,25	0,15	0,49	NS
<i>Nombre de spermatozoïdes analysés</i>		2010	2024	2045	
P4	Alterne (%)	41,47	71,96*	35,56*	ψ
	Adjacent (%)	29,69	10,18*	31,1	ψ
	3:0 (%)	21,56	15,36*	25,89*	ψ
	Diploïde (%)	1,85	1,21	1,67	NS
	Autres (%)	5,44	1,29*	5,76*	ψ
<i>Nombre de spermatozoïdes analysés</i>		2004	1159	2151	

P5	Alterne (%)	44,27	62,77*	31,63*	ψ
	Adjacent I (%)	36,43	27,58*	51,99	ψ
	Adjacent II (%)	8,64	4,77*	7,19	ψ
	3:1 (%)	7,5	3,66*	6,81*	ψ
	Diploïde ou 4:0 (%)	0,91	0,59	2,16*	ψ
	Autres (%)	2,25	0,63*	0,21*	ψ
	<i>Nombre de spermatozoïdes analysés</i>	2627	2705	2864	
P6	Alterne (%)	48,36	66,16*	50,77	ψ
	Adjacent I (%)	0,15	0,04	0,16	NS
	Adjacent II (%)	0,18	0,19	0,2	NS
	3:1 (%)	50,83	33,38*	48,64*	ψ
	Diploïde ou 4:0 (%)	0,07	0,19	0,24	NS
	Autres (%)	0,41	0,04*	0*	NS
	<i>Nombre de spermatozoïdes analysés</i>	2707	2651	2531	
P7	Alterne (%)	37,75	54,76*	27,63*	ψ
	Adjacent I (%)	32,49	30,13	36,21	ψ
	Adjacent II (%)	16,12	10,06*	22,15*	ψ
	3:1 (%)	12,75	4,76*	12,64*	ψ
	Diploïde ou 4:0 (%)	0,79	0,19 *	1,08	ψ
	Autres (%)	0,1	0,1	0,29	NS
	<i>Nombre de spermatozoïdes analysés</i>	2016	2078	2041	
P8	Alterne (%)	43,13	60,54*	33,07*	ψ
	Adjacent I (%)	35,63	31,84*	43,6*	ψ
	Adjacent II (%)	7,35	3,47*	6,95	ψ
	3:1 (%)	12,04	3,47*	14,44*	ψ
	Diploïde ou 4:0 (%)	1,45	0,53*	1,52	ψ
	Autres (%)	0,4	0,14	0,41	NS
	<i>Nombre de spermatozoïdes analysés</i>	2001	2073	2431	

P9	Alterne (%)	37,24	59,84*	30,17*	ψ
	Adjacent I (%)	1,12	0,1*	0,35*	NS
	Adjacent II (%)	5,2	2,42*	9,76*	ψ
	3:1 (%)	54,01	35,77*	54,61	ψ
	Diploïde ou 4:0 (%)	2,14	1,58*	3,37*	ψ
	Autres (%)	0,29	0,3	1,73*	ψ
<i>Nombre de spermatozoïdes analysés</i>		2057	2027	2254	
P10	Alterne (%)	44,07	58,02*	39,21*	ψ
	Adjacent I (%)	20,1	18,42	17,31*	NS
	Adjacent II (%)	19,66	16,93*	24,67*	ψ
	3:1 (%)	14,9	6,19*	17,18*	ψ
	Diploïde ou 4:0 (%)	0,49	0,35	1,19*	ψ
	Autres (%)	0,78	0,1*	0,44	ψ
<i>Nombre de spermatozoïdes analysés</i>		2040	2020	2270	
P11	Alterne (%)	36,39	53,78*	31,65*	ψ
	Adjacent I (%)	31,51	26,41*	32,28	ψ
	Adjacent II (%)	21,01	15,44*	24,33*	ψ
	3:1 (%)	9,86	4,04*	10,86	ψ
	Diploïde ou 4:0 (%)	0,5	0,05*	0,39	ψ
	Autres (%)	0,75	0,28*	0,48	NS
<i>Nombre de spermatozoïdes analysés</i>		2009	2105	2063	
P12	Alterne (%)	42,85	58,82*	40,95	ψ
	Adjacent I (%)	0,00	0,00	0,15	-
	Adjacent II (%)	12,6	6,99*	15,96*	ψ
	3:1 (%)	42,85	33,55*	41,20	ψ
	Diploïde ou 4:0 (%)	1,11	0,37*	1,35	ψ
	Autres (%)	0,58	0,28	0,4	NS
<i>Nombre de spermatozoïdes analysés</i>		2063	2176	2005	

*comparaison par rapport à la décongélation $p < 0,05$, ψ comparaison entre fraction annexine V- et V+ $p < 0,05$ et NS : non significative.

- **Hommes porteurs d'une mosaïque gonosomique**

Les résultats obtenus suite à l'analyse par FISH des chromosomes X, Y, 18 et 13, 21 sont représentés dans les Tableaux 35, 36 et 37.

FISH à trois couleurs des chromosomes X, Y et 18 (Tableau 35) :

La moyenne du taux de spermatozoïdes normaux après décongélation est de $98,95\% \pm 0,07\%$. Après passage par colonne et par rapport à la décongélation, nous n'avons observé aucune différence significative du taux de spermatozoïdes normaux dans la fraction annexine V- ($98,89\% \pm 0,19\%$). En revanche, nous avons observé une diminution significative du taux de spermatozoïdes normaux dans la fraction annexine V+ ($98,2\% \pm 0,28\%$). Cependant, nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les deux fractions annexine V- et annexine V+.

Tableau 35 : Taux de spermatozoïdes normaux pour les chromosomes X, Y et 18 à chaque étape du tri par MACS chez les hommes porteurs d'une mosaïque gonosomique

Patient	Décongélation (%)	Fraction annexine V- (%)	Fraction annexine V+ (%)	Comparaison entre fraction annexine V- et V+
P1	99	99,03	98,4	NS
P2	98,9	98,76	98*	ψ
<i>Moyenne ± SD</i>	$98,95 \pm 0,07$	$98,89 \pm 0,19$	$98,2 \pm 0,28^*$	NS

*comparaison par rapport à la décongélation $p < 0,05$, ψ comparaison entre fraction annexine V- et V+ $p < 0,05$ et NS : non significative.

FISH à deux couleurs des chromosomes 13 et 21 (Tableau 36) :

La moyenne du taux de spermatozoïdes normaux après décongélation est de $97,8\% \pm 0,8\%$. Dans la fraction annexine V- elle est de $97,61\% \pm 0,21\%$ alors que dans la fraction annexine V+, elle est de $97,45\% \pm 1,06\%$. Aucune différence significative n'a été notée avant et après le tri par MACS et entre les deux fractions annexine V- et annexine V+.

Tableau 36 : Taux de spermatozoïdes normaux pour les chromosomes 13 et 21 à chaque étape du tri par MACS chez les hommes porteurs mosaïque gonosomique

Patient	Décongélation (%)	Fraction annexine V- (%)	Fraction annexine V+ (%)	Comparaison entre fraction annexine V- et V+
P1	97,2	97,46	96,7	NS
P2	98,4	97,76	98,2	ψ
<i>Moyenne ± SD</i>	$97,8 \pm 0,8$	$97,61 \pm 0,21$	$97,45 \pm 1,06$	NS

*comparaison par rapport à la décongélation $p < 0,05$, ψ comparaison entre fraction annexine V- et V+ $p < 0,05$ et NS : non significative.

Fréquences de disomies et de diploïdie (Tableau 37) :

Les fréquences de disomies et diploïdie des deux patients ont été regroupées. Nous avons observé une diminution significative de disomie XY et de disomie 13 dans la fraction annexine V- et une augmentation significative de disomie 18, de disomie 21, de diploïdie (18, X, Y) et de la somme des disomies dans la fraction annexine V+ par rapport à la décongélation.

Nous avons observé également une augmentation significative de disomie 21 dans la fraction annexine V- et une diminution significative de disomie 13 dans la fraction annexine V+ par rapport à la décongélation.

De plus, nous avons observé une différence significative entre les deux fractions annexine V- et annexine V+, avec une majorité de spermatozoïdes normaux dans la première et de spermatozoïdes déséquilibrés dans la seconde concernant la disomie 18, la disomie Y, la diploïdie (18, X, Y) et la somme des disomies.

Tableau 37 : Fréquences des disomies et de diploïdies à chaque étape du tri par MACS chez les hommes porteurs d'une mosaïque gonosomique

Anomalie chromosomique	Décongélation	Fraction annexine V-	Fraction annexine V+	Comparaison entre fraction annexine V- et V+
Disomie 18	3/4027 (0,07%)	4/4079 (0,09%)	12/4089 (0,29%)*	ψ
Disomie X	2/4027 (0,05%)	2/4079 (0,05%)	4/4089 (0,1%)	NS
Disomie Y	1/4027 (0,02%)	0/4079 (0)	3/4089 (0,07%)	ψ
Disomie XY	7/4027 (0,17%)	1/4079 (0,02%)*	5/4089 (0,12%)	NS
Disomie 13	20/4045 (0,5%)	5/4064 (0,12%)*	9/4025 (0,22%)*	NS
Disomie 21	4/4045 (0,1%)	20/4064 (0,5%)*	31/4025 (0,77%)*	NS
Diploïdie (18, X et Y)	8/4027 (0,19%)	7/4079 (0,17%)	23/4089 (0,56%)*	ψ
Diploïdie (13 et 21)	33/4045 (0,81%)	31/4064 (0,76%)	30/4025 (0,74%)	NS
Somme des disomies	37/8072 (0,45%)	32/8143 (0,39%)	64/8114 (0,78%)*	ψ
Somme des diploïdies	41/8072 (0,5%)	38/8143 (0,46%)	53/8114 (0,65%)	NS

*comparaison par rapport à la décongélation $p < 0,05$, ψ comparaison entre fraction annexine V- et V+ $p < 0,05$ et NS : non significative.

C. Expression différentielle des gènes des spermatozoïdes : mise au point de technique d'étude du transcriptome

I. Purification des spermatozoïdes

1. Swim-up

Le swim-up permet de récupérer une population de spermatozoïdes sans contamination par des cellules somatiques. Toutefois, le taux moyen de récupération des spermatozoïdes était très faible (9,6%) car cette technique sélectionnait les gamètes les plus mobiles.

2. Lyse des cellules somatiques

Le taux moyen de récupération des spermatozoïdes après lyse des cellules somatiques était de 49,1% pour le sperme frais et 78% pour le sperme congelé. Néanmoins, la solution de lyse ne permettait pas d'éliminer la totalité des cellules somatiques.

3. Gradient de densité

Le taux moyen de récupération des spermatozoïdes par gradient de densité était de 73,4% pour le sperme frais et 89% pour le sperme congelé. Néanmoins, le gradient de densité ne permettait pas d'éliminer la totalité des cellules somatiques.

4. Association entre le gradient de densité et la lyse des cellules somatiques

Le taux moyen de récupération des spermatozoïdes suite à l'association des deux techniques de purification était de 65,2% pour le sperme frais et 73,2% pour le sperme congelé. La combinaison des deux méthodes de purification permettait d'éliminer 99,2% des cellules somatiques pour le sperme frais et 97,4% des cellules somatiques pour le sperme congelé. La purification n'exclut pas complètement les cellules somatiques à cause de la quantité initiale importante de cellules rondes dans le sperme. En effet, les échantillons de sperme présentant initialement plus de 3 millions de cellules somatiques n'ont pas pu être totalement purifiés. Par contre, lorsque les échantillons (frais ou congelés) présentaient moins de 3 millions de cellules somatiques, une élimination en totalité des cellules somatiques est observée.

II. Extraction d'ARN spermatique

Nous avons testé les deux kits (kit RNeasy plus Mini et kit NucleoSpin RNA XS) sur des spermatozoïdes purifiés à partir d'éjaculats frais et cryopréservés de dix hommes. Les deux kits ont été testés sur les mêmes échantillons. Le rendement de récupération d'ARN était similaire dans les éjaculats frais et cryopréservés avec le kit NucleoSpin RNA XS (47,8 ng *versus* 43,2 ng/10⁶ spermatozoïdes respectivement), et beaucoup plus élevé qu'avec le kit RNeasy plus Mini (23,4 ng *versus* 4,32 ng/10⁶ spermatozoïdes respectivement).

III. Evaluation de la pureté

1. RT-PCR

Nous avons vérifié l'absence d'ARN somatique par RT-PCR pour CD45, E-Cadhérine et C-KIT. La Figure 50 montre les résultats obtenus pour des échantillons traités par une combinaison de gradient de densité et de lyse de cellules somatiques. Aucune cellule somatique n'a été identifiée lors de l'examen microscopique pour ces échantillons.

L'absence d'ARN somatique a été confirmée pour les deux premiers échantillons. De plus, ils présentaient une bande à 149 pb correspondant à la protamine 2. Pour le troisième échantillon une contamination par l'ARN des leucocytes (une bande à 847 pb correspondant à CD45) a été observée.

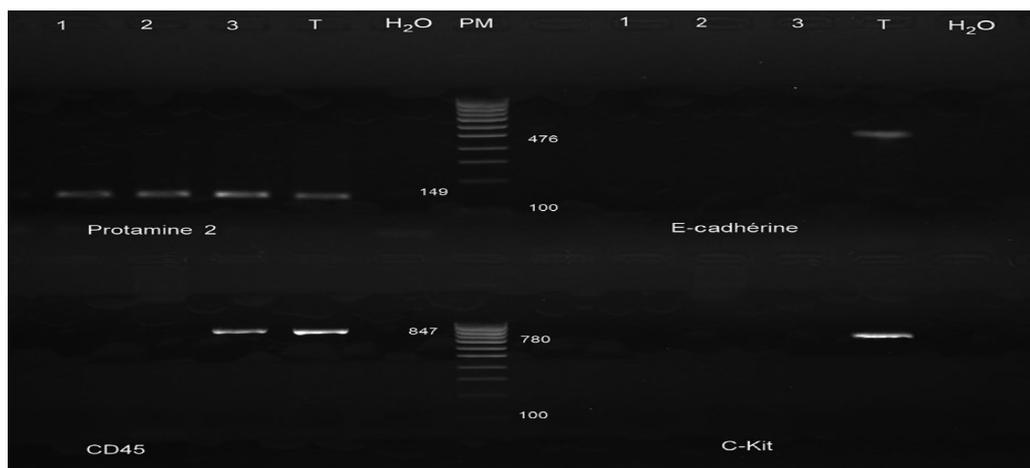


Figure 50 : Exemples de RT-PCR pour PRM2, CD45, CDH1 et KIT obtenus dans plusieurs échantillons
L'échantillon T est un contrôle positif (échantillon total de sperme) et l'échantillon H₂O est un contrôle négatif

2. Bioanalyseur

Nous avons testé la pureté de l'ARN du sperme avec le Bioanalyseur 2100 Agilent. La persistance de l'ARNr 18S et 28S était toujours indiquée pour les échantillons de sperme traités par lyse de cellules somatiques ou par gradient de densité (Figure 51 a). En fait, l'examen microscopique identifiait encore des cellules dans ces échantillons. La Figure 51 b et 51 c montre les résultats obtenus par le Bioanalyseur pour des échantillons traités avec une combinaison entre le gradient de densité et la solution de lyse. Bien qu'aucune cellule somatique n'ait été identifiée après un examen microscopique, un échantillon a encore montré une contamination par l'ARNr (Figure 51 b), mais pas l'autre échantillon (Figure 51 c).

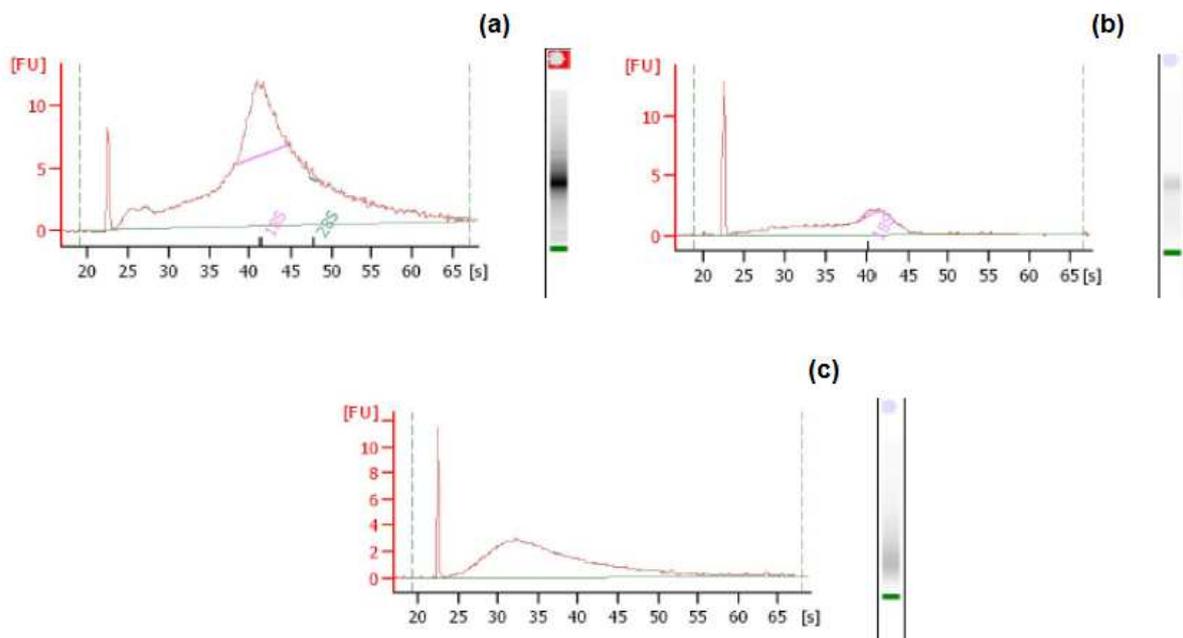


Figure 51 : Exemples de profils obtenus avec le Bioanalyseur 2100

(a) Echantillon obtenu après lyse seule montrant la persistance de l'ARNr 18S et 28S. (b) Echantillon obtenu après combinaison entre le gradient et la solution de lyse montrant la persistance de l'ARNr 18S. (c) Echantillon obtenu après combinaison entre le gradient et la solution de lyse montrant l'absence de l'ARNr.

La pureté de l'ARN de sperme a été testée en utilisant les deux approches, Bioanalyseur et RT-PCR, sur 11 échantillons. Une concordance parfaite a été trouvée entre les deux techniques. Les échantillons présentant des pics d'ARNr 18S et / ou 28S étaient positifs pour un ou plusieurs marqueurs de cellules somatiques.

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 Bioanalyseur 2100, est suffisante pour une évaluation fiable de la pureté des ARN spermatiques.

IV. Hybridation et lecture

La présence de 27 784 transcrits a été détectée. Parmi les 1 000 transcrits de spermatozoïdes les plus présents (Sendler, Johnson et al. 2013), nous avons identifié 900 transcrits. Ces gènes sont impliqués dans plusieurs processus biologiques, notamment la spermatogenèse, la régulation de la transcription, la croissance cellulaire et la différenciation, la mobilité et la capacitation des spermatozoïdes, la fécondation et l'embryogenèse (Tableau 38).

Tableau 38 : Gènes identifiés dans les spermatozoïdes et impliqués à différents stades de la spermatogenèse, de la fécondation et du développement embryonnaire

Gène	Nom du gène	Fonction
Pré-méiotique		
<i>DAZ1</i>	Deleted in azoospermia 1 [NM_004081]	Formation et différenciation des cellules germinales
<i>DAZ2</i>	Deleted in azoospermia 2 [NM_001005786]	
<i>DAZL</i>	Deleted in azoospermia-like [NM_001351]	
<i>IDE</i>	Insulin-degrading enzyme [NM_004969]	Co-régulateur du récepteur d'androgène
<i>RFX2</i>	Regulatory factor X, 2 (influences HLA class II expression) [NM_000635]	Facteur de transcription
<i>NFYA</i>	Nuclear transcription factor Y, alpha [NM_002505]	
<i>SALL4</i>	Spalt-like transcription factor 4 [NM_020436]	Prolifération de spermatogonies
<i>SPO11</i>	Meiotic protein covalently bound to DSB [NM_012444]	Implication dans la méiose
<i>HSPA2</i>	Heat shock 70kDa protein 2 [NM_021979]	
<i>SPATA33</i>	Spermatogenesis associated 33 [Source:HGNC Symbol;Acc:26463]	
<i>STRA8</i>	Stimulated by retinoic acid 8 [NM_182489]	
Post-méiotique		
<i>PRM1</i>	Protamine 1 [NM_002761]	Remodelage de la chromatine
<i>PRM2</i>	Protamine 2 [NM_001286359]	
<i>TNP1</i>	Transition protein 1 [NM_003284]	
<i>TNP2</i>	Transition protein 2 [NM_005425]	
<i>SPANXA1</i>	Homo sapiens sperm protein associated with the nucleus, X-linked, family member A1 [NM_013453]	Association avec le noyau spermatique
<i>BRWD1</i>	Bromodomain and WD repeat domain containing 1 (BRWD1) [NM_033656]	Différenciation de spermatides
<i>SPATA31A3</i>	Homo sapiens SPATA31 subfamily A, member 3 [NM_001083124]	Impliqué dans la formation de l'acrosome
<i>SPATA31D1</i>	Homo sapiens SPATA31 subfamily D, member 1 [NM_001001670]	
<i>SPATA31D4</i>	Homo sapiens SPATA31 subfamily D, member 4 [NM_001145197]	
<i>SPATA32</i>	Homo sapiens spermatogenesis associated 32 [NM_152343]	
<i>TAF7L</i>	TAF7-like RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 50kDa [NM_024885]	
<i>ZPBP</i>	Zona pellucida binding protein [Source:HGNC Symbol;Acc:15662]	Impliqué dans l'interaction spermatozoïde-ovocyte
<i>KIF3A</i>	PREDICTED: Kinesin family member 3A [XM_006714526]	Structuration du flagelle des spermatozoïdes
<i>ODF1</i>	Outer dense fiber of sperm tails 1 [NM_024410]	
<i>BRD2</i>	Bromodomain containing 2 [NM_005104]	Régulateur de transcription
Fonction des spermatozoïdes		
<i>AKAP4</i>	A kinase (PRKA) anchor protein 4 [NM_003886]	Régulation de la mobilité des spermatozoïdes
<i>CABYR</i>	Calcium binding tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated [NM_012189]	Impliqué dans la capacitation des spermatozoïdes
<i>IQCF1</i>	IQ motif containing F1 [BC034228]	
<i>CLGN</i>	Calmegin [NM_004362]	Régulation de la capacité fécondante des spermatozoïdes
<i>CALR3</i>	Calreticulin 3 [NM_145046]	
<i>LDHC</i>	Lactate dehydrogenase C [NM_002301]	Impliqué dans la mobilité et la capacitation des spermatozoïdes
Différents stades de la fécondation et du développement embryonnaire		
<i>AKAP4</i>	A kinase (PRKA) anchor protein 4 [NM_003886]	Post-fécondation
<i>WNT5A</i>	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A [NM_003392]	Impliqué dans l'embryogenèse

	Clusterin [NM_001831]	
<i>CLU</i>		
<i>FOXG1</i>	Forkhead box G1 [NM_005249]	
<i>WNT4</i>	Wingless-type MMTV integration site family, member 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:12783]	
<i>HSBP1L1</i>	Heat shock factor binding protein 1-like 1 [NM_001136180]	Impliqué dans la croissance embryonnaire
<i>INTS1</i>	Integrator complex subunit 1 [NM_001080453]	
<i>IGF2</i>	Insulin-like growth factor 2 (somatomedin A) [NM_000612]	Facteur de transcription
<i>STAT4</i>	Signal transducer and activator of transcription 4 [NM_003151]	
<i>TDGF1</i>	Teratocarcinoma-derived growth factor 1 [NM_003212]	
<i>NANOG</i>	Nanog homeobox [NM_024865]	
<i>SOX2</i>	SRY (sex determining region Y)-box 2 [NM_003106]	
<i>POU5F1</i>	POU class 5 homeobox 1 [NM_002701]	

Discussion

A. Infertilité du couple et techniques d'aide médicale à la procréation

I. Impact des facteurs maternels et paternels sur les résultats de FIV et d'ICSI

Notre objectif en AMP est de permettre aux couples de réaliser leur projet parental en prenant en compte, comme pour tout traitement médical, l'aspect risque bénéfice. En effet, le but est de mettre en œuvre les techniques les moins lourdes pour les couples et la société tout en assurant des chances de grossesse satisfaisantes avec la plus grande innocuité pour les enfants à naître. Dans cette partie, nous avons tenté d'identifier les impacts des facteurs maternels et paternels sur les résultats de FIV et d'ICSI.

1. Echec de fécondation

Dans notre étude, le taux d'échec de fécondation était de 7,2% et 10,8% respectivement en FIV et en ICSI. Selon la littérature, les taux d'échec de fécondation en FIV varient de 5% à 20% et en ICSI de 1% à 8% (Barlow, Englert et al. 1990, Liu and Baker 2000, Bhattacharya, Hamilton et al. 2001, Mahutte and Arici 2003, Heindryckx, Van der Elst et al. 2005, Taylor, Collins et al. 2007, Combelles, Morozumi et al. 2010, Combelles 2012, Peultier, Freour et al. 2015). L'hétérogénéité de ces taux est liée aux différences de populations recrutées et aux indications, ainsi qu'aux différences de critères d'inclusion et d'exclusion. Nous pouvons constater que nos chiffres sont concordants avec ceux de la littérature.

En fait, la fécondation est un processus qui se déroule en plusieurs étapes successives comprenant la réaction acrosomique, la fixation des spermatozoïdes à la zone pellucide, la fusion des gamètes, l'activation de l'ovocyte, la reprise de la méiose et la formation des pronuclei. Une perturbation de l'une de ces étapes provoque un échec total de fécondation (Asch, Simerly et al. 1995, Gabrielsen, Petersen et al. 1996). D'après la littérature, les étiologies possibles d'échec complet de fécondation sont complexes (Combelles, Morozumi et al. 2010). Elles pourraient être associées à de nombreux facteurs notamment la quantité et la qualité ovocytaire et les paramètres spermatiques (Combelles, Morozumi et al. 2010).

Concernant la FIV, dans notre étude la comparaison entre le groupe échec complet et succès de fécondation ne nous permet pas de mettre en évidence de différences significatives

entre ces deux populations concernant les paramètres étudiés. Ces résultats pourraient être dus au faible nombre de cycles étudiés (14 cycles contre 180 cycles).

D'après la littérature, l'échec de fécondation en FIV est principalement associé aux facteurs masculins (Liu and Baker 2000, Mahutte and Arici 2003). A l'aide d'une coloration par immunofluorescence, Rawe et al, ont identifié que chez environ 55,5% des cas, l'échec de fécondation en FIV est associé à l'absence de pénétration du spermatozoïde dans la zone pellucide (Rawe, Olmedo et al. 2000). La liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide et leur pénétration ont également été évaluées par Liu et al sur des ovocytes non fécondés chez des couples ayant au moins 3 ovocytes traités par FIV (Liu and Baker 2000). Ils ont montré qu'une interaction défectueuse entre le spermatozoïde et la zone pellucide était la principale cause des faibles taux de fécondation en FIV (Liu and Baker 2000). Ce défaut était présent en fréquence élevée chez les hommes présentant une oligozoospermie (< 20 M/ml) et une tératozoospermie sévère (morphologie normale $\leq 5\%$) (Liu, Garrett et al. 2004). Néanmoins, plus récemment d'autres auteurs ont remis en question l'effet de la morphologie spermatique sur l'échec de fécondation en FIV (Keegan, Barton et al. 2007).

Certains auteurs ont étudié rétrospectivement à l'aide de la régression logistique, le pouvoir prédictif de différents paramètres cliniques et biologiques féminins et masculins sur l'échec complet de fécondation en FIV. La comparaison entre les résultats de ces études est limitée du fait notamment des critères d'inclusion/d'exclusion et de la présence ou de l'absence d'ajustement dans le modèle de la régression.

Peultier et al ont comparé le bilan d'infertilité et les paramètres de cycles de FIV, entre 53 cycles avec échec de fécondation et 434 cycles avec succès de fécondation. Ils ont noté des valeurs inférieures du nombre de follicules antraux ($p < 0,05$), d'ovocytes inséminés ($p < 0,001$) et de spermatozoïdes mobiles ($p < 0,001$) dans le groupe d'échec par rapport au groupe de succès de fécondation. En revanche, les tests de régression logistique ne permettaient pas de prédire l'issue de la fécondation en FIV (Peultier, Freour et al. 2015). Par ailleurs, Zhu et al ont étudié la relation entre l'étiologie de l'infertilité des couples et le risque d'échec de fécondation chez 2 542 cycles de FIV. Ces couples ont été répartis en 4 groupes (groupe A : Infertilité primaire avec des paramètres spermatiques normaux, groupe B : Infertilité secondaire avec oligoasthénozoospermie, groupe C : Infertilité primaire avec oligoasthénozoospermie et groupe D : Infertilité secondaire avec des paramètres spermatiques normaux). Ces auteurs ont montré que l'échec de fécondation est significativement plus élevé en présence d'une oligoasthénozoospermie et d'une infertilité primaire (Zhu, Jiang et al. 2015). Ces dernières sont associées à l'échec de fécondation avec, respectivement, un

OR 12,215 (IC 95% [5,903 ; 25,26] $p < 0,001$) et un OR 10,898 (IC 95% [4,651 ; 25,538] $p < 0,001$) (Zhu, Jiang et al. 2015).

Dans le même contexte et afin de déterminer les facteurs prédictifs d'échec complet de fécondation en FIV en cas d'absence de facteurs d'infertilité masculine identifiés selon les normes de l'OMS, Krog et al ont réalisé une étude rétrospective cas-témoins incluant 304 couples avec échec complet de fécondation et 304 contrôles avec fécondation après FIV. Ils ont trouvé qu'un plus faible pourcentage de spermatozoïdes mobiles progressifs est un des facteurs prédictifs de l'échec de fécondation (OR ajuster 1,4 CI 95% [1,2 ; 1,6]). Pour expliquer ce résultat, ils ont suggéré qu'un facteur masculin non identifié pourrait être responsable de l'échec de la fécondation (Krog, Prior et al. 2015). Par exemple, le profil génétique pourrait être un des facteurs d'infertilité masculine. L'étude protéomique montrait qu'il y avait une différence du profil d'expression protéique des spermatozoïdes normaux non fécondants en FIV en comparaison à celui des spermatozoïdes normaux et fécondants (Frapsauce, Pionneau et al. 2009).

D'autre part, Krog et al ont montré que le risque d'échec complet de fécondation est associé également au nombre d'ovocytes disponibles pour la fécondation, au tabagisme chez la femme et à la stérilité due aux facteurs non tubaires (Krog, Prior et al. 2015).

Bien que les échecs complets de fécondation de cause purement féminine soient rares en FIV, certains auteurs ont rapporté que le risque d'échec de fécondation pourrait être seulement le résultat d'une réponse ovarienne sous-optimale. Ce dernier étant analysé grâce au nombre de follicules et au nombre d'ovocytes ponctionnés et matures (Kinzer, Barrett et al. 2008). D'autres auteurs ont suggéré l'implication d'anomalies de l'appareil microtubulaire de division et du fuseau méiotique ovocytaires dans les échecs de fécondation en FIV (Combelles, Morozumi et al. 2010).

L'ICSI, est un traitement de choix lors d'infertilité masculine sévère ou en cas d'échec de FIV. Lorsque le spermatozoïde est injecté directement à l'intérieur du cytoplasme d'un ovocyte, toutes les étapes nécessaires à l'approche spermatique, la traversée des différentes couches ovulaires et l'interaction avec l'ovocyte sont court-circuitées.

La comparaison entre le groupe « Echec de fécondation » et « Succès de fécondation » en ICSI montre qu'il y a une différence significative entre les deux groupes concernant l'âge maternel, le nombre d'ovocytes ponctionnés et matures et la morphologie du spermatozoïde injecté. Dans la littérature, certains auteurs ont rapporté que les résultats d'ICSI sont indépendants des paramètres spermatiques (Fishel, Aslam et al. 2000, French, Sabanegh et al.

2010, Peultier, Freour et al. 2015). Néanmoins, dans notre étude, nous avons trouvé une association entre la morphologie du spermatozoïde injecté et le risque d'échec de fécondation (OR = 10,27, IC 95% [2,91 ; 36,2], $p = 0,000$). Nos résultats sont similaires à ceux décrits par Goksan et al (Goksan Pabuccu, Sinem Caglar et al. 2016). Ils ont montré que la morphologie des spermatozoïdes était associée au nombre d'ovocytes fécondés ($\beta = 0,336$, 95% IC 95% [0,019 ; 0,654], $p = 0,039$) (Goksan Pabuccu, Sinem Caglar et al. 2016). Bien que le principe de l'ICSI repose sur la sélection d'un spermatozoïde en fonction de sa morphologie et de sa viabilité, en cas de tératozoospermie à 100%, le biologiste dans notre centre d'AMP injecte tout de même ces spermatozoïdes morphologiquement anormaux dans l'ovocyte de la partenaire. La tératozoospermie est un marqueur d'un défaut produit au cours de la spermatogenèse et pourrait être associée à des altérations de l'ADN et à un taux élevé d'aneuploïdie au niveau du spermatozoïde (Benzacken, Gavelle et al. 2001, Carrell, Wilcox et al. 2001, Morel, Douet-Guilbert et al. 2004, Goksan Pabuccu, Sinem Caglar et al. 2016). D'autre part, lors de la fécondation, le spermatozoïde doit transmettre un facteur d'activation des ovocytes qui pourrait être le PLC-zêta. Ce facteur provoque des oscillations calciques dans le cytoplasme ovocytaire par mobilisation du stock de calcium du réticulum endoplasmique (Colombero, Moomjy et al. 1999, Heytens, Parrington et al. 2009, Kashir, Heindryckx et al. 2010, Neri, Lee et al. 2014). Par conséquent, il est fort probable que les spermatozoïdes morphologiquement anormaux puissent avoir une perturbation au niveau du facteur d'activation ovocytaire.

Le nombre d'ovocytes matures est également un facteur prédictif d'échec de fécondation (OR = 0,45, IC 95% [0,35 ; 0,57], $p = 0,000$) dans notre population. Nos résultats sont concordants avec ceux de la littérature (Flaherty, Payne et al. 1998, Esfandiari, Javed et al. 2005, Goksan Pabuccu, Sinem Caglar et al. 2016). Après comparaison, pour un même couple, des résultats des cycles avec un antécédent d'échec de fécondation en ICSI et ceux des cycles ultérieurs, Kahyaoglu et al ont montré que le nombre d'ovocytes matures étaient trois fois plus élevé dans les cycles avec transfert d'embryons que dans ceux avec échec de fécondation (Kahyaoglu, Demir et al. 2014). Cette même tendance a été identifiée pour le nombre d'ovocytes ponctionnés (Kahyaoglu, Demir et al. 2014). Certains auteurs ont considéré qu'un nombre inférieur à six ovocytes ponctionnés est un facteur de risque d'échec de fécondation (Melie, Adeniyi et al. 2003, Sarikaya, Eryilmaz et al. 2011). Dans notre étude, nous avons considéré qu'un nombre inférieur à trois ovocytes matures est un facteur de risque d'échec de fécondation. Nos résultats corroborent ceux de l'équipe d'Esfandiari (Esfandiari, Javed et al. 2005).

Dans notre étude, et selon notre modèle final de régression logistique, l'âge maternel n'est pas associé à l'échec de fécondation, mais a un effet sur la qualité ovocytaire (selon le test de corrélation). Certains auteurs ont rapporté un effet de l'âge maternel sur la qualité ovocytaire en particulier sur la maturité cytoplasmique. Cet effet se manifeste principalement par l'altération de la qualité du pool de métabolites endogènes (en particulier des acides aminés), par l'altération des modes d'expression des gènes et par la régulation de la polyadénylation des ARNm (Hamatani, Falco et al. 2004, Menezo 2006). Flaherty et al ont étudié les causes d'échec de fécondation en ICSI chez 1 005 ovocytes non fécondés à l'aide d'une coloration au Hoechst 33342 (Flaherty, Payne et al. 1998). Cette équipe a mis en évidence la présence d'un noyau spermatique partiellement ou complètement décondensé dans les ovocytes non fécondés après ICSI, permettant de conclure que l'échec de l'activation des ovocytes était la principale cause de l'échec de la fécondation en ICSI (Flaherty, Payne et al. 1998). Combelles et al ont rapporté le cas d'un couple infertile qui n'a pas réussi à concevoir après plusieurs FIV et ICSI (Combelles, Morozumi et al. 2010). Ils ont montré qu'un défaut au niveau du cytoplasme impliquant une altération du fuseau méiotique ovocytaire pourrait être la cause principale de l'infertilité du couple (Combelles, Morozumi et al. 2010). Par ailleurs, Gasca et al ont montré que les anomalies d'expression génétique au niveau des ovocytes de haut grade étaient associées à l'échec de fécondation en ICSI (Gasca, Reyftmann et al. 2008). En fait, ils ont analysé l'abondance de l'ARNm pour 30 000 gènes par microarray dans des ovocytes des femmes ayant des échecs de fécondation en ICSI et dans des ovocytes des femmes fertiles. Ils ont identifié une altération du profil d'expression génétique des différents processus biologiques notamment la méiose, la croissance cellulaire et les gènes contrôlant l'apoptose en cas d'ovocytes non fécondés (Gasca, Reyftmann et al. 2008).

2. Qualité embryonnaire

Après la fécondation, le zygote subit une série de divisions cellulaires. Jusqu'au stade 4-8 cellules, le développement embryonnaire dépend principalement d'une réserve d'ARNm maternel accumulée pendant la croissance et la maturation des ovocytes (Telford, Watson et al. 1990). La transcription significative du génome embryonnaire n'a lieu qu'après ce stade (Simon, Liu et al. 2014).

Dans cette partie, nous avons tenté de déterminer les facteurs ayant un effet sur le développement embryonnaire. Cette étude n'est réalisée que pour les cycles d'ICSI du fait des limites des tests statistiques.

Seul l'âge maternel et le nombre d'ovocytes matures ($\beta = -0,12$ et $\beta = -0,29$; $p < 0,05$, respectivement) ont un effet négatif sur le taux de segmentation. Nos résultats sont en accord à ceux de la littérature (te Velde and Pearson 2002, Thum, Abdalla et al. 2008, Korkmaz, Tekin et al. 2015). Ces effets pourraient être expliqués en partie par la diminution de la réserve ovarienne liée à l'âge maternel et par l'augmentation des anomalies chromosomiques au niveau des ovocytes (Munne, Alikani et al. 1995), qui sont probablement associées au vieillissement du cytoplasme et à l'augmentation du taux d'aneuploïdie au cours de la méiose (te Velde and Pearson 2002, Martin 2008). Par ailleurs, pour notre population, aucun paramètre maternel ou paternel n'a été associé avec la qualité embryonnaire. Nos résultats sont en désaccord avec l'étude de Wu et al (Wu, Kang et al. 2016). Cette équipe a montré que dans une population de 2 627 cycles d'ICSI, l'âge paternel a une influence négative ($\beta = -0,02$; $p = 0,045$) sur le nombre d'embryons de bonne qualité après ajustement avec l'âge maternel (Wu, Kang et al. 2016).

Malheureusement nous n'avons pas pu étudier l'effet de certains paramètres sur le développement embryonnaire tel que l'effet de l'âge paternel et les paramètres spermatiques sur le taux de formation de blastocystes. En effet, plusieurs auteurs ont rapporté l'effet de l'âge paternel sur ce stade de développement embryonnaire. Ils ont montré que l'âge paternel avancé peut avoir un impact négatif sur le taux de formation de blastocystes (Frattarelli, Miller et al. 2008, Luna, Finkler et al. 2009, Dickson, Adedia et al. 2018). De plus, afin d'étudier l'effet de la concentration, de la mobilité et de l'âge paternel avancé sur les résultats de l'ICSI, Bartolacci et al ont déterminé que la concentration < 1 M/ml pourrait avoir un effet négatif sur le taux de formation de blastocystes (Bartolacci, Pagliardini et al. 2018). Ces auteurs ont suggéré qu'une qualité médiocre de l'information génétique associée à des anomalies du spermogramme/spermocytogramme ou des mutations génétiques accumulées dans les cellules germinales liées à l'âge avancé de l'homme pourraient expliquer l'effet des paramètres paternels sur le taux de formation de blastocystes (Luna, Finkler et al. 2009, Ferreira, Braga et al. 2010, Bartolacci, Pagliardini et al. 2018, Dickson, Adedia et al. 2018).

3. Transfert d'embryons

Le jour du transfert d'embryons est une stratégie spécifique de chaque centre d'AMP. Dans notre centre en Tunisie (Sousse), le transfert embryonnaire était réalisé à J2/3 dans la majorité des cycles de FIV ou d'ICSI. La comparaison selon le jour de transfert J2/3 versus J4/5 montre que les meilleurs taux de grossesse étaient obtenus suite à un transfert à J4/5 quelle que soit la technique d'AMP utilisée (FIV ou ICSI). Néanmoins, nos résultats ne nous permettent pas de conclure si la prolongation de culture embryonnaire est plus efficace à cause de la présence de différents biais. D'une part, il y a une différence significative entre les populations ciblées pour chaque jour du transfert : en particulier lorsque le transfert est réalisé à J4/5, les femmes étaient plus jeunes et présentaient une bonne réserve ovarienne et une bonne qualité ovocytaire par rapport aux femmes dont le transfert a eu lieu à J2/3. D'autre part, à J4/5, il y avait une tendance à transférer plus d'embryons qu'à J2/3.

Dans la littérature, certaines études ont rapporté que la prolongation de culture embryonnaire jusqu'à J4/5 entraîne une augmentation du taux de grossesses chimiques et une augmentation du taux de naissances vivantes (Tao, Tamis et al. 2002, Schwarzler, Zech et al. 2004, Papanikolaou, D'Haeseleer et al. 2005, Papanikolaou, Camus et al. 2006, Pantos, Makrakis et al. 2008). D'autres travaux ne trouvent aucune différence entre les jours du transfert (Coskun, Hollanders et al. 2000, Hatirnaz and Kanat Pektas 2017, Levi-Setti, Cirillo et al. 2018). Le choix du transfert à J4/5 repose généralement sur l'augmentation de la probabilité d'obtenir des embryons avancés ayant plus de chance de s'implanter (Hatirnaz and Kanat Pektas 2017). Staessen et al ont montré que le risque d'aneuploïdie était significativement plus faible chez les embryons du jour 5 que chez les embryons du jour 3 (Staessen, Platteau et al. 2004). Néanmoins, la prolongation de culture embryonnaire jusqu'à J4/5 pourrait être associée à des inconvénients notamment à un taux élevé d'annulation de cycle et à un risque accru de naissances gémellaires (Behr, Fisch et al. 2000, Tarlatzis, Qublan et al. 2002, Holschbach, Weigert et al. 2017).

4. Echec de grossesse chimique

La grossesse chimique correspond au phénomène d'implantation embryonnaire dans l'endomètre. La comparaison entre les groupes « Echec de grossesse chimique » et « Succès de grossesse chimique » montre que quelle que soit la technique d'AMP utilisée, l'âge maternel et le nombre d'ovocytes ponctionnés et matures sont impliqués dans l'échec de grossesse chimique. L'effet de l'âge maternel sur l'issue de la grossesse chimique est rapporté par de nombreuses études (Menken, Trussell et al. 1986, Szamatowicz and Grochowski 1998, Ziebe, Loft et al. 2001). Nos résultats pourraient être expliqués en partie par l'effet de l'âge maternel sur le vieillissement ovocytaire et la réceptivité de l'endomètre. Il a été rapporté que les femmes âgées présenteraient un risque plus élevé d'avoir des fibromes et/ou de l'endométriose que les femmes jeunes (Ron-El, Raziel et al. 2000). Dans notre population d'ICSI, l'association entre l'âge maternel et l'échec de grossesse chimique apparaît à partir de 41 ans. De plus, la comparaison entre groupe « Echec de grossesse chimique » et « Succès de grossesse chimique » montre également que les paramètres paternels sont impliqués dans l'échec de grossesse en ICSI.

Dans notre étude et dans le but de déterminer les facteurs prédictifs paternels de l'issue de grossesse chimique en ICSI, nous avons montré que l'âge paternel n'avait pas d'effet sur l'issue de grossesse chimique en ICSI, après des ajustements avec les paramètres maternels et du cycle d'ICSI. Nos résultats sont similaires avec certaines études (Frattarelli, Miller et al. 2008, Tsai, Lan et al. 2013). Néanmoins, d'autres travaux ont rapporté un effet de l'âge paternel sur l'issue de grossesse chimique. Luna et al ont montré que l'âge paternel > 60 ans présente un effet négatif sur le taux de grossesse chimique pour les cycles avec un don d'ovocytes (Luna, Finkler et al. 2009). Ferreira et al ont montré que chez les hommes oligozoospermiques, l'âge paternel a une influence négative sur le taux de grossesse chimique ($\beta = -0,7009$, $p < 0,05$) (Ferreira, Braga et al. 2010). Par ailleurs, dans notre étude, nous avons trouvé que la numération entre 10 M/ml et 15 M/ml présente un risque d'échec de grossesse 3 fois plus faible que dans le groupe avec une numération ≥ 15 M/ml. Ces résultats nous permettent de suggérer que la réalisation d'un spermogramme seul n'est pas suffisante pour prédire les causes sous-jacentes de l'infertilité masculine.

II. Effet de la qualité de l'ADN spermatique sur les résultats obtenus en AMP

La fragmentation de l'ADN spermatique représente une des causes majeures de l'infertilité masculine. Plusieurs travaux ont montré que les patients infertiles ont un taux de fragmentation de l'ADN spermatique supérieur à celui des hommes fertiles (Zini, Bielecki et al. 2001, Sergerie, Laforest et al. 2005, Sharma, Sabanegh et al. 2010). De plus, certains auteurs ont montré qu'il y avait une association entre la fragmentation de l'ADN et les paramètres spermatiques anormaux (Gandini, Lombardo et al. 2000, Zini, Bielecki et al. 2001), contrairement à certains autres (Saleh, Agarwal et al. 2002, Oleszczuk, Augustinsson et al. 2013). Dans notre étude nous n'avons pas trouvé de corrélation entre les paramètres spermatique et le taux de fragmentation de l'ADN. Par conséquent, l'évaluation de la qualité de l'ADN spermatique pourrait être cliniquement utile dans le cadre d'un bilan d'infertilité (Lewis, Agbaje et al. 2008).

Différentes techniques sont utilisées afin d'évaluer l'intégrité de l'information génétique des spermatozoïdes. La technique TUNEL est l'une de ces méthodes. Des études antérieures ont montré que la fragmentation de l'ADN pourrait avoir des effets négatifs sur le taux de fécondation en FIV et/ou en ICSI (Lopes, Sun et al. 1998, Marchetti, Obert et al. 2002, Benchaib, Braun et al. 2003, Bakos, Thompson et al. 2008, Simon, Liu et al. 2014). A l'aide de la technique TUNEL, Lopes et al ont identifié que chez des hommes présentant un taux de fragmentation d'ADN supérieur à 25%, le taux de fécondation après ICSI est inférieur à 20% (Lopes, Sun et al. 1998). Simon et al ont montré que le taux de fragmentation de l'ADN a un effet négatif sur le taux de fécondation après FIV chez des hommes ayant un taux de fragmentation d'ADN supérieur à 10%, alors qu'il n'y a pas de corrélation entre ces deux paramètres en cas d'ICSI (Simon, Liu et al. 2014). En revanche, dans notre étude aucune différence significative n'a été identifiée du point de vue du taux de fécondation en AMP entre les hommes ayant une qualité d'ADN normale ou altérée ainsi qu'aucune association n'a été trouvée entre la fragmentation de l'ADN et le taux de fécondation en AMP. Nos résultats sont similaires avec certaines études (Frydman, Prisant et al. 2008, Daris, Goropevsek et al. 2010, Esbert, Pacheco et al. 2011).

Malheureusement dans notre travail, nous n'avons pas pu étudier l'effet de la fragmentation de l'ADN sur la qualité embryonnaire (taux de segmentation, taux d'embryons, taux d'embryons de bonne qualité et taux de formation de blastocystes) du fait des limites des études statistiques. Cependant, de nombreuses études se sont intéressées à ce sujet. En fait,

une association entre la qualité de l'ADN spermatique et le taux de formation de blastocystes a été identifiée par certaines études (Virro, Larson-Cook et al. 2004, Alvarez Sedo, Bilinski et al. 2017). Ces observations suggèrent que la perte de la compétence des spermatozoïdes fragmentés se manifeste relativement tard dans le développement de l'embryon préimplantatoire. Ces résultats pourraient être justifiés par le fait que le génome propre de l'embryon, impliquant l'ADN paternel, ne s'active qu'après le stade 4-8 cellules. Cependant, certains auteurs ont décrit qu'un effet paternel peut être détecté à des stades précoces de développement embryonnaire (Tesarik, Mendoza et al. 2002). L'effet paternel précoce a été suggéré comme étant lié à un dysfonctionnement du centrosome ou à une carence en facteurs activant les ovocytes. Ces fonctions pourraient être affectées par le processus pathologique qui conduit à la fragmentation de l'ADN (Tesarik, Mendoza et al. 2002, Tesarik, Greco et al. 2004).

Dans notre étude, aucune association n'a été identifiée entre la fragmentation de l'ADN et l'échec de grossesse chimique. Néanmoins, ce résultat est à prendre avec précaution, au vu de la limite de l'effectif de notre population. En effet, à l'aide de la technique SCSA, Speyer et al ont montré que la fragmentation de l'ADN supérieure à 19% pourrait augmenter le risque d'échec d'implantation après ICSI (Speyer, Pizzey et al. 2010).

Dans la littérature, l'association entre la fragmentation de l'ADN et l'échec de la grossesse clinique est rapportée par certains auteurs. Borini et al ont montré que la fragmentation de l'ADN à partir de 10% a un effet négatif sur le taux de grossesse clinique (Borini, Tarozzi et al. 2006). Avendando et al ont montré que lorsque le pourcentage de spermatozoïdes à ADN fragmenté était supérieur à 17,6%, la probabilité d'obtenir une grossesse était 3,5 fois moins élevée en cas d'ICSI (Avendano, Franchi et al. 2010). Une méta-analyse des résultats des études de l'effet de la fragmentation de l'ADN sur l'issue en FIV montre que le taux de grossesse est plus faible chez les patients présentant un taux de fragmentation élevé avec un OR combiné de 1,57 (IC 95%: [1,18, 2,07]) (Cho and Agarwal 2018). D'autres auteurs ont rapporté que la fragmentation de l'ADN spermatique pourrait être la cause de perte de grossesse (Borini, Tarozzi et al. 2006).

Fernandez Gonzalez et al ont étudié les conséquences à long terme sur le développement et le comportement de souris nées après ICSI avec un spermatozoïde à ADN fragmenté. Ces auteurs ont identifié que chez les souris issues de ces spermatozoïdes, des effets tardifs peuvent apparaître tels qu'une croissance anormale, un vieillissement prématuré, un comportement anormal ou encore des tumeurs mésoenchymateuses (Fernandez-Gonzalez,

Moreira et al. 2008). Il apparaît donc prudent de ne pas utiliser ces spermatozoïdes pour l'ICSI (Delbes, Herrero et al. 2013, Sakkas 2013).

B. Tri magnétique

I. Optimisation du protocole de tri magnétique : Kit de recherche

La présence d'un taux accru de marqueurs apoptotiques dans les spermatozoïdes éjaculés d'hommes infertiles a été rapportée par plusieurs auteurs (Sakkas, Moffatt et al. 2002, Brugnon, Janny et al. 2010, Shukla, Mahdi et al. 2012, Hichri, Amor et al. 2018). Ces données suggèrent une relation possible entre les marqueurs de l'apoptose et l'infertilité masculine (Brugnon, Van Assche et al. 2006). Ces marqueurs sont principalement une EPS, une baisse du potentiel de membrane mitochondriale, une activation des caspases et une fragmentation de l'ADN. La technique MACS est une technique qui permet de séparer les spermatozoïdes en fonction de marqueurs apoptotiques localisés sur leur membrane plasmique. Afin d'adapter le protocole du tri magnétique du kit de recherche pour sélectionner les spermatozoïdes ayant externalisé leurs PS, plusieurs stratégies et tests ont été effectués.

1. Quantité de microbilles

Ce premier test avait pour but de déterminer la meilleure quantité de microbilles pour effectuer le marquage magnétique. Nous avons observé une augmentation de la pureté dans les deux fractions (annexine V- et annexine V+) en augmentant la quantité de microbilles. Avec 100 µl de microbilles la pureté a été évaluée à 67,6% dans la fraction annexine V- et à 82,8% dans la fraction annexine V+. Avec 20 µl de microbilles, la pureté a été retrouvée respectivement à seulement 55,2% et 76% dans les fractions annexine V- et annexine V+. Ceci suggère la présence d'un effet de saturation des microbilles magnétiques. Dans la littérature, certaines études ont choisi d'utiliser d'autres quantités de microbilles (Lee, Liu et al. 2010, Romany, Garrido et al. 2014, Berteli, Da Broi et al. 2017). Romany et al ont utilisé 10 µl de microbilles pour trier leurs échantillons (Romany, Garrido et al. 2014). Berteli et al ont sélectionné leurs échantillons après une étape de marquage avec 20 µl de microbilles. Toutefois, dans ces études, le taux de pureté dans chaque fraction n'a pas été précisé (Romany, Garrido et al. 2014, Berteli, Da Broi et al. 2017).

2. Tests complémentaires

Le principe du tri magnétique par MACS consiste à séparer les spermatozoïdes en fonction des marqueurs apoptotiques. Par conséquent, après passage dans la colonne, le pourcentage de marqueurs apoptotiques (taux de spermatozoïdes avec EPS et taux de fragmentation de l'ADN spermatique) devrait diminuer. Cependant, nous avons constaté une augmentation significative du taux de fragmentation de l'ADN après tri sur des échantillons de spermes décongelés et lavés avec du PBS 1X. Pour cela des tests complémentaires ont été développés pour expliquer ce résultat incohérent.

Le marquage magnétique consiste à mettre en contact les spermatozoïdes ayant externalisé leurs PS avec des microbilles magnétiques conjuguées à l'annexine V en présence de BB 1X. L'annexine présente une propriété de liaison Ca^{2+} - dépendant aux membranes contenant des phospholipides chargés négativement comme la PS (Klee 1988, Swairjo and Seaton 1994). Par conséquent, il est fort probable que le BB 1X soit riche en Ca^{2+} et permette d'obtenir des conditions favorables pour le marquage. Les tests PBS *versus* BB et lavage avec BB *versus* incubation avec BB nous permettent de mettre en évidence l'effet du BB 1X sur la qualité de l'ADN spermatique. En effet ce tampon influence le résultat du taux de fragmentation après le tri. De plus, le temps d'incubation des spermatozoïdes dans du BB augmente le taux de fragmentation de l'ADN spermatique.

Le rôle du BB a été identifié grâce au test BB *versus* triton. Le triton est un détergent, il est utilisé par plusieurs auteurs dans le but de perméabiliser la membrane des spermatozoïdes avant de réaliser la technique TUNEL (Brahem, Mehdi et al. 2011, Esbert, Pacheco et al. 2011). Les résultats de ce test nous permettent de suggérer que le BB pourrait avoir le même rôle que le triton. Il permettrait une meilleure accessibilité et une meilleure intégration de la TdT et des dUTP marqués au niveau de l'ADN lors de la technique TUNEL. Cette hypothèse a été validée suite à l'évaluation de la pureté et de la fragmentation de l'ADN à chaque étape du tri magnétique sur des échantillons décongelés et lavés avec du BB 1X. En effet, le taux d'EPS reste inchangé entre la décongélation et l'incubation avec les microbilles et le BB, alors que le taux de fragmentation de l'ADN augmente. Comme l'EPS est connue comme un événement précoce survenant dans les cellules en apoptose contrairement à la fragmentation de l'ADN qui est un événement tardif, cela indique que le BB ne fragmente pas l'ADN des spermatozoïdes mais permet une meilleure action de l'enzyme TdT utilisée lors de la technique TUNEL. Le BB révélerait donc plus facilement la fragmentation de l'ADN spermatique. Après passage par colonne, le tri cellulaire à l'aide de microbilles conjuguées à

l'annexine V permet d'éliminer une majorité de spermatozoïdes déjà en voie d'apoptose et/ou avec un ADN fragmenté.

Dans la littérature, certains auteurs ont tenté d'améliorer l'accessibilité de la transférase terminale aux cassures des brins d'ADN lors du marquage à l'aide de la technique TUNEL. Ces auteurs ont traité leurs échantillons par le dithiothréitol avant l'étape de fixation (Mitchell, De Iuliis et al. 2011). Le dithiothréitol est un agent réducteur de petite masse moléculaire qui permet de relâcher la structure chromatinienne des spermatozoïdes en coupant les ponts disulfures entre les molécules de protamines adjacentes (Codrington, Hales et al. 2007, Mitchell, De Iuliis et al. 2011).

3. Kit recherche adapté versus Kit ART

La comparaison entre les résultats obtenus à l'aide des deux kits : kit recherche adapté et kit ART montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les résultats obtenus après le tri dans la fraction annexine V-. Ceci suggère que le protocole optimisé du kit de recherche est bien adapté pour le tri des spermatozoïdes. La comparaison entre les deux kits a été réalisée sur des échantillons non appariés. Il serait intéressant de refaire la même procédure mais sur les mêmes échantillons afin de confirmer nos résultats.

Concernant la fraction annexine V+, une différence significative du taux de spermatozoïdes avec EPS a été identifiée. Ce résultat peut éventuellement s'expliquer par un conditionnement différent des deux kits.

II. Apport du tri magnétique chez les patients

Dans cette partie, nous avons étudié l'apport du tri magnétique par MACS chez 6 hommes ayant un taux anormal de fragmentation de l'ADN et chez 14 hommes porteurs d'une anomalie chromosomique constitutionnelle. Pour chaque homme, nous avons évalué le taux de spermatozoïdes avec EPS, le taux de la fragmentation de l'ADN spermatique et le contenu chromosomique des spermatozoïdes. De plus, l'évaluation de concentration totale des spermatozoïdes a été réalisée chez les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique constitutionnelle.

1. Evaluation de la concentration totale des spermatozoïdes

Cakar et al ont noté une diminution significative de la concentration et du nombre de spermatozoïdes de mobilité progressive après sélection par MACS chez 10 patients normozoospermiques et chez 10 patients oligozoospermiques (Cakar, Cetinkaya et al. 2016). Degheidy et al ont montré une diminution significative de la concentration de spermatozoïdes (en M) après passage sur colonne chez 36 patients présentant une varicocèle (Degheidy, Abdelfattah et al. 2015). Nos résultats confirment cette tendance chez les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique constitutionnelle.

2. Evaluation du taux de spermatozoïdes avec EPS

Dans la littérature, afin d'évaluer la capacité de sélection des spermatozoïdes apoptotiques par la technique MACS, plusieurs paramètres ont été évalués tels que l'externalisation de PS, le potentiel de membrane mitochondriale, la présence de CD95 (Fas) et l'activation des caspases (Grunewald, Paasch et al. 2001, Said, Agarwal et al. 2006, de Vantéry Arrighi, Lucas et al. 2009, Lee, Liu et al. 2010, Vendrell, Ferrer et al. 2014). Ces études ont rapporté que la technique MACS est une excellente méthode pour éliminer les spermatozoïdes apoptotiques.

Dans notre étude, l'évaluation du taux de spermatozoïdes avec EPS nous a permis d'analyser le taux de pureté de nos échantillons après sélection par MACS.

Chez les hommes ayant un taux anormal de fragmentation de l'ADN, nous avons trouvé une moyenne de 19,4% de spermatozoïdes avec EPS dans la fraction d'annexine V- *versus* 64,96% dans la fraction d'annexine V+ avec une différence significative par rapport aux échantillons de départ. Il en est de même chez les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure. En effet, nous avons trouvé une moyenne de 28,06% de spermatozoïdes avec EPS dans la fraction d'annexine V- *versus* 78,94% dans la fraction d'annexine V+ avec une différence significative par rapport aux échantillons de départ. De la même manière, chez les hommes porteurs d'une mosaïque gonosomique, nous avons trouvé une moyenne de 25,9% de spermatozoïdes avec EPS dans la fraction d'annexine V- *versus* 78,6% dans la fraction d'annexine V+ avec une différence significative par rapport aux échantillons de départ. Nos résultats sont similaires à ceux décrits dans la littérature (de Vantéry Arrighi, Lucas et al. 2009, Lee, Liu et al. 2010, Vendrell, Ferrer et al. 2014). Paasch et al ont trié les spermatozoïdes de donneurs par MACS à l'aide d'une cytométrie en flux en

utilisant l'annexine V conjuguée à FITC (Paasch, Grunewald et al. 2003). Ils ont trouvé une moyenne de $5,2\% \pm 1,0\%$ de spermatozoïdes marqués dans la fraction d'annexine V- *versus* $72,2\% \pm 2,7\%$ de spermatozoïdes marqués dans la fraction annexine V + (Paasch, Grunewald et al. 2003). La présence de spermatozoïdes marqués par l'annexine V-FITC dans la fraction d'annexine V-, pourrait être due à une liaison non spécifique ou une quantité insuffisante de microbilles magnétiques. En effet, Glander et Schaller ont montré que la structure primaire de la membrane spermatique pouvait perturber la capacité de l'annexine V à se lier à la PS (Glander and Schaller 2000).

3. Evaluation du taux de fragmentation de l'ADN spermatique

Des nombreuses études ont tenté de sélectionner les spermatozoïdes à ADN non fragmenté chez différents types de populations notamment chez les hommes infertiles (Nadalini, Tarozzi et al. 2014, Berteli, Da Broi et al. 2017), normozoospermiques (Said, Agarwal et al. 2006, Herrero, Delbes et al. 2012, Tavalae, Deemeh et al. 2012, Cakar, Cetinkaya et al. 2016, Chi, Kwak et al. 2016), asthénozoospermiques et/ou oligozoospermiques et/ou tératozoospermiques (Herrero, Delbes et al. 2012, Tavalae, Deemeh et al. 2012, Delbes, Herrero et al. 2013, Zahedi, Tavalae et al. 2013, Cakar, Cetinkaya et al. 2016, Zhang, Xuan et al. 2018), en cas de fragmentation de l'ADN élevée (Rawe, Alvarez et al. 2009, Rawe, Boudri et al. 2010, Herrero, Delbes et al. 2013, Curti, Skowronek et al. 2014), en cas de varicocèle (Degheidy, Abdelfattah et al. 2015), en cas d'échec d'implantation idiopathique (Vendrell, Ferrer et al. 2014) et en cas d'échec de fécondation après FIV (Lee, Liu et al. 2010).

La majorité de ces études a rapporté une diminution significative du taux de spermatozoïdes à ADN fragmenté après sélection par MACS dans la fraction annexine V-. Néanmoins, le pourcentage de diminution du taux de fragmentation de l'ADN varie d'une équipe à l'autre. Tavalae et al ont montré qu'une sélection par gradient de densité permet de diminuer 28,4% du taux de fragmentation de l'ADN et une sélection par MACS permet de diminuer 26,9% du taux de fragmentation de l'ADN (Tavalae, Deemeh et al. 2012). Plus récemment, Berteli et al ont montré qu'une sélection par gradient de densité permet de diminuer 58,33% du taux de fragmentation de l'ADN tandis qu'une sélection par MACS permet de diminuer 66,7% du taux de fragmentation de l'ADN (Berteli, Da Broi et al. 2017).

Dans la littérature, peu d'étude ont évalué l'efficacité de la technique MACS seule. En effet la majorité des auteurs a testé l'efficacité de MACS en association avec le swim-up et/ou le

gradient de densité. Zhang et al ont identifié chez des hommes ayant une asthénozoospermie à 100%, une diminution significative de 71,23% du taux de fragmentation de l'ADN après une sélection par un gradient de densité suivi par MACS, en comparaison à une sélection après un gradient de densité seul, qui permettait une diminution de 45,08% du taux de fragmentation d'ADN (Zhang, Xuan et al. 2018).

Certains auteurs proposent de réaliser le gradient de densité avant MACS (Said, Agarwal et al. 2006, Chi, Kwak et al. 2016, Zhang, Xuan et al. 2018). D'autres recommandent de réaliser MACS avant le gradient de densité (Tavalaee, Deemeh et al. 2012, Berteli, Da Broi et al. 2017). Tavalaee et al ont enregistré une diminution significative de 48,6% du taux de fragmentation de l'ADN après sélection des spermatozoïdes par MACS suivi d'un gradient de densité (Tavalaee, Deemeh et al. 2012). Herrero et al ont trouvé une diminution significative de 50% du taux de fragmentation de l'ADN après sélection par gradient de densité suivi par MACS (Herrero, Delbes et al. 2012). Berteli et al ont montré que l'efficacité de MACS suivi d'un gradient de densité était supérieure à celle du gradient de densité suivi par MACS (Berteli, Da Broi et al. 2017). Les auteurs ont expliqué ce choix par le fait que MACS avant le gradient permet d'éliminer les spermatozoïdes qui sont engagés dans la voie de l'apoptose plutôt que ceux qui ont externalisé leurs PS suite à leur capacitation pendant le traitement par le gradient de densité (Tavalaee, Deemeh et al. 2012, Berteli, Da Broi et al. 2017). Bucar et al ont rapporté qu'une association de la technique MACS suivi d'un gradient de densité puis de swim-up permettait une diminution de 83,3% du taux de fragmentation d'ADN (Bucar, Goncalves et al. 2015).

Dans notre étude afin d'identifier uniquement les apports liés à la technique MACS, nous avons sélectionné les échantillons de nos patients seulement à l'aide de MACS.

Concernant les hommes ayant un taux anormal de fragmentation de l'ADN, nous avons remarqué une augmentation significative du taux de fragmentation après incubation avec les microbilles et BB 1X ($30,67\% \pm 7,83\%$) en comparaison à celui de départ ($24,8\% \pm 5,56\%$). Comme nous l'avons vu précédemment, ces résultats sont dus à l'effet du BB 1X. Néanmoins, après passage par colonne une tendance de diminution du taux de fragmentation a été notée dans la fraction annexine V- et une augmentation significative de ce taux dans la fraction annexine V+. En effet, la fragmentation de l'ADN dans le spermatozoïde mature peut ne pas être directement liée à un processus apoptotique. En fait, aucun lien direct entre les marqueurs apoptotiques et la fragmentation de l'ADN analysée par TUNEL n'a été mis en évidence dans

les spermatozoïdes éjaculés d'hommes ayant des paramètres spermatiques normaux et anormaux (Sakkas, Moffatt et al. 2002). De plus, Vendrel et al ont étudié la relation entre la fragmentation de l'ADN, l'externalisation de PS et le potentiel de membrane mitochondriale dans des échantillons triés par MACS (Vendrell, Ferrer et al. 2014). Ils n'ont pas trouvé de corrélation entre la diminution du taux de fragmentation de l'ADN et la diminution du taux des autres marqueurs apoptotiques étudiés (Vendrell, Ferrer et al. 2014). Ceci suggère que la présence de marqueurs apoptotiques dans les spermatozoïdes éjaculés peut être liée à des anomalies de remodelage de la chromatine au cours des derniers stades de la spermatogenèse (Sakkas, Moffatt et al. 2002).

Concernant les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure, l'effet du BB 1X sur le taux de fragmentation de l'ADN spermatique a été également retrouvé après incubation des spermatozoïdes avec les microbilles et le BB 1X. Après passage par colonne, une diminution significative de plus de 44,77% du taux de fragmentation de l'ADN dans la fraction annexine V- et une augmentation significative de ce taux dans la fraction annexine V+ ont été enregistrées. Nos résultats montrent que la fragmentation de l'ADN spermatique chez les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure est associée en grande partie à un processus apoptotique. A notre connaissance, notre étude est la première à étudier l'apport de technique MACS pour sélectionner les spermatozoïdes non fragmentés chez des hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure.

La présence de spermatozoïdes à ADN fragmenté dans la fraction annexine V- pourrait être due à une séquence de processus apoptotique différente de celle connue dans les cellules somatiques. En fait, dans de précédentes études, nous avons montré que les spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés sont plus fragmentés que les spermatozoïdes chromosomiquement normaux ou équilibrés chez les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique et nous avons émis l'hypothèse qu'une apoptose abortive pourrait expliquer cette association (Perrin, Basinko et al. 2011, Perrin, Nguyen et al. 2013). Néanmoins le déroulement du processus apoptotique dans les spermatozoïdes n'est pas encore élucidé. Une séquence hypothétique a été développée récemment par Vendrell et al (Figure 52) (Vendrell, Ferrer et al. 2014). En effet, ces auteurs ont émis l'hypothèse qu'au cours de la spermatogenèse, une altération de la ségrégation méiotique déclencherait un processus apoptotique conduisant à la fragmentation de l'ADN. Néanmoins les étapes précoces de l'apoptose n'impliqueraient pas l'EPS. Par conséquent, il existerait des spermatozoïdes

fragmentés sans EPS. Ainsi ces spermatozoïdes ne seraient pas retenus dans la colonne et se retrouveraient dans la fraction annexine V- (Vendrell, Ferrer et al. 2014).

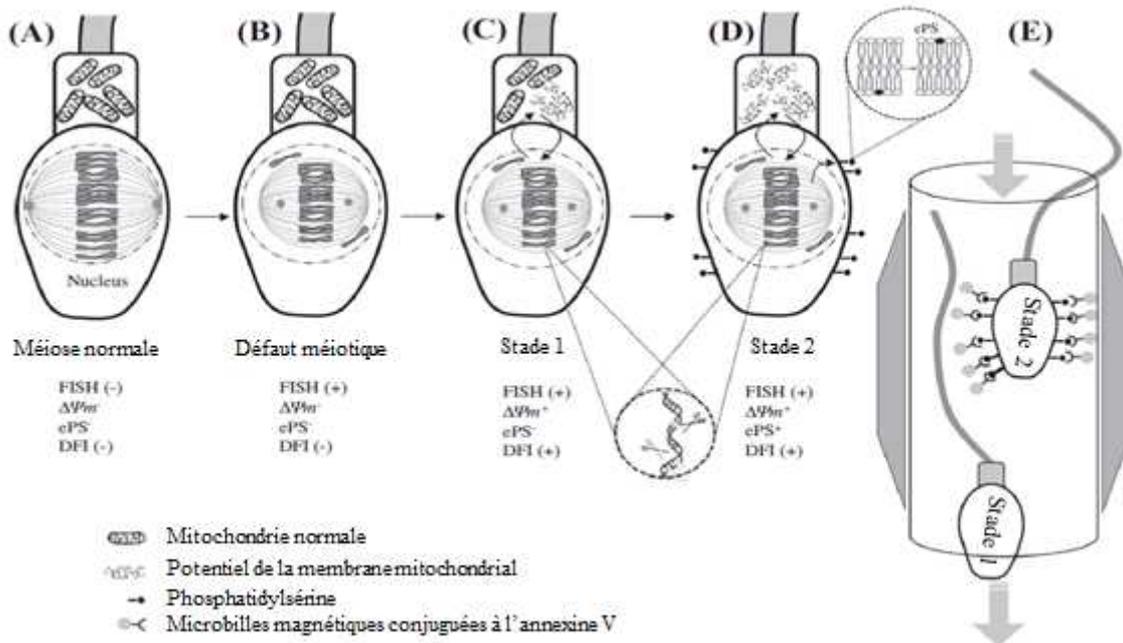


Figure 52 : Schéma hypothétique du déroulement de l'apoptose au cours de la spermatogénèse (Vendrell, Ferrer et al. 2014)

(A) Méiose normale. (B) Défaut méiotique : une ségrégation chromosomique anormale devrait déclencher des événements apoptotiques initiaux. (C) Stade 1 : le principal phénomène de déstabilisation est la perturbation du $\Delta\psi_m$; ces dommages précoces pourraient se produire en même temps que la fragmentation de l'ADN et l'externalisation des PS ; les spermatozoïdes endommagés au stade 1 ne devraient pas être retenus par la colonne et se retrouveraient dans la fraction éluee après MACS (fraction annexine V-). (D) Stade 2 : spermatozoïdes en stade avancé ; ces spermatozoïdes présentent une EPS et devraient être retenus dans la colonne (fraction annexine V+). (E) MACS : rétention de spermatozoïdes en fonction des étapes suggérées. $\Delta\psi_m$ = potentiel de membrane mitochondriale ; DFI = indice de fragmentation de l'ADN ; EPS = phosphatidylsérines externalisée ; FISH = hybridation fluorescente in situ ; MACS = tri cellulaire à l'aide des microbilles magnétiques.

Concernant les hommes porteurs d'une mosaïque gonosomique, après le tri, nous n'avons pas trouvé d'amélioration de la qualité de l'ADN spermatique dans la fraction annexine V-. L'origine multifactorielle de la fragmentation de l'ADN pourrait expliquer en partie nos résultats. De plus, ces résultats sont à prendre avec précaution car ils ne concernent que deux patients. A notre connaissance, il n'existe pas dans la littérature d'étude ayant déterminé l'apport de MACS chez ces hommes porteurs d'une mosaïque gonosomique. Par conséquent, il serait intéressant de réaliser l'analyse sur d'autres échantillons de sperme de ces hommes.

4. Evaluation de l'équipement chromosomique des spermatozoïdes

Les anomalies chromosomiques dans les spermatozoïdes sont également des paramètres qui affectent la fertilité masculine (Tempest and Griffin 2004). Elles concernent principalement les hommes présentant des caryotypes anormaux. Cependant, certains sous-groupes d'hommes infertiles avec un caryotype normal peuvent également être capables de produire des spermatozoïdes avec un équipement chromosomique anormal (Sanchez-Castro, Jimenez-Macedo et al. 2009, Templado, Uroz et al. 2013). Dans une étude rétrospective, Sarrate et al ont constaté chez 319 patients infertiles, une augmentation de 2 à 3 fois des disomies des chromosomes sexuels et des disomies 21, ainsi qu'une augmentation de 3 fois des aneuploïdies par rapport au groupe témoin (Sarrate, Vidal et al. 2010). Ces anomalies chromosomiques dans les spermatozoïdes chez les hommes infertiles sont considérées comme une des causes d'échec de grossesse, d'implantation après ICSI, de fausses couches et de fréquence élevée d'aneuploïdie chez les embryons (Burrello, Vicari et al. 2003, Platteau, Staessen et al. 2004, Nicopoullou, Gilling-Smith et al. 2008).

Depuis 2002, 12 études ont analysé le contenu chromosomique avant et après sélection spermatique chez des hommes fertiles et/ou infertiles (Tableau 39). En fait, les résultats rapportés varient selon les équipes, la technique de sélection utilisée, les chromosomes analysés et le nombre de spermatozoïdes étudiés. Trois études ont tenté de déterminer l'apport des techniques classiques de séparation des spermatozoïdes (swim-up ou gradient de densité) (Ong, Xun et al. 2002, Brahem, Letaief et al. 2013, Kim, Jee et al. 2017). Une diminution significative du taux de disomie et de diploïdie a été identifiée par deux équipes après la sélection par swim-up ou par gradient de densité (Ong, Xun et al. 2002, Brahem, Letaief et al. 2013). En revanche, à l'aide de ces deux méthodes, Kim et al n'ont pas trouvé de diminution (Kim, Jee et al. 2017). La sélection à l'aide de la liaison à l'acide hyaluronique a également été testée par certains auteurs (Jakab, Sakkas et al. 2005, Mongkolchaipak and Vutyavanich 2013). Ils ont noté une diminution du taux de disomie et de diploïdie après liaison à l'acide hyaluronique (Jakab, Sakkas et al. 2005, Mongkolchaipak and Vutyavanich 2013). Certains auteurs ont montré que la sélection à l'aide de MSOME permet de diminuer le taux d'aneuploïdie dans les spermatozoïdes sélectionnés (Garolla, Fortini et al. 2008, Perdrix, Travers et al. 2011, Mongkolchaipak and Vutyavanich 2013) par opposition à d'autres (Boitrelle, Ferfour et al. 2011, Levron, Aviram-Goldring et al. 2013). Seiringer et al ont montré également que la sélection des spermatozoïdes à l'aide de Zech-selector permet de

diminuer le taux d'aneuploïdie (Seiringer, Maurer et al. 2013). A notre connaissance, seules deux équipes ont tenté de sélectionner les spermatozoïdes d'hommes infertiles 46,XY par MACS (Vendrell, Ferrer et al. 2014, Esbert, Godo et al. 2017). Le tri magnétique par MACS a été utilisé en association avec le gradient de densité (gradient de densité suivi par MACS) pour les deux équipes. Vendrell et al ont montré une diminution des taux de nullisomie et de disomie 18 et une diminution du taux d'aneuploïdie totale (Vendrell, Ferrer et al. 2014). Esbert et al ont comparé le taux d'aneuploïdie dans les fractions annexines V- et V+ et ils ont conclu que les spermatozoïdes aneuploïdes sont de préférence retenus dans la colonne MACS (Esbert, Godo et al. 2017).

Dans notre étude, concernant les hommes ayant un taux de fragmentation de l'ADN anormal, nous avons identifié une augmentation significative du taux de disomie Y, de disomie XY, de disomie 21, de diploïdie (18, X, Y), de diploïdie (13, 21), de la somme des disomies et de la somme de diploïdes dans la fraction annexine V+ par rapport à la fraction annexine V-. De plus, nous avons trouvé également une augmentation significative des fréquences des différentes anomalies chromosomiques de nombre dans la fraction annexine V+ en comparaison à la décongélation à l'exception de la disomie 13 et de la disomie 21.

Ces tendances sont aussi identifiées chez les hommes porteurs d'une mosaïque gonosomique. En effet, nous avons observé une diminution significative de disomie XY et de disomie 13 dans la fraction annexine V- et une augmentation significative de disomie 18, de disomie 21, de diploïdie (18, X, Y) et de la somme des disomies dans la fraction annexine V+ par rapport à la décongélation.

Ces résultats encourageants ont été identifiés après l'étude de 5 chromosomes seulement (X, Y, 18, 13, 21), l'analyse des autres chromosomes serait intéressante.

Tableau 39 : FISH sur spermatozoïdes sélectionnés chez des hommes infertiles

Publication	Patients		Sélection	Chromosome	FISH		Fragmentation (TUNEL)	
	Nombre	Sperme			Nombre spermatozoïdes analysés	Résultat		
Ong 2002	20	D	SU	13,18,21,X,Y	Ejaculat : 2500	Disomie : 0,13% Diploïdie : 0,09%	NR	
					Après sélection : 2500	Disomie : 0,1% (S) Diploïdie : 0,06% (S)		
Jakab 2005	31	O ou N	AH	X,Y,17	Ejaculat : 4770	Disomie : 0,79% Diploïdie : 0,51%	NR	
					Après sélection : 495 à 2079	Disomie : 0,21% (S) Diploïdie : 0,09% (S)		
Garolla 2008	10	O	MSOME	X,Y,18	Ejaculat : 1000	14,5%	58% (analyse de 400 spz)	
					MSOME Morphologie spz normale : 10	0% (S)	9,3% (S)	
					MSOME Morphologie avec au moins une large vacuole : 10	5,1% (S)	40,1% (S)	
Perdrix 2011	20	T	MSOME	X,Y,18	Ejaculat : 1000	Disomie : 0,84% Diploïdie : 0,47%	complète : 8,6% partielle 11,5% (analyse 500 spz)	
					MSOME spermatozoïdes avec une large vacuole > 13% de la surface de la tête : 25 à 50	Disomie : 5,16% (S) Diploïdie : 2,63% (S)	complète 1,7% (S) partielle 14,5% (NS)	
Boitrelle 2011	15	D 46,XY	MSOME	X,Y,18	MSOME « top spermatozoïde » : 30	Disomie : 1,1%	3,1% (analyse 500 spz après GD)	
					MSOME spermatozoïde avec vacuole > 25% de la surface de la tête : 30	Disomie : 2,2% (NS)	0,7% (S par rapport 3,1%) (NS par rapport à 1,3%) 1,3% (NS par rapport 0,7%) (NS par rapport à 3,1%)	
Brahem 2013	45	T ou N 46,XY	GD	X,Y,18	Ejaculat (au minimum 500 spz)	Disomie 12,76%	Diploïdie 3,7%	NR
					50% (au minimum 500 spz)	10,32% (S)	3,2% (S)	
					70% (au minimum 500 spz)	7,36% (S)	1,9% (S)	
					90% (au minimum 500 spz)	4,43% (S)	1,23% (S)	

Levron 2013	8	OAT 46,XY	MSOME Bordure de goutte ICSI	X,Y,18	Ejaculat : 648 MSOME « top spermatozoïde » : 165 Bordure de goutte ICSI : 174	Disomie : 7,62% Disomie : 8,75% (NS) Disomie : 4,25% (S)	NR
Mongkolchaipak 2013	50	D 46,XY	MSOME AH	13,18,21,X,Y	Après GD 90%/40% : 200 AH : 200 MSOME : 30	Disomie : 7% Disomie : 0,8% (S par rapport 7%) (NS par rapport à 0,7%) Disomie : 0,7% (S par rapport 7%) (NS par rapport à 0,8%)	26,8% 2,6% (S par rapport 26,8%) (NS par rapport à 1,7%) 1,7% (NS par rapport 2,6%) (S par rapport à 26,8%)
Seiringer 2013	53	N ou T ou D	ZS	X,Y,18	Ejaculat : 250 Après sélection : 250	Disomie + nullisomie + diploïdie : 2,3% Disomie + nullisomie + diploïdie : 2,3%	13,3% (analyse 500 spz par halosperm assay) 0,1% (S) (analyse 300 spz par halosperm assay)
Vendrel 2014	6 46,XY	N	GD + MACS	X,Y,18	14151 en moyenne / patient Ejaculat GD MACS	Aneuploïdie : 7,10% Diploïdie : 1,91% Aneuploïdie : 5,13% (S par rapport 7,10%) Diploïdie : 1,79% (S par rapport 1,91%) Aneuploïdie : 4,22% (S par rapport 5,13%) Diploïdie : 1,19% (S par rapport 1,91%)	75,77% (S par rapport à 2,84%) 2,84% (S par rapport à 75,77%)
Esbert 2017	16 46,XY	N ou A ou OA ou O ou T	GD + MACS	13,18,21,X,Y	Annexine V- : 1017 Annexine V+ : 1020	Aneuploïdie : 0,59% Diploïdie : 0,5% (S par rapport à Annexine V-) Aneuploïdie : 0,75% Diploïdie : 1,19% (S par rapport à Annexine V+)	NR
Kim 2017	18	I	SU GD	X,Y	Ejaculat : au minimum 300 spz SU : au minimum 300 spz GD : au minimum 300 spz	Spermatozoïdes normaux 99,3% 98,5% 99%	analyse 300 spz par halosperm assay 27% 9,7% (S par rapport 27%) (S par rapport à 27,8%) 27,8% (S par rapport 9,7%) (NS par rapport à 27%)

N : normozoospermie, O : oligozoospermie, T : térazoospermie, A : asthénozoospermie, D : anomalies spermatiques diverses
 AH : liaison à l'acide hyaluronique, MSOME : motile sperm organelle morphology examination, GD : gradient de densité, ZS : Zech-selector, MACS : Magnetic activated cell sorting
 NS : non significatif, S : significatif, Spz : spermatozoïde, NR : Non réalisé

Les porteurs d'une anomalie chromosomique de structure forment un groupe particulier d'hommes infertiles qui produisent un taux élevé de spermatozoïdes présentant un déséquilibre chromosomique dans leur éjaculat (Vegetti, Van Assche et al. 2000). Pour les hommes porteurs d'une translocation robertsonienne, le mode alterne est le seul qui conduit à la production de spermatozoïdes chromosomiquement normaux ou équilibrés. Les patients P1, P2 et P3 ont produit respectivement 79,99%, 83,37% et 78,06% de gamètes issus du mode alterne. Pour le patient P4, nous avons trouvé que seulement 41,47% de ses gamètes étaient issus du mode alterne. Nos résultats sont cohérents avec ceux de la littérature (Scriven, Flinter et al. 2001, Anton, Blanco et al. 2004, Roux, Tripogney et al. 2005).

Les hommes porteurs d'une translocation réciproque équilibrée produisent entre 18,6% et 80,7% de spermatozoïdes normaux ou équilibrés (Morel, Douet-Guilbert et al. 2004, Anton, Vidal et al. 2007, Wiland, Hobel et al. 2008, Perrin, Caer et al. 2009), ce qui corrobore nos résultats. La technique FISH est fréquemment utilisée pour l'analyse de la ségrégation méiotique dans les spermatozoïdes d'hommes porteurs d'une translocation (Estop, Cieply et al. 1997, Escudero, Lee et al. 2000) afin d'estimer le nombre de spermatozoïdes déséquilibrés chez chaque patient, fournissant ainsi des informations sur les risques pour la reproduction. En effet, dans les couples où l'homme est porteur d'une translocation, il y a un risque élevé de fausses couches répétées et de naissances d'enfants présentant des anomalies chromosomiques (Stern, Pertile et al. 1999, Munné, Sandalinas et al. 2000). Il semble donc important d'éliminer les spermatozoïdes déséquilibrés afin de réduire ces risques.

A notre connaissance, seules cinq publications ont étudié l'apport de techniques de sélection des spermatozoïdes normaux ou équilibrés chez des porteurs des anomalies chromosomiques de structures (Tableau 40). Deux études ont évalué le potentiel de la technique (MSOME) pour la sélection des spermatozoïdes normaux ou équilibrés. Cassuto et al ont évalué le taux de spermatozoïdes déséquilibrés dans l'éjaculat total et après la technique MSOME chez 9 porteurs de translocation (6 hommes porteurs d'une translocation réciproque et 3 hommes porteurs d'une translocation robertsonienne) (Cassuto, Hazout et al. 2011). Une autre étude a été menée chez 6 hommes porteurs d'une translocation réciproque (Chelli, Ferfour et al. 2013). Les deux études ont conclu que la technique MSOME ne permettait pas de sélectionner les spermatozoïdes normaux ou équilibrés chez les hommes présentant une anomalie chromosomique constitutionnelle. Cependant, Vozdova et al ont évalué les effets des techniques de swim-up et de liaison à l'acide hyaluronique sur la sélection de spermatozoïdes déséquilibrés chez 9 hommes porteurs de translocation réciproque équilibrée. Ils ont identifié une diminution significative des spermatozoïdes déséquilibrés après ces méthodes (Vozdova,

Kasikova et al. 2012). En 2014, une étude a rapporté une diminution de 63,6% à 52,3% de spermatozoïdes déséquilibrés après un traitement du sperme par simple gradient de densité chez un porteur d'une translocation réciproque équilibrée, avec la naissance par insémination intra-utérine d'un enfant présentant la translocation paternelle (Rouen, Hyon et al. 2014). Une autre étude plus récente a évalué le potentiel de sélection de spermatozoïdes normaux ou équilibrés par un HOS-test chez 15 hommes porteurs de translocation (10 hommes porteurs d'une translocation réciproque équilibrée et 5 hommes porteurs d'une translocation robertsonienne). Dans cette étude, une diminution importante de la proportion de spermatozoïdes déséquilibrés après sélection a été observée (Rouen, Carlier et al. 2017). Néanmoins, cette technique est compliquée et son interprétation est difficile et parfois subjective. Notre étude est la première du genre à évaluer le taux de spermatozoïdes normaux ou équilibrés et de spermatozoïdes déséquilibrés après MACS dans les deux fractions d'annexine V- et d'annexine V+ chez les patients porteurs d'une anomalie chromosomique de structure. Par rapport à l'éjaculat, nous avons observé une augmentation significative des spermatozoïdes normaux ou équilibrés dans la fraction annexine V- et une diminution significative dans la fraction annexine V+. De plus, Il existe toujours une différence significative lorsque nous comparons les deux fractions.

Nous avons également analysé l'impact de cette technique MACS sur les différents modes de ségrégation induisant la formation de spermatozoïdes déséquilibrés. Pour les porteurs de translocation robertsonienne, les modes de ségrégation produisant des spermatozoïdes déséquilibrés sont le mode adjacent et le mode 3:0. Chez les porteurs de translocation réciproque, les spermatozoïdes déséquilibrés résultent généralement du mode adjacent I puis du mode adjacent II puis du mode 3:1 et enfin du mode 4:0 (Morel, Douet-Guilbert et al. 2004). Nos résultats sont cohérents avec ces données, sauf pour P6, P9 et P12, où le mode de ségrégation prédominant produisant des spermatozoïdes déséquilibrés était le mode 3:1. Ce phénomène a déjà été rapporté dans d'autres études (Morel, Douet-Guilbert et al. 2004, Brugnon, Van Assche et al. 2006).

Concernant les différents modes de ségrégation méiotique produisant des spermatozoïdes déséquilibrés, nous avons toujours constaté une différence significative entre les fractions annexine V- et annexine V+, toujours en faveur de l'annexine V- avec une diminution significative des spermatozoïdes déséquilibrés. Il n'y a donc pas de sélection préférentielle en fonction du type de déséquilibre chromosomique.

Tableau 40 : FISH sur spermatozoïdes sélectionnés chez des hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure

Publication	Patients	Sélection	FISH			Fragmentation (TUNEL)			
			Nombre spermatozoïdes	Gamètes normaux / équilibrés (%)	Significativité	Nombre spermatozoïdes	Résultat		
Cassuto 2011	6 trans rec	MSOME	Ejaculat trans rec : 250	37,1% à 52,6%					
			MSOME trans rec						
			Classe 1 : 30 à 50	23,4% à 59,6%		NS			
			Classe 2 : 30 à 50	35,5% à 64%		NS			
			Classe 3 : 30 à 50	38,3% à 51,7%		NS			
			Ejaculat trans rob : 250	70% à 88,6%					
			MSOME trans rec						
			Classe 1 : 30 à 50	80,4% à 84,9%		NS			
Classe 2 : 30 à 50	82,6% à 87,3%		NS						
Classe 3 : 30 à 50	73,7% à 82,4%		NS						
Vozdova 2012	9 trans rec 3 trans rob 9 N, 1 OA, 2 T	SU AH	Ejaculat trans rec : 1000	44,6%			Sperm Chromatin Structure Assay		
			SU : 1000	45,5%		NS			
			AH : 1000	49,1%		S (par rapport à éjaculat)	Ejaculat : 5000 SU : 5000 AH : non étudié	11,9% 3,1% (S)	
			Ejaculat trans rob : 3000	82,5%		NS			
			SU : 3000	83,5%		NS			
			Etude de « l'effet interchromosomique » 7/8/13/18/21/X/Y 10000 spermatozoïdes						
			Diminution signification après SU par rapport à l'éjaculat disomie 18, disomie XY et diploïdie						
Chelli 2013	6 trans rec 1 N, 8 D	MSOME Sélection ICSI	Ejaculat : 1000	57,2%					
			MSOME : 82	53,7%		NS			
			Sélection « ICSI » : 126	56,3%		NS			
			Etude de « l'effet interchromosomique » X/Y/18						
			Ejaculat : 936	disomie 1,9%					
MSOME : 90	disomie 1%		NS						
Sélection « ICSI » : 113	disomie 3,4%		NS						
Rouen 2014	1 trans rec	GD	Ejaculat	36,4%					
			GD	47,7%					

Rouen 2017	10 trans rec 5 trans rob	HOS-test	Ejaculat : 500	23% à 84,2%	
	12 N, 2 OA, 1 OAT		HOS-test		
			A : 50	24% à 78%	NS
			B : 20	56% à 99,1%	NS
			B+ : 20	69% à 100%	S (par rapport à l'éjaculat)
			C : 20	24% à 90%	NS
			D/E : 25	10% à 88%	NS
			F : 30	23% à 82%	NS
			G : 70	12,2% à 75%	NS

trans rec : translocation réciproque équilibrée, trans rob : translocation robertsonienne, N : normozoospermie, O : oligozoospermie, T : térazozoospermie, A : asthénozoospermie, D : anomalies spermatiques diverses

AH : liaison à l'acide hyaluronique, MSOME : motile sperm organelle morphology examination, SU : swim-up, GD : gradient de densité, HOST-test : hypo-osmotic swelling test, MACS : Magnetic activated cell sorting, NS : non significatif, S : significatif

III. Application de MACS en AMP

Les avantages de la technique MACS sont sa simplicité et sa haute spécificité pour sélectionner une population bien déterminée de spermatozoïdes. De plus, Grunewald et al indiquent que cette technique ne présente pas d'effet délétère ou magnétique sur les spermatozoïdes suite à leur passage dans la colonne de séparation (Grunewald, Reinhardt et al. 2009). Les microbilles n'affecteraient pas la viabilité cellulaire et sont biodégradables (Miltenyi, Muller et al. 1990). Plusieurs auteurs ont rapporté que la sélection de spermatozoïdes par MACS améliore le taux de fécondation, le taux de segmentation, le taux d'embryons de bonne qualité, le taux d'implantation et le taux de grossesse après ICSI (Dirican, Ozgun et al. 2008, Sheikhi, Jalali et al. 2013, Ziarati, Tavalae et al. 2018). Depuis 2010, de nombreux enfants en bonne santé ont été conçus après utilisation de MACS comme technique de sélection de sperme avec ICSI (Rawe, Boudri et al. 2010, Herrero, Delbes et al. 2013). De plus, en 2017, Romany et al ont mené un essai contrôlé randomisé sur 237 couples avec enfants nés vivants conçus par l'association de MACS et ICSI. Ils ont conclu qu'il n'y avait pas de différence notable entre les événements obstétricaux et périnataux lors de l'utilisation de MACS (Romany, Garrido et al. 2017). Néanmoins, se pose encore la question des effets à long terme sur la santé et le développement de ces enfants. Par ailleurs, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour vérifier l'innocuité de cette technique.

C. Expression différentielle des gènes des spermatozoïdes : mise au point de technique d'étude du transcriptome

L'étude du transcriptome des spermatozoïdes humains éjaculés par microarray est plus délicate que celle des cellules somatiques, ceci du fait des caractéristiques spécifiques du sperme humain. Les spermatozoïdes sont des cellules haploïdes hyper-différenciées transcriptionnellement inactives (Grunewald, Paasch et al. 2005) présentant une faible quantité d'ARN (Miller, Ostermeier et al. 2005). De plus, le sperme humain ne contient pas seulement des spermatozoïdes mais également d'autres cellules somatiques telles que les leucocytes, les cellules épithéliales et les cellules germinales qui possèdent une quantité d'ARN 200 fois plus grande que celles des spermatozoïdes (Jodar, Selvaraju et al. 2013). Ainsi, une étape de purification et un protocole d'extraction d'ARN optimal sont indispensables (Tableau 41).

I. Purification

Afin d'avoir une purification efficace de spermatozoïdes à partir du sperme, plusieurs méthodes ont été décrites dans la littérature. Certaines études utilisent le gradient de densité tel que le Percoll ou le PureSperm (Dadoune, Pawlak et al. 2005, Cappallo-Obermann, Schulze et al. 2011, Bonache, Mata et al. 2012, Montjean, De La Grange et al. 2012, Goodrich, Anton et al. 2013, Mao, Goodrich et al. 2013). Ces gradients assurent la séparation des cellules en fonction de leur densité. Les spermatozoïdes, plus denses que les cellules somatiques, se retrouvent dans le culot. D'autres études utilisent la lyse des cellules somatiques. La solution de lyse est composée de 0,1% de SDS et de 0,5% de Triton X-100 (Ostermeier, Goodrich et al. 2005a, Ostermeier, Goodrich et al. 2005b, Goodrich, Johnson et al. 2007, Platts, Dix et al. 2007, Lalancette, Platts et al. 2009, Linschooten, Van Schooten et al. 2009, Mao, Goodrich et al. 2013, Metzler-Guillemain, Victorero et al. 2015) ou de 0,05% SDS et de 0,25% de Triton X-100 (Bianchi, Stermer et al. 2018). Quelle est donc la technique qui permet de récupérer un maximum de spermatozoïdes purifiés ? Mao et al (2013) ont montré que l'utilisation du gradient PureSperm permet de récupérer 63,2% des spermatozoïdes alors que la lyse des cellules somatiques permet d'en récupérer 89,4%.

Nous avons testé ces deux méthodes sur 10 spermes frais. Cinq échantillons ont été purifiés par gradient et cinq échantillons ont été purifiés par lyse. Le taux moyen de récupération des spermatozoïdes était respectivement de 73,4% et 49,1%. Les deux techniques ont également

été appliquées séquentiellement sur cinq éjaculats frais. Le taux moyen de récupération des spermatozoïdes était de 65,2%. Nous avons également testé les deux méthodes sur 10 échantillons congelés. Le taux moyen de récupération des spermatozoïdes était respectivement de 89% et 78% après gradient et après lyse. Les deux techniques ont également été appliquées séquentiellement sur 12 éjaculats congelés. Le taux moyen de récupération des spermatozoïdes était de 73,2%.

Dans la littérature, la technique de préparation du sperme par swim-up a également été testée (Garcia-Herrero, Garrido et al. 2010a). Cette méthode permet de sélectionner les spermatozoïdes les plus mobiles suite à une migration ascendante dans un milieu de culture capacitant et d'éliminer les bactéries, le plasma séminal, les cellules somatiques et les spermatozoïdes anormaux et/ou peu mobiles. Par conséquent, les spermatozoïdes récupérés après swim-up ne sont pas représentatifs de l'échantillon initial. En effet, selon notre expérience, le taux moyen de récupération des spermatozoïdes après swim-up était très faible (9,6%).

Par ailleurs, plusieurs études ont tenté de combiner séquentiellement deux méthodes de purification (Ostermeier, Dix et al. 2002, Jodar, Kalko et al. 2012, Montjean, De La Grange et al. 2012, Bansal, Gupta et al. 2015). Néanmoins, dans toutes ces études le taux moyen de récupération des spermatozoïdes n'a pas été indiqué.

II. Extraction de l'ARN spermatique

Dans la littérature, deux méthodes ont été utilisées pour extraire les ARN des spermatozoïdes purifiés.

La première consiste à extraire grâce à la formation de phases et précipitation (TRizol, guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform (GITC)) (Ostermeier, Dix et al. 2002, Dadoune, Pawlak et al. 2005, Garcia-Herrero, Garrido et al. 2010a, Garcia-Herrero, Meseguer et al. 2010b, Garcia-Herrero, Garrido et al. 2011, Montjean, De La Grange et al. 2012) ; et la seconde grâce à des colonnes de purification d'affinité (Kit Qiagen; kit Marcherey-Nagel ou kit mirVana miRNA isolation) (Ostermeier, Goodrich et al. 2005a, Ostermeier, Goodrich et al. 2005b, Goodrich, Johnson et al. 2007, Lalancette, Platts et al. 2009, Bonache, Mata et al. 2012, Jodar, Kalko et al. 2012, Metzler-Guillemain, Victorero et al. 2015, Bianchi, Stermer et al. 2018). La combinaison entre ces deux méthodes a également été utilisée (Linschooten, Van Schooten et al. 2009).

Récemment, Barragan et al (2015) ont comparé deux techniques d'extraction de l'ARN spermatique RNeasy Mini kit, kit Qiagen *versus* thiocyanate de guanidinium - phénol-chloroforme. Ils n'ont trouvé aucune preuve que ces méthodes d'extraction affectent la stabilité, la quantité et la qualité de l'ARN (Barragan, Martinez et al. 2015).

Dans notre étude, nous avons testé deux kits d'extraction (kit RNeasy plus Mini et kit NucleoSpin RNA XS) sur des spermatozoïdes purifiés à partir d'éjaculats frais et congelés de dix hommes. Les deux kits ont été testés sur les mêmes échantillons. Le rendement de récupération d'ARN était beaucoup plus élevé avec le kit NucleoSpin RNA XS qu'avec le kit RNeasy plus Mini aussi bien pour les éjaculats frais (47,8 ng/10⁶ spermatozoïdes *vs* 23,4 ng/10⁶ spermatozoïdes respectivement) que pour les éjaculats congelés (43,2 ng/10⁶ spermatozoïdes *vs* 4,32 ng/10⁶ spermatozoïdes respectivement).

Tableau 41 : Revue de la littérature des étapes utilisées pour la préparation d'ARN spermatique dans le cadre de l'étude transcriptomique

Référence	Population étudiée	Swim-up	Purification Gradient	Lyse	Extraction de l'ARN spermatique			Microscope	Evaluation de la pureté		RT-PCR
					TRizol/ GITC	Qiagen	Marcherey- Nagel	mirVana miRNA isolation	Bioanalyseur	PCR	
Ostermeier <i>et al.</i> 2002	9 éjaculats d'hommes fertiles*		Percoll 40:80 (2×)	Triton X-100	GITC				×	x**	•PRM-2
Ostermeier <i>et al.</i> 2005a 2005b	Hommes fertiles			SDS et Triton X-100		×			×		•PRM-2 •PRM-2
Wang <i>et al.</i> 2004	Hommes asthénozoospermiques***								×		
Dadoune <i>et al.</i> 2005	Donneurs sains nomnozoospermiques****		Pure-Sperm 90:45		TRizol				×		
Platts <i>et al.</i> 2007	Hommes tératozoospermiques polymorphes			SDS et Triton X-100	?	?				×	
Lalancette <i>et al.</i> 2009	Donneurs fertiles			SDS et Triton X-100		×					•PRM-1 •CD45/CD34/CD4 •E-ca dhérine •C-kit •SEMG1/SEMG2 •MSMB •PIP
Linschooten <i>et al.</i> 2009	Hommes fumeurs vs hommes non fumeurs			SDS et Triton X-100	TRizol	×			×	×	
Gamido <i>et al.</i> 2009	Hommes infertiles nomnozoospermiques*****				TRizol				×		•CD45
Garcia-Herrero <i>et al.</i> 2010a	Hommes infertiles	×			TRizol						
Garcia-Herrero <i>et al.</i> 2010b	Echec IIU				TRizol						
Garcia-Herrero <i>et al.</i> 2011	Echec ICSI				TRizol				×	×	
Bonache <i>et al.</i> 2012	Donneurs nomnozoospermiques effectuant IIU		Percoll 90:65				×				•PRM-2 •E-ca dhérine •PTPRC •SYCP3 et MSH4

Bonache <i>et al.</i> 2012	Donneurs normozoospermiques effectuant IIU		Percoll 90:65			×				•PRM-2 •E-ca dhérine •PTPRC •SYCP3 et MSH4
Jodar <i>et al.</i> 2012	Hommes asthénozoospermiques		Percoll 50%	SDS et Triton X-100		×		×	×	•PRM-1 •CD45 •mtDLOOP
Montjean <i>et al.</i> 2012	Hommes oligozoospermiques	×	Percoll 90:45		TRizol				×	•PRM-2
Metzler-Guillemain <i>et al.</i> 2015	Hommes fumeurs vs hommes non fumeurs			SDS et Triton X-100		×			×	•PRM-2 •CD45 •E-ca dhérine •C-kit
Bansal <i>et al.</i> 2015	Hommes fertiles, infertilité idiopathique, asthénozoospermiques		Percoll 88:44	SDS et Triton X-100	TRizol			×	×	•E-ca dhérine
Article techniques										
Goodrich <i>et al.</i> 2007				SDS et Triton X-100		×		×		•PRM-2 •PRM-2
Goodrich <i>et al.</i> 2013			Pure-Sperm 50%			×		×	×	•PRM-1 •PRM-1
Mao <i>et al.</i> 2013	4 échantillons		Pure-Sperm 50%			×		×		•PRM-1 •SEM1/SEM2/ MSMB/PIP •CD34/CD45 •E-ca dhérine •KIT
	4 échantillons			SDS et Triton X-100						
Georgiadis <i>et al.</i> 2015	83 échantillons 18 échantillons 18 échantillons	×	Percoll 50:90		TRizol	×			×	
Bianchi <i>et al.</i> 2018	343 hommes infertiles âgés de 18 à 55 ans			0,05% SDS et 0,25% Triton X-100			×		×	•PRM-2 •CD45 •CDH1

*pool de 19 testicules, **analyse d'électrophorèse, ***<1 lymphocyte dans un champ à fort grossissement (×40), ****concentration de lymphocytes et de cellules germinales immatures < 1%, *****concentration de leucocytes < 1×10⁶ /ml. GITC : guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform

III. Evaluation de la pureté de l'ARN spermatique

La vérification d'absence de contamination est indispensable. Elle peut se faire à l'aide d'un microscope optique et/ou par biologie moléculaire (Ostermeier, Dix et al. 2002, Wang, Zhou et al. 2004, Dadoune, Pawlak et al. 2005, Goodrich, Johnson et al. 2007, Linschooten, Van Schooten et al. 2009, Garcia-Herrero, Garrido et al. 2011, Jodar, Kalko et al. 2012, Mao, Goodrich et al. 2013, Bansal, Gupta et al. 2015).

Certaines études ont évalué la quantité d'ARN à l'aide du Nanodrop (Nanodrop technologies, Wilmington, USA) et sa qualité à l'aide d'un Bioanalyseur Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), tandis que d'autres n'utilisaient que le Bioanalyseur pour les deux mesures (Platts, Dix et al. 2007, Linschooten, Van Schooten et al. 2009, Garcia-Herrero, Garrido et al. 2011, Jodar, Kalko et al. 2012, Montjean, De La Grange et al. 2012, Goodrich, Anton et al. 2013, Bansal, Gupta et al. 2015, Metzler-Guillemain, Victorero et al. 2015, Bianchi, Stermer et al. 2018). Contrairement aux autres types de cellules, les spermatozoïdes sont dépourvus d'ARN ribosomique et par conséquent, ne contiennent pas les sous-unités ribosomiques 18S et 28S (Goodrich, Anton et al. 2013). Ainsi, la valeur de RIN (RNA Integrity Number) basée sur la présence des sous-unités 18S et 28S ne peut pas être calculé. Malgré cela le Bioanalyseur reste très utile pour vérifier la pureté de l'ARN du sperme.

Nous avons testé la pureté de l'ARN spermatique à l'aide du Bioanalyseur Agilent 2100. La persistance de l'ARNr 18S et / ou 28S a toujours été identifiée pour les échantillons de spermatozoïdes traités uniquement par lyse ou par gradient.

Certaines études ont vérifié l'absence d'ADN génomique par PCR en utilisant les amorces PRM1 ou PRM2 (Ostermeier, Goodrich et al. 2005a, Goodrich, Johnson et al. 2007, Lalancette, Platts et al. 2009, Goodrich, Anton et al. 2013). Après avoir confirmé l'élimination de l'ADN génomique, la qualité de l'ARN a parfois été évaluée par RT-PCR en utilisant les amorces PRM1 ou PRM2 (Goodrich, Johnson et al. 2007, Lalancette, Platts et al. 2009).

Pour le gène PRM1 ou PRM2, la RT-PCR était fréquemment utilisée pour vérifier que les échantillons d'ARN n'étaient pas dégradés (Ostermeier, Dix et al. 2002, Ostermeier, Goodrich et al. 2005b, Goodrich, Johnson et al. 2007, Lalancette, Platts et al. 2009, Bonache, Mata et al. 2012, Montjean, De La Grange et al. 2012, Goodrich, Anton et al. 2013, Mao, Goodrich et al. 2013, Metzler-Guillemain, Victorero et al. 2015, Bianchi, Stermer et al. 2018). De plus, pour des marqueurs spécifiques, la RT-PCR a également été réalisée pour vérifier l'absence d'ARN provenant de cellules somatiques. Les marqueurs les plus couramment utilisés étaient le CD45

pour les leucocytes, le CDH1 pour les cellules épithéliales et C-KIT pour les cellules germinales testiculaires (Lalancette, Platts et al. 2009, Bonache, Mata et al. 2012, Jodar, Kalko et al. 2012, Mao, Goodrich et al. 2013, Metzler-Guillemain, Victorero et al. 2015, Bianchi, Stermer et al. 2018).

Dans notre étude, la pureté de l'ARN spermatique a été testée en utilisant les deux approches, le Bioanalyseur et la RT-PCR, sur 11 échantillons. Une concordance parfaite a été trouvée entre les deux techniques. Pour les études futures, l'évaluation de la pureté des ARN spermatiques se fera surtout avec le Bioanalyseur 2100 car cette méthode est plus rapide et surtout moins consommatrice d'ARN que la RT-PCR.

IV. Validation de base des données de microarray

Après mise au point de la technique du transcriptome dans notre laboratoire, nous avons réussi à obtenir un profil transcriptomique interprétable de 7 échantillons de sperme d'hommes normozoospermiques. Dans ces échantillons, nous avons détecté 27 784 transcrits. Nous avons identifié 900 transcrits des 1 000 transcrits les plus exprimés dans les spermatozoïdes selon Sendler et al. (Sendler, Johnson et al. 2013). Nous avons identifié des transcrits des gènes impliqués dans plusieurs processus biologiques, notamment dans :

- La spermatogenèse telle que les transcrits des gènes PRM1, PRM2, TNP1 et TNP2 qui sont impliqués dans le remodelage de la chromatine spermatique.
- La croissance et la différenciation cellulaire telles que les transcrits des gènes SPO11, HSPA2, SPATA33 et STRA8 impliqués dans le processus méiotique. En effet, il a été rapporté que la perturbation des gènes SPO11, HSPA2 chez la souris, peut induire l'arrêt de la méiose au stade prophase I (Dix, Allen et al. 1997, Smirnova, Romanienko et al. 2006). Les transcrits des gènes DAZL et DAZ 1 et 2 sont impliqués dans la formation et la différenciation des cellules germinales. Les transcrits des gènes BRWD1 et TAF7L sont impliqués respectivement dans la différenciation des spermatides et la régulation de la spermiogenèse.
- La mobilité, la capacitation des spermatozoïdes et la fécondation avec les transcrits des gènes AKAP4, CABYR, IQCF1, CLGN, CALR3 et LDHC.
- L'embryogenèse avec les transcrits des gènes TDGF1, NANOG, SOX2, POU5F1, STAT4. Les protéines issues de ces gènes sont des facteurs de transcription qui régulent la division et la prolifération cellulaire. Les transcrits des gènes FOXG1, WNT5A et WNT4

sont impliqués dans le développement embryonnaire. Il a été rapporté que la protéine FOXG1 joue un rôle dans la structuration précoce de l'embryon, la protéine WNT5A est impliquée dans la différenciation cellulaire associée à la morphogénèse embryonnaire et la protéine WNT4 est impliquée dans la signalisation de la progestérone lors de l'implantation embryonnaire et la décidualisation (Krawetz 2005, Dadoune 2009, Franco, Dai et al. 2011).

En conclusion, nous avons mis au point au laboratoire un protocole fiable et reproductible afin d'étudier le transcriptome des spermatozoïdes. Ce protocole est détaillé dans la Figure 53.

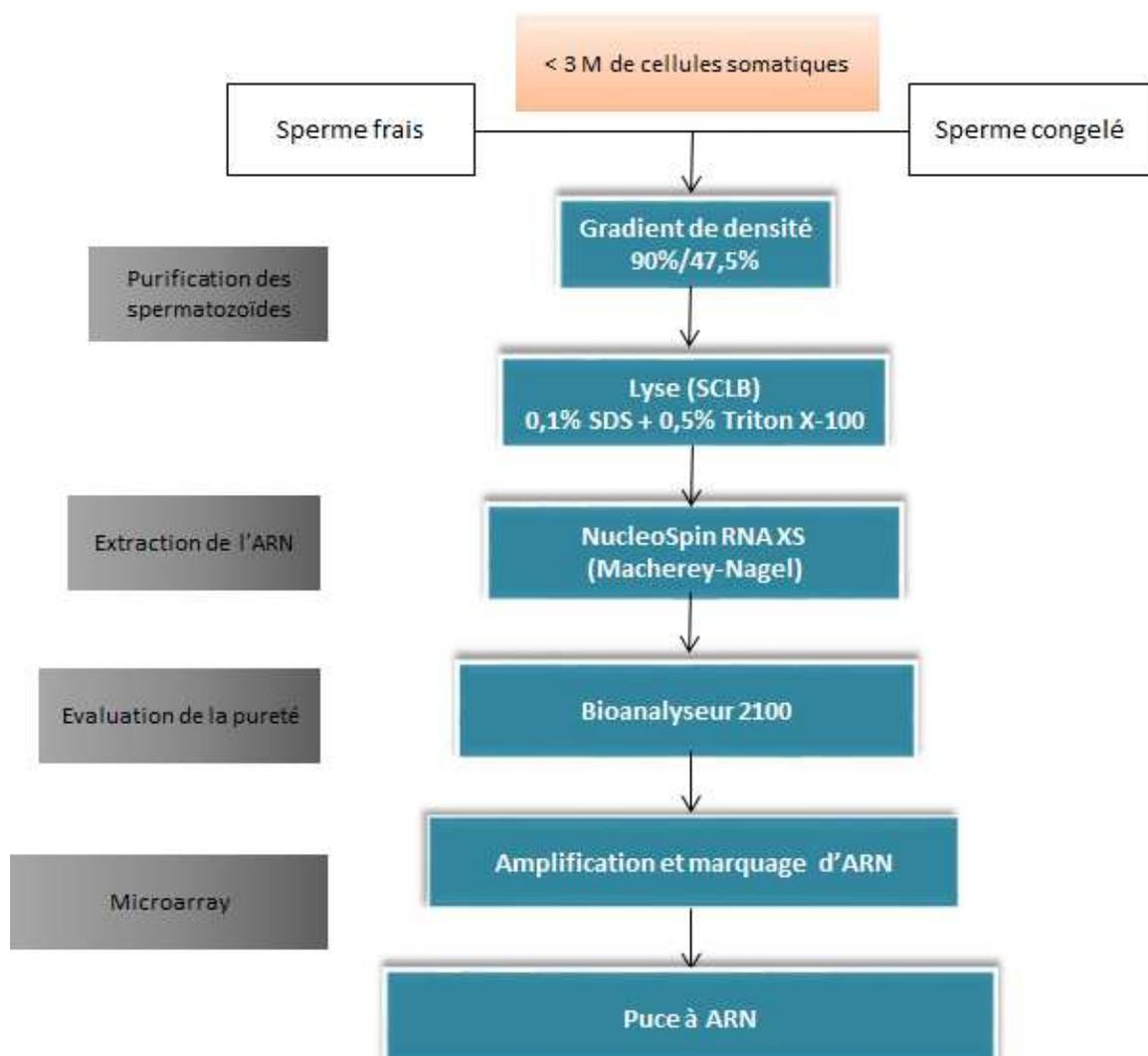


Figure 53 : Schéma du protocole de l'étude du transcriptome dans les spermatozoïdes

Conclusion et perspectives

Les travaux menés au cours de ces quatre années de thèse nous ont permis dans une première partie de déterminer les paramètres qui influencent les résultats de FIV et d'ICSI à plusieurs stades : fécondation, transfert d'embryons (jour de transfert) et grossesse chimique. Cette étude a concerné 194 cycles de FIV et 586 cycles d'ICSI. Pour notre population, l'âge maternel, le nombre d'ovocytes ponctionnés et matures sont les principaux facteurs dont il faut tenir compte. Nos résultats sont cohérents avec ceux de la littérature. Chez l'homme, ni l'âge ni les paramètres spermatiques (numération et mobilité) tels qu'ils sont décrits dans la pratique quotidienne, ne sont significativement associés à l'échec des techniques d'AMP. Cependant, la morphologie du spermatozoïde injecté a une influence sur la fécondation en ICSI.

Concernant la qualité embryonnaire, seul le stade de segmentation est influencé par l'âge maternel et le nombre d'ovocytes matures. Concernant le jour de transfert, quelle que soit la technique d'AMP utilisée, les meilleurs taux de grossesse ont été obtenus suite à un transfert à J4/5. Il serait intéressant d'ajuster nos stratégies de choix du jour de transfert. La prolongation de la culture embryonnaire jusqu'à J5 pourrait être une approche plus judicieuse pour une identification plus précise des embryons de meilleure qualité présentant une grande probabilité de réussite pour l'implantation. Néanmoins, les couples devant recevoir un transfert à J5 devraient être informés du risque d'annulation du cycle.

Cette étude rétrospective nous a permis d'avoir nos propres valeurs dans notre centre d'AMP et d'établir notre propre seuil. Certaines données non renseignées de façon systématique dans le dossier du couple n'ont pu être étudiées telles que l'indice de masse corporelle (IMC) de l'homme. De plus, des auteurs ont mis en évidence l'effet de l'IMC de l'homme sur l'infertilité (Campbell, Lane et al. 2015). Wu et al ont montré que l'IMC élevé avait une influence sur le taux de fécondation (Wu, Lu et al. 2015). Anifandis et al ont montré que même en l'absence de corrélation entre l'IMC des hommes et les paramètres spermatiques, l'IMC élevé avait un effet négatif sur la qualité embryonnaire (Anifandis, Dafopoulos et al. 2013). Il serait intéressant d'étudier ce paramètre paternel dans notre population.

L'influence des paramètres paternels et maternels sur la grossesse clinique, le taux de fausses couches et le taux de malformations sera étudiée. D'autres paramètres comme les indications de l'infertilité du couple, le bilan hormonal et le mode de vie seront inclus.

L'impact de la qualité de l'ADN spermatique sur les résultats obtenus en AMP a été étudié sur 31 couples. Cet effectif ne nous permet pas d'identifier une association entre ces deux

paramètres et ne nous permet pas également de tirer une conclusion finale. Une analyse sur une population plus grande sera réalisée.

Dans une deuxième partie de la thèse nous avons étudié la fragmentation de l'ADN et le contenu chromosomique avant et après le tri cellulaire à l'aide de microbilles magnétiques chez les hommes ayant un taux de fragmentation de l'ADN anormal et chez les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique constitutionnelle. Les résultats du tri de spermatozoïdes à l'aide de microbilles sont encourageants. Le tri aboutit à une sélection de spermatozoïdes de meilleure qualité du point de vue du taux d'aneuploïdie chez les hommes présentant un taux anormal de fragmentation de l'ADN spermatique et chez les hommes porteurs d'une mosaïque gonosomique. Cette même étude sera effectuée chez d'autres hommes porteurs d'une mosaïque gonosomique afin de valider cet effet.

Concernant les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure, nous avons identifié une diminution significative des spermatozoïdes apoptotiques, des spermatozoïdes avec une fragmentation de l'ADN et des spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés. Du point de vue fondamental, les résultats obtenus dans cette étude confirment notre hypothèse d'apoptose abortive puisque les spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés sont retenus dans la colonne (population annexine V+), correspondant aux spermatozoïdes ayant externalisé les phosphatidylsérines, phénomène précoce de l'apoptose. Les spermatozoïdes ayant un déséquilibre chromosomique sont majoritairement ceux dont l'ADN est fragmenté.

Dans notre étude, le processus apoptotique est évalué à l'aide de deux marqueurs (l'externalisation des phosphatidylsérines et la fragmentation de l'ADN). Cependant, ce processus demande l'intervention de plusieurs voies de signalisation. Plusieurs auteurs ont rapporté la présence de facteurs impliqués dans les voies de signalisation de l'apoptose dans les spermatozoïdes tels que les récepteurs Fas, caspase 3, caspase 8, caspase 9, AKT1 (AKT serine/threonine kinase 1), AKT2 (AKT serine/threonine kinase 2), AIFM1 (apoptosis inducing factor mitochondria associated 1) (Said, Paasch et al. 2004, Taylor, Weng et al. 2004, Rasoulpour, DiPalma et al. 2006, Wundrich, Paasch et al. 2006, Shaha, Tripathi et al. 2010). L'étude du niveau d'expression génétique des différentes voies de signalisation de l'apoptose sera réalisée sur les spermatozoïdes de la fraction annexine V- et de la fraction annexine V+ afin de mieux comprendre le déroulement du processus apoptotique chez les hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure.

Par ailleurs, du point de vue clinique, le tri cellulaire aboutissant à une sélection de spermatozoïdes de meilleure qualité (moins d'anomalies chromosomiques et ADN non fragmenté) pourrait s'avérer une technique de référence pour l'assistance médicale à la procréation chez ces hommes porteurs d'une anomalie chromosomique constitutionnelle. Néanmoins, à ce jour nous ne connaissons pas encore les risques éventuels que peuvent causer le champ magnétique dans lequel passent les spermatozoïdes. Y-aurait-il un risque pathologique pour le futur enfant ?

En effet dans la littérature plusieurs auteurs ont rapporté l'efficacité du tri magnétique à réduire le taux des marqueurs apoptotiques (Said, Agarwal et al. 2006), le taux de spermatozoïdes à morphologie anormale (Zahedi, Tavalae et al. 2013), le taux de fragmentation (Lee, Liu et al. 2010, Berteli, Da Broi et al. 2017) et le taux d'aneuploïdie (Vendrell, Ferrer et al. 2014, Esbert, Godo et al. 2017). Néanmoins, aucune étude n'a tenté de déterminer l'effet du champ magnétique sur l'épigénétique des spermatozoïdes sélectionnés. Il sera intéressant d'étudier ce paramètre.

Dans une troisième partie de la thèse nous avons décrit la mise au point de l'étude du transcriptome dans les spermatozoïdes au sein du laboratoire de Cytogénétique, Inserm U1078. En fait, l'étude du transcriptome présente trois grandes étapes avant l'hybridation d'ARN sur la puce et l'analyse des données. La première étape consiste en une purification des spermatozoïdes à partir du sperme éjaculé permettant d'éliminer totalement les cellules somatiques en gardant le plus possible de spermatozoïdes. Cette étape nécessite la combinaison de centrifugation en gradient de densité et de lyse de cellules somatiques. La seconde étape consiste en une extraction efficace de la faible quantité d'ARN spermatique à l'aide du kit NucleoSpin RNA xs (Marcherey-Nagel). Enfin la troisième étape correspond à l'évaluation de la qualité et de la quantité d'ARN extrait par une méthode de biologie moléculaire utilisant le Bioanalyseur. La méthodologie que nous avons développée est particulièrement adaptée aux analyses transcriptomiques des spermatozoïdes. Nous avons avec cette méthode pu obtenir des profils génétiques de sperme frais et congelé d'hommes normozoospermiques. Dans un prochain projet, cette technique sera utilisée pour comparer les profils d'ARNm entre sperme frais et congelé sur des prélèvements appariés afin de déterminer l'effet de la cryoconservation sur l'expression différentielle des gènes des spermatozoïdes.

De plus, l'étude de l'expression différentielle des gènes des spermatozoïdes par microarray chez les couples ayant des échecs ou des succès de FIV et/ou d'ICSI serait intéressante à

réaliser. Une comparaison entre les différents profils transcriptomiques des groupes pourrait être effectuée :

- Echec de fécondation en FIV *vs* succès de fécondation en FIV
- Echec d'implantation en FIV *vs* succès d'implantation en FIV
- Echec de fécondation en ICSI *vs* succès de fécondation en ICSI
- Echec d'implantation en ICSI *vs* succès d'implantation en ICSI.

Ainsi, ces comparaisons nous permettraient de déterminer des profils prédictifs pour les méthodes d'AMP. Elles pourraient donc nous aider à trouver une explication des échecs des techniques d'AMP.

Annexes

Annexe 1 : Résultats des taux de fragmentation de l'ADN spermatique chez 31 patients en FIV/ICSI

Patient	Taux de fragmentation de l'ADN (%)
P1	13,6
P2	4,16
P3	18,2
P4	16
P5	15,4
P6	11,6
P7	10,2
P8	9,8
P9	16,2
P10	12
P11	19,6
P12	14,4
P13	6,4
P14	16
P15	8,8
P16	10,2
P17	11
P18	22
P19	3,6
P20	13,2
P21	9,8
P22	8,35
P23	2,8
P24	7,5
P25	5,4
P26	2,4
P27	9,2
P28	15,6
P29	12,8
P30	1,4
P31	8,35

Annexe 2 : Solutions

- **Techniques BACs**

- **Milieu Luria Bertini (LB) / chloramphénicol :**

8 g de LB + 400 ml H₂O distillée + 800 µl de chloramphénicol à 10 mg/ml

- **Milieu LB / Agar 1% / chloramphénicol :**

8 g de LB + 5 g d'Agar + 400 ml H₂O distillée + 800 µl de chloramphénicol à 10 mg/ml

- **GTE 10X :**

45,05 g de glucose + 125 ml de Tris-HCl 250 mM pH=8 + 100 ml d'EDTA 100 mM pH=8 + H₂O distillée (qsp 500 ml)

- **GTE 1X :**

4 ml de GTE 10X + une pincée de lysozyme + H₂O distillée (qsp 40 ml)

- **SDS 1% / NaOH 0,2 N :**

1 ml de SDS 10% + 200 µl de NaOH 10 N + H₂O distillée (qsp 10 ml)

- **Acétate de potassium 3 M / Acide acétique :**

12,3 g acétate de K + 29,5 ml acide acétique + 20 ml H₂O (Ajuster le pH à 4,8 en ajoutant alternativement du NaOH 10 N et de l'H₂O jusqu'à l'obtention d'un volume de 100 ml).

- **EDTA 0,5 M :**

93,05 g d'EDTA + 400 ml H₂O distillée + ajustement du pH à 8 + H₂O distillée (qsp 500 ml)

- **Tris-HCl 1 M :**

78,8 g de Tris-HCl + 500 ml H₂O distillée

- **TE 10X :**

10 ml de Tris-HCl 1 M pH=7,5 + 2 ml d'EDTA 0,5 M pH=8 + H₂O distillée (qsp 100 ml)

- **TE 1X :**

5 ml de TE 10X + H₂O distillée (qsp 50 ml)

- **Chlorure de lithium (LiCl) 5M :**

26,49 g de LiCl + 6,25 ml de Tris-HCl 1 M pH=7,5 + H₂O distillée (qsp 125 ml)

- **Acétate d'ammonium 7,5 M :**

144,53 g d'acétate d'ammonium + 250 ml H₂O distillée

- **Technique FISH**

- **Alcool 70° :**

300 ml d'alcool 100° + 144 ml H₂O distillée

- **Alcool 90° :**

400 ml d'alcool 100° + 52 ml H₂O distillée

- **2X SSC :**

100 ml de 20X SSC + 900 ml H₂O distillée

- **4X SSC :**

200 ml de 20X SSC + 800 ml H₂O distillée

- **2X SSC/0,4%NP40 :**

400 µl de NP40 + 99,6 ml de 2X SSC

- **2X SSC/0,1% NP40 :**

100 µl de NP40 + 99,9 ml de 2X SSC

- **0,4X SSC/0,3% NP40 :**

300 µl de NP40 + 99,7 ml de 4X SSC

- **PBS 1X :**

100 ml de PBS 10X + 900 ml H₂O distillée

- **NaOH 10 N :**

200 g de NaOH + 500 ml H₂O distillée

- **NaOH 1 N :**

10 ml NaOH 10M + 90 ml H₂O distillée

- **Fluorochrome :**

Solution mère : fluorochrome sous forme lyophilisée + 50 µl H₂O distillée

Solution de travail : 10 µl de solution mère + 40 µl d'eau distillée

- **Technique TUNEL**

- **Elongation :**

31,5 µl de Reaction Buffer + 13,5 µl de TdT enzyme

- **Arrêt de l'élongation :**

1,8 ml Stop/wash Buffer + 58,2 ml H₂O distillée

- **Révélation de l'élongation :**

22,5 µl de Bloking Solution + 20,5 µl Anti-Digoxigenin-Rhodamine

- **Technique tri magnétique**

- **BB 1X :**

500 µl BB 20X + 9,5 µl H₂O distillée

- **Technique du transcriptome sur spermatozoïdes**

- **Gradient 47,5% :**

525 µl Isolate Sperm Separation Medium 90% + 225 µl RPMI + 250 µl Tyrode's Salt Solution

- **Solution de lyse :**

100 µl SDS 10% + 50 µl Triton X-100 + 9,85 ml H₂O distillée

- **Kit Qiagen**

600 µl de RLT Plus + 60 µl de DTT 0,1M

- **Kit Macherey-Nagel**

100 µl de Buffer RA1 + 2 µl de TCEP

1 µl de Carrier RNA Stock Solution + 99 µl de Buffer RA1

3 µl de rDNase + 27 µl de Reaction Buffer for rDNase

Annexe 3 : Photos des résultats des analyses microscopiques

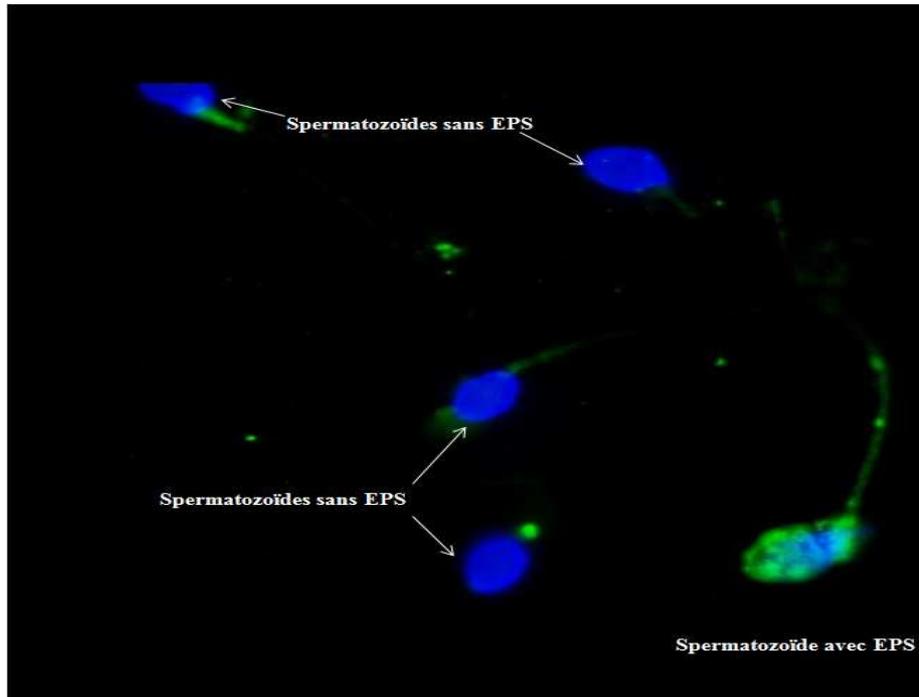


Photo 1 : Spermatozoïdes après marquage avec de l'annexine V-FITC

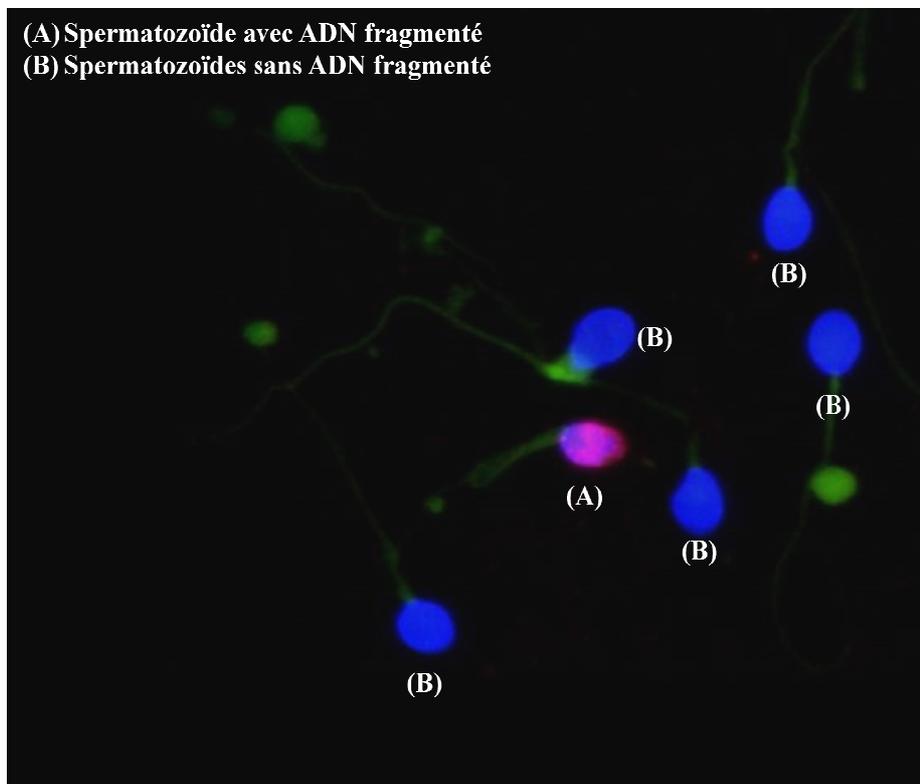


Photo 2 : Spermatozoïdes après la technique TUNEL

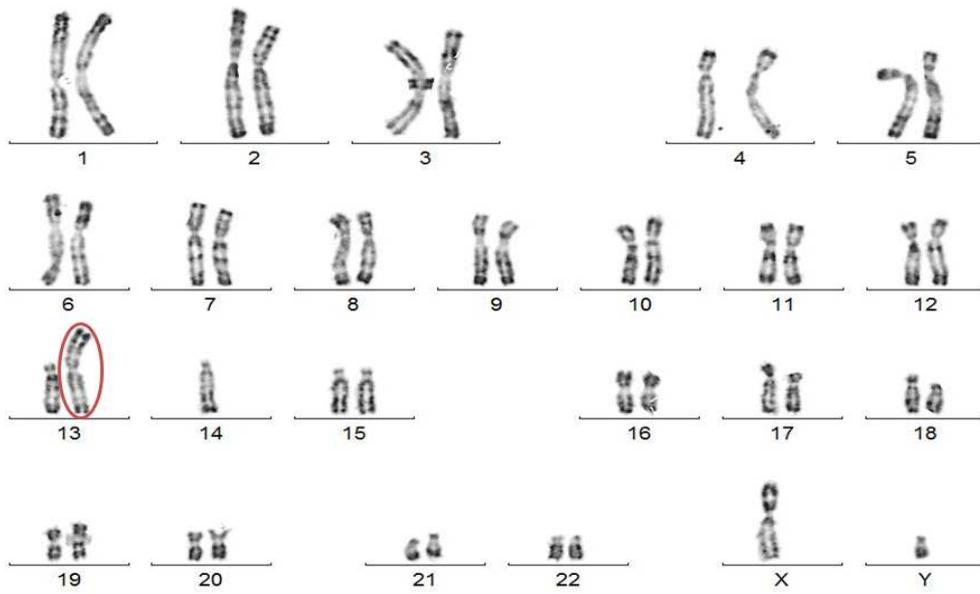


Photo 3 : Caryotype d'un patient porteur d'une translocation robertsonienne, 45,XY,rob(13;14)(q10;q10)

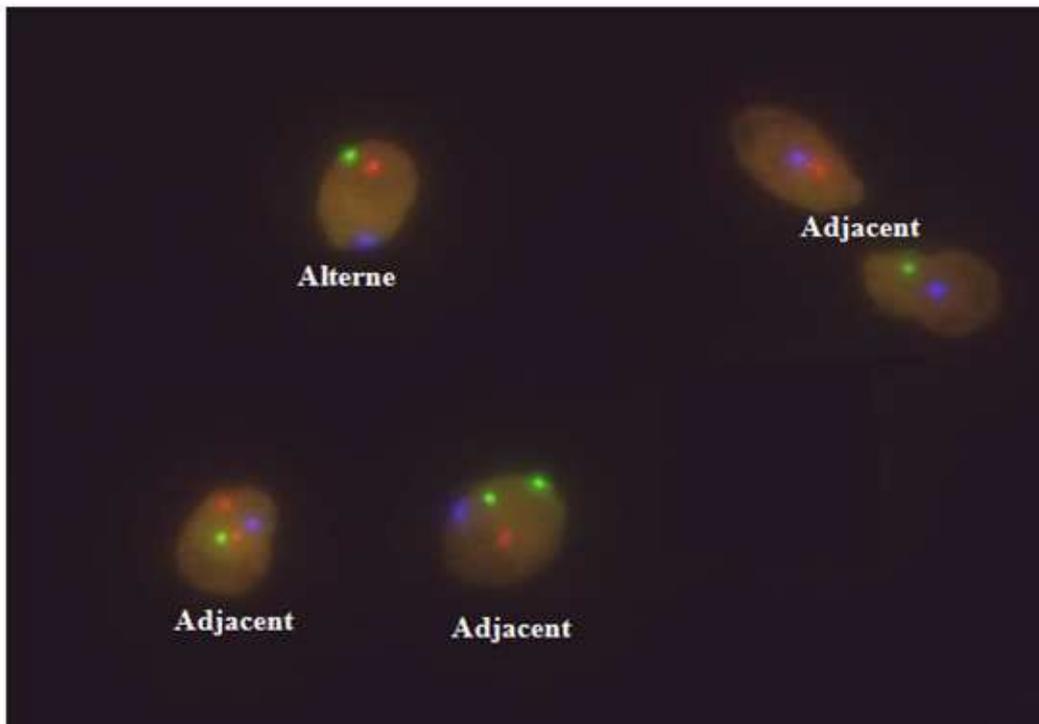


Photo 4 : FISH sur spermatozoïdes de l'éjaculat total du patient (P3) porteur d'une translocation robertsonienne, avec un pool de BACs localisés en 13q33.3 (Green), en 14q32.33 (Orange) et la sonde CEP 8 (Aqua)

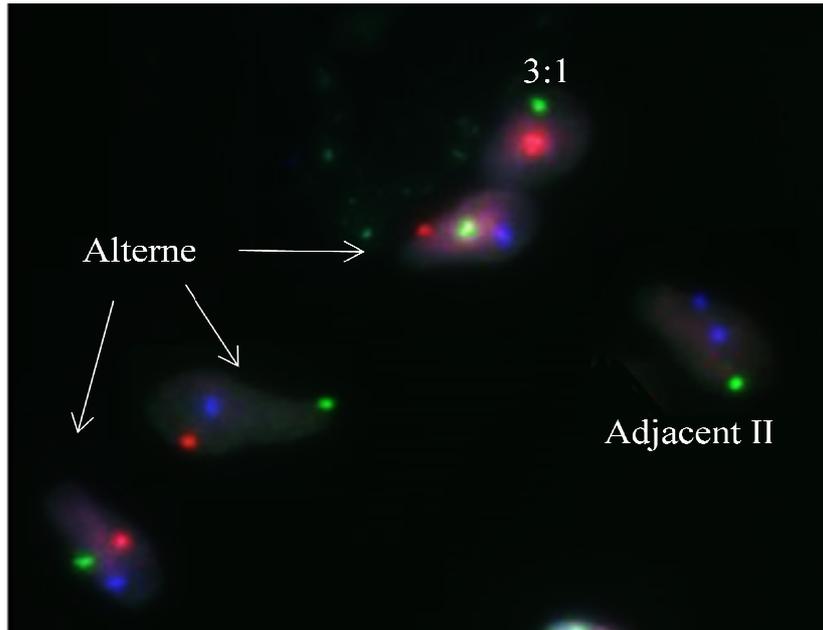


Photo 5 : FISH sur spermatozoïdes de l'éjaculat total du patient (P11) porteur d'une translocation réciproque équilibrée, avec un pool de BACs localisés en 2p25.3 (Green), en 2q37.3 (Orange) et en 9q34.12-q34.13 (Aqua)

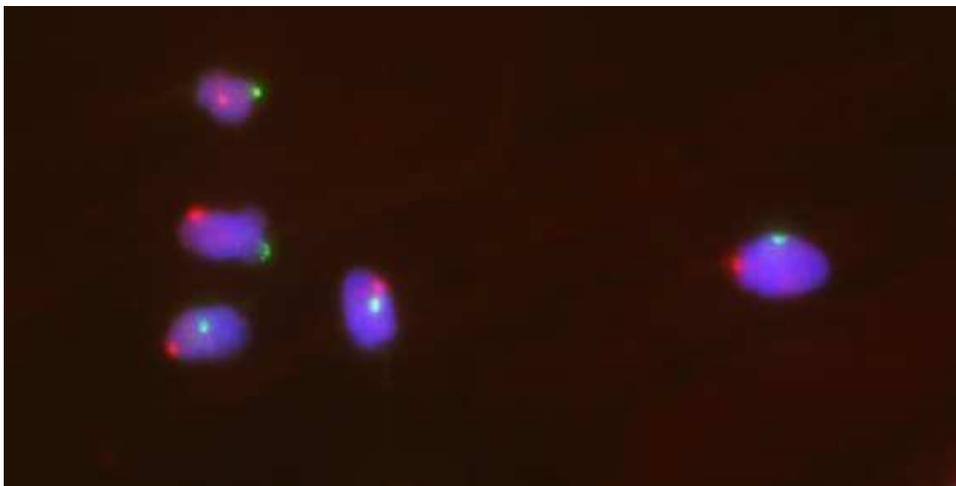


Photo 6 : FISH 13,21 sur spermatozoïdes de l'éjaculat total du patient (P1) présentant un taux anormal de fragmentation de l'ADN, avec un pool de BACs localisés en 13q33.3 (Green) et en 21q22.11 (Orange)

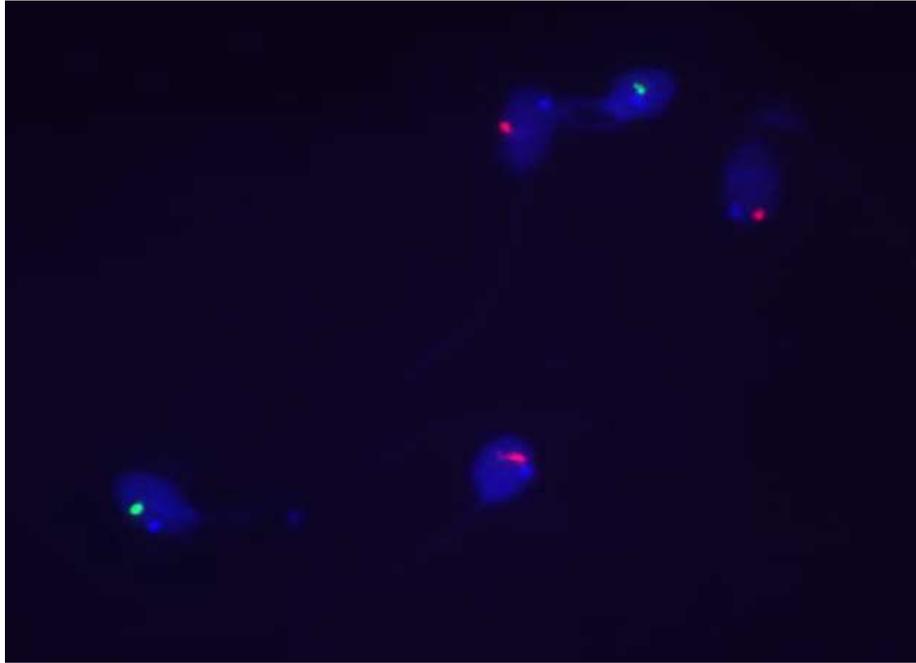


Photo 7 : FISH X,Y,18 sur spermatozoïdes de l'éjaculat total du patient (P1) présentant un taux anormal de fragmentation de l'ADN, avec les sondes CEP X (Green), CEP Y (Orange) et CEP 18 (Aqua)

Annexe 4 : Publications

Article 1 : **El Fekih, S.**, Nguyen, M.-H., Perrin, A., Beauvillard, D., Morel, F., Saad, A., Ben Ali, H., and De Braekeleer, M. (2017). Sperm RNA preparation for transcriptomic analysis: Review of the techniques and personal experience. *Andrologia* 49.

Accepted: 19 October 2016

DOI: 10.1111/and.12767

ORIGINAL ARTICLE

WILEY **ANDROLOGIA**

Sperm RNA preparation for transcriptomic analysis: Review of the techniques and personal experience

S. El Fekih^{1,2,3†} | M.-H. Nguyen^{1,2†} | A. Perrin^{1,2,4} | D. Beauvillard^{1,2,4} | F. Morel^{1,2,4} | A. Saad³ | H. Ben Ali³ | M. De Braekeleer^{1,2,4}

¹Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Brest, Brest, France

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

³Laboratoire de Cytogénétique, Génétique Moléculaire et Biologie de la Reproduction Humaines, CHU Farhat Hached Sousse, Université de Monastir, Monastir, Tunisia

⁴Service de Cytogénétique et Biologie de la Reproduction, Hôpital Morvan, CHRU Brest, Brest, France

Correspondence

Frédéric Morel, Laboratoire de Cytogénétique, Hôpital Morvan, CHRU Brest, Brest Cedex, France.
Email: frederic.morel@univ-brest.fr

Summary

In the last 10 years, several approaches, including microarrays, have been applied to investigate sperm transcript levels. However, success using microarray profiling is highly dependent of the quality of the RNA obtained. Therefore, the development of methods that deliver highly purified and intact RNA is of utmost importance. The three steps used to achieve this goal, purification of spermatozoa, RNA extraction and evaluation of RNA quality, are reviewed. Following that review and preliminary experiments, we processed sperm samples from seven normozoospermic men with a combination of gradient centrifugation and somatic cell lysis. RNA was extracted using the NucleoSpin RNA XS kit (Macherey-Nagel) and its purity checked using the BioAnalyzer. Hybridisation was done on Agilent SurePrint G3 Human GE 8 × 60K V2 microarrays. We identified 900 transcripts among the 1000 high abundance sperm transcripts reported in the literature. These genes are known to be involved in several biological processes, notably spermatogenesis, transcription regulation, cell growth and differentiation, sperm motility and capacitation, fertilisation, and embryogenesis. Therefore, our methodology is highly suitable for sperm transcriptomic analyses and can be used, notably, to compare mRNA profiles between fertile and infertile males.

KEYWORDS

microarray, RNA isolation, RNA quality, sperm purification, sperm RNA

1 | INTRODUCTION

As Ostermeier, Dix, Miller, Khatri, and Krawetz (2002) have shown that the transcriptionally inert mature spermatozoa contained a complex population of RNAs, several groups tried to elucidate the nature of these RNAs and how they could affect fertility (Ostermeier et al., 2002). In the last 10 years, several approaches, including microarrays, have been applied to investigate sperm transcript levels.

These studies led to a better understanding of sperm mRNA complexity and allowed the identification of gene expression profile in various populations of males, including men with idiopathic infertility

(Garcia-Herrero et al., 2010a; Garrido et al., 2009), teratozoospermia (Platts et al., 2007), oligozoospermia (Montjean et al., 2012), asthenozoospermia (Jodar, Kalko, Castillo, Balleca, & Oliva, 2012; Wang et al., 2004), cryptorchidism (Nguyen, Delaney, & Kolon, 2009) or exposed to genotoxic molecules (Linschooten et al., 2009; Metzler-Guillemain et al., 2015). Other studies tried to identify sperm gene expression signature in couples experiencing pregnancy or not following different assisted reproductive technologies (Bonache, Mata, Ramos, Bassas, & Larriba, 2012; Garcia-Herrero et al., 2010b, 2011; Garrido, Garcia-Herrero, & Meseguer, 2013).

However, success using microarray profiling is highly dependent of the quality of the RNA obtained. Therefore, the development of methods that deliver highly purified and intact RNA is of utmost

[†]Both authors share first authorship and equally contributed to the study.

importance. Three steps to achieve this goal can be identified: purification of spermatozoa, RNA extraction and evaluation of RNA quality.

In this article, we review the various methods reported in the literature to achieve this goal and present the methodology we adopted at the Laboratory of Reproductive Biology of the CHRU Brest. Finally, we report the transcriptomic results obtained on sperm samples from seven normozoospermic men to validate the methodology used in Brest.

2 | PURIFICATION OF SPERMATOZOA

Besides spermatozoa, the ejaculate also contains somatic cells, including germ cells, leucocytes and epithelial cells. Furthermore, a spermatozoon contains far less mRNA than a somatic cell (10–50 fg versus 10 pg; Jodar, Selvaraju, Sandler, Diamond, & Krawetz, 2013; Krawetz, 2005; Miller, Ostermeier, & Krawetz, 2005). Therefore, somatic cell removal is essential to resolve the unique pool of sperm transcripts and avoid somatic contamination. Several methods are used to remove somatic cells from the ejaculate (Table 1).

Some studies used gradient centrifugation using Percoll or clinical grade reagents like PureSperm that separates cells as a function of their density (Bonache et al., 2012; Dadoune, Pawlak, Alfonsi, & Siffroi, 2005; Goodrich, Anton, & Krawetz, 2013; Mao et al., 2013; Montjean et al., 2012). This technique removes immotile spermatozoa and somatic cells from the population. As spermatozoa are denser than somatic cells, they migrate to the bottom of the tube and form a pellet.

Other studies lysed somatic cells from the ejaculate with the Somatic Cell Lysis Buffer (SCLB) made of 0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS) and 0.5% Triton X-100 (Goodrich, Johnson, & Krawetz, 2007; Lalancette et al., 2009; Linschooten et al., 2009; Mao et al., 2013; Metzler-Guillemain et al., 2015; Ostermeier, Goodrich, Diamond, Dix, & Krawetz, 2005a; Ostermeier, Goodrich, Moldenhauer, Diamond, & Krawetz, 2005b; Platts et al., 2007). This approach effectively removes nonsperm RNAs. Others combined both methods: discontinuous Percoll gradients followed by somatic cells lysis (Bansal, Gupta, Sankhwar, & Rajender, 2015; Jodar et al., 2012; Ostermeier et al., 2002).

One question to be addressed is whether these two methods yield the same amount of spermatozoa and quality of sperm RNA. Mao et al. (2013) processed four sperm samples with PureSperm or SCLB. The average recovery rate was 63.2% and 89.4% respectively (Mao et al., 2013).

We tested both methods on fresh ejaculates from ten males. Five samples were subjected to gradient centrifugation (90/47.5 gradient and centrifugation at 1,000 g) and five samples to three rounds of lysis with SCLB. The mean recovery rate was 73.4% and 49.1% respectively. Both methods were also sequentially applied on five fresh ejaculates; the mean recovery rate was 65.2%. We also tested both methods on cryopreserved ejaculates from ten males. The mean recovery rate was 89% and 78% for gradient centrifugation and lysis respectively. Both methods were also sequentially applied on 12 cryopreserved ejaculates; the mean recovery rate was 73.2%.

The "swim-up" technique was also used to purify spermatozoa, either isolated (Garcia-Herrero et al., 2010a) or in combination with Percoll gradient (Montjean et al., 2012). This method, used to prepare spermatozoon for intrauterine insemination, selects the more mobile spermatozoa after an ascendant migration in a capacitating culture medium. Garcia-Herrero et al. (2010a) found differences in the gene expression profile of infertile males compared to fertile controls when the analysis was performed on fresh spermatozoon, but not following the "swim-up" technique, suggesting a selection towards a category of spermatozoa. Therefore, the spermatozoa retained following the "swim-up" technique may not be representative of the whole sample. Furthermore, in our experience, the average recovery rate of spermatozoa is very low (9.6%).

These techniques are used to eliminate somatic cells from the samples to be processed by microarrays, but the efficacy in recovering spermatozoa is also very important, mainly in oligozoospermic males. However, few studies gave the recovery rate.

3 | RNA EXTRACTION

Two methods are used to extract RNA from purified spermatozoa (Table 1). One method is based on phase separation and precipitation (TRIzol—guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction; Bansal et al., 2015; Dadoune et al., 2005; Garcia-Herrero et al., 2010a, b, 2011; Garrido et al., 2009; Montjean et al., 2012) and the other on spin column-based purification (RNeasy from Qiagen or NucleoSpin RNA from Macherey-Nagel; Bonache et al., 2012; Goodrich et al., 2007, 2013; Jodar et al., 2012; Lalancette et al., 2009; Mao et al., 2013; Metzler-Guillemain et al., 2015; Ostermeier et al., 2005a, b). One study combined both methods (TRIzol and RNeasy; Linschooten et al., 2009). None of these studies tried to determine whether a method or a kit was more effective in recovering RNA from spermatozoa.

Barragan et al. (2015) determined a set of reference genes messenger RNA in human spermatozoa using two different sperm RNA extraction methods (RNeasy mini kit, Qiagen versus guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction). They found no evidence that isolation method affects RNA stability, quantity and quality.

We tested both kits (RNeasy plus Mini kit and NucleoSpin RNA XS kit) on spermatozoa purified from fresh and cryopreserved ejaculates from ten males. Both kits were assayed on the same samples. The yield of RNA recovery was similar in fresh and cryopreserved ejaculates using the NucleoSpin RNA XS kit (47.8 ng versus 43.2 ng/10⁶ spermatozoa, respectively), but much higher than with the RNeasy plus Mini kit (23.4 ng versus 4.32 ng/10⁶ spermatozoa respectively).

4 | EVALUATION OF SPERM RNA PURITY

Sperm RNAs need to be devoid of contaminant RNAs from somatic cells. Two approaches have been used (Table 1). The first approach is a microscopic examination following purification to ensure that no

TABLE 1 Review of the literature of the steps used for sperm RNA preparation for transcriptomic analysis

Reference	Studied population	Sperm purification				RNA extraction			RNA purity evaluation			
		Swim-up	Gradient	Lysis	Trizol/ GITC	Qagen kit	Maclurey-Nagele kit	Microscopy	Bioanalyzer	PCR	RT-PCR	
Ostameier et al. (2002)	Fertile men		Percoll 40:80 (2x)	Triton X-100	GITC			x	x*			• PRIM-2
Ostameier et al. (2005b)	Fertile men			SDS & Triton X-100		x						• PRIM-2
Ostameier et al. (2005a)												PRIM-2
Wang et al. (2004)	Asthenozoospermic men ^A											
Didjone et al. (2005)	Normozoospermic donor men ^A		PureSperm 90:45		Trizol							
Platts et al. (2007)	Teratozoospermic men			SDS & Triton X-100	?	?						
Lalanotte et al. (2009)	Fertile donor men			SDS & Triton X-100		x						• PRIM-1 • CD45/CD84/CD4 • E-cadherin • C-kit • SEMG1/SEMG2 • MSMB • PIP
Linschooten et al. (2009)	Smoker vs nonsmoker men			SDS & Triton X-100	Trizol	x						
Garrido et al. (2009)	Normozoospermic infertile men ^A				Trizol							CD45
García-Herrero et al. (2010a)	Infertile men	x			Trizol							
García-Herrero et al. (2010b)	IUI failure				Trizol							
García-Herrero et al. (2011)	ICSI failure				Trizol							
Bonache et al. (2012)	Normozoospermic donor men for IUI		Percoll 90:65									• PRIM-2 • E-cadherin • PTPRC • SYCP3 & MSH4

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Reference	Studied population	Sperm purification			RNA extraction			RNA purity evaluation			
		Switch-up	Gradient	Lysis	TRIzol/ GITC	Qiagen kit	Magwell-y-Nagel kit	Microscopy	Bioanalyzer	PCR	RT-PCR
Jodar et al. (2012)	Asthenozoospermic men		Percoll 50%	SDS & Triton X-100	*	*	*	*	*	*	PRM-1 CD45 mDLOOP
Montjean et al. (2012)	Oligozoospermic men	*	Percoll 90-45		TRIzol			*	*	*	PRM-2
Matzler-Gulkeimain et al. (2013)	Smoker vs. nonsmoker men			SDS & Triton X-100	*	*		*	*	*	PRM-2 CD45 E-cadherin C-kit
Bansal et al. (2015)	Fertile men, idiopathic infertile men, asthenozoospermic men		Percoll 88-44	SDS & Triton X-100	TRIzol			*	*	*	E-cadherin
Technical articles											
Goodrich et al. (2007)				SDS & Triton X-100	*	*		*	*	*	PRM-2
Goodrich et al. (2013)			PureSperm 50%		*	*		*	*	*	PRM-1
Mao et al. (2013)	4 samples		PureSperm 50%		*	*		*	*	*	PRM-1 SEMGLUSEMG27 MSMB/pip CD34/CD45 E-cadherin KIT
	4 samples			SDS & Triton X-100							

*Electroporation analysis.

^b>1 lymphocyte in a microscopic field ($\times 40$).^cLymphocyte and immature germ cell concentration <1%.^dLeucocyte concentration $<1 \times 10^6$ /ml.

somatic cells are left in the sperm pellet. This evaluation has been used alone (Dadoune et al., 2005; Wang et al., 2004) or in conjunction with at least another technique (Bansal et al., 2015; Garcia-Herrero et al., 2011; Goodrich et al., 2007, 2013; Jodar et al., 2012; Linschooten et al., 2009; Mao et al., 2013; Ostermeier et al., 2002).

The second approach, following RNA extraction, relies on a spectrophotometric RNA measurement or molecular biology methods (RT-PCR). Some workers assessed the RNA quantity using a Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop technologies, Wilmington, USA) and the quality using an Agilent BioAnalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) while others only used the BioAnalyzer for both measurements (Bansal et al., 2015; Garcia-Herrero et al., 2011; Goodrich et al., 2013; Jodar et al., 2012; Linschooten et al., 2009; Metzler-Guillemain et al., 2015; Montjean et al., 2012; Platts et al., 2007). In contrast to other cell types, spermatozoa are depleted in ribosomal RNA (rRNA) and, therefore, do not contain the 18S and 28S ribosomal

subunits (Goodrich et al., 2013). Thus, the RNA Integrity Number (RIN) that is based on the presence of 18S and 28S subunits cannot be calculated. However, the BioAnalyzer is still useful to check the sperm RNA purity (absence of 18S and 28S subunits).

We tested the purity of sperm RNA with the Agilent 2100 BioAnalyzer. Persistence of 18S and/or 28S rRNA was always shown for sperm samples processed by somatic cell lysis or gradient centrifugation (Figure 1a). In fact, microscopic examination still identified somatic cells in these samples. Figure 1b, c shows the results obtained by the BioAnalyzer in samples processed with a combination of gradient centrifugation and somatic cell lysis. Although no somatic cell was identified under microscopic examination, one sample still showed rRNA contamination (Figure 1b), but not the other (Figure 1c).

A few workers verified the absence of genomic DNA by polymerase chain reaction (PCR) using *PRM1* (protamine 1) or *PRM2* (protamine 2) primers (Goodrich et al., 2007, 2013; Lalancette et al., 2009;

FIGURE 1 Examples of profiles obtained with the 2100 BioAnalyzer. (a) Sample obtained after lysis alone showing persistence of 18S and 28S rRNA. (b) Sample obtained after a combination of lysis and gradient centrifugation showing persistence of 18S rRNA. (c) Sample obtained after a combination of lysis and gradient centrifugation showing absence of rRNA

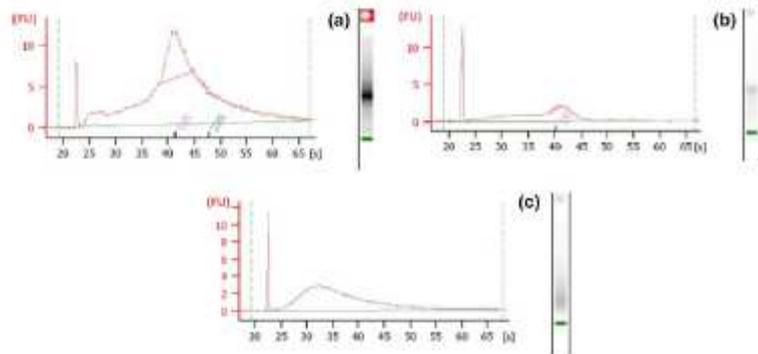


FIGURE 2 Examples of RT-PCR for *PRM2*, *CD45*, *CDH1* and *KIT* obtained in several samples. Samples 1 and 2 show a 149-bp band corresponding to *PRM2* and no somatic contamination. Sample 3 shows a 149-bp band corresponding to *PRM2* and a 847-bp band corresponding to *CD45*, signing a somatic contamination. Sample T is a positive control (total sperm sample) and sample H₂O is a negative control (water). PM is the bp ladder

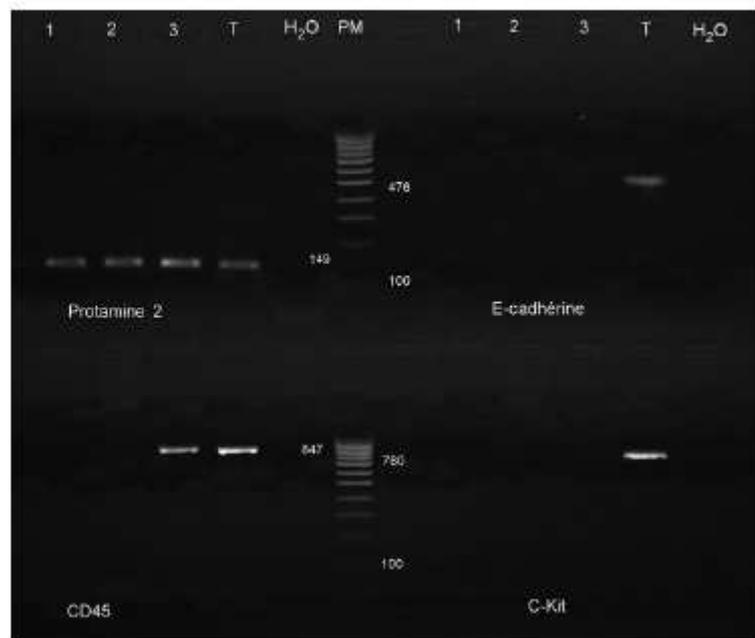


TABLE 2 Genes identified in spermatozoa and involved at different stages of spermatogenesis, fertilisation and embryonic development

Gene	Gene name	Function
Pre-meiotic		
DAZ1	Deleted in azoospermia 1 [NM_004081]	Germ cell formation and differentiation
DAZ2	Deleted in azoospermia 2 [NM_001005796]	
DAZL	Deleted in azoospermia-like [NM_001351]	
IDE	Insulin-degrading enzyme [NM_004969]	Co-regulator of androgen receptor
RFX2	Regulatory factor X, 2 (influences HLA class II expression) [NM_000635]	Transcription factor
NFYA	Nuclear transcription factor Y, alpha [NM_002505]	
SALL4	Spalt-like transcription factor 4 [NM_020436]	Spermatogonia proliferation
SPO11	Meiotic protein covalently bound to DSB [NM_012444]	Involved in meiosis
HSPA2	Heat shock 70 kDa protein 2 [NM_021979]	
SPATA33	Spermatogenesis-associated 33 [Source: HGNC Symbol; Acc:26463]	
STRA8	Stimulated by retinoic acid 8 [NM_182489]	
Post-meiotic		
PRM1	Protamine 1 [NM_002761]	Chromatin compaction
PRM2	Protamine 2 [NM_001286359]	
TNP1	Transition protein 1 [NM_003284]	
TNP2	Transition protein 2 [NM_005425]	
SPANXA1	Homo sapiens sperm protein associated with the nucleus, X-linked, family member A1 [NM_013453]	Expressed in spermatid
BRWD1	Bromodomain and WD repeat domain containing 1 (BRWD1) [NM_033656]	Spermatid differentiation
SPATA31A3	Homo sapiens SPATA31 subfamily A, member 3 [NM_001083124]	Involved in acrosome formation
SPATA31D1	Homo sapiens SPATA31 subfamily D, member 1 [NM_001001670]	
SPATA31D4	Homo sapiens SPATA31 subfamily D, member 4 [NM_001145197]	
SPATA32	Homo sapiens spermatogenesis-associated 32 [NM_152343]	
TAFL7L	TAFL7-like RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 50 kDa [NM_024885]	Regulation of spermiogenesis
ZBPB	Zona pellucida binding protein [Source: HGNC Symbol; Acc:15662]	Involved in sperm-oocyte interaction
KIF3A	PREDICTED: Kinesin family member 3A [XM_006714526]	Structuration of sperm flagellum
ODF1	Outer dense fibre of sperm tails: 1 [NM_024410]	
BRD2	Bromodomain containing 2 [NM_005104]	Transcriptional regulator
Sperm function		
AKAP4	A kinase (PRKA) anchor protein 4 [NM_003886]	Regulation of sperm motility
CABYR	Calcium binding tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated [NM_012189]	Involved in sperm capacitation
IQCF1	IQ motif containing F1 [BC034228]	
CLGN	Calmegin [NM_004362]	Regulation of sperm fertilising capacity
CALR3	Calreticulin 3 [NM_145046]	
LDHC	Lactate dehydrogenase C [NM_002901]	Involved in sperm motility and capacitation
Involvement at different stages of fertilisation and embryonic development		
AKAP4	A kinase (PRKA) anchor protein 4 [NM_003886]	Post-fertilisation
WNT5A	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A [NM_003392]	Involved in embryogenesis
CLU	Clusterin [NM_001831]	
FOXP1	Forkhead box G1 [NM_005249]	
WNT4	Wingless-type MMTV integration site family, member 4 [Source: HGNC Symbol; Acc:12783]	
HSPB1L1	Heat shock factor binding protein 1-like 1 [NM_001136180]	Involved in embryonic growth
INTS1	Integrator complex subunit 1 [NM_001080453]	

(Continued)

TABLE 2 (Continued)

Gene	Gene name	Function
IGF2	Insulin-like growth factor 2 (somatomedin A) [NM_000612]	Transcription factor
STAT4	Signal transducer and activator of transcription 4 [NM_003151]	
TDGF1	Teratocarcinoma-derived growth factor 1 [NM_003212]	
NANOG	Nanog homeobox [NM_024865]	
SOX2	SRY (sex-determining region Y)-box 2 [NM_003106]	
POU5F1	POU class 5 homeobox 1 [NM_002701]	

Ostermeier et al., 2005a). Upon confirmation of the removal of genomic DNA, RNA quality was sometimes assessed by reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) using the *PRM1* or *PRM2* primers (Goodrich et al., 2007; Lalancette et al., 2009).

RT-PCR for the *PRM1* or *PRM2* gene was frequently used to check that the RNA samples were not degraded (Bonache et al., 2012; Goodrich et al., 2007, 2013; Lalancette et al., 2009; Mao et al., 2013; Metzler-Guillemain et al., 2015; Montjean et al., 2012; Ostermeier et al., 2002, 2005b). We tested the quality of sperm RNA by RT-PCR for *PRM2*. Figure 2 shows the results obtained in samples processed with a combination of somatic cell lysis and gradient centrifugation. All three samples showed a band at 149 bp corresponding to the presence of *PRM2*.

Furthermore, RT-PCR for specific markers was also performed to verify the absence of RNA from somatic cells. The most commonly used markers included CD45 (alias *PTPRC*—protein tyrosine phosphatase, receptor type, C) for leucocytes, *CDH1* (E-cadherin) for epithelial cells and *KIT* (v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog) for testicular germ cells (Bonache et al., 2012; Jodar et al., 2012; Lalancette et al., 2009; Mao et al., 2013; Metzler-Guillemain et al., 2015). We verified the absence of somatic RNA by RT-PCR for *CD45*, *CDH1* and *KIT*. Figure 2 shows the results obtained in samples processed by a combination of somatic cell lysis and gradient centrifugation for which no somatic cells were identified upon microscopic examination. Absence of somatic RNA was confirmed for the first two samples, but the third sample still showed RNA contamination by leucocytes.

Sperm RNA purity was tested using both approaches, BioAnalyzer and RT-PCR, on 11 samples. A perfect concordance was found between both techniques. Samples showing 18S and/or 28S rRNA peaks were positive for one or more somatic marker.

5 | BREST EXPERIENCE

To validate our methodology, we performed RNA microarray on sperm samples from seven normozoospermic men to determine whether our results were consistent with those of the literature. These seven sperm samples were processed with a combination of gradient centrifugation and somatic cell lysis. RNA was extracted using the NucleoSpin RNA XS kit (Macherey-Nagel) and its purity checked using the BioAnalyzer.

Cy3 labelled cRNA was generated from total RNA of patient's spermatozoa, using the One Color Low Input Quick Amp Labeling

(Agilent Technologies) following manufacturer's instructions. Equal amounts of purified Cy3 labelled cRNA were hybridised for 17 hr at 65°C to Agilent SurePrint G3 Human GE 8 × 60K V2 microarrays. The microarrays were washed using the Gene Expression Wash Buffer Kit (Agilent) and scanned using a high-resolution microarray scanner. The data were processed using Feature Extraction software. They were analysed using the GeneSpring GX version 12.5 software (Agilent).

The presence of 27,784 transcripts was detected in our samples. Sendler et al. (2013) used RNA sequencing to characterise the population of coding and noncoding transcripts in human spermatozoon (Sendler et al., 2013). We identified 900 transcripts among the 1,000 high abundance sperm transcripts reported by Sendler et al. These genes are known to be involved in several biological processes, notably spermatogenesis, transcription regulation, cell growth and differentiation, sperm motility and capacitation, fertilisation, and embryogenesis (Table 2).

Microarrays have opened new doors to reveal the causes of infertility in men (Garcia-Herrero et al., 2010a; Garrido et al., 2009, 2013; Jodar et al., 2013; Montjean et al., 2012; Platts et al., 2007; Wang et al., 2004), and it has been found that the molecular requirements for spermatozoon to achieve a pregnancy resulting in a healthy baby are not the same for all assisted reproduction techniques (Garcia-Herrero et al., 2010b, 2011; Garrido et al., 2013). Thus, those results of microarray will not be used only for basic research, but also for clinical applications (Garrido et al., 2013). Moreover, Jodar et al. (2013) using RNA assay technologies including RNA-seq found a very complex population of sperm RNAs comprising rRNA, mRNA and both large and small non-coding RNAs. The authors indicated the important role of comparative animal models will be of use in identifying key transcripts and elucidated their functional role (Jodar et al., 2013) in spite of differences might exist when sperm cells derived from human or other mammalian species.

In conclusion, the methodology we developed is highly suitable for sperm transcriptomic analyses. It will now be used to compare mRNA profiles between fertile and infertile males. It could also be helpful as a diagnostic tool and prognostic value for IVF and ICSI.

REFERENCES

- Bansal, S. K., Gupta, N., Sankhwar, S. N., & Rajender, S. (2015). Differential genes expression between fertile and infertile spermatozoa revealed by transcriptome analysis. *PLoS ONE*, 10(5): e0127007. doi:10.1371/journal.pone.0127007

- Barragan, M., Martinez, A., Lionch, S., Pujol, A., Vernaeve, V., & Vassena, R. (2015). Effect of ribonucleic acid (RNA) isolation methods on putative reference genes messenger RNA abundance in human spermatozoa. *Andrology*, 3, 797–804.
- Bonache, S., Mata, A., Ramos, M. D., Bassas, L., & Larrriba, S. (2012). Sperm gene expression profile is related to pregnancy rate after insemination and is predictive of low fecundity in normozoospermic men. *Human Reproduction*, 27, 1556–1567.
- Dadoue, J. P., Pawlak, A., Alfonsi, M. F., & Siffroi, J. P. (2005). Identification of transcripts by microarrays, RT-PCR and in situ hybridization in human ejaculate spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*, 11, 133–140.
- Garcia-Herrero, S., Garrido, N., Martinez-Conejero, J. A., Remohi, J., Pellicer, A., & Meseguer, M. (2010a). Ontological evaluation of transcriptional differences between sperm of infertile males and fertile donors using microarray analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 27, 111–120.
- Garcia-Herrero, S., Garrido, N., Martinez-Conejero, J. A., Remohi, J., Pellicer, A., & Meseguer, M. (2011). Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. *Reproductive BioMedicine Online*, 22, 25–36.
- Garcia-Herrero, S., Meseguer, M., Martinez-Conejero, J. A., 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. *Fertility and Sterility*, 94, 1360–1373.
- Garrido, N., Garcia-Herrero, S., & Meseguer, M. (2013). Assessment of sperm using mRNA microarray technology. *Fertility and Sterility*, 99, 1008–1022.
- Garrido, N., Martinez-Conejero, J. A., Jauregui, J., Horcajadas, J. A., 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. *Fertility and Sterility*, 91, 1307–1310.
- Goodrich, R. J., Anton, E., & Krawetz, S. A. (2013). Isolating mRNA and small noncoding RNAs from human sperm. *Methods in Molecular Biology*, 927, 385–396.
- Goodrich, R., Johnson, G., & Krawetz, S. A. (2007). The preparation of human spermatozoal RNA for clinical analysis. *Archives of Andrology*, 53, 161–167.
- Jodar, M., Kalko, S., Castillo, J., Ballesta, J. L., & Oliva, R. (2012). Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients. *Human Reproduction*, 27, 1431–1438.
- Jodar, M., Selvaraju, S., Sandler, E., Diamond, M. P., & Krawetz, S. A. (2013). The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs. *Human Reproduction Update*, 19, 604–624.
- Krawetz, S. A. (2005). Paternal contribution: New insights and future challenges. *Nature Reviews Genetics*, 6, 633–642.
- Lalancette, C., Platts, A. E., Johnson, G. D., Emery, B. R., Carrell, D. T., & Krawetz, S. A. (2009). Identification of human sperm transcripts as candidate markers of male fertility. *Journal of Molecular Medicine (Berlin)*, 87, 735–748.
- Linschooten, J. O., Van Schooten, F. J., Baumgartner, A., Cemeli, E., Van, D. J., Anderson, D., & Godschalk, R. W. (2009). Use of spermatozoal mRNA profiles to study gene-environment interactions in human germ cells. *Mutation Research*, 667, 70–76.
- Mao, S., Goodrich, R. J., Hauser, R., Schrader, S. M., Chen, Z., & Krawetz, S. A. (2013). Evaluation of the effectiveness of semen storage and sperm purification methods for spermatozoa transcript profiling. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 59, 287–295.
- Metzler-Guillemain, C., Victorero, G., Lepoivre, C., Bergon, A., Yammine, M., Perrin, J., ... Nguyen, C. (2015). Sperm mRNAs and microRNAs as candidate markers for the impact of toxicants on human spermatogenesis: An application to tobacco smoking. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 61, 139–149.
- Miller, D., Ostermeier, G. C., & Krawetz, S. A. (2005). The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends in Molecular Medicine*, 11, 156–163.
- Montjean, D., De La Grange, P., Gentien, D., Rapinat, A., Belloc, S., Cohen-Bacrie, P., ... Benkhalifa, M. (2012). Sperm transcriptome profiling in oligozoospermia. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29, 3–10.
- Nguyen, M. T., Delaney, D. P., & Kolon, T. F. (2009). Gene expression alterations in cryptorchid males using spermatozoal microarray analysis. *Fertility and Sterility*, 92, 182–187.
- Ostermeier, G. C., Dix, D. J., Miller, D., Khatri, P., & Krawetz, S. A. (2002). Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet*, 360, 772–777.
- Ostermeier, G. C., Goodrich, R. J., Diamond, M. P., Dix, D. J., & Krawetz, S. A. (2005a). Toward using stable spermatozoal RNAs for prognostic assessment of male factor fertility. *Fertility and Sterility*, 83, 1687–1694.
- Ostermeier, G. C., Goodrich, R. J., Moldenhauer, J. S., Diamond, M. P., & Krawetz, S. A. (2005b). A suite of novel human spermatozoal RNAs. *Journal of Andrology*, 26, 70–74.
- Platts, A. E., Dix, D. J., Chemes, H. E., Thompson, K. E., Goodrich, R., Rockett, J. C., ... Krawetz, S. A. (2007). Success and failure in human spermatogenesis as revealed by teratozoospermic RNAs. *Human Molecular Genetics*, 16, 763–773.
- Sandler, E., Johnson, G. D., Mao, S., Goodrich, R. J., Diamond, M. P., Hauser, R., & Krawetz, S. A. (2013). Stability, delivery and functions of human sperm RNAs at fertilization. *Nucleic Acids Research*, 41, 4104–4117.
- Wang, H., Zhou, Z., Xu, M., Li, J., Xiao, J., Xu, Z. Y., & Sha, J. (2004). A spermatogenesis-related gene expression profile in human spermatozoa and its potential clinical applications. *Journal of Molecular Medicine (Berlin)*, 82, 317–324.

How to cite this article: El Fekih S, Nguyen M-H, Perrin A, et al. Sperm RNA preparation for transcriptomic analysis: Review of the techniques and personal experience. *Andrologia*. 2017;00:e12767. <https://doi.org/10.1111/and.12767>

Article 2 : **El Fekih, S.**, Tous, C., Gueganic, N., Brugnon, F., Ben Ali, H., Bujan, L., Moinard., N., Caire-Tetauru, E., Douet-Guilbert, N., Morel, F., Perrin, A. Decrease of spermatozoa with an unbalanced chromosome content after cell sorting in men carrying a structural chromosomal abnormality. Journal of Assisted Reproduction and Genetics (en révision).

Journal of Assisted Reproduction and Genetics
Decrease of spermatozoa with an unbalanced chromosome content after cell sorting in men carrying a structural chromosomal abnormality
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JARG-D-18-00573	
Full Title:	Decrease of spermatozoa with an unbalanced chromosome content after cell sorting in men carrying a structural chromosomal abnormality	
Article Type:	Original Article	
Keywords:	Spermatozoa; magnetic-activated cell separation; DNA fragmentation; chromosomally unbalanced	
Corresponding Author:	Frédéric MOREL, Ph.D INSERM U1078, Université de Bretagne Occidentale Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé de Brest FRANCE	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	INSERM U1078, Université de Bretagne Occidentale Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé de Brest	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Sahar EL FEKIH	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Sahar EL FEKIH	
	Corinne TOUS	
	Nadia GUEGANIC	
	Florence BRUGNON	
	Habib BEN ALI	
	Louis BUJAN	
	Nathalie MOINARD	
	Elodie CAIRE-TETAURU	
	Nathalie DOUET-GUILBERT	
	Frédéric MOREL, Ph.D	
	Aurore PERRIN	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Agence de la BioMédecine ("AMP, diagnostic prénatal et diagnostic génétique" 2015)	Dr Frédéric MOREL
Abstract:	<p>Purpose: To determine if magnetic-activated cell separation could select spermatozoa with lower levels of DNA fragmentation and unbalanced chromosome content in men carrying a structural chromosomal abnormality.</p> <p>Methods: To separate spermatozoa of ten males with a chromosomal rearrangement into two populations using MACS, an annexin V negative and annexin V positive population, in order to study meiotic segregation by FISH, the percentage of apoptotic spermatozoa by annexin V staining and DNA fragmentation by TUNEL on the whole ejaculate and on selected spermatozoa in the same patient.</p> <p>Results: For all patients, the percentage of apoptotic spermatozoa decreased in the fraction of annexinV- and increased in the fraction of annexin V+ as compared to the</p>	

	<p>frozen-thawed semen sample.</p> <p>The rates of DNA fragmentation were statistically much lower in the fraction of annexin V- compared to the rate before MACS except for one patient. Conversely, we observed a statistically significant higher fraction of annexin V+ for 7 patients.</p> <p>After MACS, there was a significant increase of normal/balanced spermatozoa in the fraction of annexin V- for all patients. Conversely, we observed a significant decrease in the fraction of annexin V+ for seven patients.</p> <p>Conclusions: MACS is a promising tool for increasing the selection of healthy spermatozoa, without DNA fragmentation and with a normal or balanced chromosomal content, for use in assisted reproductive technologies such as ICSI, for males with a chromosomal structural abnormality. This tool could reduce the risk of miscarriage and increase the chance of pregnancy achievement.</p>
--	--

Title:

Decrease of spermatozoa with an unbalanced chromosome content after cell sorting in men carrying a structural chromosomal abnormality

Authors and affiliations:

Sahar El Fekih ^{1,2}, Corinne Tous ³, Nadia Gueganic ¹, Florence Brugnon ^{4,5}, Habib Ben Ali ², Louis Bujan ⁶, Nathalie Moinard ⁶, Elodie Caire-Tetauru ³, Nathalie Douet-Guilbert ^{1,3}, Frédéric Morel ^{1,3}, Aurore Perrin ^{1,3}

¹ Laboratoire d'histologie, embryologie et cytogénétique, INSERM U1078, faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Bretagne Occidentale, Brest.

² Laboratoire de cytogénétique, génétique moléculaire et biologie de la reproduction humaines, CHU Farhat Hached Sousse et Université de Monastir, Tunisie.

³ Service de cytogénétique et biologie de la reproduction, CHRU Brest.

⁴ CHU Clermont-Ferrand, AMP, CECOS, Clermont Ferrand.

⁵ IMOST, INSERM 1240, Faculté de Médecine, Clermont Ferrand.

⁶ Groupe de recherche en fertilité humaine, EA 3694, Université Paul Sabatier et CECOS, groupe d'activité de médecine de la reproduction, CHU Toulouse.

Corresponding author:

Frédéric Morel, Service de cytogénétique et biologie de la reproduction, Hôpital Morvan, Bâtiment 5 bis, CHRU Brest, 2, avenue Foch F, 29609 Brest Cedex France.

E-mail address: frederic.morel@chu-brest.fr

FAX : 33-(0)298-22-39-61

Abstract:

Purpose: To determine if magnetic-activated cell separation could select spermatozoa with lower levels of DNA fragmentation and unbalanced chromosome content in men carrying a structural chromosomal abnormality.

Methods: To separate spermatozoa of ten males with a chromosomal rearrangement into two populations using MACS, an annexin V negative and annexin V positive population, in order to study meiotic segregation by FISH, the percentage of apoptotic spermatozoa by annexin V staining and DNA fragmentation by TUNEL on the whole ejaculate and on selected spermatozoa in the same patient.

Results: For all patients, the percentage of apoptotic spermatozoa decreased in the fraction of annexinV- and increased in the fraction of annexin V+ as compared to the frozen-thawed semen sample.

The rates of DNA fragmentation were statistically much lower in the fraction of annexin V- compared to the rate before MACS except for one patient. Conversely, we observed a statistically significant higher fraction of annexin V+ for 7 patients.

After MACS, there was a significant increase of normal/balanced spermatozoa in the fraction of annexin V- for all patients. Conversely, we observed a significant decrease in the fraction of annexin V+ for seven patients.

Conclusions: MACS is a promising tool for increasing the selection of healthy spermatozoa, without DNA fragmentation and with a normal or balanced chromosomal content, for use in assisted reproductive technologies such as ICSI, for males with a chromosomal structural abnormality. This tool could reduce the risk of miscarriage and increase the chance of pregnancy achievement.

Keywords:

Spermatozoa; magnetic-activated cell separation; DNA fragmentation; chromosomally unbalanced

Acknowledgements:

This research was supported by the "Agence de la BioMédecine, France". Some spermatozoa samples were provided by "GERMETHEQUE national biobank (BB-0033-00081; coordination, Toulouse, France".

The authors also thank Dr G LEFORT for her help with the translation of the manuscript.

Capsule:

After magnetic-activated cell separation, we observed a significant decrease of apoptotic spermatozoa, DNA fragmentation and chromosomally unbalanced spermatozoa in the fraction of annexin V-.

Decrease of spermatozoa with an unbalanced chromosome content after cell sorting in men carrying a structural chromosomal abnormality

Introduction

There is a 2-20 times higher probability of having a structural chromosomal abnormality in the infertile male population than in the general population [1, 2]. Robertsonian translocations are the most common structural chromosomal abnormalities observed with an incidence of 1/1085 newborns, and balanced reciprocal translocations are the second most common aberration with an incidence of 1/1175 births [3]. Carriers of a structural chromosome abnormality are phenotypically normal but males can have spermatogenic disruption such as decreased sperm concentration [1, 4] which directs them towards assisted reproductive technologies (ART) through in vitro fertilization (IVF) with Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI). However, the mobility and morphology parameters used to select spermatozoa for ICSI are not predictive of the quality of chromosomal equipment [5]. Due to their increased risk of producing chromosomally unbalanced gametes, these men have at a higher risk of repeated miscarriages and the birth of children with a chromosome abnormality [6, 7]. It would therefore be helpful to select spermatozoa with normal or balanced chromosomal content for ICSI in this group of men.

In a previously published study, we showed that the DNA fragmentation rate depended on the presence of a chromosomal abnormality, and that consequently a structural chromosomal abnormality predicted DNA fragmentation [8]. Some studies have observed significantly higher rates of apoptotic markers in translocation carriers as compared to sperm donors [9]. Several authors have also reported higher aneuploidy levels in spermatozoa with fragmented DNA in infertile 46,XY men with disrupted semen parameters [10-13], suggesting that DNA fragmented spermatozoa were apoptotic cells [12]. More recently, we showed that in men with a constitutional chromosomal abnormality, DNA fragmentation was significantly higher in chromosomally unbalanced spermatozoa than in spermatozoa with a normal or balanced chromosomal content. We hypothesized that the presence of spermatozoa with chromosomal imbalance and/or DNA fragmentation in the ejaculate of males with a chromosome abnormality could be explained by an abortive apoptosis phenomenon initiated in the testis [11, 14]. In the apoptosis process, one of the earliest signs is the externalization of the

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

phosphatidylserine (PS) inner plasma membrane, a phospholipid with a high affinity for annexin V. Magnetic-activated cell separation (MACS) is a technique of spermatozoa selection based on super-paramagnetic microbeads conjugated with annexin V which labels the apoptotic and dead spermatozoa within an external magnetic field. MACS was used to separate sperm into 2 populations: an annexin V negative fraction (spermatozoa without an externalization of PS, or non-apoptotic sperm) and an annexin V positive fraction (spermatozoa with an externalization of PS, or apoptotic spermatozoa) [15-18]. This is a very simple, specific and rapid technique which is known to reduce the level of sperm DNA fragmentation [19, 20]. It highly reduces the proportion of apoptotic spermatozoa in the processed samples [21], and also reduces the level of DNA fragmentation [19, 20, 22]. As a consequence, spermatozoa that have undergone abortive apoptosis should be retained in the column when using annexin V coupled with MACS. Therefore, if our hypothesis of abortive apoptosis is correct, we expect the rate of chromosomally unbalanced spermatozoa to be decreased in the annexin V negative population.

The aim of the present study was to separate spermatozoa of males with a chromosomal rearrangement into two populations using MACS, an annexin V negative and annexin V positive population, in order to study meiotic segregation, the percentage of apoptotic spermatozoa and DNA fragmentation on the whole ejaculate and on selected spermatozoa (annexin V negative *versus* annexin V positive) in the same patient. These analyses will allow us to determine whether there are differences in the levels of chromosomal imbalance, apoptotic cells and DNA fragmentation in annexin V negative and positive populations as compared to the total ejaculate population.

Patients and methods

Patients and sperm parameters

Ten males with a structural chromosome abnormality were included in the study (Table 1). Karyotyping was performed on peripheral blood cultures. For this study straws of cryopreserved semen samples were obtained with the collaboration of different national centers (3 samples from University Hospital of Clermont-Ferrand and 7 samples from the GERMETHEQUE national biobank, BB-0033-00081; coordination: Toulouse, France).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Sperm parameters were evaluated according to World Health Organization recommendations [23].

Our study was approved by the regional Committee for the Protection of Persons (declaration number DC-2008-597; authorization AC-2009-886). All patients gave their informed consent for the study.

Study design and MACS separation

Spermatozoa from frozen semen samples were thawed for 30 min at room temperature, and were washed in 1 ml of BB 1X (Binding Buffer) (Miltenyi Bioec, Paris, France) at 400 x g for 10 minutes to eliminate the cryoprotectant. After centrifugation, the final pellets were resuspended in BB 1X. Sperm DNA slides were prepared for annexin V staining, TUNEL (TdT-mediated-dUTP nick-end labeling) and FISH (Fluorescence *in situ* Hybridation), and the remaining sample was processed by MACS separation.

For MACS separation, the washed spermatozoa were incubated with 100 µl of BB 1X and annexin-V microbeads (Miltenyi Biotec) at room temperature for 15 minutes. Sperm DNA slides were prepared for TUNEL. The remaining spermatozoa-microbead suspension was placed on top of the separation column containing iron balls and the column placed in a magnetic field (MiniMACS, Miltenyi Biotec). The spermatozoa with intact membranes (non-apoptotic) passed through the column and were labeled annexin V negative (annexin V-). The apoptotic spermatozoa retained in the separation column were eluted using BB 1X after the column was removed from the magnetic field, and were labeled annexin V positive (annexin V+). Sperm DNA slides from annexin V- and annexin V+ solutions were prepared for annexin V staining, TUNEL and FISH. The different steps of our experiment design are illustrated in Figure 1.

Evaluation of apoptotic spermatozoa with annexin V-FITC

The separated spermatozoa populations were adjusted to a concentration of 200 000 spermatozoa. They were incubated in the dark with annexinV-FITC and 100µl of BB 1X for 15 minutes at room temperature, and centrifuged at 400 x g for 10 minutes. The final

1 pellets were resuspended in 10 µl of BB 1X. Sperm slides were prepared and counterstained
2 with DAPI. The fluorescence signals of labeled spermatozoa were analyzed using a Zeiss
3 AxioPlan Microscope (Zeiss, Le Pecq, France). A total of 500 spermatozoa were analyzed for
4 each sample. Spermatozoa were considered “annexin V-” (blue fluorescence) or “annexin
5 V+” (green fluorescence). Subsequent image acquisition was performed using a CCD camera
6 with *in situ* imaging system (ISIS) (Metasystems, Altlußheim, Germany).
7
8
9

10 11 12 13 14 Analysis of DNA fragmentation using TUNEL assay 15

16
17 Sperm DNA slides were fixed with Carnoy solution (methanol + acetic acid). The slides were
18 immersed in a jar containing a 2x SSC (Saline Sodium Citrate) /0.4% NP40 (Nonidet P40)
19 solution and then immediately passed through an ethanol series of increasing concentration
20 (70%/90%/100%). Sperm DNA fragmentation was detected by the ApopTag kit (Millipore,
21 Saint Quentin en Yvelines, France) according to the manufacturer’s recommendations. Briefly,
22 equilibration buffer was put on the slides and a mix of a reaction buffer and terminal
23 deoxyribonucleotidyl transferase was added. The slides were incubated in a dark humidified
24 chamber at 37°C. They were then incubated in a stop/wash buffer and washed with 1x
25 phosphate-buffered saline (PBS). A mix of blocking solution and anti-digoxigenin-rhodamine
26 was added to the slides before incubation at 37°C. The slides were washed in 1x PBS. They
27 were air-dried and counterstained with DAPI (4', 6-diamidino-2-phenyl-indole). A total of
28 500 spermatozoa from each sample were analyzed using a Zeiss AxioPlan Microscope.
29 Spermatozoa were considered to contain either normal (blue fluorescence) or fragmented (red
30 fluorescence) DNA [8].
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

46 Analysis of meiotic segregation by FISH 47

48
49 Meiotic segregation was analyzed by FISH with a mix of appropriate probes according to the
50 chromosomal breakpoints involved in the rearrangement (Table 2). The hybridization
51 techniques have been previously published [8, 1]. Sperm DNA preparations were fixed on a
52 slide with Carnoy solution. Before hybridization sperm nuclei were decondensed in 1M
53 NaOH solution and then washed in SSC 2X for 5-10 min at room temperature. They were
54 immersed in a jar of SSC 2X/0.4%NP40 solution for 30 min at 37°C and then passed through
55 an ethanol series of increasing concentration (70%/90%/100%) and allowed to air dry. The
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

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 30s in SSC 0.4X /0.3% NP40 at 72°C and 15 s in SSC 2X /0.1% NP40 at room temperature. Finally, they were counterstained with DAPI. The chromosomal content in spermatozoa was determined according to the combination of fluorescent spots observed. A minimum of 2000 spermatozoa were analyzed for each sample using a Zeiss AxioPlan Microscope.

Statistical analyses

An independent chi-square test was used to compare the percentages of spermatozoa stained with annexin V-FITC before and after MACS separation. The same test was used to compare:

- the percentage of spermatozoa with DNA fragmentation
- the number of spermatozoa with normal/balanced chromosomal content and chromosomally unbalanced content before and after MACS separation.

To compare the number of chromosomally unbalanced spermatozoa produced by different segregation modes we used an independent chi-square test or the Fisher's exact test if the expected numbers were below 5. The data was analyzed online using the BiostaTGV software (<http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/>). A value of $p < 0.05$ was considered to be significant.

Results

Patients

Ten male carriers of a structural chromosomal abnormality were included in the study. The karyotypes of the patients are shown in Table 1. There were 3 patients with a Robertsonian translocation (P1 to P3), and 7 patients with a simple balanced reciprocal translocation (P4 to P10).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Semen analysis

The summary of the basic semen parameters on raw semen samples before freezing are presented in Table 3. Sperm concentration ranges were between 14.4 millions/mL (P9) and 151 millions/mL (P2), the percentage of progressive motility ranged from 35% (P3, P7, P9 and P10) to 60% (P8).

Evaluation of apoptotic spermatozoa with annexin V-FITC

Data concerning the percentage of apoptotic spermatozoa before MACS separation and in the annexin V- and V+ fractions after MACS separation are summarized in Table 4. For all patients, the percentage of apoptotic spermatozoa is lower in the annexinV- fraction (average: $29.72 \pm 7.45\%$) and higher in the annexin V+ fraction (average: 80.58 ± 7.44) as compared to the frozen-thawed semen sample (average: 59.32 ± 9.34).

Analysis of DNA fragmentation using TUNEL assay

Data concerning the percentage of DNA fragmentation for each patient at each step of the study are summarized in Table 5. For the 10 male carriers of a structural chromosomal abnormality, the percentage of DNA fragmentation after freeze-thaw varied between 7.2% (P2) and 20.6% (P6). For 6 patients, the rates of DNA fragmentation were statistically significantly higher after incubation with BB 1X + annexin V microbeads than for the frozen-thawed semen sample. The rates of DNA fragmentation were statistically significantly lower in the annexin V- fraction than after incubation with BB1X + annexin V microbeads except for P6, and conversely, we observed a statistically significantly higher rate in the annexin V+ fraction than after incubation with BB 1X + annexin V microbeads for 7 patients (P2, P3, P4, P7, P9 and P10). There was a statistically significant difference for DNA fragmentation rates in the annexin V- fraction as compared to the annexin V+ fraction except for P6.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Analysis of meiotic segregation by FISH

Regarding the normal/balanced spermatozoa products of alternate segregation, the frequencies after freeze-thaw varied from 78.06% (P3) to 83.37% (P2) for patients with a Robertsonian translocation and from 36.39% (P10) to 48.36% (P5) for patients with a balanced reciprocal translocation (Table 6, Figure 2). When compared to raw semen, there was a statistically significant increase of normal/balanced spermatozoa in the annexin V- fraction for all patients ($p < 0.05$) after MACS. On the other hand, we observed a statistically significant decrease in the annexin V+ fraction for P1, P4, P6, P7, P8, P9 and P10. For all patients, we observed a statistically significant difference ($p < 0.05$) between the annexin V- and annexin V+ fractions with a majority of normal or balanced spermatozoa in the first group, and a majority of unbalanced spermatozoa in the second group.

Concerning the population of unbalanced spermatozoa, the results from FISH studies are summarized in Table 6 and illustrated in Figure 3. After MACS, the proportion of unbalanced spermatozoa from each of the segregation modes decreased significantly in the annexin V- fraction and increased significantly in the annexin V+ fraction.

Discussion

In this study, we analyzed apoptotic spermatozoa using annexin V-FITC, DNA fragmentation and the meiotic segregation on total ejaculate and on selected spermatozoa after MACS, in 10 men with a structural chromosomal abnormality.

Concerning the analysis using annexin V-FITC, we found an average of 29.72% apoptotic spermatozoa in the annexin V- fraction *versus* 80.58% in the annexin V+ fraction with a significant difference when compared to the frozen-thawed semen samples. Our results are similar to those described in the literature [15, 22, 24]. Paasch et al. analyzed the separation effect of MACS in donor sperm with flow cytometry using FITC-conjugated anti-annexin V antibodies and found an average of $5.2\% \pm 1.0\%$ labeled spermatozoa in the annexin V- fraction *versus* $72.2\% \pm 2.7\%$ labeled spermatozoa in the annexin V+ fraction [25]. The presence of annexin V-FITC+ spermatozoa in the annexin V- fraction could be due to unspecific binding or an insufficient number of beads to retain them in the column. Glander

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

and Schaller showed that the primary structural membrane of spermatozoa influences the ability of annexin V to detect PS [26].

Concerning the analysis of DNA fragmentation data showed that for 6 patients the rates of DNA fragmentation were statistically significantly higher after incubation with BB 1X (+ annexin V microbeads) than for the frozen-thawed semen sample. The BB1X has no influence on apoptosis - it does not induce DNA fragmentation. BB1X allows better accessibility and better integration of TdT and labeled dUTP during TUNEL (data not shown).

Our results are comparable with those described in the literature, with the rate of DNA fragmentation statistically significantly lower after MACS separation in the annexin V- fraction than before MACS separation and conversely, statistically significantly higher in the annexin V+ fraction than before MACS separation [19, 20, 22].

Carriers of a constitutional structural chromosomal abnormality are a particular group of infertile men who produce a high rate of chromosomally unbalanced spermatozoa in their ejaculate [27]. For Robertsonian translocations the alternate mode, which is the only mode which leads to the production of chromosomally normal or balanced spermatozoa, prevailed. P1, P2 and P3 produced 79.99%, 83.37% and 78.06% alternate modes respectively, results which are comparable to the more than 75% normal or balanced spermatozoa produced reported in the literature [28-31]. Reciprocal translocation carriers produced between 18.6% and 80.7% normal or balanced spermatozoa [1, 8, 32, 33] which corroborates our result for our seven other patients with 36.39% (P10) to 48.36% (P5). FISH technique is frequently used for the analysis of meiotic segregation in spermatozoa of translocation carriers [34-37] to estimate the number of unbalanced spermatozoa in each patient, thus providing information about the reproductive risks. Indeed translocation carriers are at a high risk of repeated miscarriages and the birth of children with chromosomal abnormalities [6, 7]. It thus seems important to eliminate unbalanced spermatozoa in order to reduce the reproductive risk associated with repeated miscarriages and the birth of children with chromosomal abnormalities in this population of infertile men.

To the best of our knowledge, only five publications have reported techniques for the selection of normal or balanced spermatozoa in translocation carriers. Two studies evaluated the potential of motile sperm organelle morphology examination (MSOME) for selecting normal or balanced spermatozoa. They evaluated the unbalanced spermatozoa rate in the total ejaculate and after MSOME in 9 translocation carriers (6 men carrying a reciprocal

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
translocation and 3 men with a robertsonian translocation) [38], and in 6 men with a reciprocal translocation [39]. Both studies concluded that MSOME could not be used to select normal or balanced spermatozoa in men with a constitutional chromosomal abnormality. However, Vozdova et al., evaluated the effect of swim-up (SU) and hyaluronan (HA)-binding method on the frequency of unbalanced spermatozoa in 6 reciprocal translocation carriers. They found a significantly lower frequency of unbalanced spermatozoa using this method [40]. In 2014, a study reported a decrease of unbalanced spermatozoa from 63.6% to 52.3% with discontinuous gradient centrifugation (DGC) in a reciprocal translocation carrier, with the birth of a child carrying the balanced paternal translocation following intrauterine insemination [41]. Another recent study evaluated the potential selection of normal or balanced spermatozoa with the hypo-osmotic swelling test in 15 translocation carriers (10 men carrying a reciprocal translocation and 5 men with a Robertsonian translocation), and obtained an important decrease in the proportion of unbalanced spermatozoa after selection [42]. Nevertheless, this technique is complicated and interpretation is difficult and sometimes subjective.

27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
To the best of our knowledge, only two studies have worked on the effects of MACS on sperm aneuploidy rate in patients with a normal karyotype [24, 43]. These studies reported that processing samples through MACS decreased sperm aneuploidy rates in the annexin V- fraction. Moreover they compared the aneuploidy rate in the annexin V- and V+ fractions and concluded that aneuploid sperm cells are preferentially retained in the MACS column [43]. Our study is the first of its kind to evaluate the rate of normal or balanced spermatozoa and unbalanced spermatozoa after MACS in the two fractions of annexin V- and annexin V+ for patients carrying a constitutional structural chromosomal abnormality. We observed a significant increase of normal or balanced spermatozoa in the annexin V- fraction and a significant decrease in the annexin V+ fraction and there is always a significant difference when comparing the two fractions.

47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
We also analyzed the impact of MACS on the different segregation modes in unbalanced spermatozoa. In the literature, for Robertsonian translocation carriers the segregation mode producing unbalanced spermatozoa with disomies and nullisomies for chromosomes involved in the translocation are adjacent and 3:0 [1]. In reciprocal translocation carriers, the unbalanced spermatozoa result mainly from the adjacent I, adjacent II, 3:1 and 4:0 [1]. Our results are concordant with these data, except for P5 and P8, where the predominant segregation mode for unbalanced spermatozoa was 3:1 at 50.83% and 54.01% respectively. This phenomenon has already been reported in previous studies [1, 9]. Regarding the different

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

meiotic segregation modes producing unbalanced spermatozoa, we always found a significant difference between the annexin V- and annexin V+ fractions, always in favor of annexin V- with a significant decrease of unbalanced spermatozoa. We concluded that there is no preferential selection depending on the type of chromosomal imbalance.

MACS is a simple technique, without deleterious or magnetic effects detectable on the spermatozoa due to their passage in the separation columns [17]. Microbeads do not affect cell viability and are biodegradable [44]. Since 2010, many healthy offspring have been reported with the use of MACS as a sperm selection technique with ICSI [45-48]. Moreover in 2017 Romany et al. did a randomized control trial on 237 couples with liveborn children conceived through the association of MACS and ICSI. They concluded that there were no noticeable differences in obstetric or perinatal events when MACS is used [49]. However, further research is needed to verify the presence of freely floating microbeads in the annexin V- fraction on the plasma membrane of the spermatozoa, and long term effects on the health and development of children.

To conclude, after MACS separation in our study we observed a significant decrease of apoptotic spermatozoa, DNA fragmentation and chromosomally unbalanced spermatozoa in the annexin V- fraction and inversely a significant increase in the annexin V+ fraction. These results consolidate the hypothesis that this technique tends to retain unbalanced spermatozoa and improve the selection of normal or balanced spermatozoa for ART. It strengthens our hypothesis of an abortive apoptosis initiated in the testis.

MACS is thus a promising tool for use in selecting healthy spermatozoa with a normal or balanced chromosomal content which can be used in assisted reproduction technique (ART) such as ICSI in males with a structural chromosomal abnormality and also for use in selecting spermatozoa with a normal or balanced chromosomal content before preimplantation genetic diagnosis in these patients. It could reduce the risk of miscarriage and increase the chance of achieving a successful pregnancy.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

References

1. Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Herry A, Amice V, Amice J et al. Meiotic segregation of translocations during male gametogenesis. *Int J Androl.* 2004;27(4):200-12. doi:10.1111/j.1365-2605.2004.00490.x.
2. Hafez ESE. *Assisted human reproductive technology.* Taylor & Francis; 1991.
3. De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod.* 1991;6(2):245-50.
4. Vincent M-C, Daudin M, De Mas P, Massat G, Mieusset R, Pontonnier F et al. Cytogenetic investigations of infertile men with low sperm counts: A 25-year experience. *J Androl.* 2002;23(1):18-22. doi:10.1002/j.1939-4640.2002.tb02597.x.
5. Nicopoullou JDM, Gilling-Smith C, Almeida PA, Homa S, Nice L, Tempest H et al. The role of sperm aneuploidy as a predictor of the success of intracytoplasmic sperm injection? *Hum Reprod.* 2008;23(2):240-50. doi:10.1093/humrep/dem395.
6. Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Fung J, Gianaroli L, Cohen J. Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Fertil Steril.* 2000;73(6):1209-18. doi:10.1016/S0015-0282(00)00495-7.
7. Stern C, Pertile M, Norris H, Hale L, Baker HW. Chromosome translocations in couples with in-vitro fertilization implantation failure. *Hum Reprod.* 1999;14(8):2097-101.
8. Perrin A, Caer E, Oliver-Bonet M, Navarro J, Benet J, Amice V et al. DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality. *Fertil Steril.* 2009;92(2):583-9. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.06.052.
9. Brugnol F, Van Assche E, Verheyen G, Sion B, Boucher D, Pouly JL et al. Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. *Hum Reprod.* 2006;21(3):685-93. doi:10.1093/humrep/dei401.
10. 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(2):130-5. doi:10.1111/j.1439-0272.2010.01115.x.
11. Perrin A, Basinko A, Douet-Guilbert N, Gueganic N, Le Bris MJ, Amice V et al. Aneuploidy and DNA fragmentation in sperm of carriers of a constitutional chromosomal abnormality. *Cytogenetic and genome research.* 2011;133(2-4):100-6. doi:10.1159/000323980.
12. Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Alvarez JG, Fernandez JL. Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH analysis. *J Androl.* 2007;28(1):38-49. doi:10.2164/jandrol.106.000067.
13. Perrin A, Louanjli N, Ziane Y, Louanjli T, Le Roy C, Gueganic N et al. Study of aneuploidy and DNA fragmentation in gametes of patients with severe teratozoospermia. *Reprod Biomed Online.* 2011;22(2):148-54. doi:10.1016/j.rbmo.2010.10.006.

14. Perrin A, Nguyen MH, Bujan L, Vialard F, Amice V, Gueganic N et al. DNA fragmentation is higher in spermatozoa with chromosomally unbalanced content in men with a structural chromosomal rearrangement. *Andrology*. 2013;1(4):632-8. doi:10.1111/j.2047-2927.2013.00100.x.
15. de Vantéry Arrighi C, Lucas H, Chardonnens D, de Agostini A. Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7(1):1. doi:10.1186/1477-7827-7-1.
16. Buzzi J, Valcarcel A, Lombardi E, Oses R, Rawe V, Young E. Magnetic activated cell sorting (MACS) improves oocytes donation results associated to severe male factor infertility. *Hum Reprod*. 2010;25:118-52.
17. Grunewald S, Reinhardt M, Blumenauer V, Said TM, Agarwal A, Abu Hmeidan F et al. Increased sperm chromatin decondensation in selected nonapoptotic spermatozoa of patients with male infertility. *Fertil Steril*. 2009;92(2):572-7. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.07.1705.
18. Huang C, Lee T, Chen C, Wu G, Lee C, Lee M. 25th Annual Meeting of the European Society on Human Reproduction and Embryology (ESHRE), Sperm preparation by magnetic-activated cell sorting improve the sperm-zona pellucida binding capacity and reduces apoptotic sperm. *Hum Reprod*. 2009;24(suppl 1):2147-i218.
19. Rawe VY, Alvarez CR, Uriondo HW, Papier S, Miasnik S, Nodar F. ICSI outcome using Annexin V columns to select non-apoptotic spermatozoa. *Fertil Steril*. 2009;92(3):S73-S4. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.07.284.
20. Herrero M, Delbes G, Troueng E, Holzer H, Chan P. 28th Annual Meeting of the European Society on Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Differential enrichment of sperm with no DNA strand breaks using magnetic activated cell sorting (MACS) in men with various categories of semen parameters. *Hum Reprod*. 2012;27(suppl 2):ii121-ii50. doi:10.1093/humrep/27.s2.73.
21. Said TM, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Glander HJ, Paasch U. Evaluation of sperm recovery following annexin V magnetic-activated cell sorting separation. *Reprod Biomed Online*. 2006;13(3):336-9.
22. Lee T-H, Liu C-H, Shih Y-T, Tsao H-M, Huang C-C, Chen H-H et al. Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility. *Hum Reprod*. 2010;25(4):839-46. doi:10.1093/humrep/deq009.
23. WHO. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen Fifth edition. Geneva: WHO Press; 2010. p. 271.
24. Vendrell X, Ferrer M, Garcia-Mengual E, Munoz P, Trivino JC, Calatayud C et al. Correlation between aneuploidy, apoptotic markers and DNA fragmentation in spermatozoa from normozoospermic patients. *Reprod Biomed Online*. 2014;28(4):492-502. doi:10.1016/j.rbmo.2013.12.001.
25. Paasch U, Grunewald S, Fitzl G, Glander HJ. Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. *J Androl*. 2003;24(2):246-52.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
26. Glander HJ, Schaller J. Hidden effects of cryopreservation on quality of human spermatozoa. *Cell and tissue banking*. 2000;1(2):133-42. doi:10.1023/a:1010122800157.
27. Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M et al. Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod*. 2000;15(2):351-65.
28. Scriven PN, Flinter FA, Braude PR, Ogilvie CM. Robertsonian translocations--reproductive risks and indications for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod*. 2001;16(11):2267-73.
29. Roux C, Tripogney C, Morel F, Joanne C, Fellmann F, Clavequin MC et al. Segregation of chromosomes in sperm of Robertsonian translocation carriers. *Cytogenetic and genome research*. 2005;111(3-4):291-6. doi:10.1159/000086902.
30. Simpson JL, Elias S. *Genetics in Obstetrics and Gynecology*. Saunders; 2003.
31. Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10). *Hum Reprod*. 2004;19(6):1345-51. doi:10.1093/humrep/deh232.
32. Anton E, Vidal F, Blanco J. Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers. *Hum Reprod*. 2007;22(8):2088-92. doi:10.1093/humrep/dem152.
33. Wiland E, Hobel CJ, Hill D, Kurpisz M. Successful pregnancy after preimplantation genetic diagnosis for carrier of t(2;7)(p11.2;q22) with high rates of unbalanced sperm and embryos: a case report. *Prenat Diagn*. 2008;28(1):36-41. doi:10.1002/pd.1899.
34. Estop AM, Cieply KM, Aston CE. The meiotic segregation pattern of a reciprocal translocation t(10;12)(q26.1;p13.3) by fluorescence in situ hybridization sperm analysis. *Eur J Hum Genet*. 1997;5(2):78-82.
35. Frydman N, Romana S, Lorc'h ML, Vekemans M, Frydman R, Tachdjian G. Assisting reproduction of infertile men carrying a Robertsonian translocation. *Hum Reprod*. 2001;16:2274-7.
36. Van Assche E, Staessen C, Vegetti W, Bonduelle M, Vandervorst M, Van Steirteghem A et al. Preimplantation genetic diagnosis and sperm analysis by fluorescence in-situ hybridization for the most common reciprocal translocation t(11;22). *Mol Hum Reprod*. 1999;5(7):682-90.
37. Escudero T, Lee M, Carrel D, Blanco J, Munne S. Analysis of chromosome abnormalities in sperm and embryos from two 45,XY,t(13;14)(q10;q10) carriers. *Prenat Diagn*. 2000;20(7):599-602.
38. 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*. 2011;96(3):S85. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.07.329.
39. Chelli MH, Ferfour F, Boitrelle F, Albert M, Molina-Gomes D, Selva J et al. High-magnification sperm selection does not decrease the aneuploidy rate in patients who are

heterozygous for reciprocal translocations. *J Assist Reprod Genet.* 2013;30(4):525-30. doi:10.1007/s10815-013-9959-3.

40. Vozdova M, Kasikova K, Oracova E, Prinosilova P, Rybar R, Horinova V et al. The effect of the swim-up and hyaluronan-binding methods on the frequency of abnormal spermatozoa detected by FISH and SCSA in carriers of balanced chromosomal translocations. *Hum Reprod.* 2012;27(3):930-7. doi:10.1093/humrep/der445.

41. Rouen A, Hyon C, Balet R, Joye N, Cassuto NG, Siffroi JP. First Birth after Sperm Selection through Discontinuous Gradient Centrifugation and Artificial Insemination from a Chromosomal Translocation Carrier. *Case reports in genetics.* 2014;2014:906145. doi:10.1155/2014/906145.

42. Rouen A, Carlier L, Heide S, Egloff M, Marzin P, Ader F et al. Potential selection of genetically balanced spermatozoa based on the hypo-osmotic swelling test in chromosomal rearrangement carriers. *Reprod Biomed Online.* 2017;35(4):372-8. doi:10.1016/j.rbmo.2017.06.017.

43. Esbert M, Godo A, Soares SR, Florensa M, Amoros D, Ballesteros A et al. Spermatozoa with numerical chromosomal abnormalities are more prone to be retained by Annexin V-MACS columns. *Andrology.* 2017;5(4):807-13. doi:10.1111/andr.12376.

44. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry.* 1990;11(2):231-8. doi:10.1002/cyto.990110203.

45. Herrero MB, Delbes G, Chung JT, Son WY, Holzer H, Buckett W et al. Case report: the use of annexin V coupled with magnetic activated cell sorting in cryopreserved spermatozoa from a male cancer survivor: healthy twin newborns after two previous ICSI failures. *J Assist Reprod Genet.* 2013;30(11):1415-9. doi:10.1007/s10815-013-0086-y.

46. Polak de Fried E, Denaday F. Single and twin ongoing pregnancies in two cases of previous ART failure after ICSI performed with sperm sorted using annexin V microbeads. *Fertil Steril.* 2010;94(1):351.e15-8. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.12.037.

47. Ugozzoli F, Alvarez Sedó C, Fiszbajn G, Nodar F, Kopelman S, Papier S. Neonatal outcome after ICSI with MACS for selection of non apoptotic spermatozoa: first report. *Fertil Steril.* 2013;100(3):S474. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.07.459.

48. Rawe VY, Boudri HU, Alvarez Sedo C, Carro M, Papier S, Nodar F. Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. *Reprod Biomed Online.* 2010;20(3):320-3. doi:10.1016/j.rbmo.2009.12.004.

49. Romany L, Garrido N, Cobo A, Aparicio-Ruiz B, Serra V, Meseguer M. Obstetric and perinatal outcome of babies born from sperm selected by MACS from a randomized controlled trial. *J Assist Reprod Genet.* 2017;34(2):201-7. doi:10.1007/s10815-016-0838-6.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table 1: Karyotype of ten male carriers of robertsonian or reciprocal translocations

Table 2: Mix of probes used to perform FISH on spermatozoa of ten male carriers of robertsonian or reciprocal translocations

Table 3: Data on sperm parameters for raw semen samples from each individual

Table 4: Percentage of spermatozoa annexin V-FITC+ in the different fractions for each patient

Table 5: Percentage of DNA fragmentation (TUNEL %) in frozen-thawed semen sample, after incubation, in the annexin V- and V+ fractions

Table 6: Data of the meiotic segregation by FISH

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure 1: Flow diagram of the overall experiment design

Figure 2: Percentages of chromosomally balanced and unbalanced spermatozoa in the semen sample and annexin V- and annexin V+ fractions for the 10 patients with a structural chromosomal abnormality

Figure 3: Variations of the different segregation modes from unbalanced spermatozoa before and after MACS (annexin V- and annexin V+ fractions) in ten male carriers of structural chromosomal abnormalities

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table 1: Karyotype of ten male carriers of robertsonian or reciprocal translocations

Patient	Karyotype
P1	45,XY,rob(13;14)(q10;q10)
P2	45,XY,rob(14;15)(q10;q10)
P3	45,XY,rob(13;14)(q10;q10)
P4	46,XY,t(4;12)(q31;q23)
P5	46,XY,t(9;12)(q31;p12)
P6	46,XY,t(1;15)(p22.2;q21.1)
P7	46,XY,t(11;13)(q22.1;q21.2)
P8	46,XY,t(13;19)(q12;q13.3)
P9	46,XY,t(1;22)(p11;p11.2)
P10	46,XY,t(2;9)(p24;p21)

Table 2: Mix of probes used to perform FISH on spermatozoa of ten male carriers of robertsonian or reciprocal translocations

Patient	Mix of probes used for FISH analyses
P1	BACs pool on 13q33.3 (Green), BACs pool on 14q32.33 (Orange), CEP18 (Aqua)
P2	BACs pool on 14q32.33 (Green), BACs pool on 15q26.3 (Orange), CEP8 (Aqua)
P3	BACs pool on 13q33.3 (Green), BACs pool on 14q32.33 (Orange), CEP8 (Aqua)
P4	BACs pool on 4q22.1 (Aqua), BACs pool on 4q34.1 (Green), CEP12 (Orange)
P5	BACs pool on 9q34 (Green), BACs pool on 12p13.33 (Aqua), CEP12 (Orange)
P6	BACs pool on 1p36.33 (Orange), BACs pool on 1q24.1-24.2 (Aqua), BACs pool on 15q26.3 (Green)
P7	BACs pool on 11q25 (Orange), BACs pool on 13q14.3 (Green), BACs pool on 13q33.3 (Aqua)
P8	BACs pool on 13q33.3 (Green), BACs pool on 19p12-p13.11 (Orange), BACs pool on 19q13.41 (Aqua)
P9	BACs pool on 1p36.33 (Orange), BACs pool on 1q24.1-24.2 (Aqua), BACs pool on 22q11.23 (Green)
P10	BACs pool on 2p25.3 (Green), BACs pool on 2q37.3 (Orange), BACs pool on 9q34.12-q34.13 (Aqua)

Table 3: Data on sperm parameters for raw semen samples from each individual

Patient	Volume (mL)	Concentration (M/mL)	Mobility (a+b+c)
P1	3.2	50	55
P2	2.1	151	45
P3	3.2	19.6	35
P4	3.2	117	41
P5	5.3	50	55
P6	2.8	108	40
P7	4.2	42	35
P8	2.5	49	60
P9	8.1	14.4	35
P10	3.5	15	35

Table 4: Percentage of spermatozoa annexin V-FITC+ in the different fractions for each patient

Patient	Frozen-thawed semen sample (%)	Fraction of annexin V- (%)	Fraction of annexin V+ (%)
P1	57.4	19.6	84.2
P2	56.0	32.6	83.6
P3	54.6	33.2	71.4
P4	38.0	14.2	85.6
P5	72.8	36	88
P6	67.2	35.4	83.4
P7	58.0	30.6	69.8
P8	63.2	28.4	84.8
P9	64.8	37.6	86.2
P10	61.2	29.2	68.8
<i>Average</i>	59.32 ± 9.34	29.72 ± 7.45	80.58 ± 7.44

Annexin V-FITC+ spermatozoa significantly decreased from frozen-thawed semen sample to the fraction of annexin V- and increased in the fraction of annexin V+ ($p < 0.05$)

Table 5: Percentage of DNA fragmentation (TUNEL %) in frozen-thawed semen sample, after incubation, in the annexin V- and V+ fractions

Patient	Frozen-thawed semen sample (%)	After Incubation (%)	Fraction of annexin V- (%)	Fraction of annexin V+ (%)	Between fraction of annexin V- and V+
P1	15	23*	9.2**	28	***
P2	7.2	21.8*	7.4**	31.2**	***
P3	18.8	20.6	14**	34.8**	***
P4	16.2	23.4*	16.2**	36.2**	***
P5	18.4	37*	18.6**	25.4**	***
P6	20.6	23.8	20	23.4	NS
P7	18.2	22.8	9.4**	34**	***
P8	15	21.2*	10**	24	***
P9	14.8	25.4*	13**	37.6**	***
P10	14	17.2	9.4**	32.8**	***
<i>Average</i>	15.82 ± 3.93	23.62 ± 5.19	$12.72 \pm 4.36^{**}$	$30.74 \pm 5.20^{**}$	***

* Significant difference when compared to the frozen-thawed semen sample ($p < 0.05$) ** significant difference when compared to after incubation ($p < 0.05$) *** significant difference when comparing the annexin V- and V+ fractions ($p < 0.05$) and NS: no significant

Table 6: Data of the meiotic segregation by FISH

Mode of meiotic segregation	Semen sample	Fraction of annexin V-	Fraction of annexin V+	Between fraction of annexin V- and V+
P1	Alternate (%)	79.99	88.03*	75*
	Adjacent (%)	18.82	11.14*	21.77*
	3 : 0 (%)	0.47	0.43	1.87*
	Diploid (%)	0.47	0.2*	1.1*
	Others (%)	0.24	0.2	0.26
<i>No of spermatozoa analysed</i>		2534	2531	2728
P2	Alternate (%)	83.37	90.2*	82.43
	Adjacent (%)	14.4	8.5*	14.23*
	3 : 0 (%)	0.2	0.1	0.15
	Diploid (%)	1.29	1.05	2.1*
	Others (%)	0.74	0.15*	1.1
<i>No of spermatozoa analysed</i>		2021	2002	2003
P3	Alternate (%)	78.06	88.64*	80.93*
	Adjacent (%)	19.55	10.72*	16.72*
	3 : 0 (%)	0.4	0.4	0.83
	Diploid (%)	1.74	0.1*	1.03
	Others (%)	0.25	0.15	0.49
<i>No of spermatozoa analysed</i>		2010	2024	2045
P4	Alternate (%)	44.27	62.77*	31.63*
	Adjacent I (%)	36.43	27.58*	51.99
	Adjacent II (%)	8.64	4.77*	7.19
	3 : 1 (%)	7.5	3.66*	6.81*
	Diploidy or 4 : 0 (%)	0.91	0.59	2.16*
Others (%)	2.25	0.63*	0.21*	
<i>No of spermatozoa analysed</i>		2627	2705	2864
P5	Alternate (%)	48.36	66.16*	50.77
	Adjacent I (%)	0.15	0.04	0.16
	Adjacent II (%)	0.18	0.19	0.2
	3 : 1 (%)	50.83	33.38*	48.64*
	Diploidy or 4 : 0 (%)	0.07	0.19	0.24
Others (%)	0.41	0.04*	0*	
<i>No of spermatozoa analysed</i>		2707	2651	2531

P6	Alternate (%)	37.75	54.76*	27.63*	**
	Adjacent I (%)	32.49	30.13	36.21	**
	Adjacent II (%)	16.12	10.06*	22.15*	**
	3 : 1 (%)	12.75	4.76*	12.64*	**
Diploidy or 4 : 0 (%)		0.79	0.19*	1.08	**
Others (%)		0.1	0.1	0.29	N/S
<i>No of spermatozoa analysed</i>		2016	2078	2041	
P7	Alternate (%)	43.13	60.54*	33.07*	**
	Adjacent I (%)	35.63	31.84*	43.6*	**
	Adjacent II (%)	7.35	3.47*	6.95	**
	3 : 1 (%)	12.04	3.47*	14.44*	**
	Diploidy or 4 : 0 (%)	1.45	0.53*	1.52	**
Others (%)		0.4	0.14	0.41	N/S
<i>No of spermatozoa analysed</i>		2001	2073	2431	
P8	Alternate (%)	37.24	59.84*	30.17*	**
	Adjacent I (%)	1.12	0.1*	0.35*	N/S
	Adjacent II (%)	5.2	2.42*	9.76*	**
	3 : 1 (%)	54.01	35.77*	54.61	**
Diploidy or 4 : 0 (%)		2.14	1.58*	3.37*	**
Others (%)		0.29	0.3	1.73*	**
<i>No of spermatozoa analysed</i>		2057	2027	2254	
P9	Alternate (%)	44.07	58.02*	39.21*	**
	Adjacent I (%)	20.1	18.42	17.31*	N/S
	Adjacent II (%)	19.66	16.93*	24.67*	**
	3 : 1 (%)	14.9	6.19*	17.18*	**
	Diploidy or 4 : 0 (%)	0.49	0.35	1.19*	**
Others (%)		0.78	0.1*	0.44	**
<i>No of spermatozoa analysed</i>		2040	2020	2270	
P10	Alternate (%)	36.39	53.78*	31.65*	**
	Adjacent I (%)	31.51	26.41*	32.28	**
	Adjacent II (%)	21.01	15.44*	24.33*	**
	3 : 1 (%)	9.86	4.04*	10.86	**
	Diploidy or 4 : 0 (%)	0.5	0.05*	0.39	**
Others (%)		0.75	0.28*	0.48	N/S
<i>No of spermatozoa analysed</i>		2009	2105	2063	

* Significant difference when compared to the semen sample (p < 0.05) ** significant difference when comparing the annexin V- and V- fractions (p < 0.05) and N/S: no significant

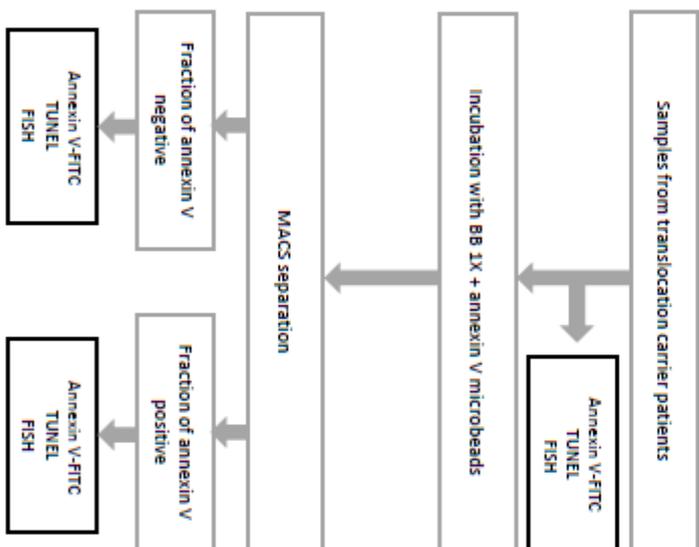
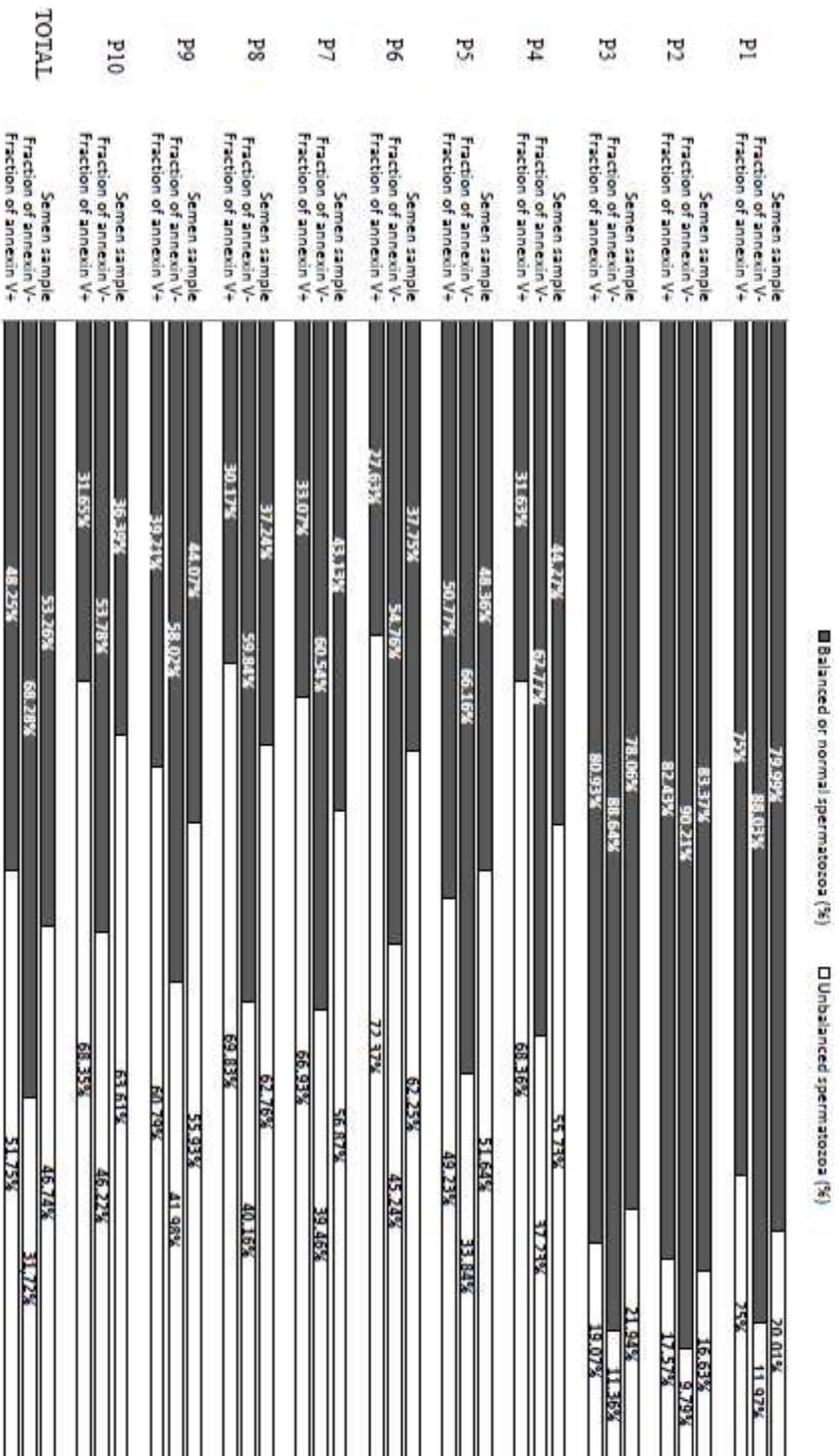


Figure 1: Flow diagram of the overall experiment design



Balanced or normal spermatozoa (%): significantly increased from the semen sample to the fraction of annexin V- for all patients ($p < 0.05$) and decreased from the semen sample to the fraction of annexin V+ for P1, P4, P6, P7, P8, P9 and P10 ($p < 0.05$)

Figure 2: Percentages of chromosomally balanced and unbalanced spermatozoa in the semen sample and annexin V- and annexin V+ fractions for the 10 patients with a structural chromosomal abnormality

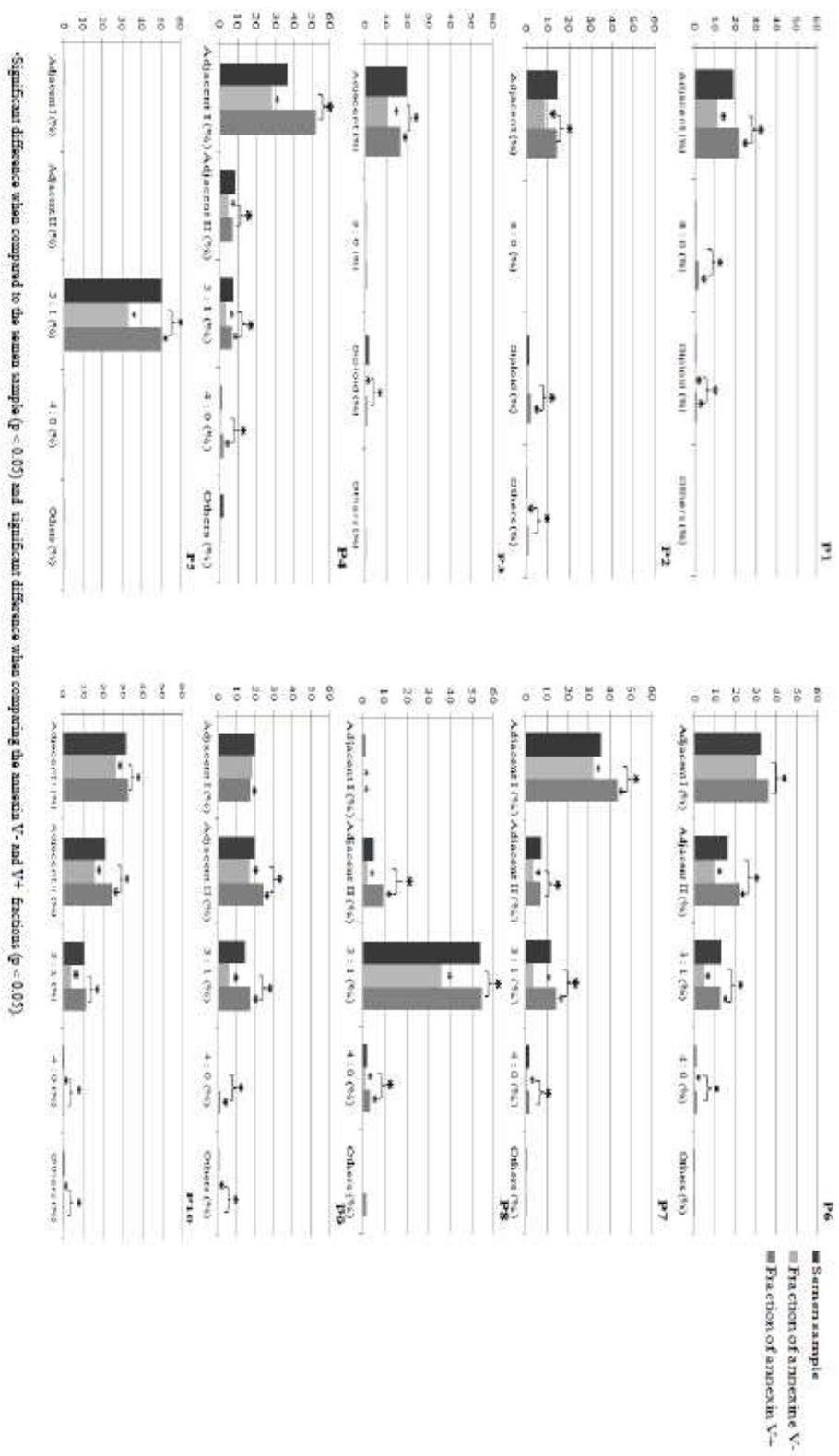


Figure 3: Variations of the different segregation modes from unbalanced spermatozoa before and after MACS (annexin V- and annexin V+ fractions) in ten male carriers of structural chromosomal abnormalities

Annexe 5 : Communications orales et écrites

Communications orales :

El Fekih, S., Tous, C., Gueganic, N., Brugnon, F., Ben Ali, H., Bujan, L., Douet-Guilbert, N., Morel, F., Perrin, A. (2018). MACS : une méthode efficace pour diminuer le nombre de spermatozoïdes à ADN fragmenté et chromosomiquement déséquilibrés. XXIV^{ème} Colloque de l'Association des Cytogénéticiens de Langue Française.

El Fekih, S., Tous, C., Gueganic, N., Brugnon, F., Ben Ali, H., Bujan, L., Douet-Guilbert, N., Morel, F., Perrin, A. Apports du tri magnétique de spermatozoïdes chez des hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure. Société Marocaine De Fertilité et de Contraception. (9 et 10 novembre 2018 **sur invitation**).

Communications écrites :

El Fekih, S., Tous, C., Gueganic, N., Brugnon, F., Ben Ali, H., Bujan, L., Douet-Guilbert, N., Morel, F., Perrin, A. (2018). MACS : une méthode efficace pour diminuer le nombre de spermatozoïdes à ADN fragmenté et chromosomiquement déséquilibrés. 23^{èmes} journées de la Fédération Française d'Etude de la Reproduction Lyon. Livre des résumés.

El Fekih, S., Tous, C., Caire-Tetauru, E., Gueganic, N., Brugnon, F., Ben Ali, H., Bujan, L., Douet-Guilbert, N., Morel, F., Perrin, A. (2018). Fragmentation de l'ADN et équipement chromosomique dans les spermatozoïdes après tri cellulaire chez des hommes porteurs d'une anomalie chromosomique constitutionnelle. 18^{ème} journée des jeunes chercheurs en santé, Brest.

El Fekih, S., Caire-Tetauru, E., Tous, C., Gueganic, N., Douet-Guilbert, N., Beauvillard, D., Ben Ali, H., Perrin, A., Morel, F. (2017). Apports du tri magnétique de spermatozoïdes chez des hommes 46,XY présentant un taux élevé de fragmentation de l'ADN spermatique. 22^{èmes} journées de la Fédération Française d'Etude de la Reproduction Tours. Livre des résumés.

Caire-Tetauru, E., **El Fekih, S.**, Brugnon, F., Tous, C., Gueganic, N., Douet-Guilbert, N., Beauvillard, D., Ben Ali, H., Bujan, L., Perrin, A., Morel, F. (2017). Diminution du taux de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés après tri cellulaire chez des patients porteurs d'une anomalie chromosomique de structure. 22^{èmes} journées de la Fédération Française d'Etude de la Reproduction Tours. Livre des résumés.

Caire-Tetauru, E., **El Fekih, S.**, Brugnon, F., Tous, C., Beauvillard, D., Ben Ali, H., Perrin, A., Morel, F. (2017). Apports du tri cellulaire des spermatozoïdes chez trois hommes infertiles porteurs d'une anomalie chromosomique de structure. 17^{ème} journée des jeunes chercheurs en santé, Brest.

El Fekih, S., Tous, C., Caire-Tetauru, E., Beauvillard, D., Ben Ali, H., Perrin, A., Morel, F., (2017). Tri magnétique de spermatozoïdes chez 24 patients infertiles. 17^{ème} journée des jeunes chercheurs en santé, Brest.

Bibliographie

- Agarwal, A. and S. S. Allamaneni (2005). "Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come." Fertil Steril **84**(4): 850-853.
- Agarwal, A., A. Majzoub, S. C. Esteves, E. Ko, R. Ramasamy and A. Zini (2016). "Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios." Transl Androl Urol **5**(6): 935-950.
- Agarwal, A., K. Makker and R. Sharma (2008). "Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update." Am J Reprod Immunol **59**(1): 2-11.
- Agarwal, A. and T. M. Said (2003). "Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility." Hum Reprod Update **9**(4): 331-345.
- Ainsworth, C., B. Nixon and R. J. Aitken (2005). "Development of a novel electrophoretic system for the isolation of human spermatozoa." Hum Reprod **20**(8): 2261-2270.
- Aitken, R. J., G. N. De Iuliis, J. M. Finnie, A. Hedges and R. I. McLachlan (2010). "Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria." Hum Reprod **25**(10): 2415-2426.
- Aitken, R. J., E. Gordon, D. Harkiss, J. P. Twigg, P. Milne, Z. Jennings and D. S. Irvine (1998). "Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa." Biol Reprod **59**(5): 1037-1046.
- Aitken, R. J. and A. J. Koppers (2011). "Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa." Asian J Androl **13**(1): 36-42.
- Aktan, G., S. Dogru-Abbasoglu, C. Kucukgergin, A. Kadioglu, G. Ozdemirler-Erata and N. Kocak-Toker (2013). "Mystery of idiopathic male infertility: is oxidative stress an actual risk?" Fertil Steril **99**(5): 1211-1215.
- Alvarez Sedo, C., M. Bilinski, D. Lorenzi, H. Uriondo, F. Noblia, V. Longobucco, E. V. Lagar and F. Nodar (2017). "Effect of sperm DNA fragmentation on embryo development: clinical and biological aspects." JBRA Assist Reprod **21**(4): 343-350.
- Anifandis, G., K. Dafopoulos, C. I. Messini, N. Polyzos and I. E. Messinis (2013). "The BMI of men and not sperm parameters impact on embryo quality and the IVF outcome." Andrology **1**(1): 85-89.
- Anton, E., J. Blanco, J. Egozcue and F. Vidal (2004). "Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10)." Hum Reprod **19**(6): 1345-1351.
- Anton, E., J. Blanco, J. Egozcue and F. Vidal (2004). "Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10)." Human Reproduction **19**(6): 1345-1351.
- Anton, E., F. Vidal and J. Blanco (2007). "Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers." Human Reproduction **22**(8): 2088-2092.
- Asch, R., C. Simerly, T. Ord, V. A. Ord and G. Schatten (1995). "The stages at which human fertilization arrests: microtubule and chromosome configurations in inseminated oocytes

which failed to complete fertilization and development in humans." MHR: Basic science of reproductive medicine **1**(5): 239-248.

Asghar, W., V. Velasco, J. L. Kingsley, M. S. Shoukat, H. Shafiee, R. M. Anchan, G. L. Mutter, E. Tuzel and U. Demirci (2014). "Selection of functional human sperm with higher DNA integrity and fewer reactive oxygen species." Adv Healthc Mater **3**(10): 1671-1679.

Atig, F., A. Kerkeni, A. Saad and M. Ajina (2017). "Effects of reduced seminal enzymatic antioxidants on sperm DNA fragmentation and semen quality of Tunisian infertile men." J Assist Reprod Genet **34**(3): 373-381.

Auger, J., F. Eustache and G. David (2000). "Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée." Andrologie **10**(4): 358-373.

Auger, J., M. Mesbah, C. Huber and J. P. Dadoune (1990). "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.

Avendano, C., A. Franchi, H. Duran and S. Oehninger (2010). "DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome." Fertil Steril **94**(2): 549-557.

Avendano, C., A. Franchi, E. Jones and S. Oehninger (2009). "Pregnancy-specific {beta}-1-glycoprotein 1 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.

Avendano, C., A. Franchi, S. Taylor, M. Morshedi, S. Bocca and S. Oehninger (2009). "Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa." Fertil Steril **91**(4): 1077-1084.

Baccetti, B., S. Capitani, G. Collodel, M. Estenoz, L. Gambera and P. Piomboni (2002). "Infertile spermatozoa in a human carrier of robertsonian translocation 14;22." Fertil Steril **78**(5): 1127-1130.

Badouard, C., Y. Menezo, G. Panteix, J. L. Ravanat, T. Douki, J. Cadet and A. Favier (2008). "Determination of new types of DNA lesions in human sperm." Zygote **16**(1): 9-13.

Bakos, H. W., J. G. Thompson, D. Feil and M. Lane (2008). "Sperm DNA damage is associated with assisted reproductive technology pregnancy." Int J Androl **31**(5): 518-526.

Balhorn, R., L. Brewer and M. Corzett (2000). "DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: analysis of toroid stability using single DNA molecules." Mol Reprod Dev **56**(2 Suppl): 230-234.

Bansal, S. K., N. Gupta, S. N. Sankhwar and S. Rajender (2015). "Differential Genes Expression between Fertile and Infertile Spermatozoa Revealed by Transcriptome Analysis." PLoS ONE **10**(5): e0127007.

Barlow, P., Y. Englert, F. Puissant, B. Lejeune, A. Delvigne, M. Van Rysselberge and F. Leroy (1990). "Fertilization failure in IVF: why and what next?" Hum Reprod **5**(4): 451-456.

- Barragan, M., A. Martinez, S. Llonch, A. Pujol, V. Vernaev and R. Vassena (2015). "Effect of ribonucleic acid (RNA) isolation methods on putative reference genes messenger RNA abundance in human spermatozoa." *Andrology* **3**(4): 797-804.
- Barratt, C. L., R. J. Aitken, L. Bjorndahl, D. T. Carrell, P. de Boer, U. Kvist, S. E. Lewis, S. D. Perreault, M. J. Perry, L. Ramos, B. Robaire, S. Ward and A. Zini (2010). "Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications--a position report." *Hum Reprod* **25**(4): 824-838.
- Barrière, P. and M. Jean (1995). "Les différentes techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP)." *Revue Française des Laboratoires* **1995**(278): 29-32.
- Bartolacci, A., L. Pagliardini, S. Makieva, A. Salonia, E. Papaleo and P. Vigano (2018). "Abnormal sperm concentration and motility as well as advanced paternal age compromise early embryonic development but not pregnancy outcomes: a retrospective study of 1266 ICSI cycles." *J Assist Reprod Genet.*
- Bartoov, B., A. Berkovitz and F. Eltes (2001). "Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection." *N Engl J Med* **345**(14): 1067-1068.
- Behr, B., J. D. Fisch, C. Racowsky, K. Miller, T. B. Pool and A. A. Milki (2000). "Blastocyst-ET and monozygotic twinning." *J Assist Reprod Genet* **17**(6): 349-351.
- Bench, G. S., A. M. Friz, M. H. Corzett, D. H. Morse and R. Balhorn (1996). "DNA and total protamine masses in individual sperm from fertile mammalian subjects." *Cytometry* **23**(4): 263-271.
- Benchaiib, M., V. Braun, J. Lornage, S. Hadj, B. Salle, H. Lejeune and J. F. Guerin (2003). "Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique." *Hum Reprod* **18**(5): 1023-1028.
- Benedetti, S., M. C. Tagliamonte, S. Catalani, M. Primiterra, F. Canestrari, S. De Stefani, S. Palini and C. Bulletti (2012). "Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality." *Reprod Biomed Online* **25**(3): 300-306.
- Benzacken, B., F. d. r. M. Gavelle, B. Martin-Pont, O. Dupuy, N. Lièvre, J.-N. I. Hugues and J.-P. Wolf (2001). "Familial sperm polyploidy induced by genetic spermatogenesis failure: Case report." *Human Reproduction* **16**(12): 2646-2651.
- Berteli, T. S., M. G. Da Broi, W. P. Martins, R. A. Ferriani and P. A. Navarro (2017). "Magnetic-activated cell sorting before density gradient centrifugation improves recovery of high-quality spermatozoa." *Andrology* **5**(4): 776-782.
- Bhattacharya, S., M. P. Hamilton, M. Shaaban, Y. Khalaf, M. Seddler, T. Ghobara, P. Braude, R. Kennedy, A. Rutherford, G. Hartshorne and A. Templeton (2001). "Conventional in-vitro fertilisation versus intracytoplasmic sperm injection for the treatment of non-male-factor infertility: a randomised controlled trial." *Lancet* **357**(9274): 2075-2079.

Bianchi, E., A. Stermer, K. Boekelheide, M. Sigman, S. Hall, G. Reyes, E. Dere and K. Hwang (2018). "High-quality human and rat spermatozoal RNA isolation for functional genomic studies." Andrology **6**(2): 374-383.

Blanco, J., J. Egozcue and F. Vidal (2000). "Interchromosomal effects for chromosome 21 in carriers of structural chromosome reorganizations determined by fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei." Hum Genet **106**(5): 500-505.

Blanco, J., C. Rubio, C. Simon, J. Egozcue and F. Vidal (1997). "Increased incidence of disomic sperm nuclei in a 47,XYY male assessed by fluorescent in situ hybridization (FISH)." Hum Genet **99**(3): 413-416.

Boitrelle, F., F. Ferfourri, J. M. Petit, D. Segretain, C. Tourain, M. Bergere, M. Bailly, F. Vialard, M. Albert and J. Selva (2011). "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.

Bonache, S., A. Mata, M. D. Ramos, L. Bassas and S. Larriba (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.

Borini, A., N. Tarozzi, D. Bizzaro, M. A. Bonu, L. Fava, C. Flamigni and G. Coticchio (2006). "Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART." Hum Reprod **21**(11): 2876-2881.

Boyer, L., A. Ravel, C. Boyer-Medeville and J. F. Viallet (1999). "Imagerie et bilan d'une infertilité masculine." Andrologie **9**(3): 394-404.

Brahem, S., K. Letaief, H. Ben Ali, A. Saad and M. Mehdi (2013). "Efficacy of the density gradient centrifugation method in eliminating sperm with aneuploidy." Andrologia **45**(3): 158-162.

Brahem, S., M. Mehdi, H. Elghezal and A. Saad (2011). "Analysis of sperm aneuploidies and DNA fragmentation in patients with globozoospermia or with abnormal acrosomes." Urology **77**(6): 1343-1348.

Brahem, S., M. Mehdi, H. Elghezal and A. Saad (2011). "Detection of DNA fragmentation and meiotic segregation in human with isolated teratozoospermia." Journal of Assisted Reproduction and Genetics **28**(1): 41-48.

Brahem, S., M. Mehdi, H. Elghezal and A. Saad (2012). "Study of aneuploidy rate and sperm DNA fragmentation in large-headed, multiple-tailed spermatozoa." Andrologia **44**(2): 130-135.

Breart, G. and J. De Mouzon (1995). "AMP vigilance." Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine **8**(179): 1759-1764.

Brugnon, F., L. Janny, Y. Communal, C. Darcha, C. Szczepaniak, F. Pellestor, P. Vago, H. Pons-Rejraji, C. Artonne and G. Grizard (2010). "Apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm from Robertsonian translocation carrier patients." Hum Reprod **25**(7): 1631-1642.

Brugnon, F., E. Van Assche, G. Verheyen, B. Sion, D. Boucher, J. L. Pouly, L. Janny, P. Devroey, I. Liebaers and A. Van Steirteghem (2006). "Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients." Hum Reprod **21**(3): 685-693.

Brugnon, F., E. Van Assche, G. Verheyen, B. Sion, D. Boucher, J. L. Pouly, L. Janny, P. Devroey, I. Liebaers and A. Van Steirteghem (2006). "Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients." Human Reproduction **21**(3): 685-693.

Bucar, S., A. Goncalves, E. Rocha, A. Barros, M. Sousa and R. Sa (2015). "DNA fragmentation in human sperm after magnetic-activated cell sorting." J Assist Reprod Genet **32**(1): 147-154.

Bujan, L., M. Walschaerts, N. Moinard, S. Hennebicq, J. Saias, F. Brugnon, J. Auger, I. Berthaut, E. Szyman, M. Daudin and N. Rives (2013). "Impact of chemotherapy and radiotherapy for testicular germ cell tumors on spermatogenesis and sperm DNA: a multicenter prospective study from the CECOS network." Fertil Steril **100**(3): 673-680.

Burrello, N., E. Vicari, P. Shin, A. Agarwal, A. De Palma, C. Grazioso, R. D'Agata and A. E. Calogero (2003). "Lower sperm aneuploidy frequency is associated with high pregnancy rates in ICSI programmes." Hum Reprod **18**(7): 1371-1376.

Cakar, Z., B. Cetinkaya, D. Aras, B. Koca, S. Ozkavukcu, I. Kaplanoglu, A. Can and O. Cinar (2016). "Does combining magnetic-activated cell sorting with density gradient or swim-up improve sperm selection?" J Assist Reprod Genet **33**(8): 1059-1065.

Campbell, J. M., M. Lane, J. A. Owens and H. W. Bakos (2015). "Paternal obesity negatively affects male fertility and assisted reproduction outcomes: a systematic review and meta-analysis." Reprod Biomed Online **31**(5): 593-604.

Cappallo-Obermann, H., W. Schulze, H. Jastrow, V. Baukloh and A. N. Spiess (2011). "Highly purified spermatozoal RNA obtained by a novel method indicates an unusual 28S/18S rRNA ratio and suggests impaired ribosome assembly." Mol Hum Reprod **17**(11): 669-678.

Carrell, D. T. and L. Liu (2001). "Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis." J Androl **22**(4): 604-610.

Carrell, D. T., A. L. Wilcox, L. C. Udoff, C. Thorp and B. Campbell (2001). "Chromosome 15 aneuploidy in the sperm and conceptus of a sibling with variable familial expression of round-headed sperm syndrome." Fertil Steril **76**(6): 1258-1260.

Cassuto, N. G., D. Bouret, J. M. Plouchart, S. Jellad, P. Vanderzwalmen, R. Balet, L. Larue and Y. Barak (2009). "A new real-time morphology classification for human spermatozoa: a link for fertilization and improved embryo quality." Fertil Steril **92**(5): 1616-1625.

Cassuto, N. G., A. Hazout, J. L. Benifla, R. Balet, L. Larue and G. Viot (2011). "Decreasing birth defect in children by using high magnification selected spermatozoon injection." Fertility and Sterility **96**(3): S85.

- Cayli, S., A. Jakab, L. Ovari, E. Delpiano, C. Celik-Ozenci, D. Sakkas, D. Ward and G. Huszar (2003). "Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI." Reprod Biomed Online **7**(4): 462-468.
- Chan, P. J., J. D. Jacobson, J. U. Corselli and W. C. Patton (2006). "A simple zeta method for sperm selection based on membrane charge." Fertil Steril **85**(2): 481-486.
- Chang, H. J., R. D. Clark and H. Bachman (1990). "The phenotype of 45,X/46,XY mosaicism: an analysis of 92 prenatally diagnosed cases." Am J Hum Genet **46**(1): 156-167.
- Chelli, M. H., F. Ferfour, F. Boitrelle, M. Albert, D. Molina-Gomes, J. Selva and F. Vialard (2013). "High-magnification sperm selection does not decrease the aneuploidy rate in patients who are heterozygous for reciprocal translocations." J Assist Reprod Genet **30**(4): 525-530.
- Chen, S. J., J. P. Allam, Y. G. Duan and G. Haidl (2013). "Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches." Arch Gynecol Obstet **288**(1): 191-199.
- Chi, H. J., S. J. Kwak, S. G. Kim, Y. Y. Kim, J. Y. Park, C. S. Yoo, I. H. Park, H. G. Sun, J. W. Kim and K. H. Lee (2016). "Efficient isolation of sperm with high DNA integrity and stable chromatin packaging by a combination of density-gradient centrifugation and magnetic-activated cell sorting." Clinical and Experimental Reproductive Medicine **43**(4): 199-206.
- Chiang, M. H., N. Steuerwald, H. Lambert, E. K. Main and A. Steinleitner (1994). "Detection of human leukocyte antigen class I messenger ribonucleic acid transcripts in human spermatozoa via reverse transcription-polymerase chain reaction." Fertil Steril **61**(2): 276-280.
- Chinnasamy, T., J. L. Kingsley, F. Inci, P. J. Turek, M. P. Rosen, B. Behr, E. Tuzel and U. Demirci (2018). "Guidance and Self-Sorting of Active Swimmers: 3D Periodic Arrays Increase Persistence Length of Human Sperm Selecting for the Fittest." Adv Sci (Weinh) **5**(2): 1700531.
- Cho, C.-L. and A. Agarwal (2018). "Role of sperm DNA fragmentation in male factor infertility: A systematic review." Arab Journal of Urology **16**(1): 21-34.
- Cho, C., H. Jung-Ha, W. D. Willis, E. H. Goulding, P. Stein, Z. Xu, R. M. Schultz, N. B. Hecht and E. M. Eddy (2003). "Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice." Biol Reprod **69**(1): 211-217.
- Chohan, K. R., J. T. Griffin, M. Lafromboise, C. J. De Jonge and D. T. Carrell (2006). "Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm." J Androl **27**(1): 53-59.
- Ciftci, H., A. Verit, M. Savas, E. Yeni and O. Erel (2009). "Effects of N-acetylcysteine on semen parameters and oxidative/antioxidant status." Urology **74**(1): 73-76.
- Clermont, Y. (1963). "The cycle of the seminiferous epithelium in man." Am J Anat **112**: 35-51.

- Codrington, A. M., B. F. Hales and B. Robaire (2007). "Exposure of male rats to cyclophosphamide alters the chromatin structure and basic proteome in spermatozoa." Hum Reprod **22**(5): 1431-1442.
- Colombero, L. T., M. Moomjy, E. S. Sills, Z. Rosenwaks and G. D. Palermo (1999). "The role of structural integrity of the fertilising spermatozoon in early human embryogenesis." Zygote **7**(2): 157-163.
- Combelles, C. (2012). "Unique patient issues: early interventions and management." Semin Reprod Med **30**(3): 243-252.
- Combelles, C. M. H., K. Morozumi, R. Yanagimachi, L. Zhu, J. H. Fox and C. Racowsky (2010). "Diagnosing cellular defects in an unexplained case of total fertilization failure." Human Reproduction **25**(7): 1666-1671.
- Coskun, S., J. Hollanders, S. Al-Hassan, H. Al-Sufyan, H. Al-Mayman and K. Jaroudi (2000). "Day 5 versus day 3 embryo transfer: a controlled randomized trial." Hum Reprod **15**(9): 1947-1952.
- Courtens, J. L. and M. Loir (1981). "Ultrastructural detection of basic nucleoproteins: alcoholic phosphotungstic acid does not bind to arginine residues." J Ultrastruct Res **74**(3): 322-326.
- Curti, G., F. Skowronek, R. Vernochi, A. L. Rodriguez-Buzzi, J. C. Rodriguez-Buzzi, G. Casanova and R. Sapiro (2014). "Morphological evaluation of sperm from infertile men selected by magnetic activated cell sorting (MACS)." Reprod Biol **14**(4): 289-292.
- Czyba, J. C. and A. Montella (1993). Biologie de la reproduction humaine, Sauramps médical.
- Dadoune, J. P. (2009). "Spermatozoal RNAs: what about their functions?" Microsc Res Tech **72**(8): 536-551.
- Dadoune, J. P., M. J. Mayaux and M. L. Guihard-Moscato (1988). "Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics." Andrologia **20**(3): 211-217.
- Dadoune, J. P., A. Pawlak, M. F. Alfonsi and J. P. Siffroi (2005). "Identification of transcripts by macroarrays, RT-PCR and in situ hybridization in human ejaculate spermatozoa." Mol Hum Reprod **11**(2): 133-140.
- Dadoune, J. P., J. P. Siffroi and M. F. Alfonsi (2004). "Transcription in haploid male germ cells." Int Rev Cytol **237**: 1-56.
- Daris, B., A. Goropevsek, N. Hojnik and V. Vlajsavljevic (2010). "Sperm morphological abnormalities as indicators of DNA fragmentation and fertilization in ICSI." Arch Gynecol Obstet **281**(2): 363-367.
- Darzynkiewicz, Z., F. Traganos, T. Sharpless and M. R. Melamed (1975). "Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry." Exp Cell Res **90**(2): 411-428.

De Braekeleer, M. and T. N. Dao (1991). "Cytogenetic studies in human spontaneous abortions." Assisted Human Reproductive Technology. : 41-45.

De Braekeleer, M. and T. N. Dao (1991). "Cytogenetic studies in male infertility: a review." Hum Reprod **6**(2): 245-250.

De Braekeleer, M., A. Perrin and F. Morel (2006). "Chromosomal abnormalities in male infertility. In: Cytogenetics and Infertility. (ed M De Braekeleer)." Transworld Research Network, Trivandrum, India. **2**: 27-52.

de Lamirande, E. and C. O'Flaherty (2008). "Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases." Biochim Biophys Acta **1784**(1): 106-115.

de Vantéry Arrighi, C., H. Lucas, D. Chardonnens and A. de Agostini (2009). "Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential." Reproductive Biology and Endocrinology **7**(1): 1.

Degheidy, T., H. Abdelfattah, A. Seif, F. K. Albuz, S. Gazi and S. Abbas (2015). "Magnetic activated cell sorting: an effective method for reduction of sperm DNA fragmentation in varicocele men prior to assisted reproductive techniques." Andrologia **47**(8): 892-896.

Delbes, G., M. B. Herrero, E. T. Troeung and P. T. Chan (2013). "The use of complimentary assays to evaluate the enrichment of human sperm quality in asthenoteratozoospermic and teratozoospermic samples processed with Annexin-V magnetic activated cell sorting." Andrology **1**(5): 698-706.

Desai, N., J. Ludgin, R. Sharma, R. K. Anirudh and A. Agarwal (2017). Female and Male Gametogenesis. Clinical Reproductive Medicine and Surgery: A Practical Guide. T. Falcone and W. W. Hurd. Cham, Springer International Publishing: 19-45.

Dickson, M., D. M. Adedia and D. A. Abaye (2018). "The Influence of Advanced Paternal Age on Sperm Chromatin Integrity and Early Embryo Morphological Development during ICSI." Advances in Reproductive Sciences **06**(02): 35-49.

Dirican, E. K., O. D. Ozgun, S. Akarsu, K. O. Akin, O. Ercan, M. Ugurlu, C. Camsari, O. Kanyilmaz, A. Kaya and A. Unsal (2008). "Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction." J Assist Reprod Genet **25**(8): 375-381.

Dix, D. J., J. W. Allen, B. W. Collins, P. Poorman-Allen, C. Mori, D. R. Blizard, P. R. Brown, E. H. Goulding, B. D. Strong and E. M. Eddy (1997). "HSP70-2 is required for desynapsis of synaptonemal complexes during meiotic prophase in juvenile and adult mouse spermatocytes." Development **124**(22): 4595-4603.

Dixon, G. H., J. M. Aiken, J. M. Jankowski, D. I. McKenzie, R. Moir and J. C. States (1985). Organization and Evolution of the Protamine Genes of Salmonid Fishes. Chromosomal Proteins and Gene Expression. G. R. Reeck, G. H. Goodwin and P. Puigdomènech. Boston, MA, Springer US: 287-314.

Donkin, I., S. Versteyhe, L. R. Ingerslev, K. Qian, M. Mehta, L. Nordkap, B. Mortensen, E. V. Appel, N. Jorgensen, V. B. Kristiansen, T. Hansen, C. T. Workman, J. R. Zierath and R.

- Barres (2016). "Obesity and Bariatric Surgery Drive Epigenetic Variation of Spermatozoa in Humans." Cell Metab **23**(2): 369-378.
- Douet-Guilbert, N., M. J. Le Bris, V. Amice, C. Marchetti, B. Delobel, J. Amice, M. De Braekeleer and F. Morel (2005). "Interchromosomal effect in sperm of males with translocations: report of 6 cases and review of the literature." Int J Androl **28**(6): 372-379.
- Egozcue, S., J. Blanco, J. M. Vendrell, F. Garcia, A. Veiga, B. Aran, P. N. Barri, F. Vidal and J. Egozcue (2000). "Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion." Hum Reprod Update **6**(1): 93-105.
- Esbert, M., A. Godo, S. R. Soares, M. Florensa, D. Amoros, A. Ballesteros and F. Vidal (2017). "Spermatozoa with numerical chromosomal abnormalities are more prone to be retained by Annexin V-MACS columns." Andrology **5**(4): 807-813.
- Esbert, M., A. Pacheco, F. Vidal, M. Florensa, M. Riqueros, A. Ballesteros, N. Garrido and G. Calderon (2011). "Impact of sperm DNA fragmentation on the outcome of IVF with own or donated oocytes." Reprod Biomed Online **23**(6): 704-710.
- Escudero, T., M. Lee, D. Carrel, J. Blanco and S. Munne (2000). "Analysis of chromosome abnormalities in sperm and embryos from two 45,XY,t(13;14)(q10;q10) carriers." Prenat Diagn **20**(7): 599-602.
- Esfandiari, N., M. H. Javed, L. Gotlieb and R. F. Casper (2005). "Complete failed fertilization after intracytoplasmic sperm injection--analysis of 10 years' data." Int J Fertil Womens Med **50**(4): 187-192.
- Estop, A., S. Munne, K. Ciepły, K. Vandermark and A. Lamb (1998). "Meiotic products of a Klinefelter 47,XXY male as determined by sperm fluorescence in-situ hybridization analysis." Human Reproduction **13**: 124-127.
- Estop, A. M., K. M. Ciepły and C. E. Aston (1997). "The meiotic segregation pattern of a reciprocal translocation t(10;12)(q26.1;p13.3) by fluorescence in situ hybridization sperm analysis." Eur J Hum Genet **5**(2): 78-82.
- Evenson, D. P., Z. Darzynkiewicz and M. R. Melamed (1980). "Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility." Science **210**(4474): 1131-1133.
- Evenson, D. P., L. K. Jost, D. Marshall, M. J. Zinaman, E. Clegg, K. Purvis, P. de Angelis and O. P. Claussen (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.
- Faure, C., C. Dupont, N. Sermondade and R. Lévy (2011). "Antioxydants et infertilité masculine." Médecine de la Reproduction **13**(4): 275-283.
- Favier, A. (2006). "[Oxidative stress in human diseases]." Ann Pharm Fr **64**(6): 390-396.
- Ferguson-Smith, M. A., B. Lennox, W. S. Mack and J. S. Stewart (1957). "Klinefelter's syndrome; frequency and testicular morphology in relation to nuclear sex." Lancet **273**(6987): 167-169.

Ferlin, A., A. Garolla and C. Foresta (2005). "Chromosome abnormalities in sperm of individuals with constitutional sex chromosomal abnormalities." Cytogenet Genome Res **111**(3-4): 310-316.

Ferlin, A., F. Raicu, V. Gatta, D. Zuccarello, G. Palka and C. Foresta (2007). "Male infertility: role of genetic background." Reprod Biomed Online **14**(6): 734-745.

Fernandez-Gonzalez, R., P. N. Moreira, M. Perez-Crespo, M. Sanchez-Martin, M. A. Ramirez, E. Pericuesta, A. Bilbao, P. Bermejo-Alvarez, J. de Dios Hourcade, F. R. de Fonseca and A. Gutierrez-Adan (2008). "Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring." Biol Reprod **78**(4): 761-772.

Fernandez, J. L., L. Muriel, V. Goyanes, E. Segrelles, J. Gosalvez, M. Enciso, M. LaFromboise and C. De Jonge (2005). "Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test." Fertil Steril **84**(4): 833-842.

Ferreira, R. C., D. P. Braga, T. C. Bonetti, F. F. Pasqualotto, A. Iaconelli, Jr. and E. Borges, Jr. (2010). "Negative influence of paternal age on clinical intracytoplasmic sperm injection cycle outcomes in oligozoospermic patients." Fertil Steril **93**(6): 1870-1874.

Fishel, S., I. Aslam, F. Lisi, L. Rinaldi, J. Timson, M. Jacobson, L. Gobetz, S. Green, A. Campbell and R. Lisi (2000). "Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in-vitro conception?" Hum Reprod **15**(6): 1278-1283.

Flaherty, S. P., D. Payne and C. D. Matthews (1998). "Fertilization failures and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection." Hum Reprod **13 Suppl 1**: 155-164.

Flannigan, R. and P. N. Schlegel (2017). "Genetic diagnostics of male infertility in clinical practice." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **44**: 26-37.

Foresta, C., A. Garolla, L. Bartoloni, A. Bettella and A. Ferlin (2005). "Genetic abnormalities among severely oligospermic men who are candidates for intracytoplasmic sperm injection." J Clin Endocrinol Metab **90**(1): 152-156.

Foresta, C., E. Moro and A. Ferlin (2001). "Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis." Endocr Rev **22**(2): 226-239.

Francavilla, S., P. D'Abrizio, N. Rucci, G. Silvano, G. Properzi, E. Straface, G. Cordeschi, S. Necozone, L. Gnessi, M. Arizzi and S. Ulisse (2000). "Fas and Fas ligand expression in fetal and adult human testis with normal or deranged spermatogenesis." J Clin Endocrinol Metab **85**(8): 2692-2700.

Franco, H. L., D. Dai, K. Y. Lee, C. A. Rubel, D. Roop, D. Boerboom, J. W. Jeong, J. P. Lydon, I. C. Bagchi, M. K. Bagchi and F. J. DeMayo (2011). "WNT4 is a key regulator of normal postnatal uterine development and progesterone signaling during embryo implantation and decidualization in the mouse." FASEB J **25**(4): 1176-1187.

Frapsauce, C., C. Pionneau, J. Bouley, V. de Larouzière, I. Berthaut, C. Ravel, J. M. Antoine, F. Soubrier and J. Mandelbaum (2009). "Infertilité masculine chez les patients

normospermiques : analyse protéomique des spermés normaux non fécondants en fécondation in vitro classique." Gynécologie Obstétrique & Fertilité **37**(10): 796-802.

Frattarelli, J. L., K. A. Miller, B. T. Miller, K. Elkind-Hirsch and R. T. Scott, Jr. (2008). "Male age negatively impacts embryo development and reproductive outcome in donor oocyte assisted reproductive technology cycles." Fertility and Sterility **90**(1): 97-103.

French, D. B., E. S. Sabanegh, Jr., J. Goldfarb and N. Desai (2010). "Does severe teratozoospermia affect blastocyst formation, live birth rate, and other clinical outcome parameters in ICSI cycles?" Fertil Steril **93**(4): 1097-1103.

Frydman, N., N. Prisant, L. Hesters, R. Frydman, G. Tachdjian, P. Cohen-Bacrie and R. Fanchin (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.

Gabrielsen, A., K. Petersen, A. L. Mikkelsen and S. Lindenberg (1996). "Intracytoplasmic sperm injection does not overcome an oocyte defect in previous fertilization failure with conventional in-vitro fertilization and normal spermatozoa." Hum Reprod **11**(9): 1963-1965.

Gandini, L., F. Lombardo, D. Paoli, L. Caponecchia, G. Familiari, C. Verlengia, F. Dondero and A. Lenzi (2000). "Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa." Hum Reprod **15**(4): 830-839.

Gapp, K., A. Jawaid, P. Sarkies, J. Bohacek, P. Pelczar, J. Prados, L. Farinelli, E. Miska and I. M. Mansuy (2014). "Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice." Nat Neurosci **17**(5): 667-669.

Garcia-Herrero, S., N. Garrido, J. A. Martinez-Conejero, J. Remohi, A. Pellicer and M. Meseguer (2010a). "Ontological evaluation of transcriptional differences between sperm of infertile males and fertile donors using microarray analysis." J Assist Reprod Genet **27**(2-3): 111-120.

Garcia-Herrero, S., N. Garrido, J. A. Martinez-Conejero, J. Remohi, A. Pellicer and M. Meseguer (2011). "Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI." Reprod Biomed Online **22**(1): 25-36.

Garcia-Herrero, S., M. Meseguer, J. A. Martinez-Conejero, J. Remohi, A. Pellicer and N. Garrido (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**(4): 1360-1373.

Garcia-Peiro, A., J. Martinez-Heredia, M. Oliver-Bonet, C. Abad, M. J. Amengual, J. Navarro, C. Jones, K. Coward, J. Gosalvez and J. Benet (2011). "Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm." Fertil Steril **95**(1): 105-109.

Gardner, D. K., M. Lane, J. Stevens, T. Schlenker and W. B. Schoolcraft (2000). "Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer." Fertil Steril **73**(6): 1155-1158.

Gardner, R. and G. Sutherland (2004). "Chromosome abnormalities and genetic counselling, 3rd edn." Oxford University Press, New York.

- Garolla, A., D. Fortini, M. Menegazzo, L. De Toni, V. Nicoletti, A. Moretti, R. Selice, B. Engl and C. Foresta (2008). "High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status." Reprod Biomed Online **17**(5): 610-616.
- Garrido, N., S. Garcia-Herrero and M. Meseguer (2013). "Assessment of sperm using mRNA microarray technology." Fertil Steril **99**(4): 1008-1022.
- Gasca, S., F. Pellestor, S. Assou, V. Loup, T. Anahory, H. Dechaud, J. De Vos and S. Hamamah (2007). "Identifying new human oocyte marker genes: a microarray approach." Reprod Biomed Online **14**(2): 175-183.
- Gasca, S., L. Reyftmann, F. Pellestor, T. Reme, S. Assou, T. Anahory, H. Dechaud, B. Klein, J. De Vos and S. Hamamah (2008). "Total fertilization failure and molecular abnormalities in metaphase II oocytes." Reprod Biomed Online **17**(6): 772-781.
- Gatewood, J. M., G. R. Cook, R. Balhorn, E. M. Bradbury and C. W. Schmid (1987). "Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin." Science **236**(4804): 962-964.
- Georgiou, I., M. Syrrou, N. Pardalidis, K. Karakitsios, T. Mantzavinos, N. Giotitsas, D. Loutradis, F. Dimitriadis, M. Saito, I. Miyagawa, P. Tzoumis, A. Sylakos, N. Kanakas, T. Moustakareas, D. Baltogiannis, S. Touloupides, D. Giannakis, M. Fatouros and N. Sofikitis (2006). "Genetic and epigenetic risks of intracytoplasmic sperm injection method." Asian J Androl **8**(6): 643-673.
- Geremia, R., A. D'Agostino and V. Monesi (1978). "Biochemical evidence of haploid gene activity in spermatogenesis of the mouse." Experimental Cell Research **111**(1): 23-30.
- Gharagozloo, P. and R. J. Aitken (2011). "The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy." Hum Reprod **26**(7): 1628-1640.
- Gianaroli, L., M. C. Magli, A. P. Ferraretti, A. Crippa, M. Lappi, S. Capitani and B. Baccetti (2010). "Birefringence characteristics in sperm heads allow for the selection of reacted spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection." Fertil Steril **93**(3): 807-813.
- Glander, H. J. and J. Schaller (2000). "Hidden effects of cryopreservation on quality of human spermatozoa." Cell and tissue banking **1**(2): 133-142.
- Glander, H. J., J. Schiller, R. Suss, U. Paasch, S. Grunewald and J. Arnhold (2002). "Deterioration of spermatozoal plasma membrane is associated with an increase of sperm lyso-phosphatidylcholines." Andrologia **34**(6): 360-366.
- Goksan Pabuccu, E., G. Sinem Caglar, O. Dogus Demirkiran and R. Pabuccu (2016). "Uncommon but devastating event: total fertilisation failure following intracytoplasmic sperm injection." Andrologia **48**(2): 164-170.
- Gonzalez-Marin, C., J. Gosalvez and R. Roy (2012). "Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells." Int J Mol Sci **13**(11): 14026-14052.
- Goodrich, R., G. Johnson and S. A. Krawetz (2007). "The preparation of human spermatozoal RNA for clinical analysis." Arch Androl **53**(3): 161-167.

- Goodrich, R. J., E. Anton and S. A. Krawetz (2013). "Isolating mRNA and small noncoding RNAs from human sperm." Methods Mol Biol **927**: 385-396.
- Govin, J., C. Caron, C. Lestrat, S. Rousseaux and S. Khochbin (2004). "The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis." Eur J Biochem **271**(17): 3459-3469.
- Grandjean, V., P. Gounon, N. Wagner, L. Martin, K. D. Wagner, F. Bernex, F. Cuzin and M. Rassoulzadegan (2009). "The miR-124-Sox9 paramutation: RNA-mediated epigenetic control of embryonic and adult growth." Development **136**(21): 3647-3655.
- Greco, E., S. Romano, M. Iacobelli, S. Ferrero, E. Baroni, M. G. Minasi, F. Ubaldi, L. Rienzi and J. Tesarik (2005). "ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment." Hum Reprod **20**(9): 2590-2594.
- Grunewald, S., U. Paasch and H. J. Glander (2001). "Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting." Cell Tissue Bank **2**(3): 127-133.
- Grunewald, S., U. Paasch, H. J. Glander and U. Andereg (2005). "Mature human spermatozoa do not transcribe novel RNA." Andrologia **37**(2-3): 69-71.
- Grunewald, S., M. Reinhardt, V. Blumenauer, T. M. Said, A. Agarwal, F. Abu Hmeidan, H.-J. Glander and U. Paasch (2009). "Increased sperm chromatin decondensation in selected nonapoptotic spermatozoa of patients with male infertility." Fertility and Sterility **92**(2): 572-577.
- Grunstein, M. (1997). "Histone acetylation in chromatin structure and transcription." Nature **389**: 349.
- Guérin, J. F. (2016). Chapitre8 - La spermatogenèse. Infertilité. R. Frydman. Paris, Content Repository Only!: 59-64.
- Gunes, S., M. Al-Sadaan and A. Agarwal (2015). "Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility." Reprod Biomed Online **31**(3): 309-319.
- Gunes, S. and S. Sertyel (2018). "Sperm DNA Damage and Oocyte Repair Capability." In: Zini A., Agarwal A. (eds) A Clinician's Guide to Sperm DNA and Chromatin Damage. Springer, Cham: 321-346.
- Gur, Y. and H. Breitbart (2006). "Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes." Genes Dev **20**(4): 411-416.
- Guttenbach, M., H. Michelmann, B. Hinney, W. Engel and M. Schmid (1997). "Segregation of sex chromosomes into sperm nuclei in a man with 47,XXY Klinefelter's Karyotype: a FISH analysis." Human Genetics **99**: 474-477.
- Hamamah, S., L. Corcia, F. Entezami and G. El Wiey (2000). "Techniques d'AMP et leurs indications dans l'hypofertilité masculine." Andrologie **10**(3): 279-283.
- Hamatani, T. (2012). "Human spermatozoal RNAs." Fertility and Sterility **97**(2): 275-281.

- Hamatani, T., G. Falco, M. G. Carter, H. Akutsu, C. A. Stagg, A. A. Sharov, D. B. Dudekula, V. VanBuren and M. S. H. Ko (2004). "Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes." Human Molecular Genetics **13**(19): 2263-2278.
- Hammadeh, M. E., M. Stieber, G. Haidl and W. Schmidt (1998). "Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program." Andrologia **30**(1): 29-35.
- Hammoud, S. S., D. A. Nix, H. Zhang, J. Purwar, D. T. Carrell and B. R. Cairns (2009). "Distinctive Chromatin in Human Sperm Packages Genes for Embryo Development." Nature **460**(7254): 473-478.
- Hassold, T., M. Abruzzo, K. Adkins, D. Griffin, M. Merrill, E. Millie, D. Saker, J. Shen and M. Zaragoza (1996). "Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology." Environ Mol Mutagen **28**(3): 167-175.
- Hatirnaz, S. and M. Kanat Pektas (2017). "Day 3 embryo transfer versus day 5 blastocyst transfers: A prospective randomized controlled trial." Turk J Obstet Gynecol **14**(2): 82-88.
- Hayashi, S., J. Yang, L. Christenson, R. Yanagimachi and N. B. Hecht (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**(4): 1170-1176.
- Healy, D. L., A. O. Trounson and A. N. Andersen (1994). "Female infertility: causes and treatment." Lancet **343**(8912): 1539-1544.
- Hecht, F. and B. Hecht (1987). "Aneuploidy in humans: dimensions, demography and dangers of abnormal number of chromosomes." In: Vig BK, Sandberg AA (eds) Aneuploidy. Part A: incidence and etiology. Alan R. Liss, New York: 9-49.
- Heindryckx, B., J. Van der Elst, P. De Sutter and M. Dhont (2005). "Treatment option for sperm- or oocyte-related fertilization failure: assisted oocyte activation following diagnostic heterologous ICSI." Hum Reprod **20**(8): 2237-2241.
- Henkel, R. (2012). "Sperm preparation: state-of-the-art—physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods." Asian Journal of Andrology **14**(2): 260-269.
- Herrero, M., G. Delbes, E. Troueng, H. Holzer and P. Chan (2012). "28th Annual Meeting of the European Society on Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Differential enrichment of sperm with no DNA strand breaks using magnetic activated cell sorting (MACS) in men with various categories of semen parameters." Human Reproduction **27**(suppl 2): ii121-ii150.
- Herrero, M. B., G. Delbes, J. T. Chung, W. Y. Son, H. Holzer, W. Buckett and P. Chan (2013). "Case report: the use of annexin V coupled with magnetic activated cell sorting in cryopreserved spermatozoa from a male cancer survivor: healthy twin newborns after two previous ICSI failures." J Assist Reprod Genet **30**(11): 1415-1419.
- Heytens, E., J. Parrington, K. Coward, C. Young, S. Lambrecht, S. Y. Yoon, R. A. Fissore, R. Hamer, C. M. Deane, M. Ruas, P. Grasa, R. Soleimani, C. A. Cuvelier, J. Gerris, M. Dhont,

- D. Deforce, L. Leybaert and P. De Sutter (2009). "Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLC ζ) in spermatozoa from infertile men." Human Reproduction **24**(10): 2417-2428.
- Hichri, R., H. Amor, M. Khammari, M. Harzallah, S. El Fekih, A. Saad, M. Ajina and H. Ben Ali (2018). "Apoptotic sperm biomarkers and the correlation between conventional sperm parameters and clinical characteristics." Andrologia **50**(1).
- Holschbach, V., J. Weigert, J. E. Dietrich, S. Roesner, M. Montag, T. Strowitzki and B. Toth (2017). "Pregnancy rates of day 4 and day 5 embryos after culture in an integrated time-lapse incubator." Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E **15**: 37.
- Hoogendijk, C. F., T. F. Kruger, P. J. Bouic and R. R. Henkel (2009). "A novel approach for the selection of human sperm using annexin V-binding and flow cytometry." Fertil Steril **91**(4): 1285-1292.
- Hook, E. (1985). "Aneuploidy: etiology and mechanism." In: Dellarco VL, Voytek PE, Hollander A (eds), Plenum, New York.; 7-33.
- Huckins, C. (1978). "The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium." Anat Rec **190**(4): 905-926.
- Huszar, G., C. C. Ozenci, S. Cayli, Z. Zavaczki, E. Hansch and L. Vigue (2003). "Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status." Fertil Steril **79 Suppl 3**: 1616-1624.
- Inhorn, M. C. and P. Patrizio (2015). "Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century." Hum Reprod Update **21**(4): 411-426.
- Ishijima, S. A., M. Okuno and H. Mohri (1991). "Zeta potential of human X- and Y-bearing sperm." International Journal of Andrology **14**(5): 340-347.
- Jacobs, P. A., M. Brunton, M. M. Melville, R. P. Brittain and W. F. McClemon (1965). "Aggressive Behaviour, Mental Sub-normality and the XYY Male." Nature **208**: 1351.
- Jacobs, P. A. and J. A. Strong (1959). "A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism." Nature **183**(4657): 302-303.
- Jakab, A., D. Sakkas, E. Delpiano, S. Cayli, E. Kovanci, D. Ward, A. Revelli and G. Huszar (2005). "Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies." Fertil Steril **84**(6): 1665-1673.
- Jedrzejczak, P., B. Kempisty, A. Bryja, M. Mostowska, M. Depa-Martynow, L. Pawelczyk and P. P. Jagodzinski (2007). "Quantitative Assessment of Transition Proteins 1, 2 Spermatid-Specific Linker Histone H1-Like Protein Transcripts in Spermatozoa from Normozoospermic and Asthenozoospermic Men." Archives of Andrology **53**(4): 199-205.
- Jena, N. R. (2012). "DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair." J Biosci **37**(3): 503-517.

- Jin, M., Y. Yu and H. Huang (2012). "An update on primary ovarian insufficiency." Sci China Life Sci **55**(8): 677-686.
- Jodar, M., S. Kalko, J. Castillo, J. L. Balleca and R. Oliva (2012). "Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients." Hum Reprod **27**(5): 1431-1438.
- Jodar, M., S. Selvaraju, E. Sendler, M. P. Diamond and S. A. Krawetz (2013). "The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs." Hum Reprod Update **19**(6): 604-624.
- Johnson, G. D., E. Sendler, C. Lalancette, R. Hauser, M. P. Diamond and S. A. Krawetz (2011). "Cleavage of rRNA ensures translational cessation in sperm at fertilization." Mol Hum Reprod **17**(12): 721-726.
- Kahyaoglu, I., B. Demir, A. Turkkani, O. Cinar, S. Dilbaz, B. Dilbaz and L. Mollamahmutoglu (2014). "Total fertilization failure: is it the end of the story?" Journal of Assisted Reproduction and Genetics **31**(9): 1155-1160.
- Kashir, J., B. Heindryckx, C. Jones, P. De Sutter, J. Parrington and K. Coward (2010). "Oocyte activation, phospholipase C zeta and human infertility." Human Reproduction Update **16**(6): 690-703.
- Keegan, B. R., S. Barton, X. Sanchez, A. S. Berkeley, L. C. Krey and J. Grifo (2007). "Isolated teratozoospermia does not affect in vitro fertilization outcome and is not an indication for intracytoplasmic sperm injection." Fertil Steril **88**(6): 1583-1588.
- Keel, B. A., J. V. May and C. J. D. Jonge (2000). Handbook of the assisted reproduction laboratory, CRC Press
- Kempisty, B., M. Depa-Martynow, M. Lianeri, P. Jedrzejczak, A. Darul-Wasowicz and P. P. Jagodzinski (2007). "Evaluation of protamines 1 and 2 transcript contents in spermatozoa from asthenozoospermic men." Folia histochemica et cytobiologica **45**: 109-113.
- Keskes-Ammar, L., N. Feki-Chakroun, T. Rebai, Z. Sahnoun, H. Ghazzi, S. Hammami, K. Zghal, H. Fki, J. Damak and A. Bahloul (2003). "Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men." Arch Androl **49**(2): 83-94.
- Khallouk, D. A., M. Tazi, M. EL Fassi and M. Farih (2010). "Infertile_masculine physiopathologie bilan et prise en charge." Urologie **170**: 421-429.
- Kim, S. W., B. C. Jee, S. K. Kim and S. H. Kim (2017). "Sperm DNA fragmentation and sex chromosome aneuploidy after swim-up versus density gradient centrifugation." Clinical and Experimental Reproductive Medicine **44**(4): 201-206.
- Kinzer, D. R., C. B. Barrett and R. D. Powers (2008). "Prognosis for clinical pregnancy and delivery after total fertilization failure during conventional in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection." Fertil Steril **90**(2): 284-288.
- Kjessler, B. (1966). "Karyotype, meiosis and spermatogenesis in a sample of men attending an infertility clinic." Monogr Hum Genet **2**: 1-93.

- Klaude, M., S. Eriksson, J. Nygren and G. Ahnstrom (1996). "The comet assay: mechanisms and technical considerations." Mutat Res **363**(2): 89-96.
- Klee, C. B. (1988). "Ca²⁺-dependent phospholipid- (and membrane-) binding proteins." Biochemistry **27**(18): 6645-6653.
- Kleene, K. C. (2003). "Patterns, mechanisms, and functions of translation regulation in mammalian spermatogenic cells." Cytogenet Genome Res **103**(3-4): 217-224.
- Kong, M., E. S. Diaz and P. Morales (2009). "Participation of the human sperm proteasome in the capacitation process and its regulation by protein kinase A and tyrosine kinase." Biol Reprod **80**(5): 1026-1035.
- Korkmaz, C., Y. B. Tekin, M. Sakinci and C. M. Ercan (2015). "Effects of maternal ageing on ICSI outcomes and embryo development in relation to oocytes morphological characteristics of birefringent structures." Zygote **23**(4): 550-555.
- Kosower, N. S., H. Katayose and R. Yanagimachi (1992). "Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei." J Androl **13**(4): 342-348.
- Kothari, S., A. Thompson, A. Agarwal and S. S. du Plessis (2010). "Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function." Indian J Exp Biol **48**(5): 425-435.
- Kramer, J. A. and S. A. Krawetz (1997). "RNA in spermatozoa: implications for the alternative haploid genome." Mol Hum Reprod **3**(6): 473-478.
- Krawetz, S. A. (2005). "Paternal contribution: new insights and future challenges." Nat Rev Genet **6**(8): 633-642.
- Krawetz, S. A., A. Kruger, C. Lalancette, R. Tagett, E. Anton, S. Draghici and M. P. Diamond (2011). "A survey of small RNAs in human sperm." Hum Reprod **26**(12): 3401-3412.
- Krawetz, S. A., A. Kruger, C. Lalancette, R. Tagett, E. Anton, S. Draghici and M. P. Diamond (2011). "A survey of small RNAs in human sperm." Human Reproduction (Oxford, England) **26**(12): 3401-3412.
- Krog, M., M. Prior, E. Carlsen, A. Loft, J. Forman, A. Pinborg and A. N. Andersen (2015). "Fertilization failure after IVF in 304 couples--a case-control study on predictors and long-term prognosis." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **184**: 32-37.
- Kumar, G., D. Patel and R. K. Naz (1993). "c-MYC mRNA is present in human sperm cells." Cell Mol Biol Res **39**(2): 111-117.
- Laberge, R. M. and G. Boissonneault (2005). "On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids." Biol Reprod **73**(2): 289-296.
- Lalancette, C., A. E. Platts, G. D. Johnson, B. R. Emery, D. T. Carrell and S. A. Krawetz (2009). "Identification of human sperm transcripts as candidate markers of male fertility." J Mol Med (Berl) **87**(7): 735-748.

- Le-du, A., M. Lelorc'h, N. Frydman, M. Benkhalifa, S. Romana, M. Vekemans, R. Frydman and G. Tachdjian (2004). "Apoptose et ségrégation méiotique dans les spermatozoïdes d'hommes porteurs de translocations." Génétique et infertilité **14**: 186-192.
- Lee, J., J. H. Richburg, S. C. Younkin and K. Boekelheide (1997). "The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis." Endocrinology **138**(5): 2081-2088.
- Lee, T.-H., C.-H. Liu, Y.-T. Shih, H.-M. Tsao, C.-C. Huang, H.-H. Chen and M.-S. Lee (2010). "Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility." Human Reproduction **25**(4): 839-846.
- Lee, T.-H., C.-H. Liu, Y.-T. Shih, H.-M. Tsao, C.-C. Huang, H.-H. Chen and M.-S. Lee (2010). "Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility†." Human Reproduction **25**(4): 839-846.
- Lejeune, J. (1965). "[The meiotic consequences of chromosome modifications]." Ann Genet **8**(1): 9-10.
- Levi-Setti, P. E., F. Cirillo, A. Smeraldi, E. Morengi, G. E. G. Mulazzani and E. Albani (2018). "No advantage of fresh blastocyst versus cleavage stage embryo transfer in women under the age of 39: a randomized controlled study." J Assist Reprod Genet **35**(3): 457-465.
- Levron, J., A. Aviram-Goldring, S. Rienstien, D. Bider, J. Dor and G. Raviv (2013). "Aneuploidy rates for chromosomes X/Y and 18 among preselected spermatozoa in men with severe teratospermia." Reprod Biomed Online **27**(3): 280-285.
- Lewis, S. E., I. Agbaje and J. Alvarez (2008). "Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis." Syst Biol Reprod Med **54**(3): 111-125.
- Lewis, S. E. and R. J. Aitken (2005). "DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy." Cell Tissue Res **322**(1): 33-41.
- Linschooten, J. O., F. J. Van Schooten, A. Baumgartner, E. Cemeli, J. Van Delft, D. Anderson and R. W. Godschalk (2009). "Use of spermatozoal mRNA profiles to study gene-environment interactions in human germ cells." Mutat Res **667**(1-2): 70-76.
- Liu, B., P. Wang, Z. Wang, Y. Jia, X. Niu, W. Wang and W. Zhang (2010). "Analysis and difference of voltage-dependent anion channel mRNA in ejaculated spermatozoa from normozoospermic fertile donors and infertile patients with idiopathic asthenozoospermia." Journal of Assisted Reproduction and Genetics **27**(12): 719-724.
- Liu, C. H., H. M. Tsao, T. C. Cheng, H. M. Wu, C. C. Huang, C. I. Chen, D. P. Lin and M. S. Lee (2004). "DNA fragmentation, mitochondrial dysfunction and chromosomal aneuploidy in the spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic males." J Assist Reprod Genet **21**(4): 119-126.
- Liu, D. Y. and H. W. Baker (2000). "Defective sperm-zona pellucida interaction: a major cause of failure of fertilization in clinical in-vitro fertilization." Hum Reprod **15**(3): 702-708.

- Liu, D. Y., C. Garrett and H. W. Baker (2004). "Clinical application of sperm-oocyte interaction tests in in vitro fertilization--embryo transfer and intracytoplasmic sperm injection programs." Fertil Steril **82**(5): 1251-1263.
- Lombardo, F., A. Sansone, F. Romanelli, D. Paoli, L. Gandini and A. Lenzi (2011). "The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility: an overview." Asian J Androl **13**(5): 690-697.
- Lopes, S., J. G. Sun, A. Jurisicova, J. Meriano and R. F. Casper (1998). "Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection." Fertil Steril **69**(3): 528-532.
- Luna, M., E. Finkler, J. Barritt, N. Bar-Chama, B. Sandler, A. B. Copperman and L. Grunfeld (2009). "Paternal age and assisted reproductive technology outcome in ovum recipients." Fertility and Sterility **92**(5): 1772-1775.
- MacLeod, J. (1943). "The RÔle of Oxygen in the Metabolism and Motility of Human Spermatozoa." American Journal of Physiology-Legacy Content **138**(3): 512-518.
- Mahutte, N. G. and A. Arici (2003). "Failed fertilization: is it predictable?" Curr Opin Obstet Gynecol **15**(3): 211-218.
- Manicardi, G. C., P. G. Bianchi, S. Pantano, P. Azzoni, D. Bizzaro, U. Bianchi and D. Sakkas (1995). "Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility." Biol Reprod **52**(4): 864-867.
- Mao, S., R. J. Goodrich, R. Hauser, S. M. Schrader, Z. Chen and S. A. Krawetz (2013). "Evaluation of the effectiveness of semen storage and sperm purification methods for spermatozoa transcript profiling." Syst Biol Reprod Med **59**(5): 287-295.
- Marchetti, C. and P. Marchetti (2005). "Detection of apoptotic markers in human ejaculated spermatozoa as new methods in human reproductive biology." Gynecol Obstet Fertil **33**(9): 669-677.
- Marchetti, C., G. Obert, A. Deffosez, P. Formstecher and P. Marchetti (2002). "Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm." Hum Reprod **17**(5): 1257-1265.
- Martin, R. H. (2008). "Cytogenetic determinants of male fertility." Hum Reprod Update **14**(4): 379-390.
- Martin, R. H. (2008). "Meiotic errors in human oogenesis and spermatogenesis." Reprod Biomed Online **16**(4): 523-531.
- May-Panloup, P., M. C. Malinge, L. Larget-Piet and M. F. Chrétien (2001). "Infertilité masculine d'origine génétique et assistance médicale à la procréation." Gynécol Obstét Fertil **29**: 583-593.
- McPherson, S. and F. J. Longo (1993). "Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids." Eur J Histochem **37**(2): 109-128.

- McPHERSON, S. M. and F. J. Longo (1992). "Localization of DNase I-Hypersensitive Regions During Rat Spermatogenesis: Stage-Dependent Patterns and Unique Sensitivity of Elongating Spermatids." Molecular reproduction and development **31**: 268-279.
- McPherson, S. M. and F. J. Longo (1993). "Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II." Dev Biol **158**(1): 122-130.
- Melie, N. A., O. A. Adeniyi, O. M. Igbneweka and R. A. Ajayi (2003). "Predictive value of the number of oocytes retrieved at ultrasound-directed follicular aspiration with regard to fertilization rates and pregnancy outcome in intracytoplasmic sperm injection treatment cycles." Fertil Steril **80**(6): 1376-1379.
- Mello, M. L. (1982). "Induced metachromasia in bull spermatozoa." Histochemistry **74**(3): 387-392.
- Menezo, Y., B. Dale and M. Cohen (2010). "DNA damage and repair in human oocytes and embryos: a review." Zygote **18**(4): 357-365.
- Menezo, Y., F. Entezami, I. Lichtblau, M. Cohen, S. Belloc and M. Brack (2012). "[Oxidative stress and fertility: false evidence and bad recipes]." Gynecol Obstet Fertil **40**(12): 787-796.
- Menezo, Y., D. Evenson, M. Cohen and B. Dale (2014). "Effect of antioxidants on sperm genetic damage." Adv Exp Med Biol **791**: 173-189.
- Menezo, Y. J. (2006). "Paternal and maternal factors in preimplantation embryogenesis: interaction with the biochemical environment." Reprod Biomed Online **12**(5): 616-621.
- Meniru, G. I. (2004). Cambridge guide to infertility management and assisted reproduction, Cambridge University Press.
- Menken, J., J. Trussell and U. Larsen (1986). "Age and infertility." Science **233**(4771): 1389-1394.
- Metzler-Guillemain, C., G. Victorero, C. Lepoivre, A. Bergon, M. Yammine, J. Perrin, I. Sari-Minodier, N. Boulanger, P. Rihet and C. Nguyen (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**(3-4): 347-351.
- Miki, K., W. D. Willis, P. R. Brown, E. H. Goulding, K. D. Fulcher and E. M. Eddy (2002). "Targeted disruption of the Akap4 gene causes defects in sperm flagellum and motility." Dev Biol **248**(2): 331-342.
- Miller, D., D. Briggs, H. Snowden, J. Hamlington, S. Rollinson, R. Lilford and S. A. Krawetz (1999). "A complex population of RNAs exists in human ejaculate spermatozoa: implications for understanding molecular aspects of spermiogenesis." Gene **237**(2): 385-392.
- Miller, D. and G. C. Ostermeier (2006). "Spermatozoal RNA: Why is it there and what does it do?" Gynecol Obstet Fertil **34**(9): 840-846.

- Miller, D., G. C. Ostermeier and S. A. Krawetz (2005). "The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA." Trends Mol Med **11**(4): 156-163.
- Miller, D., P. Z. Tang, C. Skinner and R. Lilford (1994). "Differential RNA fingerprinting as a tool in the analysis of spermatozoal gene expression." Hum Reprod **9**(5): 864-869.
- Miltenyi, S., W. Muller, W. Weichel and A. Radbruch (1990). "High gradient magnetic cell separation with MACS." Cytometry **11**(2): 231-238.
- Mitchell, L. A., G. N. De Iuliis and R. J. Aitken (2011). "The TUNEL assay consistently underestimates DNA damage in human spermatozoa and is influenced by DNA compaction and cell vitality: development of an improved methodology." International Journal of Andrology **34**(1): 2-13.
- Miyagawa, Y., H. Nishimura, A. Tsujimura, Y. Matsuoka, K. Matsumiya, A. Okuyama, Y. Nishimune and H. Tanaka (2005). "Single-nucleotide polymorphisms and mutation analyses of the TNP1 and TNP2 genes of fertile and infertile human male populations." J Androl **26**(6): 779-786.
- Monesi, V. (1965). "Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse: RNA and protein." Experimental Cell Research **39**(1): 197-224.
- Mongkolchaipak, S. and T. Vutyavanich (2013). "No difference in high-magnification morphology and hyaluronic acid binding in the selection of euploid spermatozoa with intact DNA." Asian J Androl **15**(3): 421-424.
- Montjean, D., P. De La Grange, D. Gentien, A. Rapinat, S. Belloc, P. Cohen-Bacrie, Y. Menezo and M. Benkhalifa (2012). "Sperm transcriptome profiling in oligozoospermia." J Assist Reprod Genet **29**(1): 3-10.
- Morel, F., N. Douet-Guilbert, M. J. Le Bris, A. Herry, V. Amice, J. Amice and M. De Braekeleer (2004). "Meiotic segregation of translocations during male gametogenesis." Int J Androl **27**(4): 200-212.
- Morel, F., N. Douet-Guilbert, A. Moerman, B. Duban, C. Marchetti, B. Delobel, M. J. Le Bris, V. Amice and M. De Braekeleer (2004). "Chromosome aneuploidy in the spermatozoa of two men with globozoospermia." MHR: Basic science of reproductive medicine **10**(11): 835-838.
- Morel, F., C. Roux and J. L. Bresson (2000). "Segregation of sex chromosomes in spermatozoa of 46,XY/47,XXY men by multicolour fluorescence in-situ hybridization." Mol Hum Reprod **6**(6): 566-570.
- Morel, F., C. Roux and J. L. Bresson (2001). "FISH analysis of the chromosomal status of spermatozoa from three men with 45,XY,der(13;14)(q10;q10) karyotype." Mol Hum Reprod **7**(5): 483-488.
- Moura, A. A., D. A. Chapman and G. J. Killian (2007). "Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididymal sperm from holstein bulls of documented fertility." Mol Reprod Dev **74**(2): 214-222.

- Mroz, K., T. J. Hassold and P. A. Hunt (1999). "Meiotic aneuploidy in the XXY mouse: evidence that a compromised testicular environment increases the incidence of meiotic errors." Hum Reprod **14**(5): 1151-1156.
- Munne, S., M. Alikani, G. Tomkin, J. Grifo and J. Cohen (1995). "Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities." Fertil Steril **64**(2): 382-391.
- Munne, S., M. Sandalinas, T. Escudero, J. Fung, L. Gianaroli and J. Cohen (2000). "Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations." Fertil Steril **73**(6): 1209-1218.
- Munné, S., M. Sandalinas, T. Escudero, J. Fung, L. Gianaroli and J. Cohen (2000). "Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations." Fertility and Sterility **73**(6): 1209-1218.
- Nadalini, M., N. Tarozzi, M. Di Santo and A. Borini (2014). "Annexin V magnetic-activated cell sorting versus swim-up for the selection of human sperm in ART: is the new approach better than the traditional one?" J Assist Reprod Genet **31**(8): 1045-1051.
- Neri, Q. V., B. Lee, Z. Rosenwaks, K. Machaca and G. D. Palermo (2014). "Understanding fertilization through intracytoplasmic sperm injection (ICSI)." Cell Calcium **55**(1): 24-37.
- Nguyen, M. H., F. Morel, N. Douet-Guilbert, A. Basinko, M.-J. L. Bris, M. D. Braekeleer and A. Perrin (2014). "Meiotic segregation studies in spermatozoa of males carrying a structural chromosome abnormality." 139-148.
- Nguyen, M. T., D. P. Delaney and T. F. Kolon (2009). "Gene expression alterations in cryptorchid males using spermatozoal microarray analysis." Fertil Steril **92**(1): 182-187.
- Nicopoulos, J. D., C. Gilling-Smith, P. A. Almeida, S. Homa, L. Nice, H. Tempest and J. W. Ramsay (2008). "The role of sperm aneuploidy as a predictor of the success of intracytoplasmic sperm injection?" Hum Reprod **23**(2): 240-250.
- Nicopoulos, J. D. M., C. Gilling-Smith, P. A. Almeida, S. Homa, L. Nice, H. Tempest and J. W. Ramsay (2008). "The role of sperm aneuploidy as a predictor of the success of intracytoplasmic sperm injection?" Hum Reprod **23**(2): 240-250.
- Nieschlag, E. (2010). "Scope and Goals of Andrology." Andrology. Springer, Berlin, Heidelberg 1-10.
- O'Flaherty, C., E. de Lamirande and C. Gagnon (2006). "Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events." Free Radic Biol Med **41**(4): 528-540.
- O'Flaherty, C. M., P. T. Chan, B. F. Hales and B. Robaire (2012). "Sperm chromatin structure components are differentially repaired in cancer survivors." J Androl **33**(4): 629-636.
- O'Flynn O'Brien, K. L., A. C. Varghese and A. Agarwal (2010). "The genetic causes of male factor infertility: a review." Fertil Steril **93**(1): 1-12.

- Ogawa, S., S. Araki, Y. Araki, M. Ohno and I. Sato (2000). "Chromosome analysis of human spermatozoa from an oligoasthenozoospermic carrier for a 13;14 Robertsonian translocation by their injection into mouse oocytes." Hum Reprod **15**(5): 1136-1139.
- Ogur, G., E. Van Assche, W. Vegetti, G. Verheyen, H. Tournaye, M. Bonduelle, A. Van Steirteghem and I. Liebaers (2006). "Chromosomal segregation in spermatozoa of 14 Robertsonian translocation carriers." Mol Hum Reprod **12**(3): 209-215.
- Oleszczuk, K., L. Augustinsson, N. Bayat, A. Giwercman and M. Bungum (2013). "Prevalence of high DNA fragmentation index in male partners of unexplained infertile couples." Andrology **1**(3): 357-360.
- Oliva, R. (2006). "Protamines and male infertility." Hum Reprod Update **12**(4): 417-435.
- Ong, T. D., L. Xun, S. D. Perreaut and W. A. Robbins (2002). "Aneuploidy and Chromosome Breakage in Swim-Up Versus Unprocessed Semen From Twenty Healthy Men." Journal of Andrology **23**(2): 270-277.
- Ostermeier, G. C., D. J. Dix, D. Miller, P. Khatri and S. A. Krawetz (2002). "Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men." Lancet **360**(9335): 772-777.
- Ostermeier, G. C., R. J. Goodrich, M. P. Diamond, D. J. Dix and S. A. Krawetz (2005a). "Toward using stable spermatozoal RNAs for prognostic assessment of male factor fertility." Fertil Steril **83**(6): 1687-1694.
- Ostermeier, G. C., R. J. Goodrich, J. S. Moldenhauer, M. P. Diamond and S. A. Krawetz (2005b). "A suite of novel human spermatozoal RNAs." J Androl **26**(1): 70-74.
- Ostermeier, G. C., D. Miller, J. D. Huntriss, M. P. Diamond and S. A. Krawetz (2004). "Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte." Nature **429**(6988): 154.
- Paasch, U., S. Grunewald, G. Fitzl and H. J. Glander (2003). "Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa." J Androl **24**(2): 246-252.
- Palermo, G., H. Joris, P. Devroey and A. C. Van Steirteghem (1992). "Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte." Lancet **340**(8810): 17-18.
- Pantos, K., E. Makrakis, M. Chronopoulou, M. Biba, A. Perdikaris and A. Dafereras (2008). "Day 4 versus day 3 embryo transfer: a prospective study of clinical outcomes." Fertil Steril **89**(3): 573-577.
- Papanikolaou, E. G., M. Camus, E. M. Kolibianakis, L. Van Landuyt, A. Van Steirteghem and P. Devroey (2006). "In vitro fertilization with single blastocyst-stage versus single cleavage-stage embryos." N Engl J Med **354**(11): 1139-1146.
- Papanikolaou, E. G., E. D'Haeseleer, G. Verheyen, H. Van de Velde, M. Camus, A. Van Steirteghem, P. Devroey and H. Tournaye (2005). "Live birth rate is significantly higher after blastocyst transfer than after cleavage-stage embryo transfer when at least four embryos are available on day 3 of embryo culture. A randomized prospective study." Hum Reprod **20**(11): 3198-3203.

- Pelloni, M., D. Paoli, M. Majoli, F. Pallotti, T. Carlini, A. Lenzi and F. Lombardo (2018). "Molecular study of human sperm RNA: Ropporin and CABYR in asthenozoospermia." Journal of Endocrinological Investigation **41**(7): 781-787.
- Perdrix, A., A. Travers, M. H. Chelli, D. Escalier, J. L. Do Rego, J. P. Milazzo, N. Mousset-Simeon, B. Mace and N. Rives (2011). "Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles." Hum Reprod **26**(1): 47-58.
- Perrin, A., A. Basinko, N. Douet-Guilbert, N. Gueganic, M. J. Le Bris, V. Amice, M. De Braekeleer and F. Morel (2011). "Aneuploidy and DNA fragmentation in sperm of carriers of a constitutional chromosomal abnormality." Cytogenet Genome Res **133**(2-4): 100-106.
- Perrin, A., E. Caer, M. Oliver-Bonet, J. Navarro, J. Benet, V. Amice, M. De Braekeleer and F. Morel (2009). "DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality." Fertil Steril **92**(2): 583-589.
- Perrin, A., N. Louanjli, Y. Ziane, T. Louanjli, C. Le Roy, N. Gueganic, V. Amice, M. De Braekeleer and F. Morel (2011). "Study of aneuploidy and DNA fragmentation in gametes of patients with severe teratozoospermia." Reprod Biomed Online **22**(2): 148-154.
- Perrin, A., F. Morel, N. Douet-Guilbert, M. J. Le Bris, J. Amice, V. Amice and M. De Braekeleer (2010). "A study of meiotic segregation of chromosomes in spermatozoa of translocation carriers using fluorescent in situ hybridisation." Andrologia **42**(1): 27-34.
- Perrin, A., M. H. Nguyen, L. Bujan, F. Vialard, V. Amice, N. Gueganic, N. Douet-Guilbert, M. De Braekeleer and F. Morel (2013). "DNA fragmentation is higher in spermatozoa with chromosomally unbalanced content in men with a structural chromosomal rearrangement." Andrology **1**(4): 632-638.
- Pessot, C. A., M. Brito, J. Figueroa, Concha, II, A. Yanez and L. O. Burzio (1989). "Presence of RNA in the sperm nucleus." Biochem Biophys Res Commun **158**(1): 272-278.
- Petersen, C. G., L. D. Vagnini, A. L. Mauri, F. C. Massaro, M. Cavagna, R. L. Baruffi, J. B. Oliveira and J. G. Franco, Jr. (2011). "Relationship between DNA damage and sperm head birefringence." Reprod Biomed Online **22**(6): 583-589.
- Peultier, A. S., T. Freour, N. Cazenave and P. Barriere (2015). "Fertilization failure in IVF and ICSI." J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) **44**(4): 380-386.
- Piomboni, P., A. Stendardi and L. Gambera (2014). "Chromosomal aberrations and aneuploidies of spermatozoa." Adv Exp Med Biol **791**: 27-52.
- Platteau, P., C. Staessen, A. Michiels, H. Tournaye, A. Van Steirteghem, I. Liebaers and P. Devroey (2004). "Comparison of the aneuploidy frequency in embryos derived from testicular sperm extraction in obstructive and non-obstructive azoospermic men." Human Reproduction **19**(7): 1570-1574.
- Platts, A. E., D. J. Dix, H. E. Chemes, K. E. Thompson, R. Goodrich, J. C. Rockett, V. Y. Rawe, S. Quintana, M. P. Diamond, L. F. Strader and S. A. Krawetz (2007). "Success and failure in human spermatogenesis as revealed by teratozoospermic RNAs." Hum Mol Genet **16**(7): 763-773.

- Plymate, S. R., W. J. Bremner and C. A. Paulsen (1976). "The association of D-group chromosomal translocations and defective spermatogenesis." Fertil Steril **27**(2): 139-144.
- Pons-Rejraji, H., B. Sion, F. Saez, F. Brugnol, L. Janny and G. Grizard (2009). "Rôle des dérivés actifs de l'oxygène (DAO) sur les spermatozoïdes humains et infertilité masculine." Gynécologie Obstétrique et Fertilité **37**(6): 529-535.
- Pylyp, L. Y., L. O. Spinenko, N. V. Verhoglyad and V. D. Zukin (2013). "Chromosomal abnormalities in patients with oligozoospermia and non-obstructive azoospermia." J Assist Reprod Genet **30**(5): 729-732.
- Ranganathan, S., A. K. Ganguly and K. Datta (1994). "Evidence for presence of hyaluronan binding protein on spermatozoa and its possible involvement in sperm function." Mol Reprod Dev **38**(1): 69-76.
- Rasoulpour, T., K. DiPalma, B. Kolvek and M. Hixon (2006). "Akt1 suppresses radiation-induced germ cell apoptosis in vivo." Endocrinology **147**(9): 4213-4221.
- Rassoulzadegan, M., V. Grandjean, P. Gounon, S. Vincent, I. Gillot and F. Cuzin (2006). "RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse." Nature **441**(7092): 469-474.
- Ravel, C., I. Berthaut, J. L. Bresson, J. P. Siffroi and C. Genetics Commission of the French Federation of (2006). "Prevalence of chromosomal abnormalities in phenotypically normal and fertile adult males: large-scale survey of over 10,000 sperm donor karyotypes." Hum Reprod **21**(6): 1484-1489.
- Rawe, V. Y., C. R. Alvarez, H. W. Uriondo, S. Papier, S. Miasnik and F. Nodar (2009). "ICSI outcome using Annexin V columns to select non-apoptotic spermatozoa." Fertility and Sterility **92**(3): S73-S74.
- Rawe, V. Y., H. U. Boudri, C. Alvarez Sedo, M. Carro, S. Papier and F. Nodar (2010). "Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI." Reprod Biomed Online **20**(3): 320-323.
- Rawe, V. Y., S. B. Olmedo, F. N. Nodar, G. D. Doncel, A. A. Acosta and A. D. Vitullo (2000). "Cytoskeletal organization defects and abortive activation in human oocytes after IVF and ICSI failure." Mol Hum Reprod **6**(6): 510-516.
- Reubinoff, B. E., D. Abeliovich, M. Werner, J. G. Schenker, A. Safran and A. Lewin (1998). "A birth in non-mosaic Klinefelter's syndrome after testicular fine needle aspiration, intracytoplasmic sperm injection and preimplantation genetic diagnosis." Hum Reprod **13**(7): 1887-1892.
- Rolf, C., T. G. Cooper, C. H. Yeung and E. Nieschlag (1999). "Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoasthenozoospermia with high-dose vitamin C and vitamin E: a randomized, placebo-controlled, double-blind study." Hum Reprod **14**(4): 1028-1033.
- Romany, L., N. Garrido, A. Cobo, B. Aparicio-Ruiz, V. Serra and M. Meseguer (2017). "Obstetric and perinatal outcome of babies born from sperm selected by MACS from a randomized controlled trial." J Assist Reprod Genet **34**(2): 201-207.

- Romany, L., N. Garrido, Y. Motato, B. Aparicio, J. Remohi and M. Meseguer (2014). "Removal of annexin V-positive sperm cells for intracytoplasmic sperm injection in ovum donation cycles does not improve reproductive outcome: a controlled and randomized trial in unselected males." Fertil Steril **102**(6): 1567-1575.e1561.
- Ron-El, R., A. Raziel, D. Strassburger, M. Schachter, E. Kasterstein and S. Friedler (2000). "Outcome of assisted reproductive technology in women over the age of 41." Fertility and Sterility **74**(3): 471-475.
- Ron-El, R., D. Strassburger, S. Gelman-Kohan, S. Friedler, A. Raziel and Z. Appelman (2000). "A 47,XXY fetus conceived after ICSI of spermatozoa from a patient with non-mosaic Klinefelter's syndrome: case report." Hum Reprod **15**(8): 1804-1806.
- Rouen, A., L. Carlier, S. Heide, M. Egloff, P. Marzin, F. Ader, M. Schwartz, E. Rogers, N. Joye, R. Balet, N. Ledee, L. Prat-Ellenberg, N. G. Cassuto and J. P. Siffroi (2017). "Potential selection of genetically balanced spermatozoa based on the hypo-osmotic swelling test in chromosomal rearrangement carriers." Reprod Biomed Online **35**(4): 372-378.
- Rouen, A., C. Hyon, R. Balet, N. Joye, N. G. Cassuto and J. P. Siffroi (2014). "First Birth after Sperm Selection through Discontinuous Gradient Centrifugation and Artificial Insemination from a Chromosomal Translocation Carrier." Case Rep Genet **2014**: 906145.
- Rousseaux, S., C. Caron, J. Govin, C. Lestrat, A. K. Faure and S. Khochbin (2005). "Establishment of male-specific epigenetic information." Gene **345**(2): 139-153.
- Rousseaux, S., E. Chevret, M. Monteil, J. Cozzi, R. Pelletier, F. Devillard, J. Lespinasse and B. Sele (1995). "Meiotic segregation in males heterozygote for reciprocal translocations: analysis of sperm nuclei by two and three colour fluorescence in situ hybridization." Cytogenet Cell Genet **71**(3): 240-246.
- Roux, C., C. Tripogney, F. Morel, C. Joanne, F. Fellmann, M. C. Clavequin and J. L. Bresson (2005). "Segregation of chromosomes in sperm of Robertsonian translocation carriers." Cytogenetic and Genome Research **111**(3-4): 291-296.
- Said, T., A. Agarwal, S. Grunewald, M. Rasch, T. Baumann, C. Kriegel, L. Li, H. J. Glander, A. J. Thomas, Jr. and U. Paasch (2006). "Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model." Biol Reprod **74**(3): 530-537.
- Said, T. M., A. Agarwal, S. Grunewald, M. Rasch, H. J. Glander and U. Paasch (2006). "Evaluation of sperm recovery following annexin V magnetic-activated cell sorting separation." Reprod Biomed Online **13**(3): 336-339.
- Said, T. M. and J. A. Land (2011). "Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review." Hum Reprod Update **17**(6): 719-733.
- Said, T. M., U. Paasch, H. J. Glander and A. Agarwal (2004). "Role of caspases in male infertility." Hum Reprod Update **10**(1): 39-51.
- Sakkas, D. (2013). "Novel technologies for selecting the best sperm for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection." Fertil Steril **99**(4): 1023-1029.

Sakkas, D. and J. G. Alvarez (2010). "Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis." Fertil Steril **93**(4): 1027-1036.

Sakkas, D. and H. M. El-Fakahany (2018). "Apoptosis in Ejaculated Spermatozoa and in the Normal and Pathological Testes: Abortive Apoptosis and Sperm Chromatin Damage." In: Zini A., Agarwal A. (eds) A Clinician's Guide to Sperm DNA and Chromatin Damage. Springer, Cham: 197-218.

Sakkas, D., E. Mariethoz and J. C. S. John (1999). "Abnormal Sperm Parameters in Humans Are Indicative of an Abortive Apoptotic Mechanism Linked to the Fas-Mediated Pathway." Experimental Cell Research **251**: 350-355

Sakkas, D., E. Mariethoz, G. Manicardi, D. Bizzaro, P. G. Bianchi and U. Bianchi (1999). "Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa." Rev Reprod **4**(1): 31-37.

Sakkas, D., E. Mariethoz and J. C. St John (1999). "Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway." Exp Cell Res **251**(2): 350-355.

Sakkas, D., O. Moffatt, G. C. Manicardi, E. Mariethoz, N. Tarozzi and D. Bizzaro (2002). "Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis." Biol Reprod **66**(4): 1061-1067.

Sakkas, D., E. Seli, G. C. Manicardi, M. Nijs, W. Ombelet and D. Bizzaro (2004). "The presence of abnormal spermatozoa in the ejaculate: did apoptosis fail?" Hum Fertil (Camb) **7**(2): 99-103.

Saleh, R. A., A. Agarwal, D. R. Nelson, E. A. Nada, M. H. El-Tonsy, J. G. Alvarez, A. J. Thomas, Jr. and R. K. Sharma (2002). "Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study." Fertil Steril **78**(2): 313-318.

Sanchez-Castro, M., A. R. Jimenez-Macedo, M. Sandalinas and J. Blanco (2009). "Prognostic value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis over PGD." Hum Reprod **24**(6): 1516-1521.

Sarikaya, E., O. G. Eryilmaz, R. Deveer, M. Dogan and L. Mollamahmutoglu (2011). "Analysis of 232 total fertilization failure cycles during intracytoplasmic sperm injection." Iran J Reprod Med **9**(2): 105-112.

Sarrate, Z., F. Vidal and J. Blanco (2010). "Role of sperm fluorescent in situ hybridization studies in infertile patients: indications, study approach, and clinical relevance." Fertility and Sterility **93**(6): 1892-1902.

Schlosser, J., I. Nakib, F. Carré-Pigeon and F. Staerman (2007). "Infertilité masculine: définition et physiopathologie." Annales d'Urologie **41**(3): 127-133.

Schmid, T. E., A. Kamischke, H. Bollwein, E. Nieschlag and M. H. Brinkworth (2003). "Genetic damage in oligozoospermic patients detected by fluorescence in-situ hybridization, inverse restriction site mutation assay, sperm chromatin structure assay and the Comet assay." Hum Reprod **18**(7): 1474-1480.

- Schulte, R. T., D. A. Ohl, M. Sigman and G. D. Smith (2010). "Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes." J Assist Reprod Genet **27**(1): 3-12.
- Schuster, A., C. Tang, Y. Xie, N. Ortogero, S. Yuan and W. Yan (2016). "SpermBase: A Database for Sperm-Borne RNA Contents." Biol Reprod **95**(5): 99.
- Schwarzler, P., H. Zech, M. Auer, K. Pfau, G. Gobel, P. Vanderzwalmen and N. Zech (2004). "Pregnancy outcome after blastocyst transfer as compared to early cleavage stage embryo transfer." Hum Reprod **19**(9): 2097-2102.
- Scriven, P. N., F. A. Flinter, P. R. Braude and C. M. Ogilvie (2001). "Robertsonian translocations--reproductive risks and indications for preimplantation genetic diagnosis." Hum Reprod **16**(11): 2267-2273.
- Seiringer, M., M. Maurer, O. Shebl, K. Dreier, G. Tews, S. Ziehr, G. Schappacher-Tilp, E. Petek and T. Ebner (2013). "Efficacy of a sperm-selection chamber in terms of morphology, aneuploidy and DNA packaging." Reprod Biomed Online **27**(1): 81-88.
- Sendler, E., G. D. Johnson, S. Mao, R. J. Goodrich, M. P. Diamond, R. Hauser and S. A. Krawetz (2013). "Stability, delivery and functions of human sperm RNAs at fertilization." Nucleic Acids Res **41**(7): 4104-4117.
- Sepaniak, S., T. Forges, H. Gerard, B. Foliguet, M. C. Bene and P. Monnier-Barbarino (2006). "The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation." Toxicology **223**(1-2): 54-60.
- Sergerie, M., G. Bleau, R. Teulé, M. Daudin and L. Bujan (2005). "Intégrité de l'ADN des spermatozoïdes comme élément diagnostique et pronostique de la fertilité masculine." Gynécologie Obstétrique & Fertilité **33**(3): 89-101.
- Sergerie, M., G. Laforest, L. Bujan, F. Bissonnette and G. Bleau (2005). "Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility." Hum Reprod **20**(12): 3446-3451.
- Shaha, C., R. Tripathi and D. P. Mishra (2010). "Male germ cell apoptosis: regulation and biology." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **365**(1546): 1501-1515.
- Sharma, R. and A. Agarwal (2011). "Spermatogenesis: An Overview." 19-44.
- Sharma, R. K., E. Sabanegh, R. Mahfouz, S. Gupta, A. Thiyagarajan and A. Agarwal (2010). "TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility." Urology **76**(6): 1380-1386.
- Sheikhi, A., M. Jalali, M. Gholamian, A. Jafarzadeh, S. Jannati and N. Mousavifar (2013). "Elimination of apoptotic spermatozoa by magnetic-activated cell sorting improves the fertilization rate of couples treated with ICSI procedure." Andrology **1**(6): 845-849.
- Shen, S., J. Wang, J. Liang and C. Zhu (2015). "Low-expressed testis-specific calcium-binding protein CBP86-IV (CABYR) is observed in idiopathic asthenozoospermia." World J Urol **33**(5): 633-638.

- Shi, Q. and R. H. Martin (2001). "Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men." Reproduction **121**(5): 655-666.
- Shukla, K. K., A. A. Mahdi and S. Rajender (2012). "Apoptosis, spermatogenesis and male infertility." Front Biosci (Elite Ed) **4**: 746-754.
- Simon, L., J. Castillo, R. Oliva and S. E. Lewis (2011). "Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes." Reprod Biomed Online **23**(6): 724-734.
- Simon, L., L. Liu, K. Murphy, S. Ge, J. Hotaling, K. I. Aston, B. Emery and D. T. Carrell (2014). "Comparative analysis of three sperm DNA damage assays and sperm nuclear protein content in couples undergoing assisted reproduction treatment." Human Reproduction **29**(5): 904-917.
- Singh, A. and A. Agarwal (2011). "The Role of Sperm Chromatin Integrity and DNA Damage on Male Infertility." The Open Reproductive Science Journal **3**: 65-71.
- Smirnova, N. A., P. J. Romanienko, P. P. Khil and R. D. Camerini-Otero (2006). "Gene expression profiles of Spo11^{-/-} mouse testes with spermatocytes arrested in meiotic prophase I." Reproduction **132**(1): 67-77.
- Smyth, C. M. and W. J. Bremner (1998). "Klinefelter syndrome." Arch Intern Med **158**(12): 1309-1314.
- Soffer, Y. (2000). "Les inséminations intra-utérines." Andrologie **10**(4): 443-451.
- Sone, Y., M. Ito, H. Shirakawa, T. Shikano, H. Takeuchi, K. Kinoshita and S. Miyazaki (2005). "Nuclear translocation of phospholipase C-zeta, an egg-activating factor, during early embryonic development." Biochem Biophys Res Commun **330**(3): 690-694.
- Sotolongo, B., E. Lino and W. S. Ward (2003). "Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA." Biol Reprod **69**(6): 2029-2035.
- Speyer, B. E., A. R. Pizzey, M. Ranieri, R. Joshi, J. D. Delhanty and P. Serhal (2010). "Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation." Hum Reprod **25**(7): 1609-1618.
- Spira, A. (1986). "Epidemiology of human reproduction." Hum Reprod **1**(2): 111-115.
- Splingart, C., A. Catteau and P. Barrière (2016). Chapitre 17 : Inséminations intrautérines : indications, réalités, résultats. Infertilité prise en charge globale et thérapeutique M. Elsevier: 115-120.
- Staessen, C., P. Platteau, E. Van Assche, A. Michiels, H. Tournaye, M. Camus, P. Devroey, I. Liebaers and A. Van Steirteghem (2004). "Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial." Hum Reprod **19**(12): 2849-2858.
- Stephoe, P. C. and R. G. Edwards (1978). "Birth after the reimplantation of a human embryo." The Lancet **312**(8085): 366.

- Stern, C., M. Pertile, H. Norris, L. Hale and H. W. Baker (1999). "Chromosome translocations in couples with in-vitro fertilization implantation failure." Hum Reprod **14**(8): 2097-2101.
- Suleiman, S. A., M. E. Ali, Z. M. Zaki, E. M. el-Malik and M. A. Nasr (1996). "Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E." J Androl **17**(5): 530-537.
- Sun, F., E. Ko and R. H. Martin (2006). "Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology?" Reprod Biol Endocrinol **4**: 1.
- Sun, J. G., A. Jurisicova and R. F. Casper (1997). "Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro." Biol Reprod **56**(3): 602-607.
- Swairjo, M. A. and B. A. Seaton (1994). "Annexin structure and membrane interactions: a molecular perspective." Annu Rev Biophys Biomol Struct **23**: 193-213.
- Szamatowicz, M. and D. Grochowski (1998). "Fertility and infertility in aging women." Gynecological Endocrinology **12**(6): 407-413.
- Szczygiel, M. A. and W. S. Ward (2002). "Combination of dithiothreitol and detergent treatment of spermatozoa causes paternal chromosomal damage." Biol Reprod **67**(5): 1532-1537.
- Tahir, B. and A. A. Sharma Rakesh K (2014). Chapter-29 Sperm Preparation and Selection Techniques. Medical & Surgical Management of Male Infertility. R. B. RMB, A. Nabil, A. Ashok and J. E. Sabanegh: 244-251.
- Tao, J., R. Tamis, K. Fink, B. Williams, T. Nelson-White and R. Craig (2002). "The neglected morula/compact stage embryo transfer." Hum Reprod **17**(6): 1513-1518.
- Tarlatzis, B. C., H. S. Qublan, T. Sanopoulou, L. Zepiridis, G. Grimbizis and J. Bontis (2002). "Increase in the monozygotic twinning rate after intracytoplasmic sperm injection and blastocyst stage embryo transfer." Fertil Steril **77**(1): 196-198.
- Tateno, H., Y. Kimura and R. Yanagimachi (2000). "Sonication per se is not as deleterious to sperm chromosomes as previously inferred." Biol Reprod **63**(1): 341-346.
- Tavalae, M., M. R. Deemeh, M. Arbabian and M. H. Nasr-Esfahani (2012). "Density gradient centrifugation before or after magnetic-activated cell sorting: which technique is more useful for clinical sperm selection?" J Assist Reprod Genet **29**(1): 31-38.
- Taylor, J., B. Collins, G. Grudzinkas, A. H. Handyside, L. M. Shaw and A. R. Thornhill (2007). "Failed fertilisation: a review of approximately 6,000 cases of IVF/ICSI." Fertility and Sterility **88**: S153.
- Taylor, S. L., S. L. Weng, P. Fox, E. H. Duran, M. S. Morshedi, S. Oehninger and S. J. Beebe (2004). "Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality." Mol Hum Reprod **10**(11): 825-834.

- te Velde, E. R. and P. L. Pearson (2002). "The variability of female reproductive ageing." Human Reproduction Update **8**(2): 141-154.
- Telford, N. A., A. J. Watson and G. A. Schultz (1990). "Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species." Mol Reprod Dev **26**(1): 90-100.
- Tempest, H. G. and D. K. Griffin (2004). "The relationship between male infertility and increased levels of sperm disomy." Cytogenet Genome Res **107**(1-2): 83-94.
- Templado, C., L. Uroz and A. Estop (2013). "New insights on the origin and relevance of aneuploidy in human spermatozoa." MHR: Basic science of reproductive medicine **19**(10): 634-643.
- Templado, C., F. Vidal and A. Estop (2011). "Aneuploidy in human spermatozoa." Cytogenet Genome Res **133**(2-4): 91-99.
- Templado, C., F. Vidal, J. Navarro, S. Marina and J. Egozcue (1984). "Meiotic studies and synaptonemal complex analysis in two infertile males with a 13/14 balanced translocation." Hum Genet **67**(2): 162-165.
- Tesarik, J., E. Greco and C. Mendoza (2004). "Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation." Human Reproduction **19**(3): 611-615.
- Tesarik, J., C. Mendoza and E. Greco (2002). "Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI." Hum Reprod **17**(1): 184-189.
- Thonneau, P., S. Marchand, A. Tallec, M.-L. Ferial, B. Ducot, J. Lansac, P. Lopes, J.-M. Tabaste and A. Spira (1991). "Incidence and main causes of infertility in a resident population (1 850 000) of three French regions (1988–1989)*." Human Reproduction **6**(6): 811-816.
- Thum, M. Y., H. I. Abdalla and D. Taylor (2008). "Relationship between women's age and basal follicle-stimulating hormone levels with aneuploidy risk in in vitro fertilization treatment." Fertil Steril **90**(2): 315-321.
- Tremellen, K., G. Miari, D. Froiland and J. Thompson (2007). "A randomised control trial examining the effect of an antioxidant (Menevit) on pregnancy outcome during IVF-ICSI treatment." Aust N Z J Obstet Gynaecol **47**(3): 216-221.
- Tsai, Y. R., K. C. Lan, F. T. Kung, P. Y. Lin, H. J. Chiang, Y. J. Lin and F. J. Huang (2013). "The effect of advanced paternal age on the outcomes of assisted reproductive techniques among patients with azoospermia using cryopreserved testicular spermatozoa." Taiwan J Obstet Gynecol **52**(3): 351-355.
- Tunc, O., J. Thompson and K. Tremellen (2009). "Improvement in sperm DNA quality using an oral antioxidant therapy." Reprod Biomed Online **18**(6): 761-768.
- Turek, P. J. and R. A. Pera (2002). "Current and future genetic screening for male infertility." Urol Clin North Am **29**(4): 767-792.

- Van Assche, E., M. Bonduelle, H. Tournaye, H. Joris, G. Verheyen, P. Devroey, A. Van Steirteghem and I. Liebaers (1996). "Cytogenetics of infertile men." Hum Reprod **11 Suppl 4**: 1-24; discussion 25-26.
- Van Royen, E., K. Mangelschots, D. De Neubourg, M. Valkenburg, M. Van de Meerssche, G. Ryckaert, W. Eestermans and J. Gerris (1999). "Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer." Human Reproduction **14**(9): 2345-2349.
- Vanderzwalmen, P., A. Hiemer, P. Rubner, M. Bach, A. Neyer, A. Stecher, P. Uher, M. Zintz, B. Lejeune, S. Vanderzwalmen, G. Cassuto and N. H. Zech (2008). "Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles." Reprod Biomed Online **17**(5): 617-627.
- Varghese, A., F. Deepinder, A. Chandra, A. W. Jeat, F. Pathan and A. Agarwal (2014). "Anatomy and Physiology of Male Gametogenesis."
- Vegetti, W., E. Van Assche, A. Frias, G. Verheyen, M. M. Bianchi, M. Bonduelle, I. Liebaers and A. Van Steirteghem (2000). "Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men." Hum Reprod **15**(2): 351-365.
- Veld, P. A., R. F. Weber, F. J. Los, N. den Hollander, M. Dhont, M. H. Pieters and J. O. Van Hemel (1997). "Two cases of Robertsonian translocations in oligozoospermic males and their consequences for pregnancies induced by intracytoplasmic sperm injection." Hum Reprod **12**(8): 1642-1644.
- Vendrell, X., M. Ferrer, E. Garcia-Mengual, P. Munoz, J. C. Trivino, C. Calatayud, V. Y. Rawe and M. Ruiz-Jorro (2014). "Correlation between aneuploidy, apoptotic markers and DNA fragmentation in spermatozoa from normozoospermic patients." Reprod Biomed Online **28**(4): 492-502.
- Vidal, F., C. Templado, J. Navarro, S. Marina and J. Egozcue (1982). "Meiotic and synaptonemal complex studies in a 14/21 translocation carrier." Int J Androl **5**(1): 21-26.
- Virro, M. R., K. L. Larson-Cook and D. P. Evenson (2004). "Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles." Fertil Steril **81**(5): 1289-1295.
- Vozdova, M., K. Kasikova, E. Oracova, P. Prinosilova, R. Rybar, V. Horinova, R. Gaillyova and J. Rubes (2012). "The effect of the swim-up and hyaluronan-binding methods on the frequency of abnormal spermatozoa detected by FISH and SCSA in carriers of balanced chromosomal translocations." Hum Reprod **27**(3): 930-937.
- Wang, H., Z. Zhou, M. Xu, J. Li, J. Xiao, Z. Y. Xu and J. Sha (2004). "A spermatogenesis-related gene expression profile in human spermatozoa and its potential clinical applications." J Mol Med (Berl) **82**(5): 317-324.
- Ward, W. S. (2010). "Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development." Mol Hum Reprod **16**(1): 30-36.

Wells, D., M. G. Bermudez, N. Steuerwald, A. R. Thornhill, D. L. Walker, H. Malter, J. D. Delhanty and J. Cohen (2005). "Expression of genes regulating chromosome segregation, the cell cycle and apoptosis during human preimplantation development." Hum Reprod **20**(5): 1339-1348.

Weng, S. L., S. L. Taylor, M. Morshedi, A. Schuffner, E. H. Duran, S. Beebe and S. Oehninger (2002). "Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm." Mol Hum Reprod **8**(11): 984-991.

WHO (2010). "WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen." 7-113.

WHO (2010). WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen Fifth edition, Geneva: WHO Press.

: 271.

Wiland, E., C. J. Hobel, D. Hill and M. Kurpisz (2008). "Successful pregnancy after preimplantation genetic diagnosis for carrier of t(2;7)(p11.2;q22) with high rates of unbalanced sperm and embryos: a case report." Prenatal Diagnosis **28**(1): 36-41.

Wong, E. C., K. A. Ferguson, V. Chow and S. Ma (2008). "Sperm aneuploidy and meiotic sex chromosome configurations in an infertile XYY male." Hum Reprod **23**(2): 374-378.

Wright, C., S. Milne and H. Leeson (2014). "Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility." Reprod Biomed Online **28**(6): 684-703.

Wu, Y., X. Kang, H. Zheng, H. Liu, Q. Huang and J. Liu (2016). "Effect of Paternal Age on Reproductive Outcomes of Intracytoplasmic Sperm Injection." PLoS ONE **11**(2): e0149867.

Wu, Z., X. Lu, M. Wang and H. Cheng (2015). "Correlation between body mass index of Chinese males and assisted reproductive technology outcome." International Journal of Clinical and Experimental Medicine **8**(11): 21472-21476.

Wundrich, K., U. Paasch, M. Leicht and H. J. Glander (2006). "Activation of caspases in human spermatozoa during cryopreservation--an immunoblot study." Cell Tissue Bank **7**(2): 81-90.

Wykes, S. M., D. W. Visscher and S. A. Krawetz (1997). "Haploid transcripts persist in mature human spermatozoa." Mol Hum Reprod **3**(1): 15-19.

Yanagimachi, R., H. Yanagimachi and B. J. Rogers (1976). "The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa." Biol Reprod **15**(4): 471-476.

Yatsenko, A. N., S. A. Yatsenko, J. W. Weedin, A. E. Lawrence, A. Patel, S. Peacock, M. M. Matzuk, D. J. Lamb, S. W. Cheung and L. I. Lipshultz (2010). "Comprehensive 5-year study of cytogenetic aberrations in 668 infertile men." J Urol **183**(4): 1636-1642.

Yazbeck, C. (2016). Chapitre13 : Infertilit du couple : la premire consultation Infertilité prise en charge globale et thérapeutique M. Elsevier: 87-92.

Yudin, A. I., C. A. Vandevort, M. W. Li and J. W. Overstreet (1999). "PH-20 but not acrosin is involved in sperm penetration of the macaque zona pellucida." Mol Reprod Dev **53**(3): 350-362.

Zahedi, A., M. Tavalae, M. R. Deemeh, L. Azadi, M. Fazilati and M. H. Nasr-Esfahani (2013). "Zeta potential vs apoptotic marker: which is more suitable for ICSI sperm selection?" J Assist Reprod Genet **30**(9): 1181-1186.

Zegers-Hochschild, F., G. D. Adamson, J. de Mouzon, O. Ishihara, R. Mansour, K. Nygren, E. Sullivan, S. van der Poel, T. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive and O. World Health (2009). "International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009." Fertil Steril **92**(5): 1520-1524.

Zegers-Hochschild, F., G. D. Adamson, J. de Mouzon, O. Ishihara, R. Mansour, K. Nygren, E. Sullivan, S. van der Poel, T. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive and O. World Health (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): 2683-2687.

Zegers-Hochschild, F., G. D. Adamson, S. Dyer, C. Racowsky, J. de Mouzon, R. Sokol, L. Rienzi, A. Sunde, L. Schmidt, I. D. Cooke, J. L. Simpson and S. van der Poel (2017). "The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017." Fertil Steril **108**(3): 393-406.

Zegers-Hochschild, F., G. D. Adamson, S. Dyer, C. Racowsky, J. de Mouzon, R. Sokol, L. Rienzi, A. Sunde, L. Schmidt, I. D. Cooke, J. L. Simpson and S. van der Poel (2017). "The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017." Hum Reprod **32**(9): 1786-1801.

Zhang, H., X. Xuan, S. Yang, X. Li, C. Xu and X. Gao (2018). "Selection of viable human spermatozoa with low levels of DNA fragmentation from an immotile population using density gradient centrifugation and magnetic-activated cell sorting." Andrologia **50**(1).

Zhu, J., H. Jiang, R. B. He, H. Q. Yin, C. L. Wang, Y. Li and X. Du (2015). "Association between etiologic factors in infertile couples and fertilization failure in conventional in vitro fertilization cycles." Andrology **3**(4): 717-722.

Ziarati, N., M. Tavalae, M. Bahadorani and M. H. Nasr Esfahani (2018). "Clinical outcomes of magnetic activated sperm sorting in infertile men candidate for ICSI." Hum Fertil (Camb): 1-8.

Ziebe, S., A. Loft, J. H. Petersen, A. G. Andersen, S. Lindenberg, K. Petersen and A. N. Andersen (2001). "Embryo quality and developmental potential is compromised by age." Acta Obstet Gynecol Scand **80**(2): 169-174.

Zini, A., R. Bielecki, D. Phang and M. T. Zenzes (2001). "Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men." Fertility and Sterility **75**(4): 674-677.

Zini, A., R. Bielecki, D. Phang and M. T. Zenzes (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.

Ziyyat, A. and A. Lefevre (2001). "Differential gene expression in pre-implantation embryos from mouse oocytes injected with round spermatids or spermatozoa." Hum Reprod **16**(7): 1449-1456.

Titre : Impact des facteurs maternels et paternels sur les résultats de FIV / ICSI et investigations génétiques des spermatozoïdes d'hommes infertiles

Mots clés : assistance médicale à la procréation, fragmentation de l'ADN, anomalie chromosomique, tri magnétique, ARN spermatique.

Résumé : L'infertilité concerne 8 à 12% des couples en âge de procréer. Face à ce problème, des prises en charge médicales peuvent être proposées comme la fécondation *in vitro* (FIV) et l'injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI). Toutefois, le taux d'échec de ces techniques reste relativement élevé.

Dans la première partie, l'impact des facteurs maternels et paternels sur les résultats de 194 cycles de FIV et 586 cycles d'ICSI a été étudié. L'âge maternel, le nombre d'ovocytes ponctionnés et matures influencent principalement les résultats. Ni l'âge paternel ni les paramètres spermatiques (numération et mobilité) ne s'associent significativement à l'échec des techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP). Seule la morphologie du spermatozoïde injecté a une influence sur la fécondation en ICSI.

En deuxième partie, l'apoptose, la fragmentation de l'ADN et le contenu chromosomique avant et après tri cellulaire à l'aide des microbilles magnétiques ont été étudiés chez des hommes avec un taux de fragmentation de l'ADN spermatique anormal et chez des hommes porteurs d'une anomalie chromosomique constitutionnelle. Une diminution significative des spermatozoïdes apoptotiques avec un ADN fragmenté et chromosomiquement déséquilibrés a été observée. Le tri cellulaire aboutissant à une sélection de spermatozoïdes de meilleure qualité pourrait s'avérer une méthode de référence pour l'AMP.

Dans une troisième partie, un protocole fiable a été élaboré pour étudier le transcriptome des spermatozoïdes.

La mise au point de ces technologies permettra de mieux comprendre les causes d'échec des techniques d'AMP et ainsi améliorer leur taux de réussite.

Title: Impact of maternal and paternal factors on the results of IVF / ICSI and genetic investigations on the spermatozoa of infertile men

Keywords: assisted reproductive technologies, DNA fragmentation, chromosome abnormality, magnetic sorting, spermatid RNA

Abstract: Infertility concerns 8-12% of couples of reproductive age. Various medical treatments such as *in vitro* fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) are available to address this problem. However the rate of failure of these procedures remains relatively high.

In the first part of this work the impact of maternal and paternal factors on the results of 194 IVF cycles and 586 ICSI cycles was studied. Results are mainly affected by maternal age, the number of oocytes retrieved and the number of mature oocytes collected. Neither paternal age nor spermatid parameters (number and mobility) are significantly associated with the failure of Assisted Reproductive Technologies (ART). Only the morphology of the sperm injected during ICSI influences fertilization rate.

In the second part of this work apoptosis, DNA fragmentation and the chromosomal content before and after cell sorting with magnetic micro beads were studied in men with an abnormal level of sperm DNA fragmentation and in men with a constitutional chromosome abnormality. A significant decrease of apoptotic spermatozoa with fragmented DNA and chromosome imbalance was observed. Thus cell sorting leading to the selection of better quality spermatozoa could become a reference method for ART.

In a third part of the work a reliable protocol for the study of spermatid transcriptomes is designed.

The development of these technologies will lead to a better understanding of the underlying causes of ART failure and thus increase the success rate.