



Noyau spermatique humatin et fertilité

Solène Vorilhon

► To cite this version:

Solène Vorilhon. Noyau spermatique humatin et fertilité. Biologie de la reproduction. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2019. Français. NNT : 2019CLFAS006 . tel-02449213

HAL Id: tel-02449213

<https://theses.hal.science/tel-02449213>

Submitted on 22 Jan 2020

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.



UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

D. U. N°

ANNEE : 2019

***ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE,
ENVIRONNEMENT***

N° d'ordre : ED SVSAE

Thèse

Présentée à l'Université CLERMONT AUVERGNE
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Génétique, Physiologie, Pathologie, Nutrition, Microbiologie, Santé, Innovation
Présentée et Soutenue publiquement par

Solène MARTIN, épouse VORILHON

Le 5 Juillet 2019

Noyau spermatique humain et fertilité

Présidente : Pr Florence BRUGNON (Clermont-Ferrand)

Rapporteurs : Pr Jean PARINAUD (Toulouse)

Pr Daniel VAIMAN (Paris)

Examinatrice : Pr Jeanne PERRIN (Marseille)

Co-encadrante : Dr Hanae PONS-REJRAJI (Clermont-Ferrand)

Directeur de thèse : Pr Joël DREVET (Clermont-Ferrand)

Laboratoire GReD : UMR-CNRS 6293 INSERM U1103 – Université Clermont
Auvergne – Equipe « Mécanismes post-testiculaires de l'infertilité mâle »

A tous ces challenges que la vie nous lance ...

A ces spermatozoïdes champions ...

Remerciements

Je tiens à remercier le Professeur Daniel Vaiman et le Professeur Jean Parinaud d'avoir accepté de consacrer une partie de leur temps à la correction et à l'évaluation de ce travail. Je remercie également le Professeur Jeanne Perrin pour l'évaluation de ce travail, sa participation à mon comité de suivi de thèse et mon jury final de thèse. Pour le temps précieux que chacun de vous a pu accorder à la lecture attentive de ce manuscrit, merci.

Je remercie le Professeur Joël Drevet pour m'avoir permis de prendre part à son équipe de recherche pour effectuer ce doctorat dans les meilleures conditions. Je lui suis très reconnaissante de m'avoir donné cette chance et de m'avoir guidée et conseillée durant ce long travail de recherche.

Je remercie le Docteur Hanae Pons-rejraji, à mes côtés depuis le début de cette aventure de thèse. Merci pour tes conseils et ton implication. Merci de m'avoir transmis ton expérience.

Je remercie le Professeur Florence Brugnion pour ses précieux conseils et le temps consacré à guider ce travail. Pour la confiance que tu m'accordes, l'honneur que tu me fais d'apprendre chaque jour à tes côtés avec passion, merci.

A toute l'équipe du GReD, merci pour votre accueil, pour votre dynamisme et votre bonne humeur qui fait se potentialiser les talents de chacun. Un grand merci tout particulier à Ayhan pour m'avoir guidé dans ce beau challenge.

Je tiens à remercier Sandra Carlet-Dollet, pour tout.

A toute l'équipe de biostatistique, de cytométrie en flux, de la faculté et du service de Biologie de la Reproduction, merci pour vos encouragements et votre bienveillance au quotidien qui m'ont motivée pour réussir à achever ce travail.

A ma merveilleuse famille, ma belle belle-famille, mes formidables amis de toutes horizons, merci pour votre présence et votre soutien.

A Charles, Joséphine et Jeanne, mes trésors, ma force chaque jour. Rien n'aurait été possible sans vous.

Une partie des travaux décrits dans ce mémoire a été présentée aux congrès suivant :

Communications orales :

- **Optimisation diagnostique de l'oxydation de l'ADN spermatique humain : Quantification du 8-OHdG et détermination d'un seuil pathologique.** S. Vorilhon, F. Brugnon, A. Kocer, S. Dollet, C. Bourgne, M. Berger L. Janny, B. Pereira, RJ. Aitken, A. Moazamian, P. Gharagozloo, J. Drevet et H. Pons-Rejraji ; Prix meilleure communication, 10^{ème} Journée de la recherche et des Innovations, DRCI CHU Clermont-Ferrand et Université d'Auvergne, Juin 2018
- **Détection du 8-OHdG sur spermatozoïdes humains frais.** S. Vorilhon, F. Brugnon, A. Kocer, S. Dollet, C. Bourgne, M. Berger, L. Janny, J. Drevet et H. Pons-Rejraji; Journée du GReD ; Université d'Auvergne, Février 2015.

Communications affichées :

- **Pathological threshold of human sperm DNA oxidation : optimization of a diagnostic assay for clinical use ,** S Vorilhon, F Brugnon, A Kocer, S Dollet, C Bourgne, M Berger, L Janny, B Pereira, RJ Aitken, A Moazamian, P Gharagozloo Joël Drevet and H Pons-Rejraji; American Society of Andrology SA, Miami 2017
- **Oxydation de l'ADN spermatique humain : Optimisation diagnostique par un seuil pathologique,** S. Vorilhon, F. Brugnon, A. Kocer, S. Dollet, C. Bourgne, M. Berger, L. Janny, B. Pereira, RJ. Aitken, A. Moazamian, P. Gharagozloo, J. Drevet and H. Pons-Rejraji; Congrès de la société d'Andrologie de la Langue Française, Toulouse Janvier 2017
- **Etude du développement embryonnaire après ICSI par Time-lapse au CHU de Clermont-Ferrand ;** S. Vorilhon, C. Bouche, B. Pereira, L. Janny, H. Pons-Rejraji, AS. Gremeau, JL. Pouly et F. Brugnon ; Club des biologistes du Sud Est, Paris Novembre 2016
- **Une cinétique rapide du développement embryonnaire précoce est prédictive de l'obtention d'un top blastocyste. Etude rétrospective sur 222 blastocystes observés par Time Lapse PrimoVision®,** S. Vorilhon, C. Bouche, L. Janny, B. Pereira, H. Pons-Rejraji, AS. Gremeau, S. Mestres, JL. Pouly et F. Brugnon ; 21^{ème} journées de la Fédération Française d'Etude de la Reproduction, Paris Septembre 2016.

- **Oxydation nucléaire & infertilité masculine : Un test diagnostique du stress oxydant nucléaire spermatique chez l'homme,** S. Vorilhon Auvergnescience .com, Septembre 2016.
- **Pathological threshold of human sperm DNA oxidation, an increase value for infertility diagnostics,** S. Vorilhon, F. Brugnon, A. Kocer, S. Dollet, C. Bourgne, M. Berger, L. Janny, B. Pereira, R.J. Aitken, P. Gharagozloo, J. Drevet & H. Pons-Rejraji; European Society of Human Reproduction and Embryology, Helsinki, 2016
- **Oxydation nucléaire & infertilité masculine : Un test diagnostique du stress oxydant nucléaire spermatique chez l'homme,** S. Vorilhon, F. Brugnon, A. Kocer, S. Dollet, C. Bourgne, M. Berger, L. Janny, J. Drevet et H. Pons-Rejraji, Journées de l'Ecole Doctorale, Université d'Auvergne 2016.
- **Sperm DNA oxidation: a new marker of fertility?** S. Vorilhon, F. Brugnon, A. Kocer, S. Dollet, C. Bourgne, M. Berger, L. Janny, J. Drevet et H. Pons-Rejraji; European Society of Human Reproduction and Embryology, Lisbonne Juin 2015

**Une partie de ces travaux a par ailleurs fait l'objet de publications internationales
à comité de lecture :**

- **Accuracy of human sperm DNA oxidation quantification and threshold determination using an 8-OHdG immuno-detection assay.** S. Vorilhon, F. Brugnon, A. Kocer, S. Dollet, C. Bourgne, M. Berger, L. Janny, B. Pereira, R.J. Aitken, A. Moazamian, P. Gharagozloo, J. Drevet and H. Pons-Rejraji. Human Reproduction. Avril 2018; 33(4):553-562.
- **Hypotaurine Supplementation in Freezing and Preparation media improves human sperm nuclear integrity and fertilizing ability.** H. Pons-Rejraji, S. Vorilhon, A. Difrane, S. Dollet, C. Bourgne, M. Berger, B. Pereira, C. Bouche, J.R. Drevet and F. Brugnon (En cours de rédaction)

Résumé

Chez l'Homme, les succès de la fécondation et d'un développement embryonnaire aboutissant à la naissance d'un enfant en bonne santé résident principalement dans la qualité des cellules reproductrices. Les dommages oxydants de l'ADN spermatique sont une cause majeure d'infertilité masculine. Afin de permettre une prise en charge thérapeutique optimale et adaptée, j'ai tout d'abord mis au point et validé un test diagnostique de l'oxydation de l'ADN spermatique par immunodétection du 8-hydroxy-2'-desoxyguanosine (8-OHdG), adduit majeur de l'oxydation nucléaire. Ce travail de thèse a déterminé, pour la première fois, un seuil d'oxydation de l'ADN spermatique en relation avec les paramètres conventionnels spermatiques. Dans un second temps, je me suis focalisée sur les atteintes de la chromatine et de l'ADN spermatique les plus fréquentes en cas d'infertilité masculine, à savoir les anomalies de condensation de la chromatine, la fragmentation et l'oxydation de l'ADN spermatique. Une corrélation entre l'oxydation de l'ADN, tout particulièrement la moyenne d'intensité de fluorescence, et le pourcentage de spermatozoïde fragmenté a été mise en évidence. Pour objectiver l'impact de ces dommages nucléaires spermatiques en pratique clinique, j'ai étudié, après cryopréservation, les effets bénéfiques d'une supplémentation en hypotaourine des milieux de sélection et de congélation/décongélation des échantillons. Une baisse de la cryocapacitation et du pourcentage de spermatozoïde fragmenté et décondensé ont été retrouvées ainsi qu'une amélioration de la vitalité et de la mobilité progressive spermatique. Enfin, comme le spermatozoïde a pour but ultime de participer à la genèse d'un nouvel individu, j'ai mis en évidence que la fragmentation et l'oxydation de l'ADN spermatique avaient un impact à des moments clés de la cinétique du développement embryonnaire précoce suite à une ICSI sans pour autant modifier l'obtention de blastocystes de bonne qualité. Ce travail de thèse a permis de mieux comprendre la physiopathologie de l'infertilité masculine et de mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs spermatiques en lien avec un développement embryonnaire normal.

Mots clés : noyau spermatique humain, oxydation de l'ADN, fragmentation de l'ADN, décondensation de l'ADN, hypotaourine, cryoconservation spermatique, développement embryonnaire

Abstract

In humans, the success of fertilization and embryonic development leading to the birth of a healthy child lies mainly in the quality of reproductive cells. Oxidative damage to sperm DNA is a major cause of male infertility. In order to provide optimal and appropriate therapeutic management, I first developed and validated a diagnostic test for sperm DNA oxidation by immunodetection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), a major adduct of nuclear oxidation. This thesis work determined, for the first time, a threshold for the oxidation of sperm DNA in relation to conventional sperm parameters. In a second step, I focused on the most common chromatin and sperm DNA disorders in male infertility, namely chromatin condensation anomalies, sperm DNA fragmentation and oxidation. A correlation between DNA oxidation, particularly the mean fluorescence intensity, and the percentage of fragmented sperm was found. To objectify the impact of this nuclear sperm damage in clinical practice, I studied, after cryopreservation, the beneficial effects of hypotaurine supplementation to the selection and freeze/thaw media of seed samples. A decrease in cryocapacitation and the percentage of fragmented and decondensed sperm has been found, as well as an improvement in sperm vitality and progressive mobility. Finally, since the ultimate goal of the sperm cells is to participate in the genesis of a new individual, I have shown that the fragmentation and oxidation of sperm DNA has an impact at key moments in the kinetics of early embryonic development following ICSI without modifying the obtaining of good quality blastocysts. This thesis work has led to a better understanding of the pathophysiology of male infertility and the identification of new sperm biomarkers related to normal embryonic development.

Key words: Human sperm nucleus, DNA oxidation, DNA fragmentation, DNA decondensation, hypotaurine, spermatoc cryopreservation, embryonic development

Abréviations

2cb : 2 cells beginning
2Ce : 2 cells ending
2GP : 2^{ème} globule polaire
2PN : 2 pronoyaux
3-dG : 3-désoxyguanosine
5-mC : 5-méthylecytosine
8-OHdG : 8-oxo-7,8-dihydro-2'guanosine
AC : Adénylate cyclase
ADN : Acide désoxyribonucléique
AGPI : Acides gras poly-insaturés
AMP : Assistance médicale à la procréation
AO : Antioxydant
Apaf-1 : *Apoptosis Activating Factor-1*
APEN : *Apurinic endonuclease*
AZF : *AZoospermia Factor*
B : Blastocyste
BER : *Base excision repair*
CECOS : Centre d'Etudes et de Conservation des Œufs et du Sperme
CGP : Cellules germinales primordiales
CMA3 : Chromomycine A3
CMF : Cytométrie en Flux
Cys : Cystéine
DAO : Dérivés actifs de l'oxygène
DFI : *DNA fragmentation index*
DMR : *Differentially-methylated region*
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DNMT : *DNA methyltransferase*
dNTP : Désoxyribonucléotide
DTT : Dithiothréitol
ECR : Excès de cytoplasme résiduel
ERK : *Extracellular signalregulated kinase*
ERO : Espèce réactive de l'oxygène
FapyGua : 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine
FISH : *Fluorescent in situ hybridization*
FIV : Fécondation in vitro
FSC : *Forward-scattered light*
FSH : *Follicle stimulating hormone*
ICSI : *Intra cytoplasmic sperm injection*
G : Guanine
GADD45 : *DNA damage inductible gene 45*
GH : *Growth Hormone*
GP : Globules polaires
GPx : Glutathione peroxydase
GnRH : *Gonadotrophin releasing hormone*
GSTM1 : *Glutathion S-transferase Mu1*

Gy : Gray
h : heure
H : Histone
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HPLC : *High-performance liquid chromatography*
HRP : *Horseradish peroxidase*
IL-6 : Interleukine-6
IMC : Indice de masse corporelle
Kb : Kilo base
Keap1 : *Kelch-like ECH associated protein 1*
LH : *Luteinizing hormone*
Mb : Mégabase
MAPK : *Mitogen-activated protein kinases*
MAR : *Matrix attachment region*
MCI : Masse cellulaire interne
MDA : Malondialdéhyde
MIF : Moyenne d'Intensité de fluorescence
MMR : *Mismatch repair*
MOSH : Adiposité abdominale et hypogonadisme associé à l'obésité masculine
MSOME : *Motility sperm organelle morphology examination*
NASP : *Nuclear Autoantigenic Sperm Protein*
NER : *Nucleotide excision repair*
Nrf2 : Facteur nucléaire érythroïde 2
NO° : Monoxyde d'azote
¹O₂ : Oxygène singulet
O₂^{•-} : Anion superoxyde
O₂ : Oxygène
OH° : Radical hydroxyle
OMS : Organisation mondiale de la santé
ONOO- : Peroxynitrite
P : Protamine
PBS : *Phosphate Buffered Saline*
PE : Perturbateurs endocriniens
PI : Propidium Iodide
PKA : Protéine kinase A
PKC : *Protein kinase C*
PN : Pronucléus / Pronucléi
PNB : PN blind-out
PNNS : Plan National Nutritionnel Santé
PSA : *Pisum Sativum Agglutinin*
PTP : Pore de transition de perméabilité
PTK : *Protein tyrosine kinase*
ROO• : Radical peroxyde
SCGE : *Single Cell Gel Electrophoresis*
SCSA : *Sperm Chromatine Structure Assay*
SCSO : *Syndrome de Cellule de Sertoli Only*
SGA : *SpermatoGenic Arrest*

snGPx4 : *Sperm nucleus glutathione peroxydase 4*

SSC : *Side-scattered light*

SOD : Superoxyde dismutase

SRY : *Sex-determining region Y*

TdT : *Terminal deoxynucleotidyl transferase*

TE : Trophectoderme

THC : Delta-9-tetrahydrocannabinol

tM : *Morula time*

TP : Protéines de transition

TUNEL : *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*

β-hCG : hormone chorionique gonatrophine

Sommaire

Avant-propos

Etat de l'art

I.	Le noyau spermatique humain.....	18
I.1.	Généralités sur le noyau et sa structure	18
a.	La chromatine dans les cellules somatiques	18
b.	Le nucléosome.....	19
c.	Les histones de cœur.....	19
d.	Les histones internucléosomales.....	20
e.	La chromatine dans les cellules germinales	20
I.2.	Les cellules germinales primordiales.....	21
I.3.	La spermatogenèse	22
a.	Multiplication ou phase pré-méiotique.....	22
b.	Maturation nucléaire ou phase méiotique.....	23
c.	Spermiogenèse	26
d.	Cycles spermatogéniques chez l'homme	28
I.4.	La maturation épидидymaire du spermatozoïde	28
I.5.	Epigénome des cellules germinales masculines	30
a.	Généralités	30
b.	Epigénome du spermatozoïde.....	31
I.6.	L'architecture nucléaire spermatique	32
II.	Les altérations du noyau spermatique	34
II.1.	Les atteintes chromosomiques	34
a.	Les anomalies de nombre de chromosomes	34
b.	Les anomalies chromosomiques constitutionnelles de structure	35
c.	Cas particuliers du chromosome Y	38
II.2.	Atteintes de la chromatine et de l'ADN spermatique	39
a.	Anomalie de la condensation chromatinienne	40
b.	La fragmentation	41
c.	Anomalies de la méthylation de l'ADN spermatique	45
d.	Anomalies de l'oxydation de l'ADN spermatique.....	46

III.	Les systèmes de réparation des dommages nucléaires spermatiques	51
III.1.	Les antioxydants (AO).....	51
a.	AO Enzymatiques	51
b.	AO Non enzymatiques.....	53
III.2.	Mécanismes intrinsèques de réparation des dommages à l'ADN spermatique	54
a.	Mécanismes de réparation du spermatozoïde.....	54
b.	Les mécanismes de réparation ovocytaire	55
IV.	Les étiologies des altérations du noyau spermatique en lien avec la fertilité.....	58
IV.1.	Les étiologies intrinsèques	58
a.	Spermatogenèse défectueuse.....	58
b.	Les mécanismes de réparation insuffisants ou défectueux	59
c.	Apoptose	59
IV.2.	Les étiologies extrinsèques	61
a.	Age.....	62
b.	Liées au mode de vie	63
c.	Consommation de toxiques.....	66
d.	Pollution environnementale.....	69
e.	Traitement radiochimiothérapeutique	71
f.	Les pathologies du tractus génital masculin.....	73
g.	Les pathologies systémiques	74
h.	Les procédures d'AMP.....	76
V.	Prise en charge des anomalies nucléaires spermatiques.....	78
V.1.	Supplémentation AO orale	78
V.2.	Supplémentation des milieux.....	79
V.3.	Prise en charge globale et adaptée	81

Matériels et Méthodes

I.	Patients et prélèvements	83
II.	Traitements des échantillons et examens de spermiologie diagnostique	83
II.1.	Mesure des paramètres conventionnels spermatiques par spermogramme- spermocytogramme	83

II.2.	Le test de migration survie	84
II.3.	La congélation – décongélation des spermatozoïdes.....	85
III.	Mise au point et analyses des altérations nucléaires spermatiques.....	85
III.1.	Oxydation de l'ADN spermatique par immunodétection du 8-OHdG	85
III.2.	Fragmentation de l'ADN spermatique	88
III.3.	Mesure de la Condensation/Protamination de la chromatine spermatique par Chromomycine A 3	89
III.4.	Analyse des vacuoles.....	90
III.5.	Mesure de l'expression de marqueurs de la capacitation et de l'acrosome.....	91
III.6.	Impact sur le développement embryonnaire et les issues en AMP	92
IV.	Analyses statistiques	94

Résultats

I.	Oxydation de l'ADN spermatique	97
II.	COMET assay et immunodétection du 8-OHdG	99
III.	HYPOTHAURINE.....	104
IV.	Impact de la qualité nucléaire des spermatozoïdes humains sur le développement embryonnaire : Etude PRIMOSPERMO	107

Discussion Perspectives

I.	Diagnostic de l'oxydation de l'ADN spermatique.....	117
II.	Les dommages à l'ADN.....	120
III.	Quelle prise en charge en cas de dommages à l'ADN spermatique.....	123
IV.	Conclusion	130

Liste des figures.....	132
------------------------	-----

Liste des tableaux.....	135
-------------------------	-----

Références Bibliographiques.....	136
----------------------------------	-----

Avant-propos

L'intégrité du noyau spermatique est essentielle pour la transmission du génome paternel à sa descendance et une activation optimale du génome paternel dès le troisième jour post-fécondation. Ainsi, dès la spermatogenèse, par la maturation épидидymaire et la traversée du tractus génital féminin, puis l'étape clé de la fécondation jusqu'au développement embryonnaire, les spermatozoïdes vont être sélectionnés et modifiés afin de garantir cette intégrité nucléaire et de permettre de donner naissance à un nouvel être humain.

Le spermatozoïde humain, est haploïde avec un noyau structurellement différent de celui des cellules somatiques. Cette singularité nucléaire est acquise notamment au cours de la spermatogenèse dans les tubes séminifères des testicules *via* la succession de trois mitoses et d'une méiose à partir des spermatogonies *Ad* diploïdes. Ces gonies résultent elle-même de cellules germinales primordiales qui se sont développées pendant la vie fœtale. Ce n'est qu'à partir de la puberté, sous l'influence hormonale, que la spermatogenèse est complète et efficace (Hess and Renato de Franca, 2008). Le noyau est de nouveau remodelé lors de la maturation épидидymaire par des modifications structurales et biochimiques (Noblanc *et al.*, 2012). De façon synchrone, le pouvoir fécondant et la mobilité progressive sont acquises lors de la descente épидидymaire. Les spermatozoïdes subissent de nouvelles étapes de sélection et de contrôle indispensables avant la fécondation de l'ovocyte, lui aussi haploïde. En effet, lors de la traversée des voies génitales féminines, par l'intermédiaire de la glaire cervicale, et de l'environnement tubaire évolutif, les spermatozoïdes sont sélectionnés et subissent encore de nombreuses modifications pour assurer leur fonction (Eisenbach and Giojalas, 2006; Xella *et al.*, 2010; Bahat *et al.*, 2012).

On estime actuellement que près de 15 % des couples en âge de procréer consultent pour infertilité. Dans un tiers des cas, il s'agit d'une étiologie exclusivement masculine (Carlsen *et al.*, 1992; Jouannet *et al.*, 2001; Swan, 2006). La qualité nucléaire des spermatozoïdes n'est jamais analysée en première intention dans le bilan d'infertilité des patients infertiles. Pourtant, l'ADN spermatique peut subir différentes altérations au cours de son parcours jusqu'à l'ovocyte. Ces altérations peuvent se traduire par des atteintes au niveau chromosomique, chromatinien ou de l'ADN. Elles peuvent être à l'origine d'une diminution de la qualité fonctionnelle et du pouvoir fécondant des spermatozoïdes (Morado *et al.*,

2013; Park *et al.*, 2015). Par ailleurs, des spermatozoïdes mobiles et féconds peuvent également présenter une altération du génome, asymptomatique en spermologie diagnostique de première intention, et induire un risque de défauts de développement embryonnaire et d'augmentation de l'incidence des fausses couches (Lewis and Aitken, 2005a). Pourtant à ce jour, même s'il est admis que la qualité de l'ADN des spermatozoïdes affecte les issues de grossesse des tentatives d'assistance médicale à la procréation (AMP), peu d'éléments sont connus sur les effets des altérations nucléaires des spermatozoïdes sur la cinétique du développement de l'embryon.

L'objectif de mon travail a été de mieux caractériser chez l'homme l'impact de la qualité nucléaire spermatique sur la fertilité masculine tout particulièrement dans le contexte de l'AMP et de la cryoconservation.

Pour cela, j'ai travaillé à la mise au point et à la validation d'un test diagnostique de l'oxydation de l'ADN spermatique humain avec la mise en évidence d'un seuil pathologique en relation avec les paramètres du spermogramme. Ce travail s'inscrit dans la continuité de travaux antérieurs réalisés dans l'équipe chez la souris.

Dans un second temps, je me suis intéressée à la relation entre les principales altérations nucléaires des spermatozoïdes (oxydation, fragmentation de l'ADN et condensation de la chromatine) et leurs conséquences en pratique clinique.

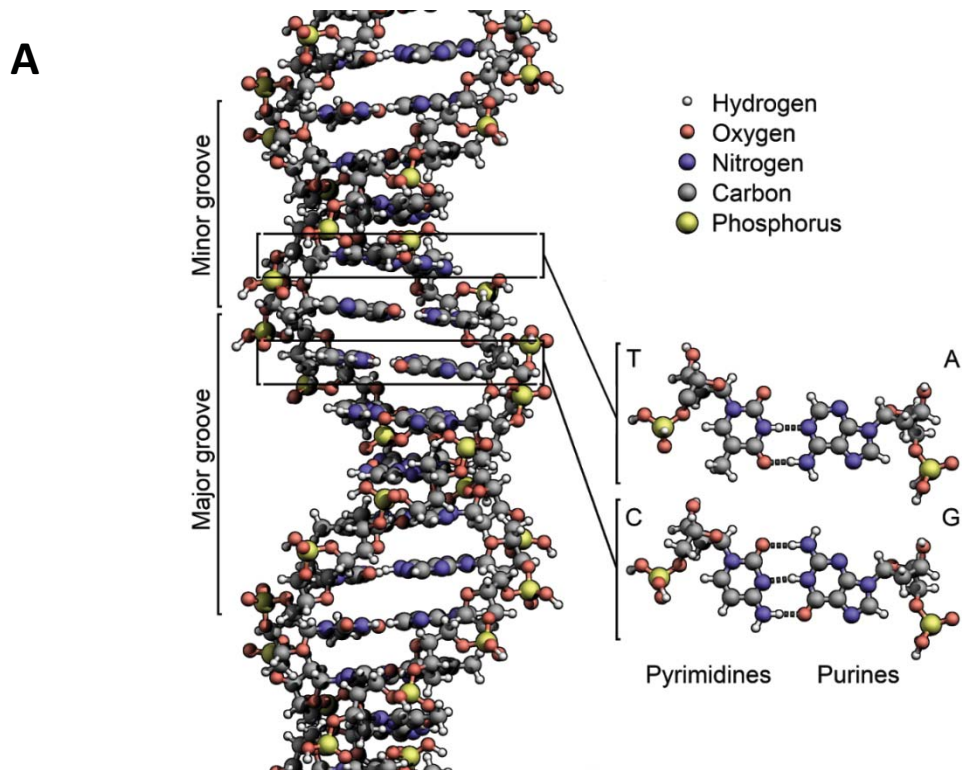
J'ai réalisé ce travail dans le contexte de la congélation lente des spermatozoïdes humains en mesurant les effets d'une supplémentation antioxydante sur les altérations nucléaires post-décongélation.

Enfin, j'ai évalué l'impact potentiel de la qualité nucléaire du spermatozoïde humain sur la fécondation, la cinétique de développement embryonnaire ainsi que les issues de grossesses dans le cadre des patients pris en charge AMP.

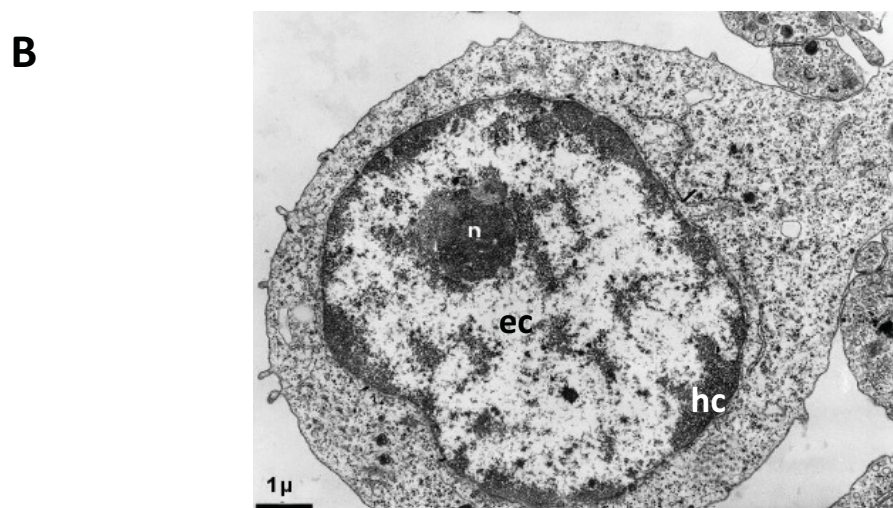
En guise d'introduction bibliographique, j'ai choisi de synthétiser l'état de l'art en matière d'organisation du noyau spermatique humain. L'accent a été mis sur les particularités de l'organisation du noyau gamétique chez l'homme et les multiples altérations pouvant l'atteindre, leurs étiologies et leurs conséquences cliniques.

Etat de l'Art

FIGURE 1



La double hélice d'ADN



Condensation de la chromatine dans un noyau de cellule somatique en interphase

A. Géométrie de la double hélice d'ADN montrant le petit et le grand sillon

En haut : L'adénine et la thymine s'apparient grâce à deux liaisons d'hydrogène ;

En bas : La guanine et la cytosine s'apparient au moins de trois liaisons d'hydrogène (D'après RichardWheeler.ent 2011).

B. Condensation de la chromatine dans un noyau de cellule somatique en interphase

En microscopie électronique à transmission, la chromatine du noyau (n) d'une cellule somatique présente des zones de différentes densités : L'hétérochromatine (hc) et l'euchromatine (ec) (Microscopy & Imaging Facility, Hamilton College, Clinton, NY, USA).

I. Le noyau spermatique humain

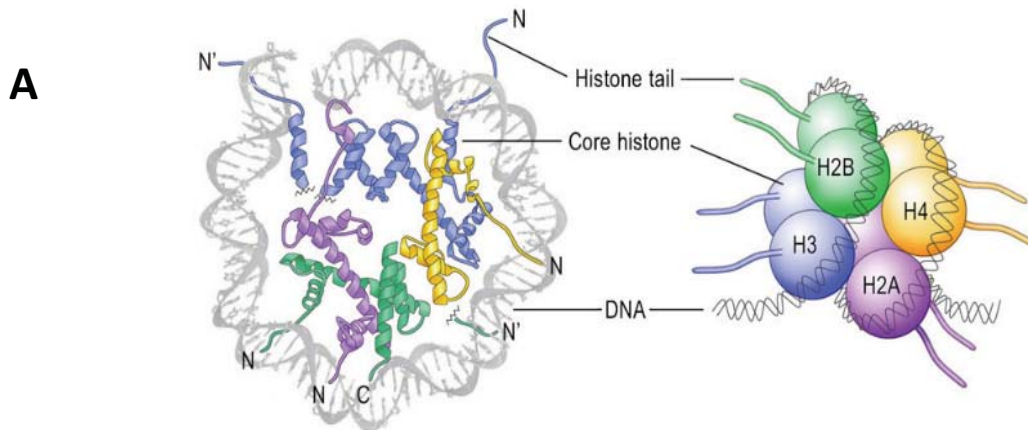
I.1. Généralités sur le noyau et sa structure

Le génome humain représente environ trois milliards de paires de bases, distribuées en 46 chromosomes sous la forme d'ADN bicaténaire (Venter *et al.*, 2001). Cette double hélice d'ADN est constituée de deux brins antiparallèles enroulés l'un autour de l'autre. L'unité de base est un nucléotide, formé d'une base nucléique ou base azotée (Figure 1A). L'association de l'ADN avec différentes protéines permettent son enroulement sur lui-même de façon ordonnée formant la chromatine. En microscopie, on distingue deux types de chromatine. L'hétérochromatine correspond à une chromatine dense donc peu accessible, principalement localisée en périphérie du noyau. Elle est définie comme une structure qui ne change pas de condensation au cours du cycle cellulaire. *A contrario*, l'euchromatine apparaît décondensée pendant l'interphase. Les gènes sont ainsi plus accessibles et voient leur expression facilitée (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology 2018 ; Figure 1B). La capacité des cellules souches embryonnaires à générer *in vivo* tous les lignages, somatique et germinale, présents dans un embryon tout particulièrement dans la masse cellulaire interne du blastocyste sont largement documentées (Shahbazi *et al.*, 2017). C'est pourquoi, en partant de la cellule somatique, passant par la cellule germinale primordiale pour obtenir un spermatozoïde hautement différencié, le noyau va subir des modifications colossales et finement orchestrées.

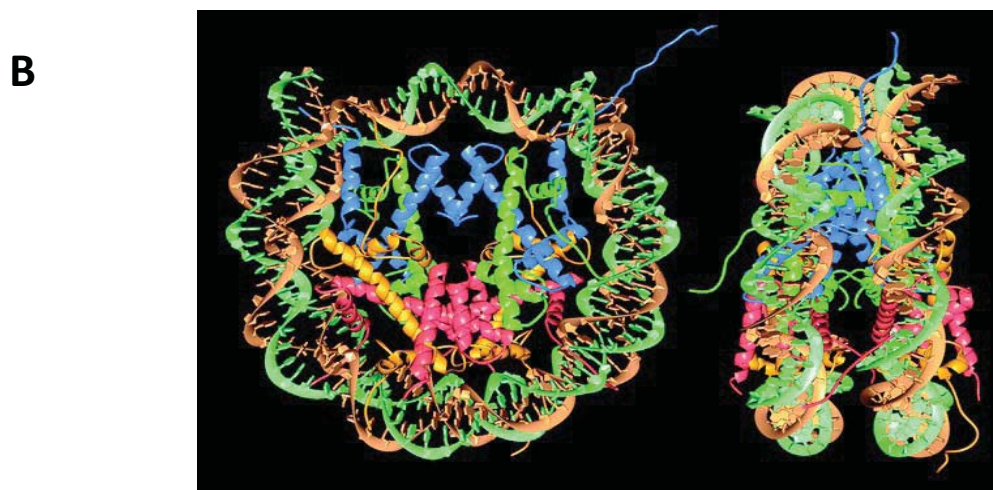
a. La chromatine dans les cellules somatiques

Environ deux mètres d'ADN doivent être compactés dans un noyau de 5 micromètres. Il est nécessaire d'ouvrir cette chromatine afin de permettre son interaction avec la machinerie protéique régulant les fonctions de la chromatine, notamment pour initier la transcription. Dans les cellules somatiques, l'unité fondamentale de la chromatine est le nucléosome. Pour dépasser l'obstacle que représente le nucléosome, un complexe de remodelage intervient pour réorganiser les histones afin de permettre la fixation de facteurs *trans* sur l'ADN et son expression (Wheeler *et al.*, 2012).

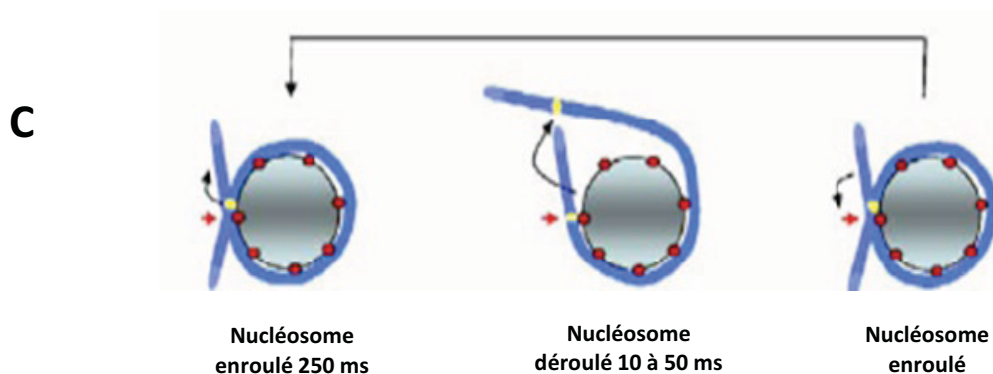
FIGURE 2



Le nucléosome, unité fondamentale de la chromatine



Modélisation de la structure nucléosome



Dynamique du nucléosome

- A. Le nucléosome, unité fondamentale de la chromatine** (Gräff J and Mansuy IM, 2008)
- B. Modélisation de la structure nucléosome** par cristallographie au rayons-X à une résolution de 2,8 Å. L'hélice d'ADN est représentée en marron et vert. Les histones sont représentées en bleu (H3), vert (H4), rose (H2B) et orange (H2A) (Luger *et al.*, 1997).
- C. Dynamique du nucléosome** : Les points de contacts entre l'ADN (bleu) et le cœur d'histone (gris) sont symbolisés par des cercles rouges (Mellor, J. 2005).

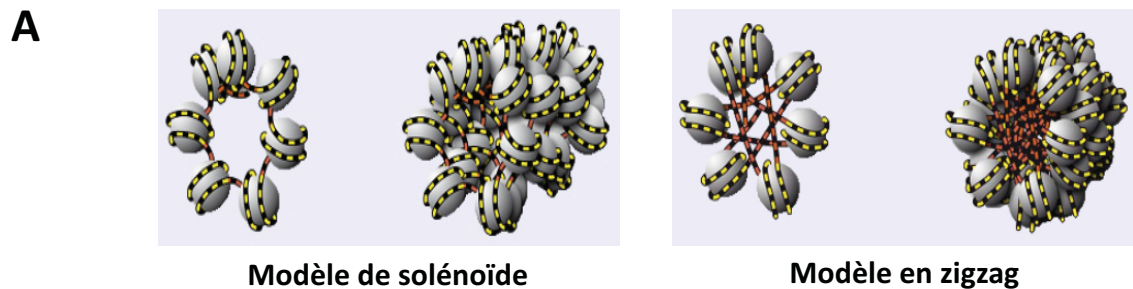
b. Le nucléosome

Le nucléosome est composé de 146 paires de bases (pb) de la double hélice de 2 nm enroulées autour d'un disque protéique octamérique. Cet octamère du nucléosome est composé d'histones canoniques appelées histones de cœur ou « *Core histones* » organisés en tétramère d'histones (H3-H4)₂ nouvellement synthétisées, auquel viennent s'adjoindre deux dimères H2A-H2B (Figure 2A et B). Les histones adoptent un repliement caractéristique : trois hélices alpha reliées par deux boucles. Cette structure appelée le nucléosome est l'unité de base répétée de la chromatine (fibre de 11 nm ; Wolffe and Kurumizaka, 1998). La distance relative entre chaque nucléosome influe sur le degré de condensation de la chromatine et donc sur l'accessibilité de l'information génétique aux facteurs de transcription (Felsenfeld, 1992). Les nucléosomes sont dans un état d'équilibre. Il existe une alternance entre un état complètement enroulé et plusieurs états de déroulement plus ou moins partiels. L'interconversion entre ces états est rapide et spontanée. Ainsi, l'ADN nucléosomal reste en contact avec les histones avant d'être spontanément désenroulé pour retrouver ensuite un état enroulé (Mellor, 2005 ; Figure 2C).

c. Les histones de cœur

Ces histones sont de petites protéines basiques (11 à 16 kDa) fortement conservées au cours de l'évolution. Chaque histone se compose de deux domaines : le domaine globulaire qui permet les interactions histone-histone ou histone-ADN et un domaine amino-terminal fortement acide qui s'étend au-delà du cœur d'histone. Les extrémités N et C terminales de ces histones, appelée queue, sont dépourvues de structure secondaire, particulièrement riche en résidus lysine et arginine, donc très basiques. Leur composition leur confère une charge globale positive, qui va favoriser l'interaction avec l'ADN chargé négativement, du fait des groupements phosphates composant le squelette sucré. L'association de l'ADN avec les histones, neutralise une grande partie des charges négatives et permet ainsi son repliement sur lui-même et donc la compaction (Arya and Schlick, 2006). Les queues des histones sont la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles.

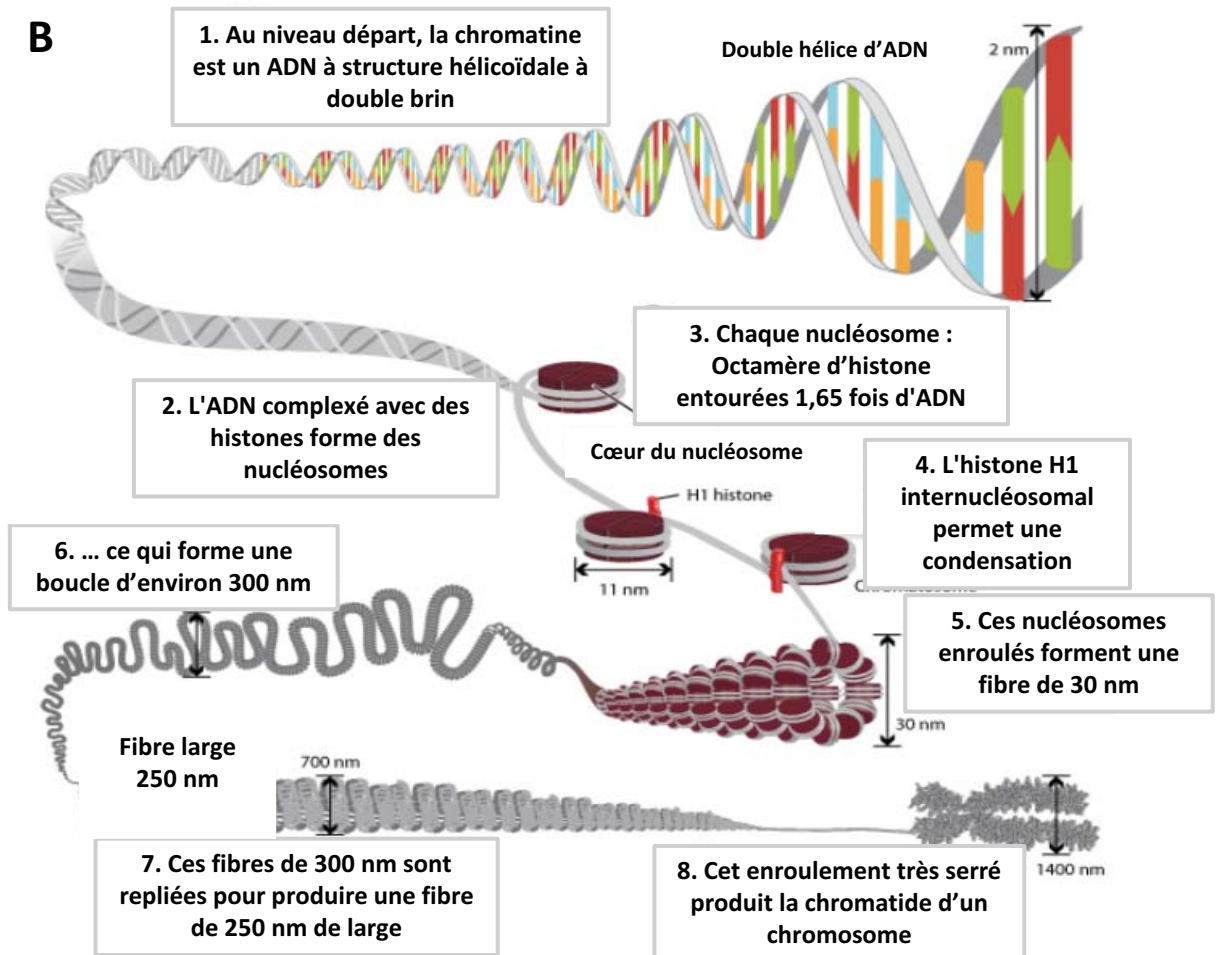
FIGURE 3



Modèle de solénoïde

Modèle en zigzag

Deux modèles pour la fibre de 30 nm



Compaction de l'ADN au sein de la chromatine

A. Deux modèles existent pour décrire cette fibre de 30 nm (Dupont JM ; Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, 2008-06)

B. De l'ADN au nucléosome, le nucléofilament, la fibre de 30 nm et le chromosome métaphasique (D'après Annunziato, Nature 2008)

d. Les histones internucléosomales

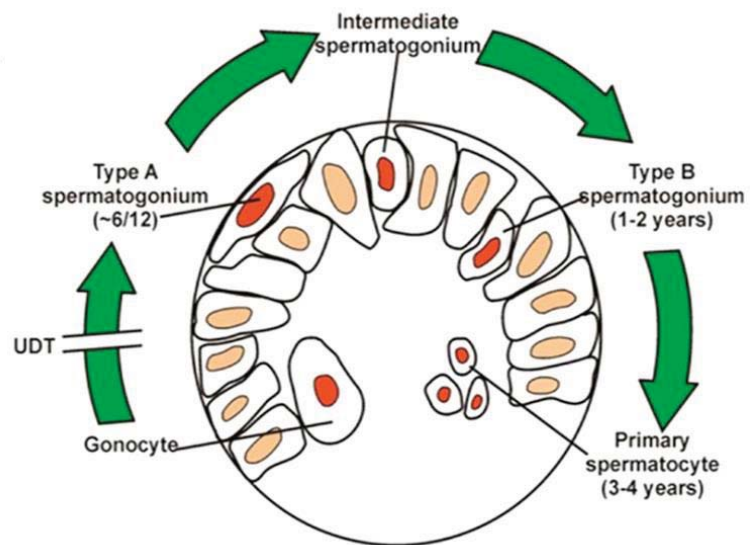
Ces histones internucléosomales sont les protéines qui s'associent à la région d'ADN de liaison entre deux nucléosomes. Contrairement aux histones de la particule cœur, elles sont peu conservées parmi les espèces. Ces histones de liaison, H1 et H5, interagissent avec des séquences d'ADN de liaison pour permettre une meilleure compaction de la chromatine. L'histone canonique H1 peut s'associer avec la région de l'ADN qui lie deux nucléosomes adjacents par la chaperonne NASP (Nuclear Autoantigenic Sperm Protein ; Finn et al. 2008). Ces histones ne présentent pas d'homologie structurale avec les histones de l'octamère. L'inclusion de l'histone H1 au sein de cette structure permet une condensation plus importante de la chromatine (fibre de 30 nm ; Misteli *et al.*, 2000).

En 1976, Finch et Klug ont proposé une structure en solénoïde où deux nucléosomes consécutifs se retrouvent côte à côte dans une même hélice (Finch and Klug, 1976). Plus tard, un second model d'hélice en zigzag à deux départs a été suggéré. C'est un arrangement linéaire des nucléosomes sur l'ADN, formant un chapelet de nucléosomes. Le second niveau d'organisation correspond à la compaction des chapelets de nucléosomes. C'est la formation 3D d'une fibre chromatinienne de 30 nm, composée de nucléosomes et de protéines régulatrices sur une séquence d'ADN spécifique. Ainsi, Grigoryev *et al.*, 2009 a montré que les deux structures pouvaient coexister au sein de la fibre (Figure 3A). Cependant, l'arrangement des nucléosomes *in vivo* pourrait ne pas être si régulier, avec des régions ordonnées en zigzag alternant avec des régions localement désordonnées. Au cours de la mitose et de la méiose, il existe transitoirement un niveau extrême de compaction, les chromosomes. Le niveau de condensation le plus élevé étant atteint au sein des chromosomes métaphasiques morphologiquement étudiables en microscopie optique (Figure 3B). Enfin, le degré ultime de compaction de la chromatine des cellules somatique est représenté au sein des chromosomes mitotiques (14000 nm).

e. La chromatine dans les cellules germinales

Les spermatozoïdes possèdent un noyau particulier du fait de leur génome haploïde. Depuis les cellules germinales primordiales (CGP), au cours de la spermatogenèse, des phases mitotiques des cellules germinales diploïdes précèdent une méiose et une maturation

FIGURE 4



Développement des cellules germinales en post-natal chez l'humain

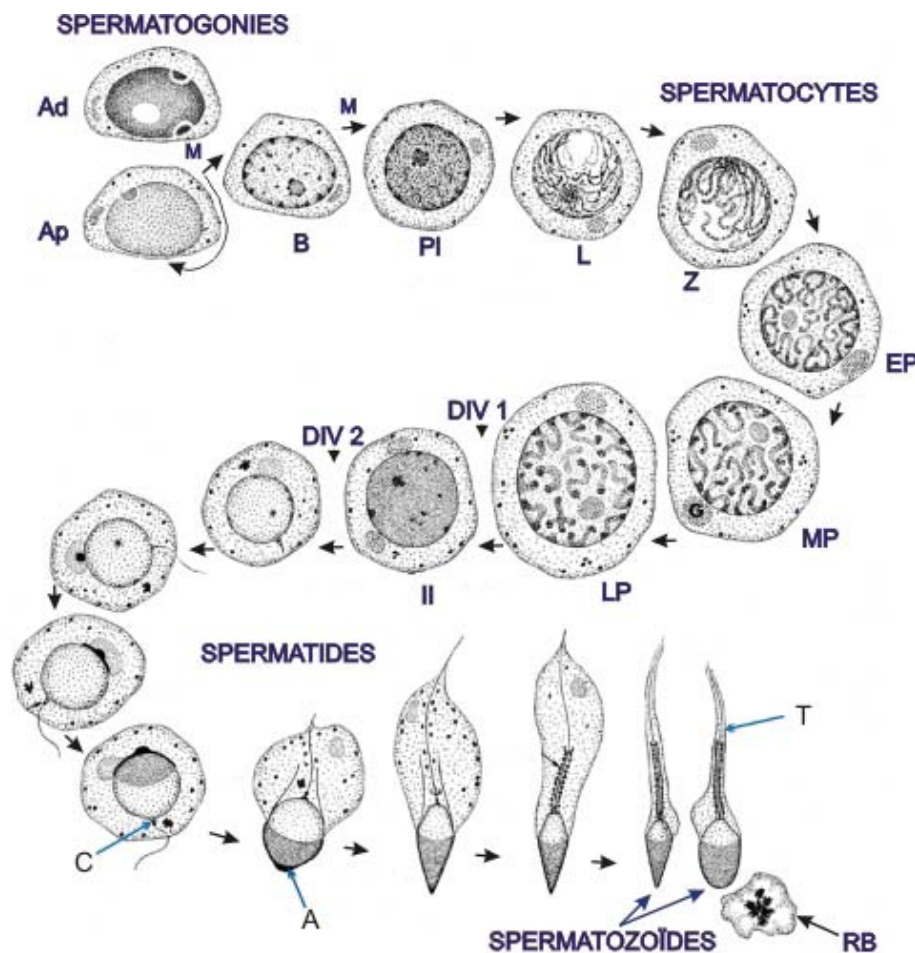
Les gonocytes migrent du centre vers la périphérie des tubules séminifères autour du sixième mois après la naissance et se différencient en spermatogonies (D'après Hutson *et al.*, 2013). UDT= Undescended testis

morphologie y compris nucléaire. Pendant cette dernière phase, on assiste au remplacement des histones (environ 85%) par des protéines de transition qui sont à leurs tours remplacées par les protamines, protéines basiques à conformation spatiale particulière. Ainsi, la chromatine spermatique est constituée d'une nouvelle structure nucléoprotéique arrangée en tores et en solénoïdes fixés à la matrice par des régions d'attachements et des nucléohistones (Schagdarsurengin *et al.*, 2012).

I.2. Les cellules germinales primordiales

Chez l'homme, les cellules germinales primordiales (CGP) diploïdes, peuvent être mise en évidence dès la deuxième semaine embryonnaire dans l'épiblaste. L'aptitude à la pluripotence est une des particularités des CGP (Dadoune, 2003). Durant la troisième semaine, ces cellules vont migrer de l'épiblaste vers la base de la future allantoïde. Puis entre quatre et six semaines de vie fœtale, les CGP migrent vers la crête génitale. Ces CGP se multiplient par mitose non seulement lors de la migration mais aussi dans la crête génitale. Dans la gonade indifférenciée, on parle d'épithélium germinatif contenant des gonocytes et les cellules somatopleurales. Les gonocytes sont plus grands et plus claires que les cellules somatiques qui les entourent et les compriment, leur conférant ainsi une forme sphérique. Le noyau est volumineux avec de gros nucléoles, irrégulièrement lobé avec une chromatine finement granulaire, dispersée et claire contenant de rares mottes d'hétérochromatines (Fouquet *et al.*, 1998). L'environnement produit ensuite différents facteurs initiant la différenciation en cellules germinales ou gonocytes. Les gonocytes arrêtent alors toute mitose. Sous l'influence du chromosome Y et plus spécifiquement du gène SRY (Sex determining region of the Y) la différenciation masculine est induite. SRY est exprimé dans les cellules somatiques de la crête génitale masculine et permet notamment la production de testostérone. Les gonocytes migrent du centre vers la périphérie des tubules séminifères autour du sixième mois après la naissance et se différencient en spermatogonies (Figure 4). Les divisions cellulaires ne reprendront qu'après la naissance. Avant la puberté, les divisions restent inférieures à celles des cellules de Sertoli, aboutissant ainsi à l'augmentation du diamètre et de la longueur des cordons séminifères. Ce n'est qu'au moment de la puberté, sous l'influence des hormones produites par l'axe hypothalamo-hypophysaire (GnRH

FIGURE 5



Transformation des spermatogonies en spermatozoïdes

❖ La prolifération, renouvellement et différenciation des spermatogonies:

1. Ad, spermatogonies foncées (ou de réserve)
2. Spermatogonies pâles ou de renouvellement Ap
3. Spermatogonies différenciées ou de type B.

Les spermatogonies Ap et B se divisent par mitose (M). Toutes les spermatogonies B donnent naissance aux spermatocytes préleptotènes.

❖ **La méiose** concerne les spermatocytes primaires et secondaires qui subissent deux divisions réductionnelles (Div 1 et Div 2). La prophase de la première division méiotique : PI, préleptotène; L, leptotène; Z, zygotène; EP, début du pachytène; MP, pachytène intermédiaire; LP, pachytène avancé. Les spermatocytes secondaires (II), se divisent à leur tour et donnent naissance aux spermatides haploïdes.

❖ **La spermiogenèse** : les spermatides se métamorphosent en spermatozoïdes.

Appareil de Golgi (G), l'acrosome (A), les centrioles (C); la queue ou flagelle (T); un corps cytoplasmique résiduel (RB).

(Yves Clermont, Michael Lalli, Zsuzsanna Bencsath-Makkai ; Atlas d'histologie en microscopie optique, 2013)

Gonadotrophin releasing hormone ; LH *Luteinizing hormone* ; FSH *follicle stimulating hormone*) que les divisions vont s'accélérer et que les testicules vont subir un profond remodelage. Ainsi, une lumière apparaît dans les cordons séminifères, devenant des tubules séminifères. Entre les tubes, les cellules de Leydig sécrètent la testostérone. L'épithélium séminifère établit une barrière hémato-testiculaire fonctionnelle *via* des jonctions serrées intracellulaires. La production de gamètes masculins différenciés peut alors commencer (Hutson *et al.*, 2012).

I.3. La spermatogenèse

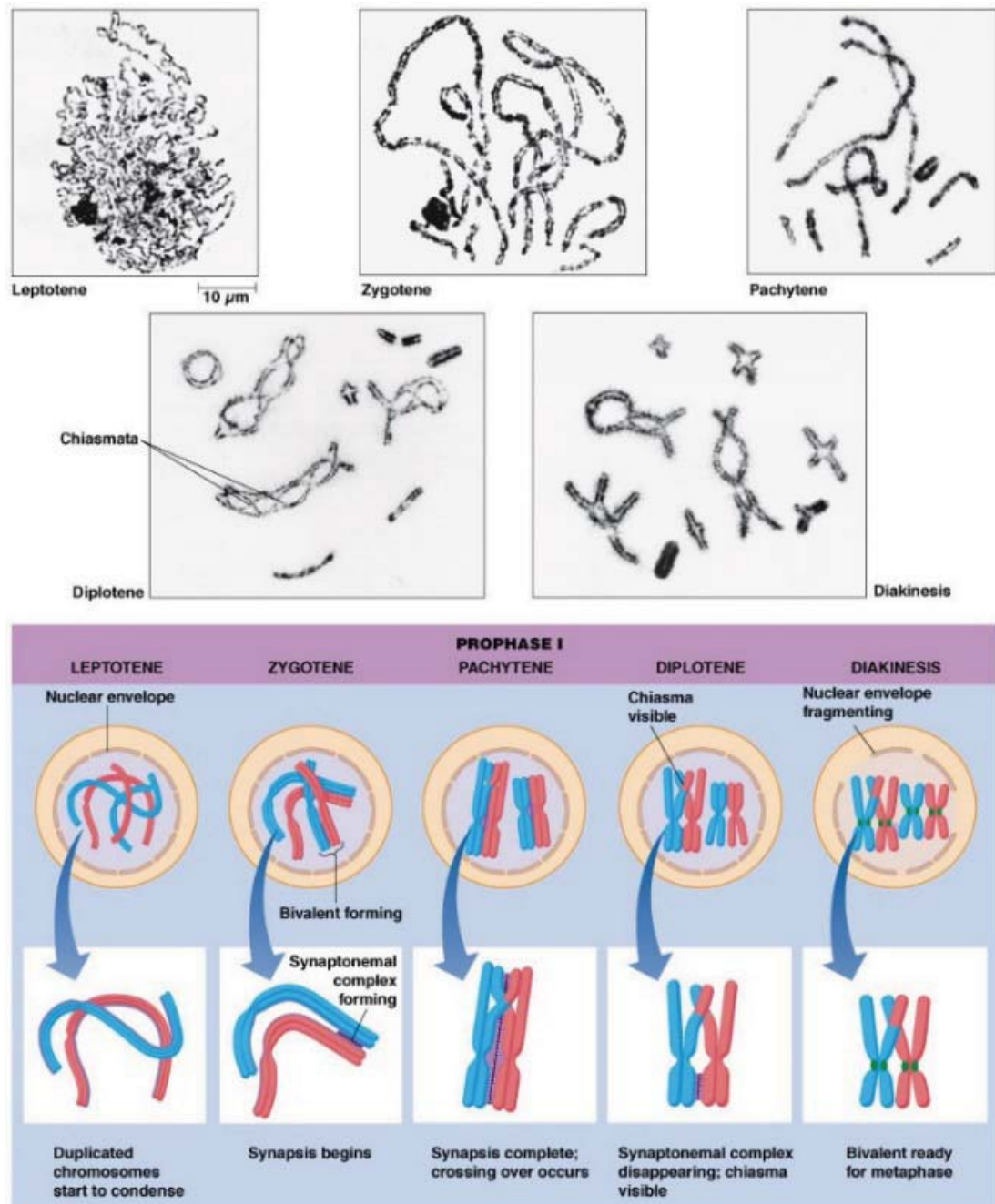
C'est un processus physiologique et continu, mis en place à la puberté, permettant la production à partir de cellules diploïdes, la formation de cellules germinales masculines haploïdes. La production continue de spermatozoïde nécessite à la fois la division des spermatogonies pour le renouvellement et le maintien d'un pool constant de spermatogonies *Ad* constituant un stock de réserve permanent et une activité de différenciation (d'après Yves Clermont, Michael Lalli, Zsuzsanna Bencsath-Makkai ; Atlas d'histologie en microscopie optique, 2013 ; Figure 5).

a. Multiplication ou phase pré-méiotique

Une phase de multiplication est tout d'abord initiée à partir des spermatogonies *Ad* puis une succession de mitoses vont permettre d'aboutir à la formation successive de spermatogonies *Ap*, *B* puis finalement les spermatocytes I (Clermont, 1972).

Les spermatogonies *Ad* (dark) possèdent un noyau arrondi, dont la chromatine est finement granuleuse, occupée par une vacuole centrale. Les spermatogonies *Ap* (pâle) possèdent un noyau ovale, clair, à chromatine fine et dispersée, renfermant une ou plusieurs nucléoles. Les spermatogonies *B* sont caractérisées par un noyau arrondi, foncé avec une chromatine en amas. Déjà, en 1998, il a été découvert dans les spermatogonies *Ap* et *Ad* une activité mitotique, immunoréactivité Ki-67 spécifique de la phase S du cycle cellulaire (Steger *et al.*, 1998). Plus la différenciation se poursuit, plus les gènes impliqués dans l'auto-renouvellement sont inactivés par la formation d'hétérochromatine. Hormis ces données histologiques et génomiques précises, peu d'informations sont connues concernant la

FIGURE 6



Les différents stades de la prophase I

(Principes of Cell Biology (BIOL2060) Department of Biology Memorial Université of Newfoundland, Pearson Edition 2012)

mécanistique des modifications structurales nucléaires des spermatogonies chez l'homme (Hermo *et al.*, 2010).

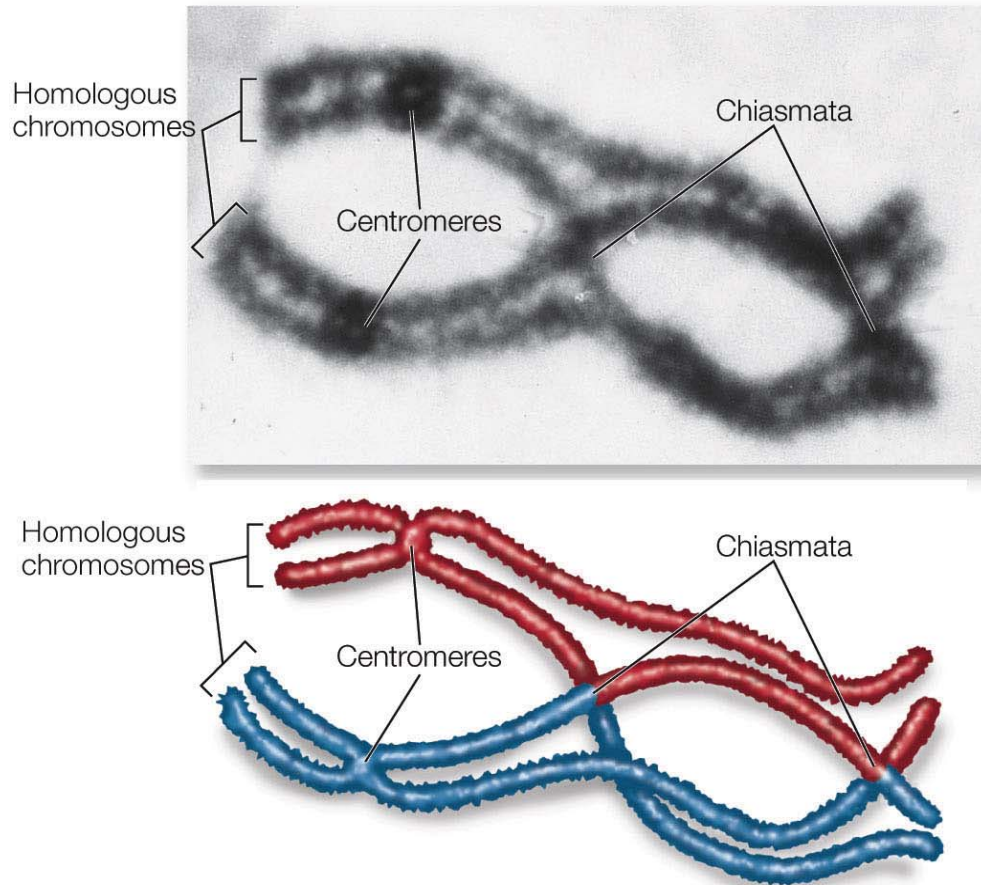
b. Maturation nucléaire ou phase méiotique

La méiose consiste en deux divisions consécutives à une seule phase de réplication de l'ADN. La première division, dite réductionnelle, aboutit à la séparation des chromosomes appariés du spermatocyte I. C'est la formation des spermatocytes II, dont chaque chromosome est formé de deux chromatides. La deuxième division de méiose, dite équationnelle, permet la répartition de chaque chromatide dans les deux cellules filles appelées spermatides. Au final, la méiose permet donc la réduction chromatique, le brassage de l'information génétique et la transmission de l'information génétique à la génération suivante.

L'acétylation des histones, notamment H2A, H2B et H4, favorise l'ouverture de la chromatine et facilite le travail de la machinerie de réplication. La première division de méiose est précédée d'une phase de réplication, pré-leptotène, permettant de doubler la quantité d'ADN dans les spermatocytes I diploïdes et la réplication des filaments chromosomiques. C'est à ce stade que débute le remplacement des histones canoniques par des variants. En effet, on observe en premier lieu l'incorporation de TH2B, variant de H2B spécifique du testicule, qui apporte une plus grande instabilité des nucléosomes le contenant (Singleton *et al.*, 2007). Les chromosomes sont tous dédoublés, ils possèdent deux chromatides sœurs reliées entre elles par des protéines appelées complexe cohésine. Au début de la méiose, le spermatocyte I se situe dans le compartiment adluminal du tube séminifère. Les spermatocytes, poussés par les cellules de Sertoli, traversent la jonction serrée. Cinq étapes se succèdent pendant la première division de méiose en fonction de l'état caractéristique de la chromatine et des événements génétiques (Figure 6) :

1- Au stade leptotène, (*leptos* mine et *taenia* ruban), les 23 paires de chromosomes sont sous forme de filament fins irréguliers, semblables deux à deux. Ils commencent à se condenser et à s'apparier. A la fin de ce stade, les télomères s'associent à la membrane nucléaire pour initier un rapprochement spatial des chromosomes homologues et se positionnent à la face interne de l'enveloppe nucléaire. Les chromatides subissent de nombreuses cassures doubles brins permettant la reconnaissance entre les chromosomes

FIGURE 7



Représentation microscopique et schématique d'une paire de chromosome homologue lors d'un échange d'une portion de leurs chromatides durant la prophase I de méiose, au niveau de deux chiasmata

(Life : The Science of Biology, Eighth Edition 2007)

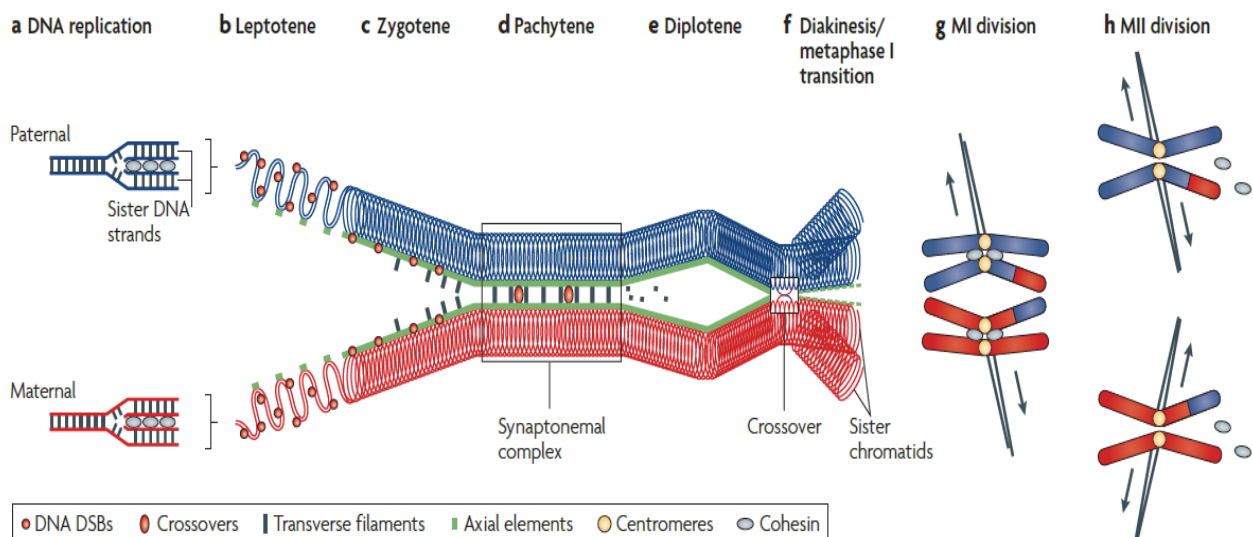
homologues ainsi que leur stabilisation. Une désacétylation et une méthylation des histones assurent la compaction de la chromatine. En effet, on observe des méthylations de l'histone H3 de l'hétérochromatine des régions péri-centromériques (Sasaki and Matsui, 2008). Elles permettent d'éviter la formation d'un appariement non homologue de deux chromosomes par la formation de *crossing-over* ou enjambement trop proche des centromères. Les cassures de l'ADN induisent la formation de la forme gamma de H2A.X, indispensable au bon déroulement de la réparation de l'ADN et une hyperacétylation de l'histone H4 favorisant l'ouverture de la chromatine (Buard *et al.*, 2009).

2- Au stade zygotène, (*zygos*, joug et *ten*, filament) le processus d'épaississement des chromosomes se poursuit. Les paires de chromosomes s'apparient, formant des bivalents. Cette association stable entre les chromosomes homologues favorise la réparation des cassures doubles brins par des complexes protéiques. Le complexe synaptonémal, structure protéique, permet l'appariement des chromosomes homologues. C'est le synapsis.

3- Au stade pachytène, (*packhus* épais), l'appariement des chromosomes homologues étroitement unis par le complexe synaptonémal est achevé. C'est le synapsis complet. Il devient possible de reconnaître et d'individualiser chaque bivalent, formant ainsi les tétrades. Des nodules de recombinaison apparaissent au niveau des chromosomes appariés permettant des échanges de segments chromosomiques entre chromosomes homologues d'origines maternelle et paternelle. Ces *crossing-over*, ou recombinaisons, permettent le brassage génétique intra-chromosomique.

Le bivalent sexuel (chromosome X ou Y) se sépare des 22 bivalents autosomiques. En effet, les chromosomes sexuels des spermatocytes I ont un comportement spécifique. Leur chromatine va fortement et rapidement se condenser et s'inactiver. C'est la formation de la vésicule sexuelle, particulièrement visible en microscopie. Ce mécanisme est basé sur la réalisation de nombreuses modifications des histones présentes sur ces chromosomes (Turner *et al.*, 2004). L'incorporation de variants d'histones et/ou les modifications post-traductionnelles sur les régions amino-terminales des histones induisent des variations de conformation de la chromatine et jouent un rôle dans la régulation de l'expression génique en fonction du type cellulaire et du stade de développement (Talbert and Henikoff, 2017).

FIGURE 8



La méiose

a. Pré-méiose : Réplication de l'ADN de chaque chromosome maternel et paternel maintenus ensemble par des cohésines.

b. Leptotène : Introduction de cassures doubles brins dans l'ADN, permettant la reconnaissance entre les chromosomes homologues et leur stabilisation (DsB : cassures doubles brins, cercles rouges).

c. Zygotène : Appariement des paires de chromosomes formant des bivalents.. Association stable entre les chromosomes homologues favorisant la réparation des cassures doubles brins par des complexes protéiques. Le synapsis commence via des filaments transversaux pour former un complexe synaptonémique.

d. Pachytène : C'est l'achèvement du synapsis. Les cassures d'ADN sont réparées.

e. Diplotène : Démontage du complexe synaptonémique. Les chromosomes homologues sont ainsi maintenus ensemble par les chiasmas.

f. Fin de la prophase I : Diacinese.

g. Métaphase de la première division méiotique (MI) : Séparation des homologues avec un homologue de chaque paire passant à chaque cellule fille.

h. Deuxième division méiotique (MII) : Chaque lot de chromosome haploïde est entouré d'une membrane nucléaire constituant ainsi le noyau haploïde des deux spermatides formées.

(D'après Burgoyne *et al.* 2009)

4- Au stade diplotène (*diplos* double), les chromosomes se décondensent et se séparent incomplètement par dissociation du complexe synaptonémal. L'appariement étroit entre les chromosomes homologues ne persiste qu'en quelques points spécifiques, les chiasmas. Les chiasmas proviennent de la réunion de deux des quatre chromatides du bivalent, localisés où les *crossing-over* se sont produits auparavant (Figure 7). A ce stade, la vésicule sexuelle disparaît.

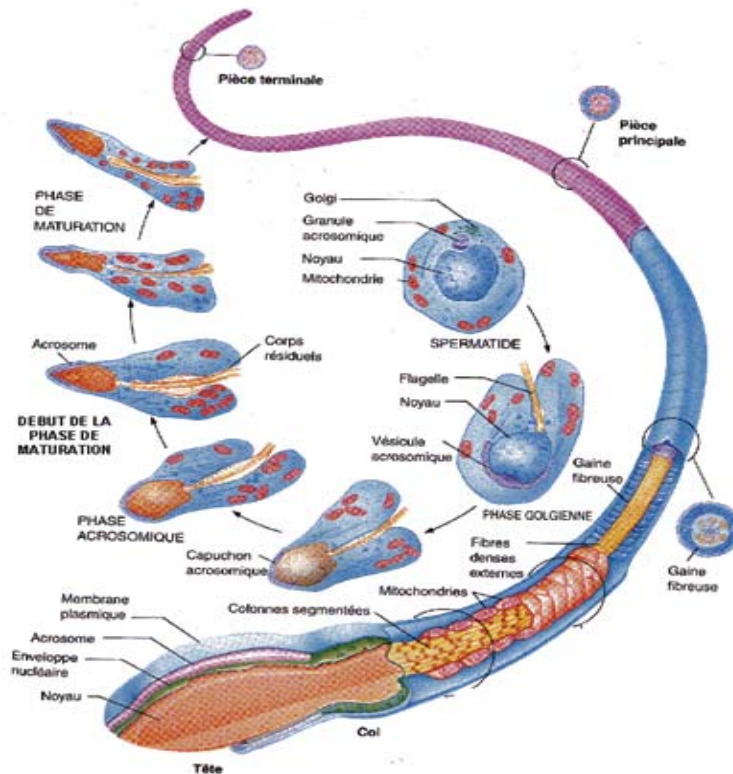
La fin de la prophase I est marquée par le stade diacinèse. Les chromosomes toujours reliés entre eux par les chiasmas présentent une condensation maximale. Lors de la métaphase I, les chromosomes homologues se disposent de manière aléatoire sur les fibres du fuseau mitotique constituant ainsi la plaque équatoriale. Les chiasmas se trouvent sur la plaque équatoriale, entre les deux centromères.

5- A l'anaphase I, il y a rupture des chiasmas. Chaque chromosome à deux chromatides sœurs migre vers un pôle du fuseau. La ségrégation aléatoire des chromosomes homologues aux pôles opposés est un facteur de brassage génétique notamment interchromosomique. Enfin, lors de la télophase I, une nouvelle membrane nucléaire enveloppe les deux lots de chromosome. Cette individualisation nucléaire est suivie d'une cytotéière incomplète avec réunion par un pont cytoplasmique des deux spermatocytes II obtenus. A la fin de cette première division réductionnelle de méiose, chacun des deux spermatocytes II contient un lot haploïde de chromosomes (23+X ou 23+Y) avec deux chromatides.

Les spermatocytes II sont rarement retrouvés sur des coupes histologiques car leur existence n'est que de cinq heures. En effet, les spermatocytes II abordent directement la deuxième division de méiose. Sans duplication, ni recombinaison du matériel héréditaire, la deuxième division équationnelle de méiose progresse rapidement donnant naissance à deux spermatides. Pendant la prophase II, les chromosomes comportant deux chromatides se condensent et migrent vers la plaque métaphasique sur laquelle ils vont s'aligner en métaphase II. L'anaphase II débute par le clivage des liaisons entre chromatides sœurs, puis migration vers les pôles opposés. Enfin, lors de la télophase II, chaque lot de chromosomes est entouré d'une membrane nucléaire constituant ainsi le noyau haploïde des deux spermatides (Figure 8).

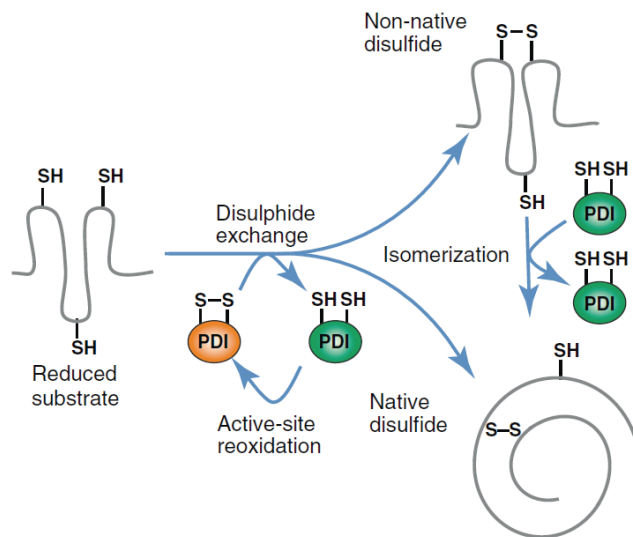
FIGURE 9

A



Remaniement morphologique du spermatozoïde durant la spermiogénèse

B



Formation de ponts disulfures

A. Remaniement morphologique du spermatozoïde durant la spermiogénèse (Editions Pradel, 1993)

B. Formation de ponts disulfures par la Protéine Disulfite Isomérase (PDI) au sein des protéines ; Cystéines libres - représentés ici dans leur état protoné (-SH) - ont lieu via l'état anion thiolate (-S-). Membre de la famille PDI réduits sont en vert et les PDI oxydés en orange (D'après Bulleid & Ellgaard, 2011).

c. Spermiogenèse

Cette étape ne comporte pas de division cellulaire mais uniquement une phase de différenciation des spermatides par transformation de l'ensemble des constituants cellulaires pour aboutir à la libération de spermatozoïdes dans la lumière du tube séminifère. La spermatide, initialement, est une petite cellule ronde à noyau central de 6 à 7 μm , à chromatine granulaire et irrégulière. Ces cellules vont subir des transformations nucléaires, cytoplasmiques et membranaires qui sont le résultat de la traduction d'ARN synthétisés et stockés depuis le stade de spermatocyte primaire. Huit stades morphologiquement identifiables se succèdent (Figure 9A). La spermiogenèse est caractérisée par plusieurs événements majeurs qui modifient de manière importante la morphologie cellulaire : le développement du flagelle, l'élimination de l'excès de cytoplasme sous forme de corps résiduels, la biogenèse de l'acrosome et la compaction du noyau spermatique.

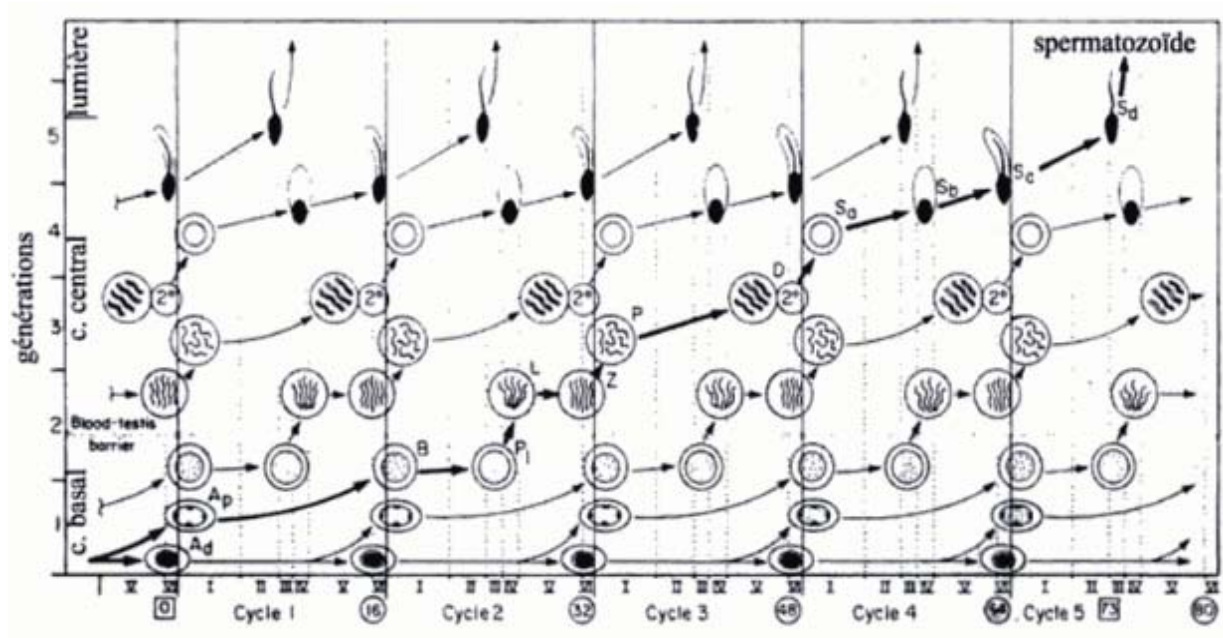
Progressivement la chromatine des spermatides se condense pour former un noyau compact, de forme ovoïde. C'est une compaction protectrice déterminante pour la condensation de la chromatine caractéristique du noyau du spermatozoïde mature. Cette hyper compaction de la chromatine est nécessaire pour protéger le matériel génétique du gamète paternel contre les agressions physico-chimiques durant le transit dans les voies génitales. De plus, la réduction de la taille du noyau qui en résultera rend le spermatozoïde plus hydrodynamique et favorise sa mobilité. Le noyau subit une élongation et effectue une rotation pour diriger le pôle céphalique (acrosomal) vers la membrane basale du tube séminifère. On assiste au remplacement des histones de types somatiques présents dans les stades précoces de la spermatogenèse par des nucléoprotéines plus basiques (protéines de transition TP1, TP2). Ces protéines sont elles-mêmes remplacées par des nucléoprotéines riches en arginine et cystéine : les protamines P1 et P2 (Balhorn, 2007; Maor-Sagie *et al.*, 2015). Ces deux variants sont exprimés dans le spermatozoïde en quantité équimolaire. Les protamines présentent plusieurs domaines de liaison à l'ADN appelés « *enchroaching domains* » riches en arginine (chargés positivement), qui se lie fortement au phosphosquelette de l'ADN (chargé négativement). Au final, on estime chez l'homme que près de 15% de l'ADN reste associé aux histones alors que 85% de l'ADN se lie à des

protamines (Gatewood *et al.*, 1990 ; Oliva *et al.*, 2010). La formation de ponts disulfures entre les résidus cystéines (intra et inter-protamines) favorise la compaction de la chromatine et stabilise des complexes protamines-ADN.

La formation d'un pont disulfure est une réaction d'oxydo-réduction réversible, dépendante du potentiel rédox du milieu et du pH. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO), et tout particulièrement le peroxyde d'hydrogène sont aussi utilisées comme substrats par certaines enzymes chargées de réaliser les ponts disulfures telles que certaines glutathion peroxydases. Par exemple, la snGPx4 pour *sperm nucleus glutathione peroxydase 4* exprimée dans le testicule à partir du même gène que les isoformes cytosoliques et mitochondriales de GPX4 est positionnée dans le noyau spermatique où elle fonctionnera durant la maturation épидидymaire comme une disulfide isomérase pour créer des ponts disulfures entre les protamines (Shalgi *et al.*, 1989; Bulleid and Ellgaard, 2011 ; Figure 9B). L'oxydation spontanée des cystéines par les ERO est une réaction lente en condition physiologique pouvant néanmoins influencer sur le niveau de compaction du noyau spermatique.

Des histones de la lignée germinale vont subir des modifications post-traductionnelles. On retrouve tout particulièrement la phosphorylation, l'acétylation et la méthylation. Par exemple, les spermatides allongées présentent une phosphorylation importante sur le variant H1 (Mishra *et al.*, 2015). De même, l'ajout d'un groupement acétyl entraîne la perte d'une charge négative sur la région amino-terminale de l'histone permettant l'ouverture de la chromatine. L'acétylation joue donc un rôle dans l'activation de la transcription. L'hyperacétylation de l'histone H4 est un évènement physiologique bien connu, juste avant la transition par les protamines. Deux hypothèses coexistent. L'hyperacétylation peut soit déstabiliser l'interaction histone-ADN, ouvrant ainsi la chromatine et facilitant la fixation de facteurs d'échange protéiques. Sinon l'hyperacétylation peut permettre le recrutement et la fixation de protéine à bromodomaine, permettant l'activation de facteurs de remodelage nécessaires pour le déplacement des nucléosomes, le déroulement de l'ADN ou le remplacement des histones par des variants ou d'autres protéines (Clapier *et al.*, 2017). Ces étapes se déroulent simultanément.

FIGURE 10



Cycle de l'épithélium séminifère chez l'homme

Les associations cellulaires de chaque cycle sont numérotées de I à VI. Leur largeur, délimitée par les lignes verticales en pointillé est proportionnelle à la durée. Quatre à cinq génération cellulaires germinales se développent simultanément de façon synchrone en un point précis du tube séminifère. Cette figure décrit de gauche à droite les fragments qui surviennent avec le temps, en un point donnée du tube séminifère durant 74 jours, soit 4,6 cycles d'épithélium séminifère, nécessaires au déroulement complet de la spermatogenèse.

Ad : spermatogonie de type Ad ; Ap spermatogonie de type A p ; B : spermatogonie de type B ; PI, L, Z, P, D : spermatocytes I au stade pré leptotène, leptotène, zygotène, pachytène et diplotène ; Sc II : spermatocyte II ; Sa, Sb, Sc , Sd : différents stades de différenciation des spermatides (Classification de Clermont en microscopie photonique)
(D'après Amann, J Amer Cell Toxicol, 1989 : 8,457-471)

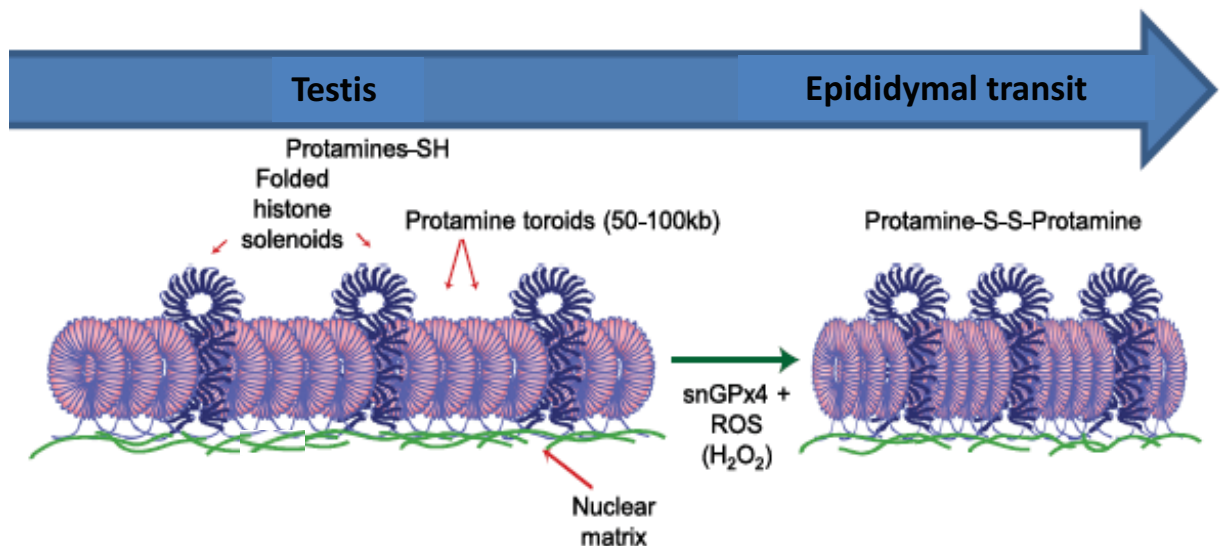
d. Cycles spermatogéniques chez l'homme

Les gamètes sont produits par vagues synchrones et successives en chaque région de l'épithélium germinal, sans que le processus soit synchrone dans tous les tubes séminifères. Chez l'homme, le processus de spermatogenèse se déroule en moyenne en 74 jours (95% IC : 69-80 jours) du stade spermatogonies *Ap* jusqu'à la spermiation. Ainsi, chez l'homme les spermatogonies *Ap* ont une durée de vie de 18 jours, les spermatogonies B de 9 jours, les spermatocytes I de 23 jours, les spermatocytes II d'une journée et les spermatides de 23 jours. Les gonies chez l'homme sont programmées pour entrer en division par « vague spermatogénétiques » tous les 16 jours. Chez l'homme, il est identifié la succession de six associations cellulaires préférentielles dans un épithélium germinal. Ces cellules se dirigent en spirale vers l'intérieur de la lumière. En périphérie du tubule et au début de la spirale se trouvent les spermatogonies et à la fin de la spirale les spermatozoïdes libérés dans la lumière tubulaire (Heller and Clermont, 1964; Clermont, 1972; Amann, 1989 ; Figure 10). Les spermatogonies permettent la production de gamètes par autorenouveaulement *via* les divisions mitotiques et les processus de mitose et méiose pour assurer une production continue de spermatozoïdes tout au long de la vie d'un homme (Dadoune, 2007).

I.4. La maturation épидидymaire du spermatozoïde

C'est durant ce transit que l'épididyme va assurer sa fonction principale de maturation des spermatozoïdes. Ce processus est basé sur l'interaction constante des spermatozoïdes avec le fluide épидидymaire. La composition de celui-ci varie entre chaque segment anatomique de l'organe, grâce aux activités spécifiques de sécrétion et d'endocytose de l'épithélium (Cornwall, 2009). Les cellules principales de l'épithélium épидидymaire, majoritaires, sont liées entre elles au pôle apical par des jonctions serrées et des desmosomes qui forment une barrière hémato-épидидymaire (Mruk and Cheng, 2015). Celle-ci assure la protection des spermatozoïdes envers une réponse auto-immune et contrôle les apports provenant du compartiment sanguin. La maturation épидидymaire concerne tous les composants biochimiques cellulaires du spermatozoïde, lipidique, glucidique et protéique. Lors de ce transit de la tête vers la queue de l'épididyme, sous l'influence de l'environnement

FIGURE 11



Représentation schématique de l'organisation de la chromatine spermatique testiculaires et épididymaires

Au cours de la maturation épididymaire des spermatozoïdes, le noyau est condensé au moyen de pontage disulfure intense. Une enzyme nucléaire (glutathion GPx4 = snGPx4 dans le noyau spermatique) agissant comme une disulfure isomérase utilise les dérivés actifs de l'oxygène, tout particulièrement le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pour créer des liaisons disulfure inter et intra-protamine sur les groupes thiol portés par le groupe riche en cystéine des protamines. Il compacte le noyau spermatique et le verrouille dans un état condensé (D'après Champroux *et al.* 2016)

séquentiel et spécifique, le spermatozoïde va acquérir une mobilité fléchante. Ainsi, le profond remodelage de la membrane plasmique conduit à une plus grande fluidité et à l'acquisition ou la modification de protéines essentielles à la reconnaissance et la fusion avec l'ovocyte (Sullivan and Mieusset, 2016).

La morphologie des spermatozoïdes va aussi évoluer au cours du transit épидидymaire. La taille de la tête du spermatozoïde diminue à la fois grâce à la poursuite de la compaction intense de la chromatine et à la perte d'eau par le gamète (Gervasi and Visconti, 2017). On observe aussi une maturation des enzymes acrosomiques. Les protamines mises en place sur l'ADN spermatique durant la phase d'élongation de la spermiogenèse vont modifier la conformation et l'organisation spatiale de la chromatine spermatique. Ainsi, la différenciation des spermatozoïdes initiée dans le testicule va s'achever dans l'épididyme. Comme déjà évoqué ci-dessus, la protéine snGPx4 testiculaire, liée à la matrice nucléaire spermatique semble être nécessaire au bon déroulement des pontages disulfures dès la spermiogenèse et lors du transit épидидymaire. Clivée au début du transit épидидymaire, elle possède une activité enzymatique de type disulfide isomérase capable de réduire les ERO notamment l' H_2O_2 (Pfeifer *et al.*, 2001). Ce même auteur, soutenu par Noblanc *et al.*, en 2012, postulent que le variant snGPx4 localisé dans le noyau spermatique contribuerait à la stabilité de la chromatine *via* l'établissement de ponts disulfures entre les protamines en utilisant différents ERO présents dans l'environnement spermatique (Noblanc *et al.*, 2012; Champroux *et al.*, 2016). Ainsi, les spermatozoïdes en fin de maturation épидидymaire vont posséder un ADN dix fois plus condensé que celui des cellules somatiques (Figure 11).

L'épididyme possède une fonction primordiale de protection des spermatozoïdes. En effet, ces cellules sont quiescentes et ne peuvent pas réagir à leur milieu par elles-mêmes, leur ADN étant extrêmement compacté, inaccessible pour la transcription. De plus, leur cytoplasme et ses organites ont été éliminés lors de la spermiogenèse, limitant ainsi les réserves d'enzymes de défense et de réponse à tout type de stress cellulaire. C'est donc l'épithélium épидидymaire qui est chargé de contrôler l'environnement des spermatozoïdes, c'est-à-dire la composition du fluide, pour éviter toute atteinte des gamètes. Pour se prémunir des dommages oxydants inhérents au métabolisme de toute cellule aérobie, on

retrouve au niveau épидидymaire des molécules comme le zinc, le sélénium, des vitamines ou bien des enzymes anti oxydantes comme les peroxyrédoxines, la superoxyde dismutase (SOD), la catalase ou les membres de la famille des glutathion peroxydases (GPx). Les GPx1, GPx3 et GPx5 sont particulièrement exprimées dans l'épididyme des mammifères (Drevet *et al.*, 1998). Chez la souris il a été montré que Gpx5, en queue d'épididyme, assure essentiellement un rôle protecteur contre les dommages radicalaires. Dans la tête de l'épididyme le rôle de GPx5 est double. Il protège d'une part les gamètes de l'oxydation comme un nettoyeur de ERO et d'autre part il assure un niveau optimal de pontages disulfures en fixant la concentration en H_2O_2 substrat de la snGPx4 (Chabory *et al.*, 2009). Ainsi, la maturation épидидymaire intervient dans le succès reproductif *via* notamment l'acquisition d'une vélocité optimale du spermatozoïde et la protection accrue du matériel génétique paternel.

I.5. Epigénome des cellules germinales masculines

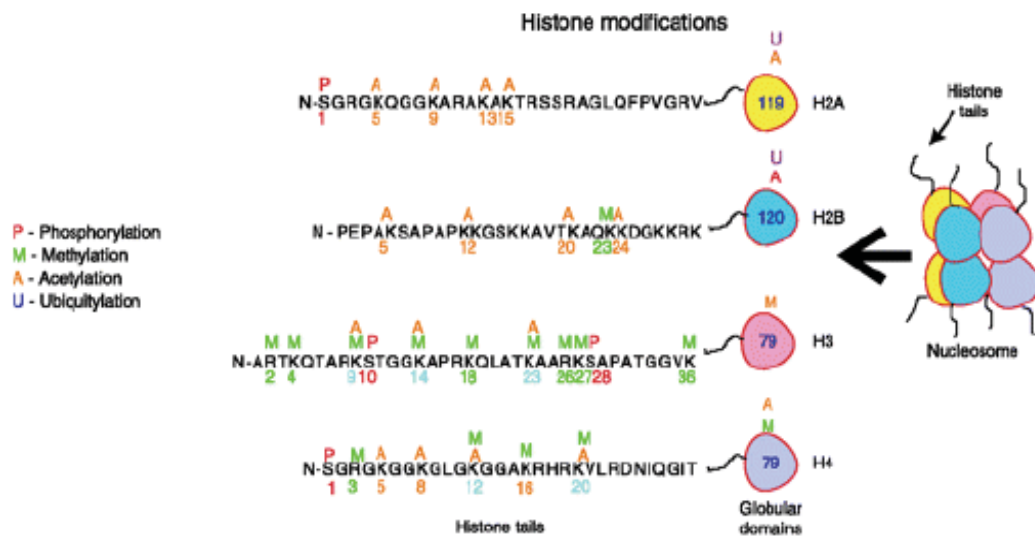
a. Généralités

L'information épигénétique (épi : autour) est une information non codée par la séquence de l'ADN, transmise de façon stable et héréditaire mais réversible (Weaver *et al.*, 2004; Waterland *et al.*, 2006). Elles peuvent correspondre à des modifications sur l'ADN, de type méthylation, ou post-traductionnelles sur des histones, ou encore à l'incorporation de variants d'histones. Ces modifications sont transmises aux cellules filles et permettent au génome de s'adapter à l'environnement.

A chaque génération, ces marques épигénétiques sont redéfinies deux fois : dans la lignée germinale, pour permettre la différenciation des spermatozoïdes et des ovules, et à la fécondation, pour créer le zygote totipotent qui commence alors sa croissance et sa différenciation en un nouvel individu. Un petit groupe de gènes échappe à la deuxième vague zygotique de reprogrammation épигénétique. Ces gènes conservent ainsi l'«empreinte» épигénétique parentale dont ils sont issus (Mackay and Temple, 2017). La méthylation de l'ADN apparaît comme une marque épигénétique majeure. Elle contribue à la définition des domaines génomiques, siège d'expression ou de répression génique. La méthylation est coordonnée avec l'ensemble des modifications post-traductionnelles des histones, connu sous le nom de « code histones » (Acétylation, méthylation et

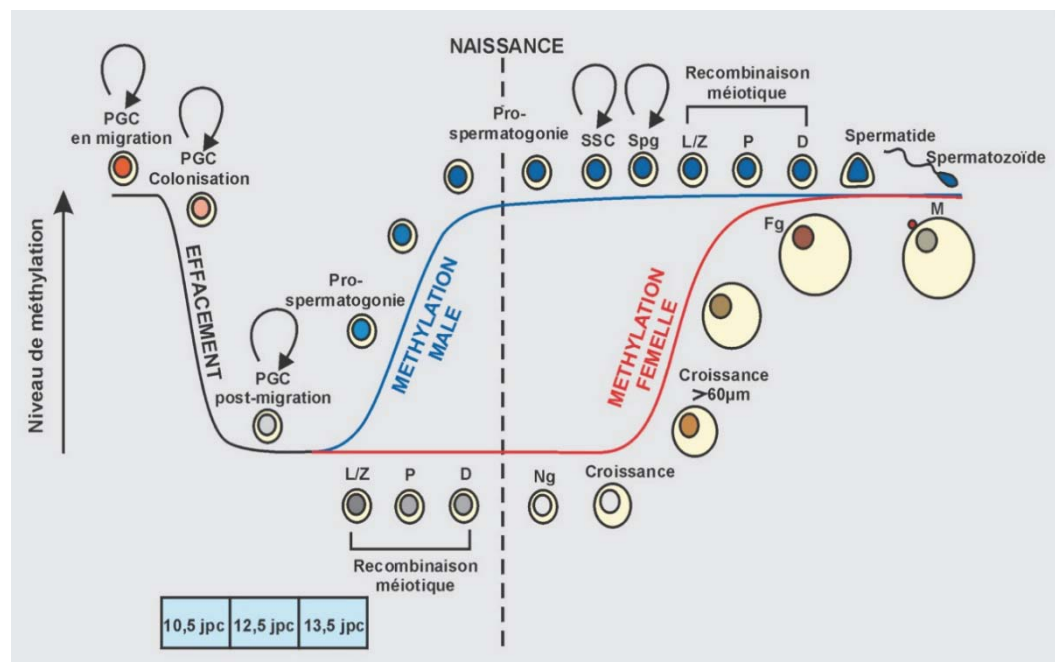
FIGURE 12

A



Le code des histones

B



Profils de méthylation

- A. Schématisation des modifications post-traductionnelles des histones :**
Un grand nombre de résidus arginines peuvent être méthylés (R). Les résidus lysines (K) peuvent être acétylés, ubiquitinés ou méthylés. Les résidus serines (S) peuvent être phosphorylés. (D'après Zamudio *et al.* 2008)
- B. Profils de méthylation ;** SSC : cellules souches des spermatogonies ; L/z : leptotène/zygotène ; P : pachytène ; D : diplotène ; Spg : spermatogonie ; Fg : ovocyte mûr ; Ng : ovocyte quiescent ; M : ovocyte en métaphase II de la méiose, après ovulation (d'après Bourc'his et Proudhon, 2008)

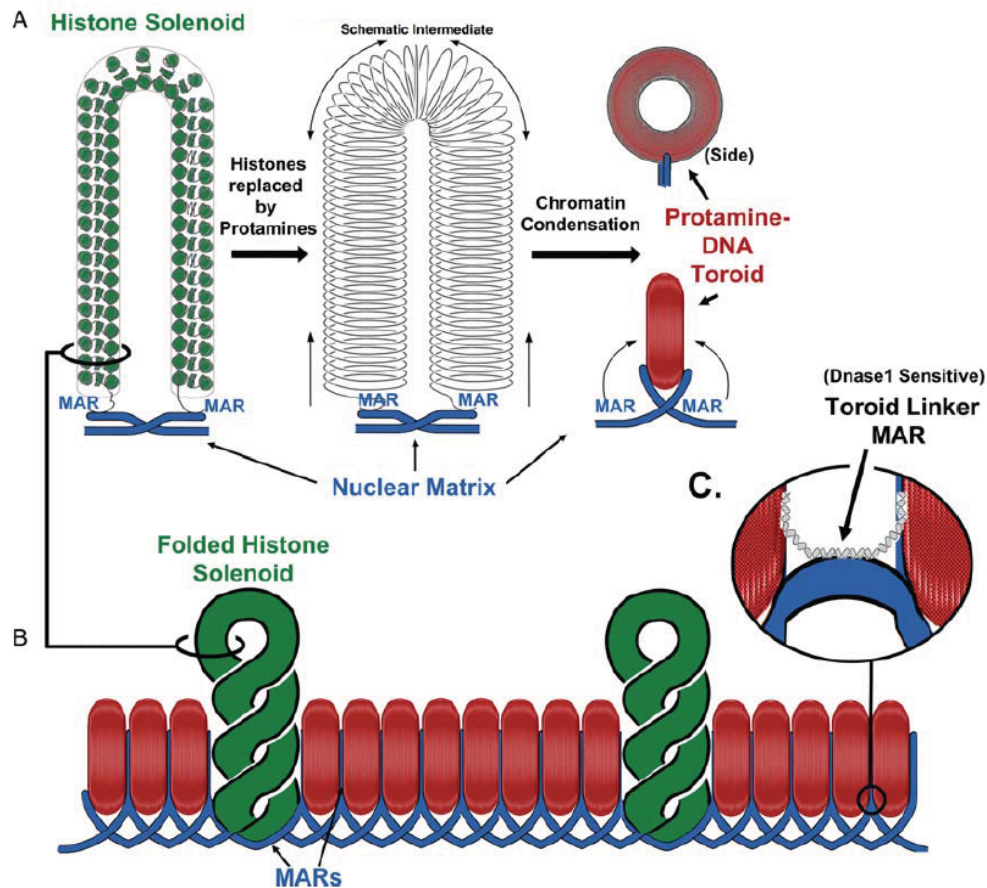
phosphorylation ; Figure 12A). La méthylation est assurée par la famille enzymatique des ADN méthyl-transférases (DNMT). Les gènes soumis à l’empreinte sont souvent organisés en cluster, soit un ensemble de gènes, dont la transcription est soumise à l’état de méthylation d’une voire deux régions différenciellement méthylées (DMR ou *differentially-methylated region*) selon leur origine parentale. Cette méthylation est à l’origine du recrutement ou de la répulsion de différents facteurs modifiant les histones et isolant les gènes de régions régulatrices.

b. Epigénome du spermatozoïde

Les DMR conservent leur empreinte parentale même après la fécondation lorsque les génomes d’origine paternelle et maternelle sont presque totalement déméthylés pour assurer la totipotence des cellules embryonnaires. Après fécondation on assiste à un phénomène de reprogrammation des génomes gamétiques. L’ADN du génome paternel est rapidement déméthylé après fécondation, alors que celui du génome maternel reste méthylé. Ceci permet l’acquisition de la pluripotence. Cette phase d’effacement permet aussi potentiellement de remettre à zéro dans la nouvelle lignée germinale toute anomalie de méthylation ou épimutation acquise, et empêche ainsi sa transmission à la génération suivante. Ensuite, pour acquérir leur lignage spécifique, l’ADN méthyltransférase 3 (Dnmt3) réalise une méthylation *de novo* de l’ADN des cellules embryonnaires (Schaefer *et al.*, 2007; Bourc’his and Proudhon, 2008 ; Figure 12B). Chez l’homme, l’expression du gène de détermination sexuelle *SRY* porté par le chromosome Y, déclenche la re-méthylation germinale en période fœtale. Les cibles identifiées de cette re-méthylation mâle sont les éléments transposables qui comptent pour la moitié du génome, et les gènes soumis à empreinte paternelle. Ces profils de méthylation mâle sont ensuite maintenus et perpétués dans la lignée germinale après la naissance, au cours de la méiose et jusqu’à la formation de spermatozoïdes matures.

Par ailleurs, en 2010, Ewen et Koopman rapportent, chez la souris, que les histones sont également impliquées dans ce phénomène d’effacement de l’empreinte parentale avec une perte de l’histone de liaison H1 et la déméthylation de H2AR3me et H4R3me, qui favorisent une décondensation de l’ADN (Ewen and Koopman, 2010). En fonction du génotype sexuel

FIGURE 13



Trois éléments structuraux majeurs de la chromatine spermatique

A. Au cours de la spermiogenèse, les histones sont remplacées par des protamines, condensant l'ADN en tores serrés. Chaque tore de protamine est un domaine en boucle (modifiée à partir d'une figure similaire publiée dans Ward, 1993).

B. Les tores de protamine peuvent être organisés en les empilant d'un côté à l'autre. Les histones persistants sont retrouvés dans les solénoïdes (vert). Il peut s'agir de domaines de boucles entiers qui ne sont pas condensés par les protamines.

C. Les brins d'ADN qui relient les tores de protamines sont sensibles aux nucléases et peuvent également être liés aux histones et attachés à la matrice nucléaire (bleu) par des régions MAR (*Matrice attachment region*).
(D'après Ward 2010)

des gonocytes, l'acquisition de la nouvelle empreinte parentale diffère. Chez l'homme, la méthylation *de novo* de l'ADN débute dès le stade embryonnaire, puis après la naissance jusqu'au stade pachytène de la méiose lors de la spermatogenèse, grâce à l'action enzymatique des Dnmt3 (La Salle and Trasler, 2006). La chromatine est donc un support d'information épigénétique par le biais des variants d'histones, le remplacement des histones par les protamines et des modifications post traductionnelles de ces histones. Ainsi le remodelage de la condensation de la chromatine peut être considéré comme un support de cette information épigénétique, avec la méthylation globale de l'ADN spermatique et la présence de petits ARN dans le sperme (Boissonnas *et al.*, 2013).

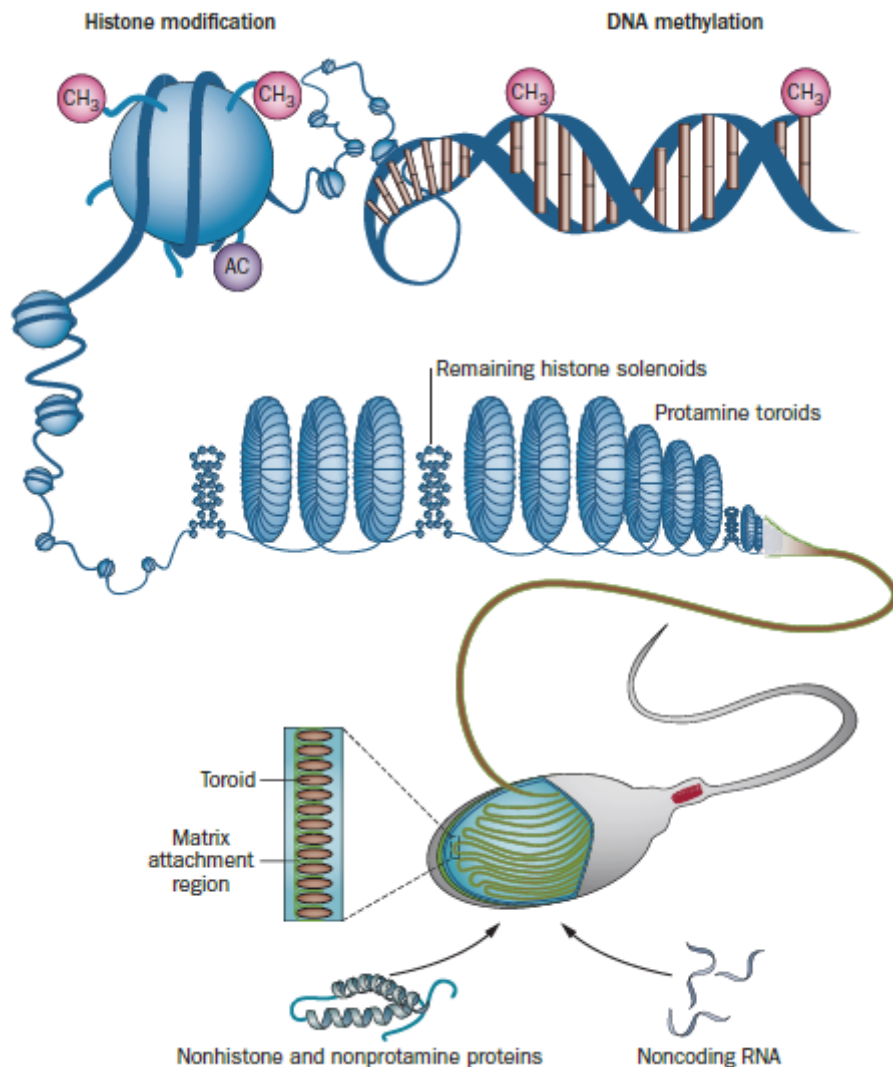
Près de 100 gènes sont soumis à l'empreinte épigénétique chez l'homme (Wilkins *et al.*, 2016). Ils ont été identifiés comme étant impliqués de manière préférentielle dans la croissance prénatale et le développement neurologique. Des mutations ou des épimutations dans des gènes « imprimés » ou dans des centres de contrôle d'empreinte sont associées à des troubles d'empreinte tels que le syndrome d'Angelman et le syndrome de Beckwith-Wiedemann (Benchabib *et al.*, 2005; Neelanjana and Sabaratnam, 2008; Vermeiden and Bernardus, 2013).

I.6. L'architecture nucléaire spermatique

Comme décrit précédemment, l'ADN spermatique est fortement compacté et donc peu accessible permettant ainsi la protection du matériel génétique et l'optimisation de la mobilité des gamètes dans le tractus génital féminin.

Des stratégies d'analyse globale de la chromatine spermatique (immunoprécipitation de la chromatine, puce à ADN et séquençage haut débit) ont permis de mettre en évidence des histones persistantes non distribuées au hasard, suggérant que le maintien de ces histones nucléaires ne soit pas le résultat de l'inefficacité de leur remplacement par les protamines. Ces régions du noyau spermatique plus riches en histones comportent en fait un mélange de nucléosomes et de nucléoprotamines. Ces régions sont réparties soit en courtes séquences dispersées dans le génome ; soit en larges régions de 10 à 100kb agencées en solénoïdes, possédant une conformation spatiale différente des tores de protamines (Hammoud *et al.*, 2010).

FIGURE 14



Remplacement des histones par les protamines et hypercompaction de la chromatine spermatique - Vue d'ensemble de l'épigénétique du sperme

Près de 85% des histones liés à l'ADN sont remplacées par des protamines pendant la spermiogenèse. Ainsi, la chromatine spermatique est enroulée en tores (constituée de nucléoprotamines) et en solénoïdes fixation à la matrice par des régions d'attachements et des nucléohistones. Bien que le sperme soit connu pour être une cellule transcriptionnellement inactive, les histones restantes sont très acétylées. Comme dans les cellules somatiques, l'ADN des spermatozoïdes est méthylé. Le sperme contient également protéines non histones, ARNm silencieux (dont la fonction n'est pas encore connue) et ARN non codants. AC : groupement acétyle ; CH³ : groupement méthyle. (D'après Schagdarsurengin et al., 2012)

Les histones sont majoritairement retrouvées au sein des promoteurs de gènes impliqués dans le développement embryonnaire précoce de l'embryon (facteurs de transcription, gènes impliqués dans les voies, ...) de séquences codantes pour des micros ARN, de gènes à empreinte ou de gènes participants à la spermatogenèse (Hammoud *et al.*, 2009).

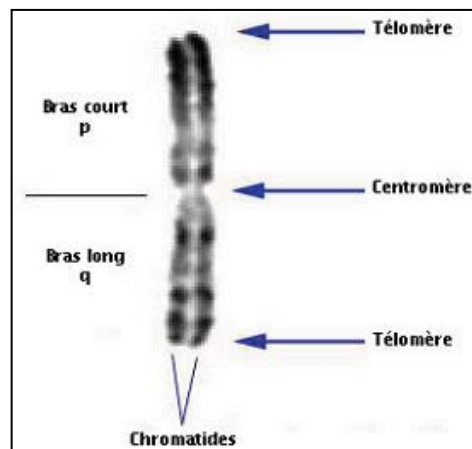
Les zones denses des territoires chromosomiques sont en forme d'épingle à cheveux. Les télomères des deux bras des chromosomes s'associent en dimères à la périphérie du noyau spermatique. Il semble que les chromosomes riches en gènes soient situés vers l'apex du noyau et que les chromosomes pauvres en gènes soient plutôt localisés vers la base du noyau (Mudrak *et al.*, 2012 ; Figure 13).

Enfin, les chromosomes ne sont pas positionnés au hasard les uns par rapport aux autres. Il semblerait que, quel que soit le chromosome étudié, qu'il soit sexuel ou autosome, la position relative du chromosome dans le noyau spermatique resterait la même d'un spermatozoïde à l'autre. L'équipe de Millan *et al.*, en 2012 a établi une position relative des centromères le long de l'axe antéro-postérieur du noyau spermatique notamment pour les chromosomes 17, 1, X, 19 et Y. L'organisation des chromosomes dans le noyau s'effectuerait lors de la méiose.

Comme dans les cellules somatiques, l'ADN des spermatozoïdes est méthylé. Le spermatozoïde contient également un pool d'ARNm, pas ou peu traduits, et de petits ARN non codants comme les miARN et les PIWI (Romero *et al.*, 2012; Sandler *et al.*, 2013). Néanmoins, des expériences d'incorporation d'uridine radiomarquée n'ont pas démontré d'activité transcriptionnelle dans le spermatozoïde éjaculé (Grunewald *et al.*, 2005). Toutefois, ces affirmations sont peu à peu remises en cause car la protéomique a permis de mettre en évidence la présence de protéines ribosomales (de Mateo *et al.*, 2011). Ces données récentes supposent la possibilité d'une activité traductionnelle probablement restreinte dans le spermatozoïde (Schagdarsurengin *et al.*, 2012 ; Figure 14).

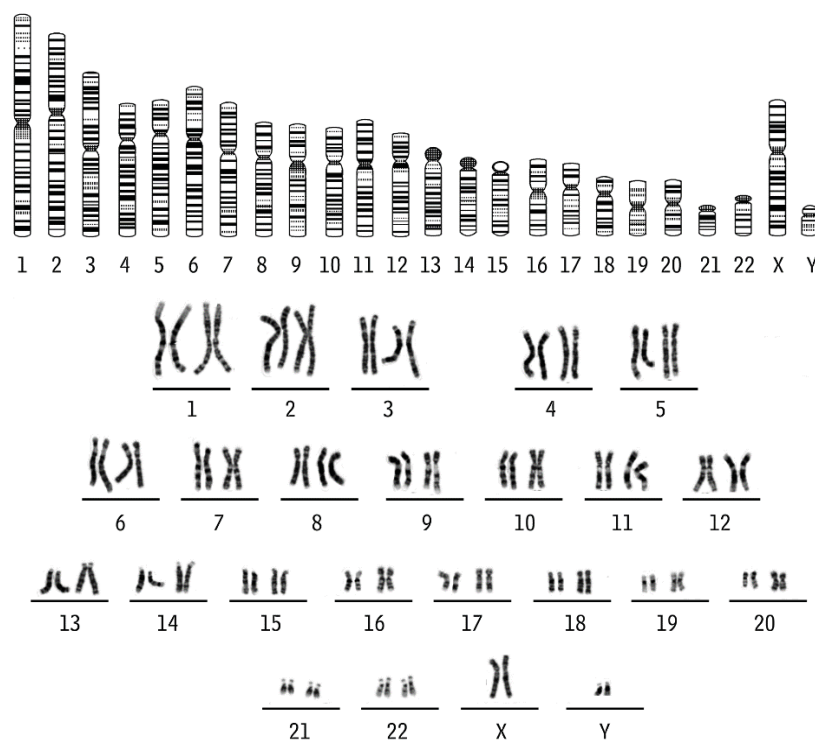
FIGURE 15

A



Morphologie des chromosomes en microscopie optique

B



Le caryotype humain

A. Morphologie des chromosomes en microscopie optique

La constriction centromérique est un repère qui permet de séparer le chromosome en deux régions principales : un bras court (au-dessus du centromère) et un bras long (en-dessous). Les extrémités chromosomiques sont des régions possédant une architecture particulière sur le plan moléculaire appelés télomères (Atlas de genetic).

B. Représentation d'un caryotype humain (Extrait de Immunohématologie,5)

II. Les altérations du noyau spermatique

Je vais m'intéresser ici tout particulièrement aux dommages du noyau spermatique qui peuvent être d'origine chromosomique, chromatinienne ou de l'ADN en lien avec l'infertilité masculine.

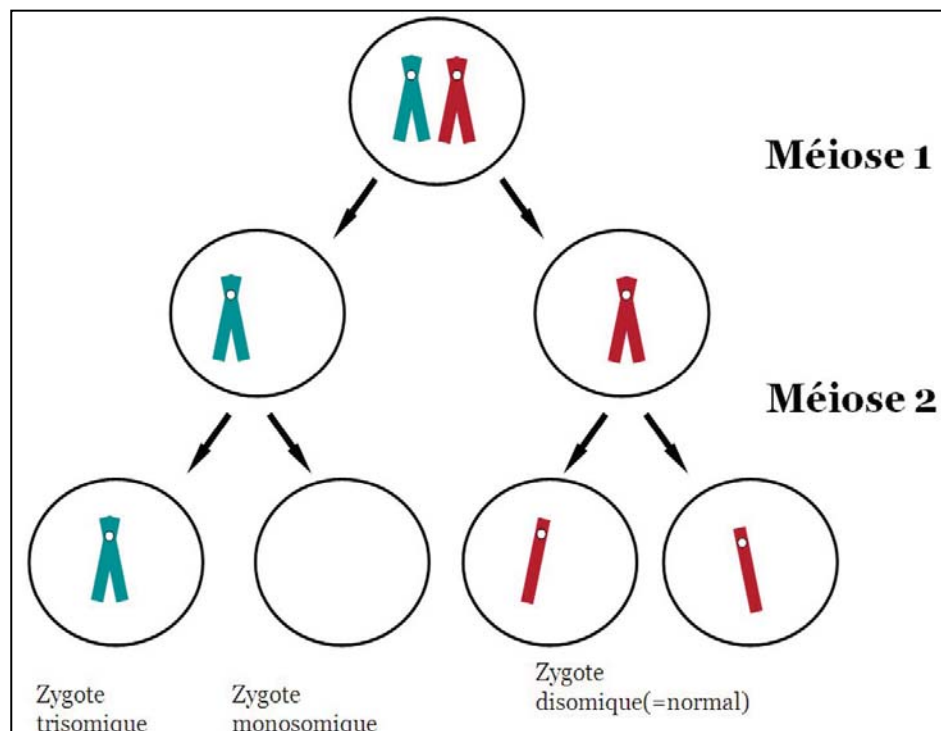
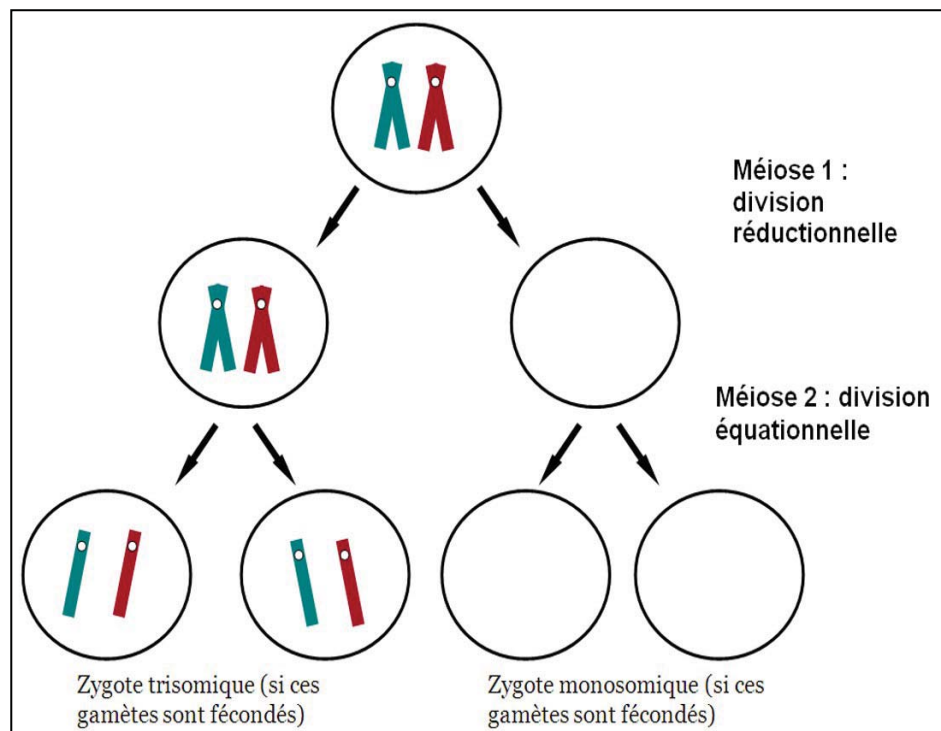
II.1. Les atteintes chromosomiques

La relation entre anomalies chromosomiques et infertilité a été suggérée dès les années 1950. Elles sont objectivables par la réalisation d'un caryotype sanguin, examen simple de première intention, permettant la classification des chromosomes en fonction de leur taille par la coloration au giemsa, donnant ainsi deux types de bandes. Les bandes « G » (sombres) mettant en évidence des séquences riches en AT se distinguant des bandes R (claires) riches en GC (Figure 15A et B). Très tôt, une corrélation a été notée entre le nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat et la présence d'anomalies chromosomiques. D'autres auteurs ont rapporté que les translocations chromosomique (cassure d'un segment de chromosome transféré sur un chromosome non homologue) pouvaient être associées à une altération de la spermatogenèse (Plymate *et al.*, 1976). En cytogénétique postnatale, le caryotype constitutionnel a montré une incidence 10 à 15 fois plus élevée d'anomalies chromosomiques chez les hommes infertiles que dans la population générale (Van Assche *et al.*, 1996). En cas d'oligozoospermie inférieure à 10 millions de spermatozoïdes/ml, le taux des anomalies chromosomiques est estimé à 5-7%. Ce taux atteint près de 20% chez les hommes présentant une azoospermie sécrétoire non obstructive (Antonelli *et al.*, 2000). L'étude cytogénétique moléculaire par FISH sur spermatozoïdes permet d'évaluer le taux de gamètes déséquilibrés, de réaliser un conseil génétique adéquat et de proposer une prise en charge optimale aux hommes infertiles porteurs d'anomalies chromosomiques.

a. Les anomalies de nombre de chromosomes

L'aneuploïdie caractérise une cellule qui ne possède pas le nombre normal de chromosome. Les aneuploïdies résultent d'une mauvaise ségrégation des chromosomes au cours de la division cellulaire conduisant aux risques de zygote trisomique ou monosomique après

FIGURE 16



Anomalie du nombre de chromosome : Non disjonction en méiose 1 et en méiose 2

(Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale ; Damien Sanlaville, Catherine Turleau 2010-2011)

fécondation. Ces mauvaises ségrégations méiotiques sont habituellement accidentelles, mais elles sont favorisées par l'accroissement de l'âge maternel et par l'existence de certains remaniements chromosomiques chez l'un des parents (Cimadomo *et al.*, 2018). Cette non-disjonction peut se produire entre deux chromosomes homologues lors de la première division de méiose maternelle ou paternelle ou bien entre deux chromatides sœurs, lors de la deuxième division de méiose (Figure 16). Les taux d'aneuploïdies spermatiques restent cependant bien inférieurs à ceux observés lors de l'ovogenèse.

Chez l'homme, le taux d'aneuploïdie varie selon les études chez les patients infertiles de 33 à 74% contre 4 à 8% chez des patients témoins fertiles et normozoospermiques. Les patients à caryotype normal et présentant une altération de la spermatogenèse sont connus pour être des patients à risque augmenté d'aneuploïde fœtale (Hens *et al.*, 1988; Pellestor, 1991). De plus, un taux supérieur d'aneuploïdie a été rapporté chez un patient avec des gamètes macrocéphales (Viville *et al.*, 2000). En 2006, Sun *et al.* ont montré que les taux d'aneuploïdies sont augmentés dans les gamètes avec des flagelles anormaux (Sun *et al.*, 2006).

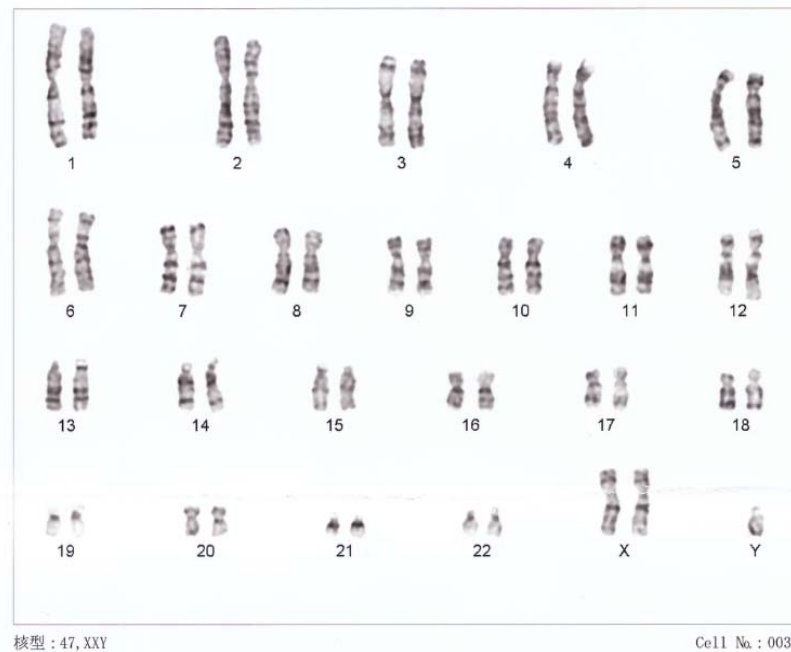
Les anomalies du nombre de gonosomes sont les plus fréquentes et diverses. En 1959, (Jacobs and Strong, 1959) associent, une dysgénésie gonadique, une gynécomastie et la présence de petits testicules au caryotype 47,XXY (syndrome de Klinefelter). Les caryotypes 47,XXY (mosaïque ou homogène) sont 44 fois plus fréquents chez les hommes infertiles (De Braekeleer and Dao, 1991). De plus, la fréquence des caryotypes 47,XYY dans la population des hommes infertiles semble peu différente de celle de la population générale (Figure 17A).

b. Les anomalies chromosomiques constitutionnelles de structure

Elles sont la conséquence d'un réarrangement du matériel chromosomique. Si le réarrangement ne s'accompagne ni de perte ni de gain de matériel génétique, il est dit équilibré et n'a habituellement pas de traduction clinique. Dans le cas contraire, on parle d'anomalie déséquilibrée, qui s'accompagne le plus souvent de manifestations cliniques d'autant plus marquées que le déséquilibre est important. Classiquement on distingue trois grands types de remaniements chromosomiques : les translocations réciproques, les

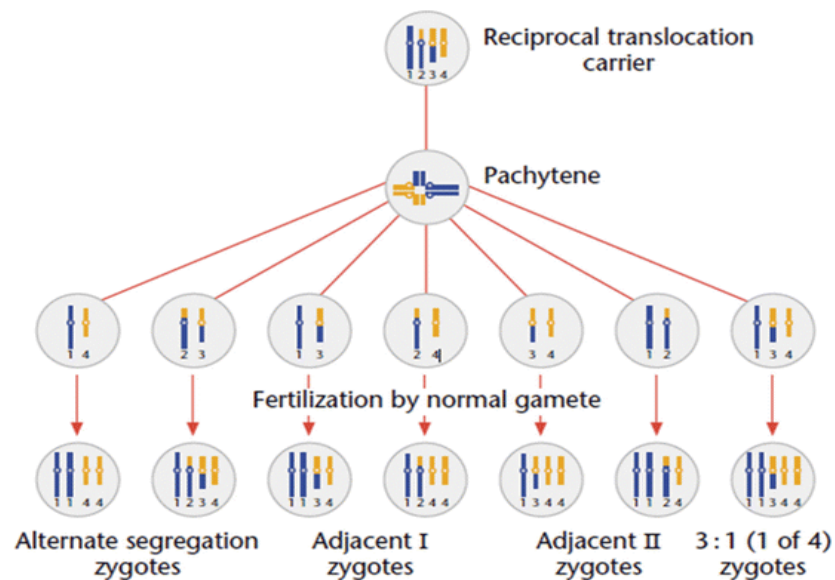
FIGURE 17

A



Le syndrome de Klinefelter

B



Les translocations réciproques

A. Caryotype d'un syndrome de Klinefelter ; (Nami-ja ; 2009)

B. Anomalies chromosomiques constitutionnelles de structure : Les translocations réciproques ; (D'après Shakoori AR, Aftab S and Al-Ghanim K, 2017).

translocations Robertsoniennes, les inversions péri ou paracentromériques. L'analyse de la ségrégation méiotique par FISH sur spermatozoïdes des sujets porteurs de ces types de translocations est d'un grand intérêt pour comprendre les mécanismes de la transmission des translocations et pour le conseil génétique. Elle permet aussi de rechercher un effet interchromosomique éventuel (Lohmann *et al.*, 2000). De plus, la présence d'une translocation Robertsonienne ou réciproque peut altérer la spermatogenèse au stade pachytène de la méiose en fonction du type de la translocation.

- **Les translocations réciproques**

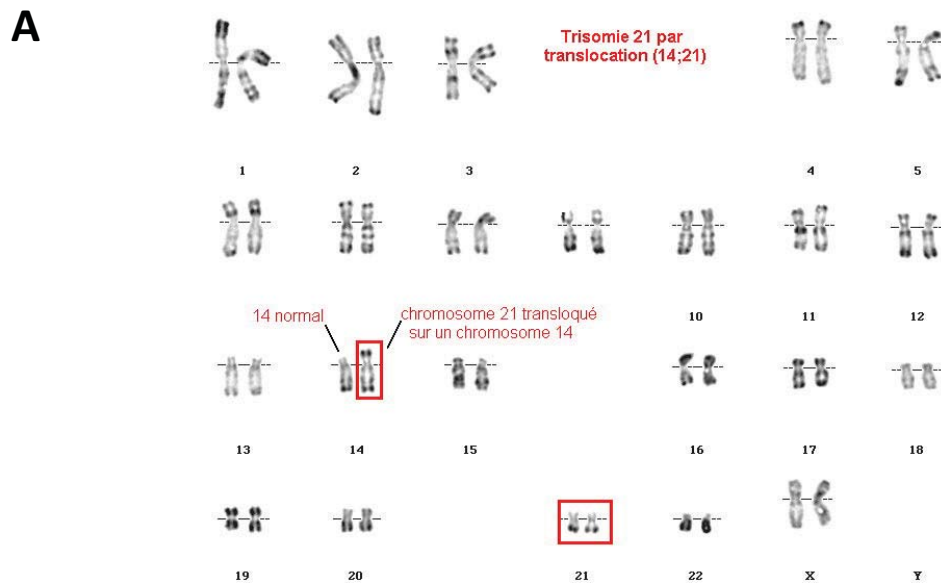
Une translocation réciproque est un échange de fragments de chromosome entre deux chromosomes non homologues. Les patients porteurs de ces translocations n'ont pas de phénotype particulier en dehors de trouble de la fertilité. Ces translocations sont souvent équilibrées, car la totalité de l'information génétique est bien présente mais les problèmes surgissent lors de la formation des gamètes. Les chromosomes impliqués ne peuvent pas s'apparier normalement. Il se forme ainsi une structure « en croix » lors de la métaphase de la méiose, permettant l'appariement des chromosomes homologues. Lors de la ségrégation différentes possibilités peuvent exister générant la formation de gamètes normaux ou équilibrés ou de gamètes déséquilibrés. Il existe 3 grands types de ségrégation, alterne, adjacente ou 3:1 (Figure 17B). Le risque de déséquilibre dans la descendance de la translocation équilibrée varie d'une translocation à l'autre, d'une famille à l'autre. Différentes approches méthodologiques ont été développées pour estimer ce risque pour une translocation réciproque déterminée prenant en compte les chromosomes impliqués, les points de cassure, la longueur des segments transloqués, le sexe du parent porteur du remaniement.

En règle générale, les hommes porteurs de translocation réciproque produisent plus de spermatozoïdes déséquilibrés que de spermatozoïdes normaux ou équilibrés, porteurs de la translocation, avec des fréquences variant entre 23 à 81% (Bhat and Wani, 2017).

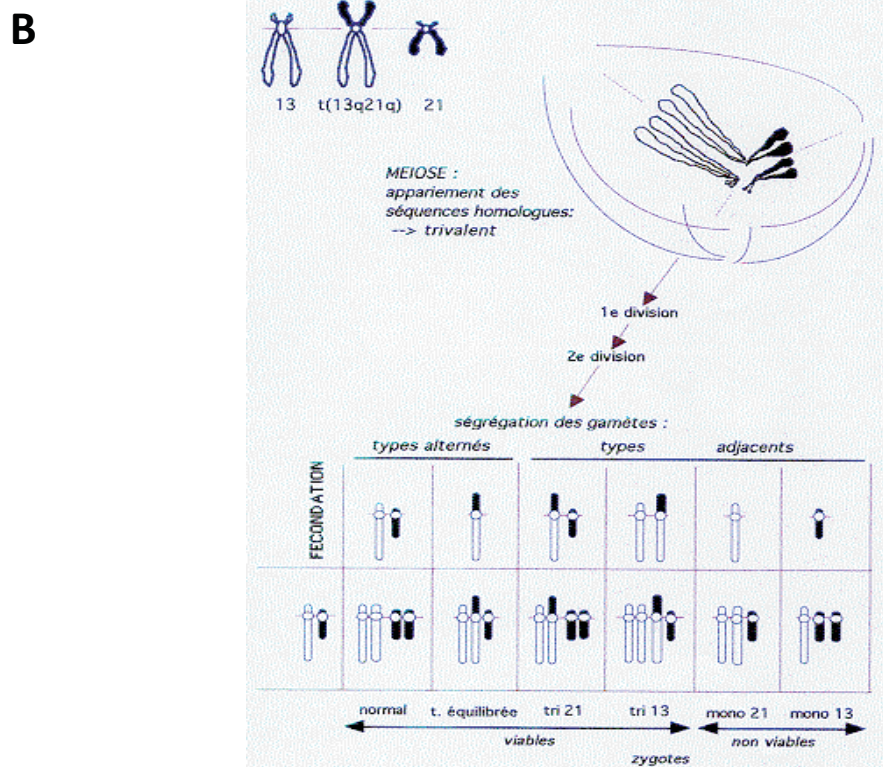
- **Les translocations robertsoniennes**

Ces translocations sont les plus fréquentes dans la population générale (2/1000). Elles sont dues à un processus de fusion centromérique entre chromosomes acrocentriques (13, 14,

FIGURE 18



Trisomie par translocation sur le chromosome 14



Les translocations Robertsoniennes

A. Caryotype d'un individu masculin trisomique par translocation sur le chromosome 14 ; (Leleux C et Descours V, 2014-2015).

B. Les translocations Robertsoniennes : Transmission à la descendance (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, Huret JL, 2004).

15, 21, 22). Les patients porteurs de translocations Robertsoniennes ont un caryotype à 45 chromosomes. Ces anomalies de structure chromosomiques sont principalement retrouvées chez des patients infertiles porteurs de translocations rob(13 ;14) et rob(14 ;21), représenté Figure 18 A (Roux *et al.*, 2005; Ogur *et al.*, 2006). Ainsi, l'équipe de Ferfour *et al.*, en 2011 a mis en évidence que le taux d'aneuploïdie des spermatozoïdes des patients porteurs de translocation robertsoniennes était plus élevé en cas d'oligozoospermie (18 %) *versus* les patients normozoospermiques (9,7 %). Les patients porteurs de ce type de translocations équilibrées présentent donc un morphotype normal en dehors d'une altération des caractéristiques spermatiques. L'altération du spermogramme peut s'expliquer par l'interaction entre le trivalent des chromosomes impliqués dans la translocation avec la vésicule sexuelle entraînant une altération du processus de la spermatogenèse (Figure 18 B). En effet, au moment de la méiose, la ségrégation des chromosomes peut être variable et entraîner un pourcentage différent de gamètes déséquilibrés pour les chromosomes impliqués dans la translocation. Cette variabilité, fonction du type de translocation Robertsonienne, est essentielle à prendre en considération en cas de fécondation de l'ovocyte. Le spermatozoïde présentant un déséquilibre chromosomique peut aboutir à l'obtention d'un embryon aneuploïde expliquant des échecs de développement embryonnaire précoce, des échecs d'implantation, des fausses couches ou des malformations congénitales à la naissance (Perrin *et al.*, 2010).

- **Les inversions péri- ou para-centriques**

Il existe deux types d'inversions selon la localisation des points de cassures. Les péricentriques sont de part et d'autre du centromère et les paracentriques, se situent sur un même bras chromosomique. Les études réalisées sur le sperme de porteurs d'inversions péricentriques font apparaître une grande hétérogénéité dans les pourcentages de déséquilibres méiotiques (de 0 à 37%). Il semblerait cependant que l'incidence de spermatozoïdes déséquilibrés soit liée à la proportion du segment inverse et de sa taille. Ainsi, le risque devient important si le segment représente plus de 50% de la taille du chromosome et s'il fait plus de 100 Mb (Anton *et al.*, 2005; Morel *et al.*, 2007). Une étude empirique (Winsor *et al.*, 1978) rapporte qu'un minimum de 30% d'hétérochromatine doit être impliqué dans l'inversion pour produire un chromosome recombinant.

L'inversion péri-centrique la plus souvent retrouvée dans le caryotype humain est l'inversion péri-centrique de la région hétérochromatique du chromosome 9, inv(9) (p11q13) ou bien inv(9) (p12q13). Cette inversion est retrouvée dans la population générale dans 1 à 3% des cas et est souvent considérée comme variant caryotypique normal (polymorphisme) (Dana and Stoian, 2012). Cependant, plusieurs rapports controversés ont établi un lien entre cette inversion chromosomique et des anomalies cliniques telles qu'une hypofertilité (Mozdarani *et al.*, 2007; Miskovic *et al.*, 2012), des fausses couches multiples ainsi que des anomalies congénitales variées découvertes en période post-natale (Jeong *et al.*, 2010).

c. Cas particuliers du chromosome Y

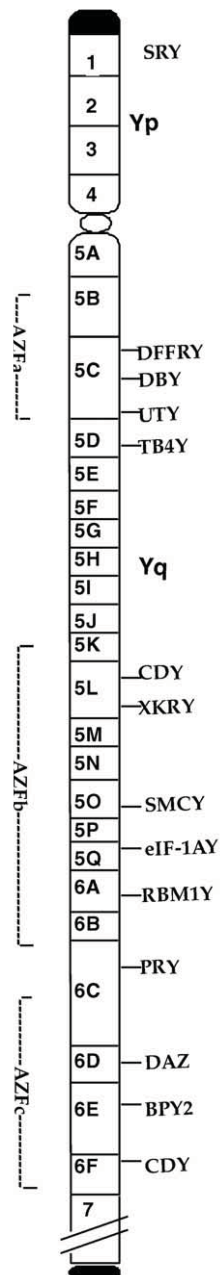
- **SRY**

L'établissement du sexe gonadique est sous contrôle génétique et dépend de la présence de SRY ou Sex-determining region Y. Chez l'homme le gène SRY, situé sur le bras court (p) du chromosome Y est nécessaire pour la différenciation de la gonade en testicule. Le facteur SRY est une protéine de liaison à l'ADN membre de la famille des SRY-like box (SOX). Son expression, dès six semaines de vie fœtale, provoque la différenciation des cellules de Sertoli qui vont former les cordons testiculaires primaires en encapsulant les cellules germinales (Woodward and Neilson, 2013). Ces cellules de Sertoli vont produire l'hormone antimüllérienne, permettant la différenciation des cellules de Leydig et inhibant ainsi le développement de la gonade en ovaire. Des recombinaisons atypiques au cours de crossing-over lors du développement du spermatozoïde peuvent entraîner un caryotype qui ne correspond pas à l'expression phénotypique (McElreavey *et al.*, 1993). Ainsi des anomalies du déterminant sexuel ont été identifiées grâce à l'étude de patients dont le sexe gonadique était en contradiction avec le sexe chromosomique. Par exemple, le syndrome de Swyer correspond à une dysgénésie gonadique complète à caryotype 46,XY avec un phénotype féminin du fait du transfert de SRY sur le chromosome X non transmis. Inversement en cas de transmission de ce chromosome X avec SRY, le phénotype masculin est caractérisé par un caryotype XX (Massanyi *et al.*, 2013).

- **Les microdélétions du chromosome Y**

Tiepolo and Zuffardi, en 1976, ont été les premiers à avoir suggéré une corrélation entre la région AZF (AZoospermia Factor) présente sur le chromosome Y et la spermatogenèse. Le

FIGURE 19



Infertilité masculine et les microdélétions du chromosome Y

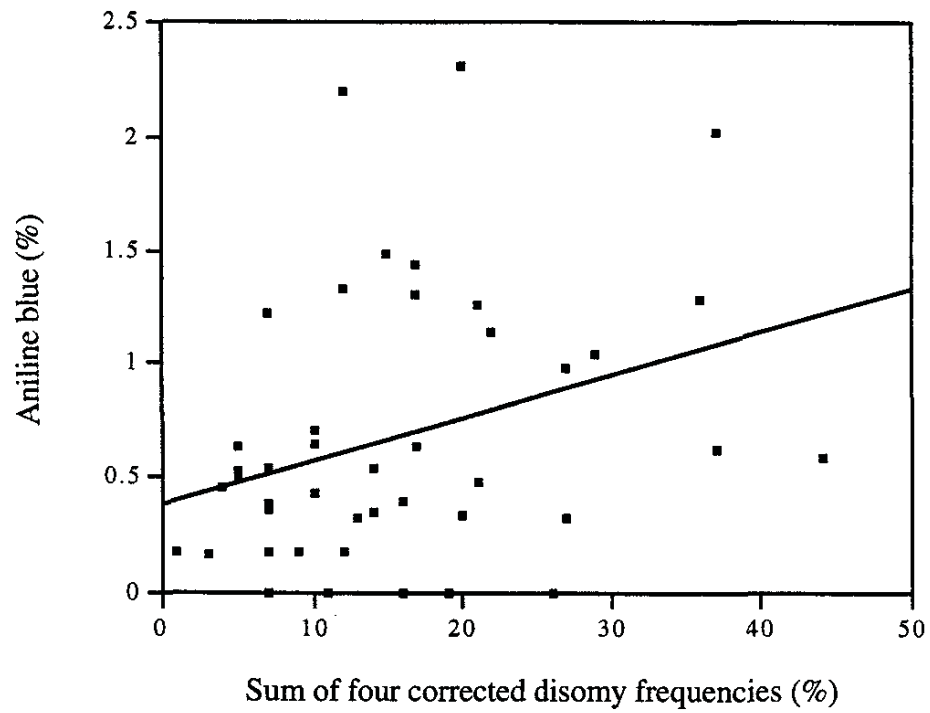
Représentation schématique du chromosome Y montrant les trois régions AZF : AZFa, AZFb et AZFc et les gènes localisés dans chacune d'elles (K. McElreavey *et al.* 2002).

recours à la biologie moléculaire a permis de déceler une microdélétion d'une partie de la région AZF chez plus de 15% des hommes ayant à la fois des perturbations importantes de la spermatogenèse et moins de 5 millions/mL de spermatozoïdes (Foresta *et al.*, 2001a, 2001b). La prévalence des microdélétions du chromosome Y chez les hommes infertiles est estimée à 7,5 % (Colaco and Modi, 2018). Cela concernerait environ 10% des patients avec une azoospermie non obstructive et 6% des patients avec une oligozoospermie sévère. Aucune microdélétion n'a été mise en évidence chez les normozoospermes (Kent-First *et al.*, 1996). Il existe 3 loci AZF différents (respectivement dénommé AZFa, AZFb et AZFc) sur le bras long du chromosome Y. Les délétions du locus AZFa sont moins fréquentes (1 à 5%) et associées à un phénotype histologique de « SCSO type 1 = *Syndrome de Cellule de Sertoli Only type1* » avec une absence de cellules germinales. La délétion du locus AZFb est associée à un blocage de la spermatogenèse au niveau spermatocyte (SGA : *SpermatoGenic Arrest*). La délétion AZFc est associée à divers phénotypes, allant de l'azoospermie avec présence de quelques cellules germinales (SCSO type 2 = *Syndrome de Cellule de Sertoli Only type 2*) à l'oligozoospermie. Cette corrélation génotype/phénotype existe seulement dans les cas où la délétion enlève entièrement la région c'est-à-dire lorsque la délétion est « complète ». Les délétions AZFc et AZFc+b sont les plus fréquemment retrouvées associées à des phénotypes variés (McElreavey *et al.*, 2002 ; Figure 19). La très grande majorité des délétions correspond à des mutations *de novo*, probablement due à une anomalie de la méiose. Cependant, on ne peut exclure que ces délétions aient lieu au stade très précoce de l'embryogenèse chez le fœtus. Les patients infertiles affectés transmettent obligatoirement ce défaut génétique à leur enfant de sexe masculin. Différentes équipes ont récemment suggéré que certaines fausses couches à répétition pourraient être corrélées à la présence de microdélétions du chromosome Y (Dewan *et al.*, 2006; Karaer *et al.*, 2008).

II.2. Atteintes de la chromatine et de l' ADN spermatique

Il est maintenant admis que les dommages au noyau spermatique concernant la chromatine et/ou l'ADN peuvent être présents de manière indépendante ou associées. Dans ce travail, je me suis tout particulièrement focalisée sur les atteintes chromatinienne et de l'ADN les plus fréquemment retrouvées en cas d'infertilité masculine chez l'homme, à savoir les anomalies

FIGURE 20



Régression linéaire de la fréquence des disomies de quatre paires testées
(6,7,15,16) par rapport à la maturité nucléaire
mesurée par la coloration au bleu d'aniline
(Morel F *et al.* 1998)

de condensation de la chromatine, la fragmentation, la méthylation et l'oxydation de l'ADN spermatique.

a. Anomalie de la condensation chromatinienne

L'altération du compactage de la chromatine spermatique concerne la structure tertiaire de l'ADN. L'ADN spermatique peut être décondensé, soit parce qu'il est pauvre en protamine, signe d'une immaturité nucléaire testiculaire, soit parce que la compaction de cette chromatine est moindre, signe d'une maturation post-testiculaire anormale ; ou les deux.

Une chromatine hautement condensée au cours de la spermatogenèse est essentielle pour la fonction du génome paternel des spermatozoïdes (Agarwal and Said, 2003). Ainsi, une chromatine anormalement condensée peut être associée à une spermatogenèse altérée (Hammadeh *et al.*, 1998; Erenpreiss *et al.*, 2006). Le pourcentage de spermatozoïdes présentant une décondensation de l'ADN est corrélé positivement à la tératozoospermie (Franken *et al.*, 1999). Ainsi, 30% de la population totale des spermatozoïdes avant et après sélection sur gradient de densité présenteraient une décondensation anormale de l'ADN chez des patients infertiles avec une tératozoospermie sur leur spermogramme (Perdrix *et al.*, 2011). Toutefois, cette association n'est pas stricte et des patients ne présentant pas de tératozoospermie peuvent avoir des spermatozoïdes dont l'ADN est fortement décondensé. L'immaturité nucléaire du noyau spermatique est connue depuis longtemps pour interférer avec les taux de fécondation en FIV (Jeulin *et al.*, 1986). Certains auteurs rapportent même une corrélation positive entre une décondensation anormale de la chromatine des spermatozoïdes et la présence de disomies 8, 15, 18, X ou Y (Morel *et al.*, 1998 ; Figure 20). Lorsque ces patients à décondensation nucléaire spermatique élevée sont pris en charge en ICSI, un faible taux de fécondation (Sakkas *et al.*, 1996, 1998) et des défauts de développement embryonnaire (Hammadeh *et al.*, 1996) peuvent être observés.

Un des marqueurs les plus répandu pour mesurer un défaut de compaction ou la décondensation de l'ADN est la Chromomycine A 3 (CMA3). La CMA3 se fixe sur les séquences riches en Guanosine-Cytosine, accessibles lors d'un déficit de protamination (Talebi *et al.*, 2008). Ainsi la fluorescence du noyau des spermatozoïdes marqués par la CMA3 permet de visualiser indirectement un déficit en protamination ou une dénaturation de l'ADN spermatique. La littérature s'accorde sur l'existence d'un seuil de pathogénicité au-

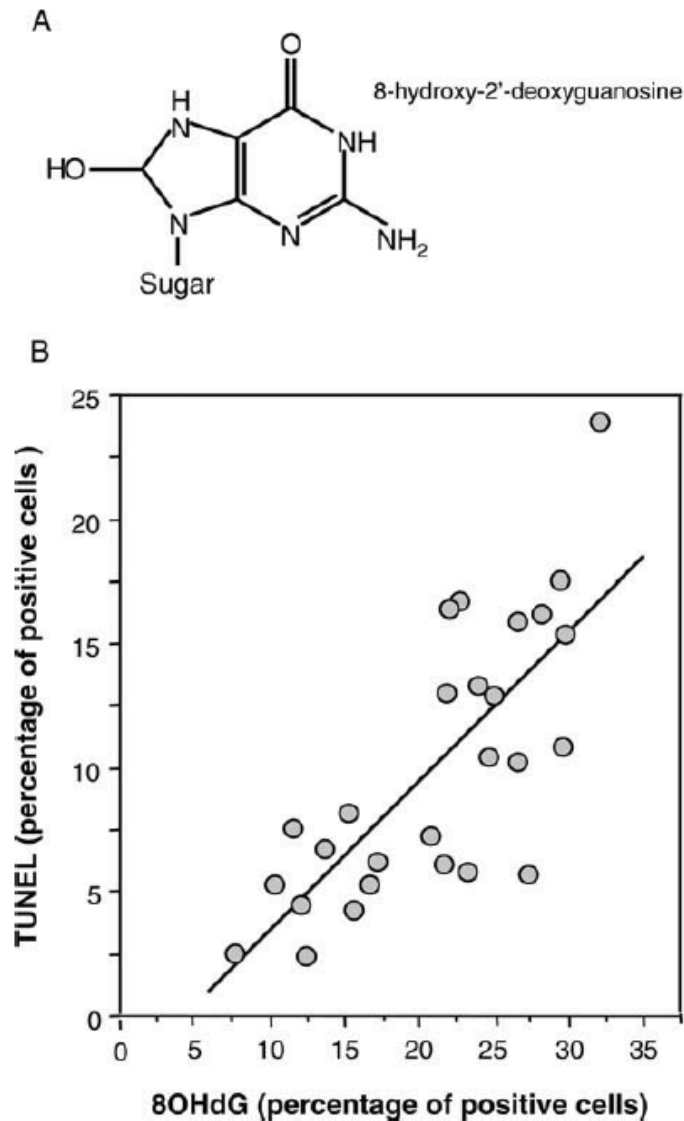
delà de 30% de spermatozoïdes dont l'ADN est marqué en cas d'infertilité (Sakkas *et al.*, 1996, 1998). Nijs *et al.*, en 2009, suggèrent que des tests de la fonction spermatique basés sur la réactivité au CMA3 sont prédictifs des résultats de l'AMP.

Le test de coloration au bleu d'aniline acidifié permet aussi d'évaluer le degré de condensation de la chromatine, et par extension, la maturité nucléaire. Cette technique est fondée sur le fait que le bleu d'aniline colore la chromatine des spermatides rondes. La coloration se fixe sélectivement sur les nucléoprotéines riches en lysines contenues en abondance dans les histones et les protéines de transition (Terquem A., Dadoune JP, 1983; Iranpour *et al.*, 2000). Les protamines, riches en arginines et en cystéines, ne sont pas colorées. Par conséquent, seuls les spermatozoïdes présentant un défaut de protamination et/ou de condensation (immatures car n'ayant pas échangé la majorité de leurs histones contre des protamines lors de la spermiogenèse) sont colorés. C'est une technique de coloration simple, ne nécessitant pas d'équipement spécifique (Roux *et al.*, 2004).

b. La fragmentation

La présence de cassures d'ADN dans le spermatozoïde humain est aussi un indicateur d'une maturation imparfaite de la chromatine lors de la spermatogenèse. De nombreuses études mettent en évidence un lien entre fragmentation de l'ADN spermatique et infertilité (Sakkas *et al.*, 2003; Brugnion *et al.*, 2006; Rex *et al.*, 2017). Plusieurs phénomènes lors de la spermatogenèse peuvent être à l'origine d'un niveau de fragmentation anormale du noyau paternel. Les cassures chromosomiques non réparées qui accompagnent le brassage méiotique peuvent être en cause, de même qu'une mauvaise évacuation de cellules germinales apoptotiques et/ou un niveau de cassures mécaniques (shearing) trop important lors du remplacement des histones par les protamines en spermiogenèse peuvent être à l'origine d'un niveau de fragmentation élevé des noyaux de spermatozoïdes. En outre, l'inflammation, quelle que soit son origine (génétique, infectieuse, environnementale) et le stress oxydant associé peut être aussi à l'origine d'une fragmentation nucléaire spermatique accrue. A l'heure actuelle, l'hypothèse d'une origine multiple de la fragmentation de l'ADN est retenue. Les mécanismes retenus sont notamment l'apoptose lors de la spermatogenèse, l'oxydation et l'altération de la compaction de l'ADN (Muratori *et al.*, 2006).

FIGURE 21



Fragmentation et oxydation de l'ADN dans les cellules germinales

(A) 8-OH,20-deoxyguanosine (8OHdG) : marqueur de l'oxydation de l'ADN spermatique.

(B) La fragmentation de l'ADN spermatique : test TUNEL

On observe une forte corrélation entre les pourcentages de 8-OHdG et la fragmentation spermatique (Résultats en pourcentage de spermatozoides positifs par cytométrie en flux, $R \approx 0.756$, $P = 0.001$) (D'après Aitken RJ and De Iuliis GN, 2009).

Des données suggèrent que l'ADN spermatique fragmenté est pauvre en protamine (ou montre un ratio P1/P2 altéré) et présente des signes d'immaturité nucléaire via une altération de la compaction de l'ADN spermatique (Muratori *et al.*, 2000; Torregrosa *et al.*, 2006). En effet, au cours de la spermatogenèse l'ADN spermatique subit des cassures contrôlées induites par l'activité de la topoisomérase II β ou TopoII β (Wang, 2002). Les topoisomérases sont des protéines appartenant à la matrice nucléaire intervenant dans la réplication, la transcription, la condensation ou la décondensation de la chromatine. Ces cassures sont reconnues par des poly(ADP) ribose polymérases ou PARP (PARP1 et 2) qui permettent la coordination de la décondensation de l'ADN et facilitent le remplacement des histones (Meyer-Ficca *et al.*, 2009, 2011). L'équipe de Redon *et al.*, en 2002, a mis en évidence un variant de l'histone H2A, spécifique des cassures de l'ADN, γ H2A.X. Ainsi, dans les spermatocytes, le variant γ H2A.X est mis en place pour permettre la réparation des cassures doubles brins de l'ADN après le remplacement des histones (Blanco-Rodríguez, 2009).

La fragmentation peut aussi être induite par des attaques radicalaires engendrées tout particulièrement par le stress oxydant post-testiculaire (Aitken *et al.*, 2012). En effet, une corrélation positive entre la fragmentation de l'ADN et la production de ERO existe (Barroso *et al.*, 2000) notamment avec le métabolite principal de la dégradation de l'ADN par le stress oxydant, la desoxyguanosine oxydée ou 8-OHdG (Aitken *et al.*, 2009 ; Figure 21). A noter que la fragmentation du noyau spermatique impliquant les ERO peut aussi survenir après l'éjaculation (Muratori *et al.*, 2003) mettant en exergue l'impact que peuvent avoir à la fois le tractus génital féminin en reproduction naturelle et les milieux et techniques de manipulation/conservation des gamètes en AMP.

L'augmentation de la fragmentation peut de même faire intervenir le phénomène d'apoptose. En effet, on retrouve en cas d'anomalie du spermogramme des marqueurs d'apoptose (Caspases, p53, FAS) et la présence de corps apoptotiques (M540) dans les spermatozoïdes fragmentés (Marchiani *et al.*, 2007). Cependant de faibles corrélations sont retrouvées entre l'activité des caspases et la fragmentation de l'ADN spermatique (Weng *et al.*, 2002). C'est pourquoi le phénomène d'apoptose ne peut être seul responsable d'une fragmentation de l'ADN spermatique.

A ce jour, en France, les mesures de la compaction de la chromatine et de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes sont des techniques de qualification de l'ADN spermatique référencées dans les laboratoires de spermologie diagnostique mais peu réalisées en pratique clinique courante. Différentes techniques peuvent être utilisées pour détecter la fragmentation de l'ADN spermatique. La méthode de référence en France pour la détection *in situ* de la fragmentation du noyau spermatique est la technique TUNEL pour « Terminal desoxy uridine nick end labelling ». Elle permet de mesurer les cassures simples et doubles brins de l'ADN. Le principe est d'incorporer des nucléotides marqués par un fluorochrome (dUTP : digoxigenin-Uridine triphosphate) au niveau des extrémités 3' libres (simple ou double brins) puis de mesurer leur intensité de fluorescence. Le test Comet ou Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) est également une technique d'électrophorèse simple et peu onéreuse permettant de qualifier directement la fragmentation de l'ADN spermatique. Les spermatozoïdes inclus dans une mince couche de gel d'agarose sur lame de microscope sont lysés, exposés à un courant électrique, puis colorés avec un fluorochrome spécifique de l'ADN. Les cassures de l'ADN libèrent les super-tours de la chromatine et permettent la migration de l'ADN vers l'anode. La coloration révèle une distribution dans le gel rappelant l'aspect d'une poussière d'étoile, d'où le nom de comète. L'intensité de la fluorescence et la longueur de la queue de la comète sont corrélées au niveau de fragmentation. Des paramètres supplémentaires tels que le diamètre du noyau, la queue d'olive et la longueur de la comète sont utilisés pour améliorer l'efficacité diagnostique du test (Singh *et al.*, 1988). Le test SCSA (Sperm Chromatine Structure Assay) met en évidence simultanément un index de fragmentation de l'ADN spermatique (DFI pour *DNA fragmentation index*) détectant un ADN monocaténaire et le pourcentage de spermatozoïde dont la chromatine est non condensée (HDS pour *High DNA stainability*; Evenson, 2017). Ce test est réalisé grâce à une coloration par l'acridine orange en milieu acide ou *via* une dénaturation par la chaleur qui révèle les cassures de l'ADN (Erenpreiss *et al.*, 2006). L'évaluation de la fragmentation de l'ADN spermatique par SCSA est largement utilisée dans la littérature scientifique (Giwerzman *et al.*, 2010; Cissen *et al.*, 2016; Simon *et al.*, 2017). Certains auteurs ont défini un seuil de DFI en lien avec le délai nécessaire pour concevoir (DNC) et propose une prise en charge en AMP. En effet, lorsque le DFI est supérieur à 20%, le DNC augmente (Bungum *et al.*, 2007). Il est préconisé un recours à des inséminations intra-utérines quand le DFI est supérieur à

25% ; à la fécondation *in vitro* avec micro-injection quand le DFI est supérieur à 30%. Enfin, en cas de DFI supérieur à 40%, les chances de grossesse sont faibles et associées à un risque de fausse couche spontané élevé (Evenson, 2017).

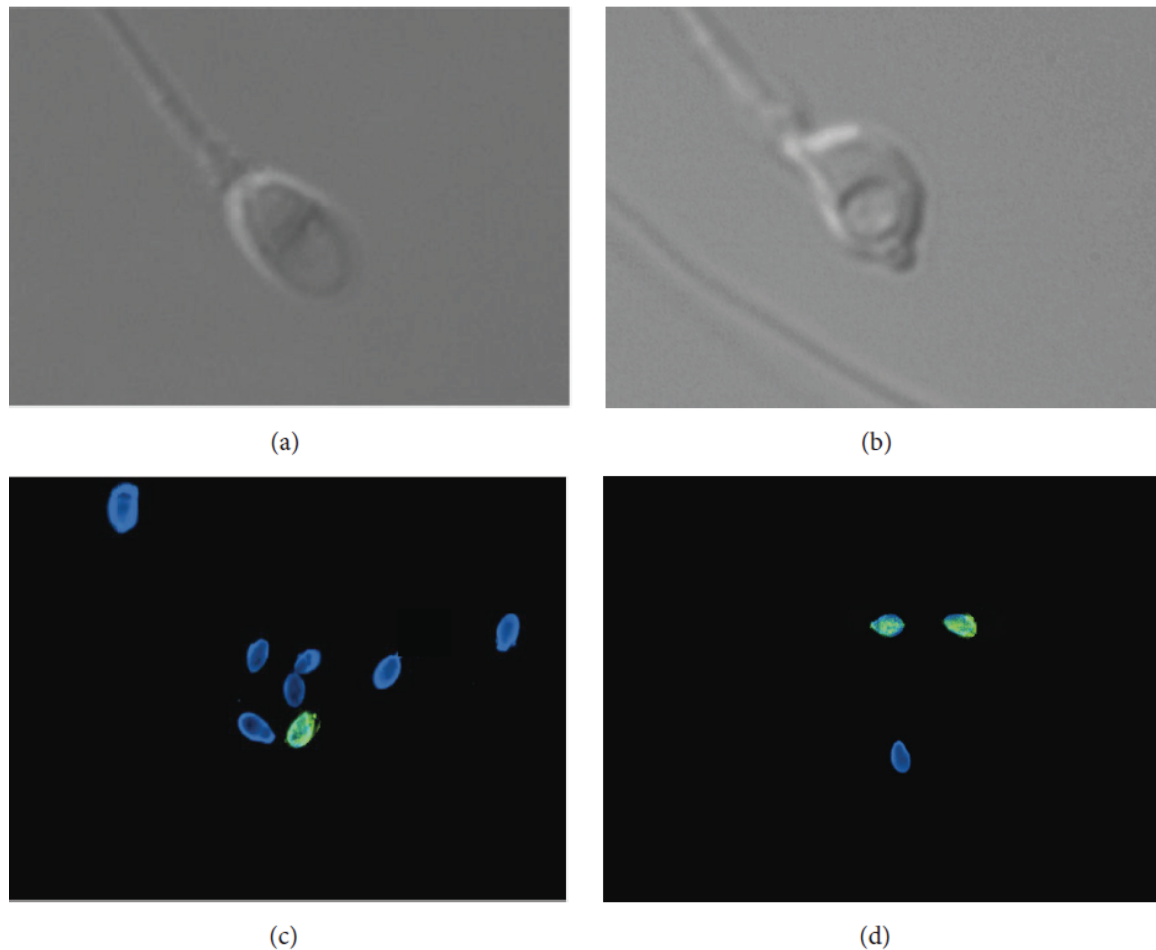
Il existe de nombreuses études qui ont essayé d'établir une valeur référence pour le test TUNEL (Selvam and Agarwal, 2018). Avec une spécificité de 89 %, une sensibilité de 96,9% et une valeur prédictive de 92,8 %, l'équipe de Sergerie et al. (2005) a analysé 66 patients infertiles, mettant en évidence une valeur-seuil de 20% de spermatozoïdes positifs. Dans une autre étude prospective portant sur 1633 patients, il est estimé qu'un tiers des patients suivis en AMP pour infertilité présente un taux de fragmentation supérieur ou égal à 30 % distinguant les hommes infertiles $29,5 \pm 18,7\%$ vs fertiles $11,9 \pm 6,8\%$ (Sharma *et al.*, 2010). Enfin, cette même équipe, en 2016, a établi une nouvelle valeur de référence du taux de fragmentation de l'ADN spermatique par TUNEL grâce au kit APO-DIRECT (BD Pharmingen) à 16,8% de spermatozoïdes positifs chez les patients infertiles avec une spécificité à 91.6% et une valeur prédictive positive de 91,4%. Par une méta-analyse, Santi *et al.*, en 2018, valident le fait que la fragmentation de l'ADN spermatique est significativement plus importante chez les patients infertiles vs les patients fertiles, quelle que soit la méthode de détection utilisée (Santi *et al.*, 2018).

Menezo *et al.*, en 2017, ont proposé une nouvelle approche de l'évaluation de la structure de l'ADN spermatique en combinant l'index de fragmentation de l'ADN spermatique (DFI) et l'index de décondensation spermatique (SDI). Elle aiderait ainsi à la prise en charge diagnostique par la mise en évidence de nouveaux seuils prenant en compte à la fois le DFI et le SDI. Ils proposent pour un DFI et SDI au-delà de 25% une évaluation des risques environnementaux encourus par le patient et une supplémentation nutritionnelle.

Il est clairement démontré que le pourcentage de fragmentation de l'ADN spermatique est corrélé négativement à la qualité embryonnaire (Sakkas *et al.*, 1998; Morris *et al.*, 2002) et au taux d'obtention de blastocystes (Janny and Menezo, 1994; Virant-Klun *et al.*, 2002; Nasr-Esfahani *et al.*, 2005; Muriel *et al.*, 2006; Benchaib *et al.*, 2007). Ainsi, un taux élevé de spermatozoïdes fragmentés est généralement associé à un faible taux de grossesse en AMP, voire une augmentation des taux de fausses couches spontanées (Zini and Sigman, 2009).

Une évaluation de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes est réalisée le plus souvent en France après plusieurs échecs de fécondation ou lors de l'obtention d'embryons de

FIGURE 22



Classification et marquage de la 5-méthylcytosine des spermatozoïdes

Classification Cassuto Barak pour les spermatozoïdes mobiles (Fertil Steril 2009) :

a- Spermatozoïde «à score élevé» Score 6 à fort grossissement (6100x).

b- Spermatozoïde «à faible score» Score 0 à fort grossissement (6100x).

Les spermatozoïdes présentant un marquage vert indiquent un niveau détectable de méthylation de l'ADN. Fusionnez Dapi (bleu) et FITC (vert).

c- Détection de la 5-méthylcytosine dans les spermatozoïdes S6 (100x).

d- Détection de la 5-méthylcytosine dans les spermatozoïdes S0 (100x).

(Cassuto N *et al.* 2016)

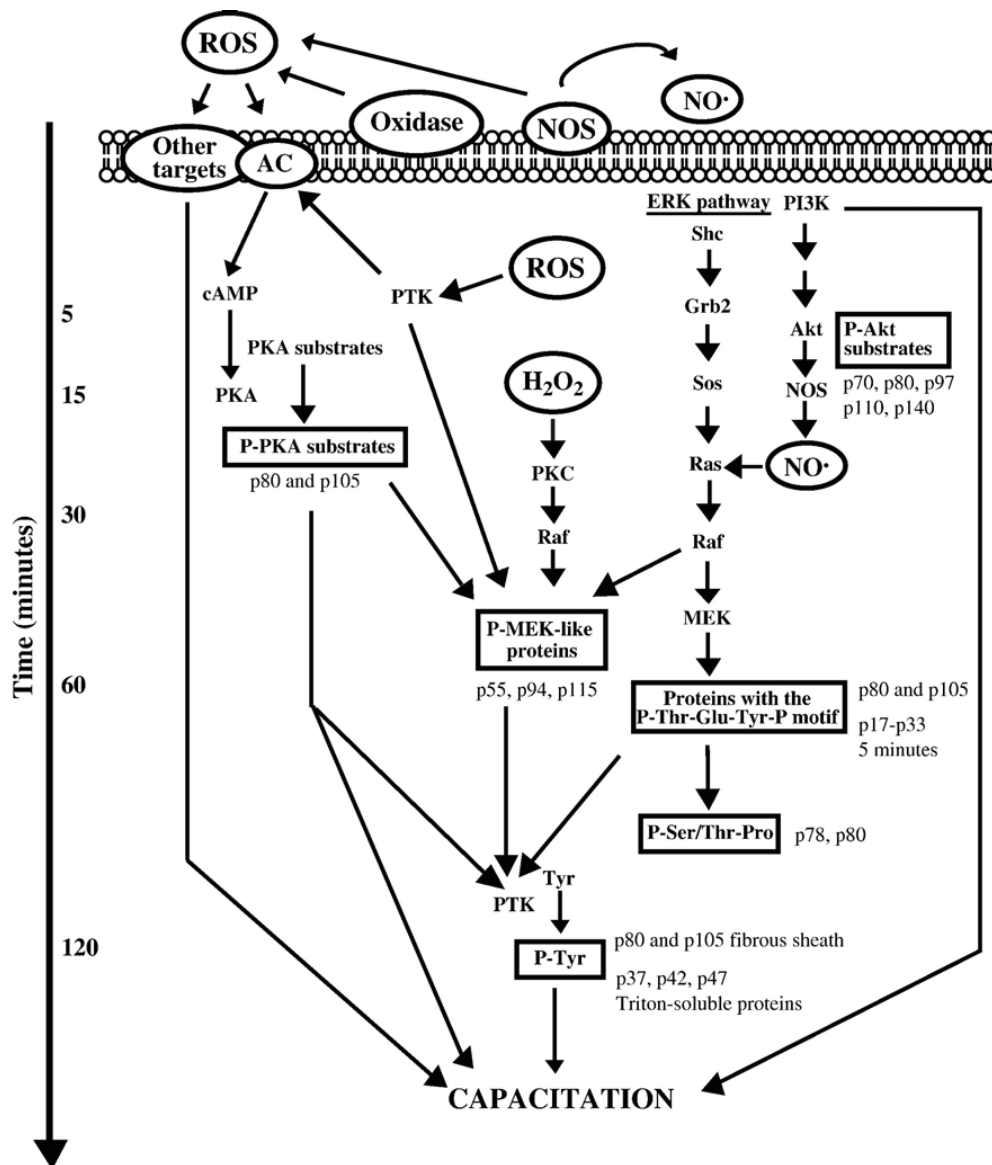
mauvaise qualité en AMP ou encore dans le cas de fausses couches précoces à répétition. Même s'il a été démontré que la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes conduit clairement à une réduction de la fertilité masculine (Kodama *et al.*, 1997; Henkel *et al.*, 2004), lorsqu'elle est évaluée en clinique, son interprétation pose problème en termes de seuil de pathogénicité et d'impact réel sur les chances de grossesse.

c. Anomalies de la méthylation de l'ADN spermatique

La méthylation de l'ADN, une des marques épigénétiques majeures, est réalisée sur le carbone 5 de la cytosine par des ADN méthyltransférases (DNMT). Comme je l'ai déjà introduit précédemment, cette méthylation est réalisée dès la spermatogenèse puis se poursuit dans le tractus épидидymaire (Narayan and Raman, 1995; Marques *et al.*, 2011). Les dinucléotides Cytosine Guanosine (CpG) situés dans les régions régulatrices des gènes sont majoritairement méthylés. L'expression d'un gène ainsi que sa transcription sont possibles lorsque la chromatine est décompactée (euchromatine) en cas d'hypométhylation. A l'inverse, l'hyperméthylation compacte la chromatine et empêche la transcription.

De nombreux travaux montrent des résultats contradictoires en cas d'altération du niveau de méthylation du noyau spermatique associé aux caractéristiques spermatiques, à la fois liés à une altération (Marques *et al.*, 2004; Boissonnas *et al.*, 2010; Montjean *et al.*, 2015) ou non du spermogramme (Benchaïb *et al.*, 2006). Certains auteurs ont mis en évidence qu'une méthylation globalement faible, suggérant une spermatogenèse défectueuse, était défavorable à l'obtention de grossesse, alors qu'une méthylation importante était plus favorable (Doerksen and Trasler, 1996; Benchaïb *et al.*, 2006). Kobayashi *et al.*, en 2009, a montré que 21.8% des embryons étudiés dans le cadre d'une AMP présentaient des anomalies de méthylation de l'ADN. Bien que ces anomalies puissent être augmentées par les procédures d'AMP elles-mêmes, Kobayashi retrouve des anomalies d'hypométhylation à la fois dans les spermatozoïdes et l'embryon suggérant ainsi une transmission paternelle de cette hypométhylation (Kagami *et al.*, 2007; Kobayashi *et al.*, 2017). De plus, l'équipe de Benchaib *et al.*, en 2005 a mis en évidence une relation inverse entre le niveau global de méthylation et les index de condensation de la chromatine et de fragmentation de l'ADN spermatique. Actuellement, aucun consensus n'a été trouvé concernant le niveau de méthylation et les conséquences sur les caractéristiques spermatiques.

FIGURE 23



Activation des spermatozoïdes: Rôle des espèces réactives de l'oxygène et des kinases

Le schéma résume les événements de phosphorylation associés à la capacitation du sperme humain et l'hypothèse sur les interférences possibles et les interactions entre les voies de transduction impliquées dans la capacitation du sperme humain via la modulation par les ROS et les kinases. Le déroulement temporel de ces événements est donné à gauche et les protéines phosphorylées sont appelées par leur masse moléculaire.

(De Lamirande & O'Flaherty, 2008)

Des anomalies de méthylation de l'ADN peuvent être impliquées dans la survenue de maladies telles que le syndrome d'Angelman (Ludwig *et al.*, 2005) et le syndrome de Beckwith-Wiedemann (Hiura *et al.*, 2012).

L'immunodétection du 5-méthylecytosine (5-mC) permet d'évaluer le niveau de méthylation de l'ADN spermatique. Récemment, Cassuto *et al.*, en 2016, a mis en évidence une relation entre le niveau de méthylation spermatique et la morphologie des spermatozoïdes par microscopie à fort grossissement (Figure 22).

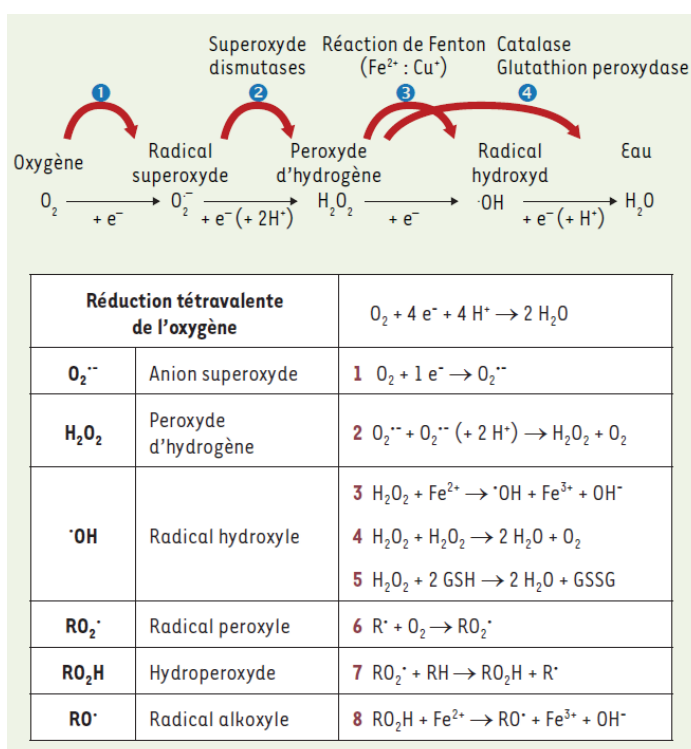
d. Anomalies de l'oxydation de l'ADN spermatique

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des sous-produits toxiques de la respiration cellulaire (en particulier des chaînes de transporteurs d'électrons et de certaines activités enzymatiques). Leur production peut être médiée par l'action d'agents exogènes, tels que les radiations ionisantes, les métaux lourds ou certains produits chimiques, que je développerai en détail plus tard dans ce travail. Ces ERO jouent un rôle physiologique indispensable au dialogue intracellulaire, à la protection immunitaire, au maintien de l'homéostasie en dioxygène et à la régulation de l'apoptose. Selon leur réactivité et leur capacité à traverser les membranes biologiques, elles vont pouvoir agir à plus ou moins grande distance de leur lieu de synthèse dans différents processus physiologiques. Comme déjà évoqué précédemment, les ERO à concentrations modérées, ont un rôle majeur dans la maturation testiculaire et post-testiculaire des spermatozoïdes (Agarwal and Allamaneni, 2004; Drevet, 2006; Noblanc *et al.*, 2014).

En effet, en plus de leur action sur la compaction de la chromatine, les ERO interviennent sur l'épigénome par l'oxydation des acides nucléiques, dans l'acquisition de la mobilité, dans les différents processus de fécondation notamment de la capacitation, de la réaction acrosomique par l'oxydation notamment de protéines et de lipides cellulaires et membranaires et l'activation des cascades de signalisation (Drevet, 2006; De Lamirande and O'Flaherty, 2008; Pons-Rejraji *et al.*, 2009; Noblanc *et al.*, 2012 ; Figure 23).

Au niveau cellulaire, il existe différentes ERO, comprenant notamment les radicaux libres, qui possèdent un électron non apparié et les dérivés actifs de l'oxygène (DAO). Parmi les radicaux libres on distingue les radicaux primaires, qui dérivent directement de l'oxygène,

A



Les espèces réactives de l'oxygène

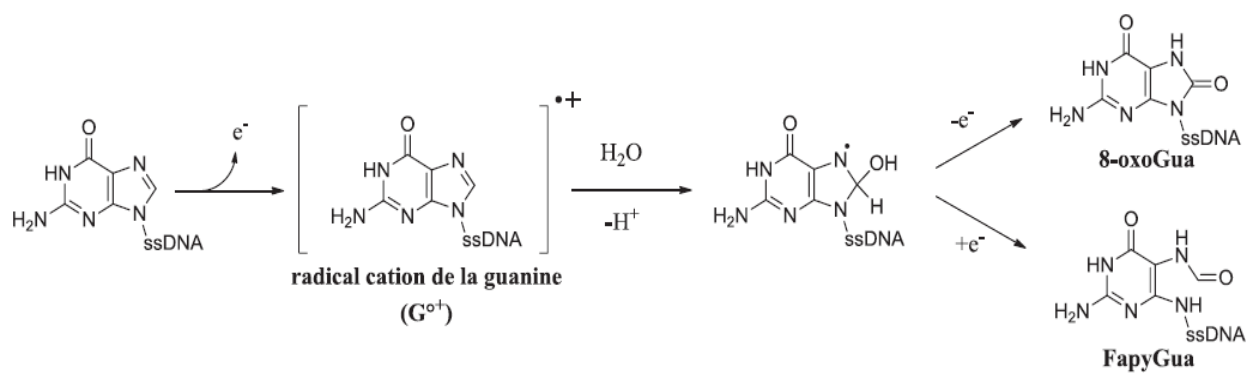
B. Origine des espèces réactives de l'oxygène ; Les quatre étapes de la réduction de l'oxygène et la formation des intermédiaires partiellement réduits sont détaillées (Migdal and Serres 2011).

par des réductions à un électron et les radicaux secondaires, qui résultent de l'action des radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Les principaux radicaux primaires sont l'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$, le radical hydroxyle OH° , et le monoxyde d'azote NO° . Les plus réactives d'entre elles sont principalement le radical hydroxyle OH° , et les radicaux peroxyde ROO° , qui sont des radicaux secondaires provenant de l'oxydation de substrats organiques (Cadet *et al.*, 2008). En effet, l'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$ est peu réactif car rapidement dismuté en peroxyde d'hydrogène soit spontanément soit par l'action d'une superoxyde dismutase (SOD). Les DAO tels que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , l'oxygène singulet 1O_2 et le peroxydinitrite $ONOO^-$, peuvent être des précurseurs de radicaux. Le peroxyde d'hydrogène, intermédiaire stable est capable de traverser les membranes lipidiques et de générer des radicaux hydroxyles grâce notamment à la réaction de Fenton. Au cours de cette réaction d'oxydation avancée, le peroxyde d'hydrogène oxyde le fer ferreux selon la réaction $Fe^{2+}_{(aq)} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+}_{(aq)} + OH^-_{(aq)} + OH^{\circ}$. Ainsi, le radical hydroxyle OH° , deuxième oxydant le plus puissant présent dans la nature après le fluor est obtenu. Il est particulièrement toxique induisant la cascade de peroxydation des lipides et l'oxydation des protéines, des sucres et de l'ADN (Figure 24A).

La haute réactivité des ERO peut aussi les rendre nocifs. Leur accumulation en grand nombre, ou un défaut en agents antioxydants, est à l'origine d'une situation pathologique appelée « stress oxydant » (Migdal and Serres, 2011 ; Figure 24B). Il s'agit d'une rupture de l'équilibre entre les pro-oxydants et les systèmes de défense antioxydants à l'origine de modifications chimiques sur tous les constituants organiques qui ont potentiellement des conséquences dommageables pour toute cellule aérobie (Cooke *et al.*, 2003). En situation de stress oxydant, les impacts cellulaires sur le spermatozoïde sont multiples (membranaires, cytosoliques et nucléaires) induisant une altération globale de la fonctionnalité des gamètes.

Lors de la spermiogenèse, la chromatine spermatique extrêmement compactée permet aux spermatozoïdes d'être particulièrement résistants aux dommages à l'ADN. Toutefois, dans certains cas où la compaction est médiocre et la protamination incomplète, l'ADN spermatique est plus vulnérable au stress oxydant. Une oxydation exacerbée de l'ADN peut

FIGURE 25



Réaction d'oxydation de la guanine

Lésions obtenues lors de la réaction d'hydratation du radical cation de la guanine
(Cadet J et al. 2008).

induire des cassures, une décondensation anormale de la chromatine, voire une activation des mécanismes d'apoptose qui peuvent conduire *in fine* à une fragmentation de l'ADN.

Différents types de dommages oxydants de l'ADN sont connus à ce jour : les bases oxydées, les sites abasiques, les pontages intra-brin et inter-brins, les cassures simples ou doubles brins et les pontages ADN-protéines. Les bases azotées peuvent être modifiées, des liaisons covalentes inter/intra-brins ou avec les protéines chromatinienne peuvent se mettre en place et des cassures de l'ADN peuvent survenir (Jena, 2012). Les ERO agissent en arrachant un atome d'hydrogène à une base, formant un radical qui pourra réagir en cascade et en fonction de l'environnement chimique, jusqu'à former une molécule stable. La guanine du fait de son faible potentiel d'oxydo-réduction est la cible principale de l'oxydation. Le carbone C8 du radical G est particulièrement favorable aux additions nucléophiles. Le radical cation de la guanine (G) peut être impliqué dans 2 types de réactions : des additions nucléophiles et des réactions de déprotonation. Parmi les différentes réactions actuellement décrites, la plus étudiée est celle correspondant à la formation de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine. Celle-ci se produit suite à l'addition nucléophile d'une molécule d'eau en C8 du radical cation de la guanine, ce qui conduit au radical 8-hydroxy-7,8-dihydroguanyl. Cette hydratation est suivie d'une seconde étape d'oxydation pour former la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua). Le radical 8-hydroxy-7,8-dihydroguanyl peut également être réduit, ce qui provoque une ouverture du cycle imidazole, formant ainsi la FapyGua ou 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (Cadet *et al.*, 2008 ; Figure 25). Cependant, même si le résidu guanine est le plus sensible à l'oxydation, il est important de noter que toutes les bases de l'ADN peuvent être oxydées.

Les acides aminés possèdent une susceptibilité différente vis-à-vis des ERO. Des cassures simples et doubles brins de l'ADN résultants de l'action des ERO ont été observées dans les spermatozoïdes testiculaires et épидидymaires. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Toute attaque radicalaire oxydante d'un acide aminé a pour conséquence l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bityrosine intra- et inter-chaînes. La plupart de ces dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (non reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique). Certaines



1. L'oxydation est initiée par le radical hydroxyle qui enlève un atome d'hydrogène sur le

protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire (Aitken, 2017). Les protéines cibles des oxydations réversibles des cystéines sont les phosphatases qui sont inactivées ; les kinases et les protéases pouvant être activées ou inactivées. Par exemple, les caspases sont inhibées par l' H_2O_2 et les métalloprotéinases sont activées par H_2O_2 (Figure 26). Ces réactions d'oxydation sont fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Cu^{2+} et le Fe^{2+} . On retrouve tout d'abord des cassures de liaison peptidiques avec une modification de la chaîne protéique. Ensuite, des modifications des peptides par l'addition de produits issus de la peroxydation des lipides peuvent être rencontrées. Ainsi ces modifications structurales des protéines ont des conséquences majeures.

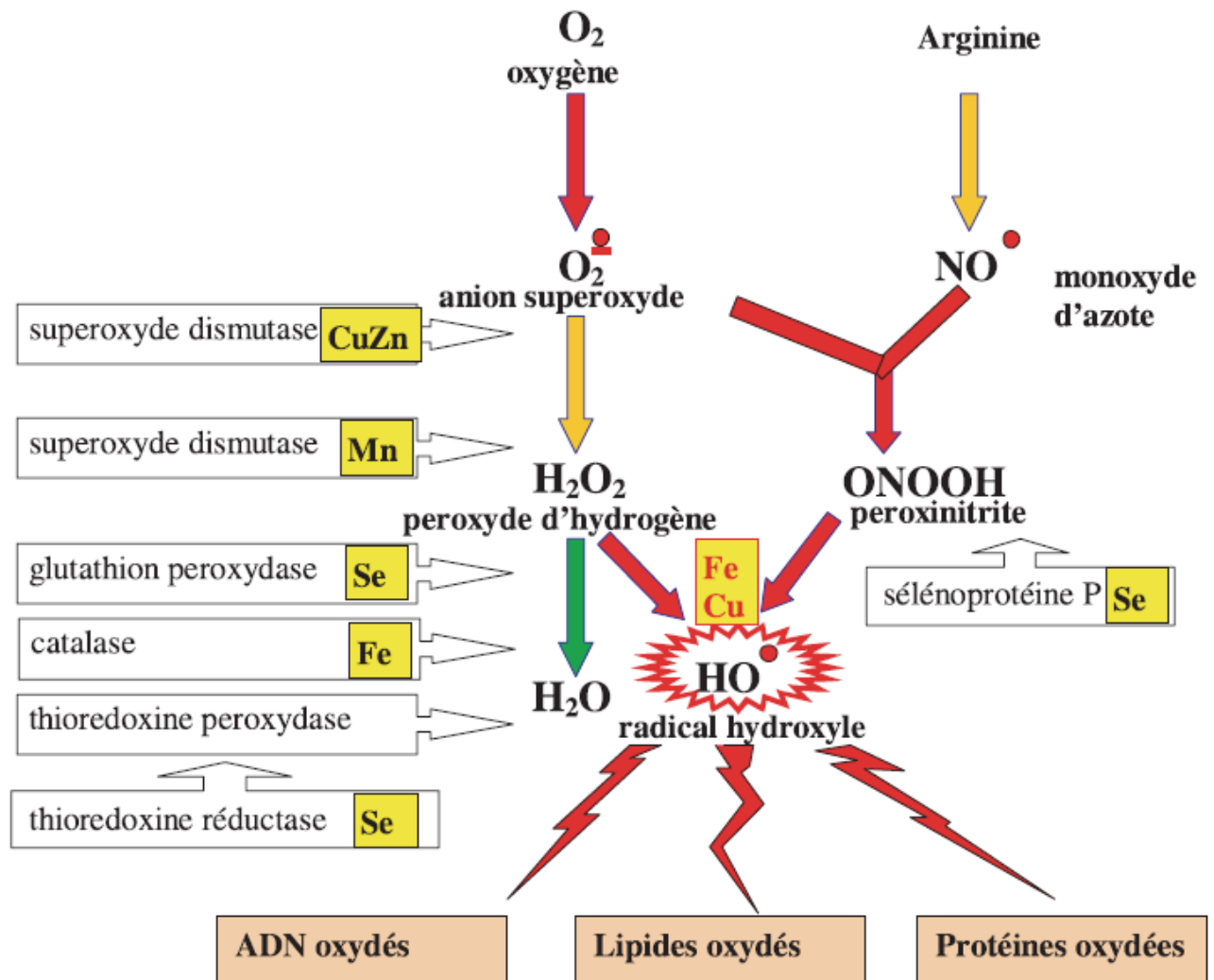
Les ERO peuvent agir sur d'autres constituants du noyau et de la cellule. Les effets délétères d'un excès de ERO sur les membranes plasmiques, acrosomique et sur l'enveloppe nucléaire spermatique sont fréquents et ont des conséquences sur le pouvoir fécondant des spermatozoïdes. La peroxydation des lipides et l'oxydation des protéines rigidifient la membrane plasmique, déstabilise la membrane acrosomique et mènent à une perte de la mobilité spermatique.

Les premières cibles membranaires des ERO sont les acides gras poly-insaturés (AGPI) extrêmement présents dans les membranes spermatiques. Leur présence est responsable de la fluidité membranaire. Le stress oxydant provoque une cascade de réactions chimiques aboutissant à la peroxydation des lipides. Dans le sperme, elle peut entraîner près de 60% de destruction des AGPI, d'où une altération des propriétés membranaires des spermatozoïdes. Sur les lipides membranaires, le radical hydroxyle est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des AGPI. Le radical lipidique réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxy ($\text{ROO}\bullet$), suffisamment réactif pour arracher un H^+ à un AGPI voisin, propageant ainsi la réaction. Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire. Les peroxydes générés seront neutralisés par la glutathion peroxydase ou continueront à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes (Malondialdéhyde = MDA, 4-hydroxynonéal = 4-HNE). Auparavant, aucun consensus n'était établi concernant la technique de détection de l'oxydation de l'ADN spermatique. Jusqu'à ce jour, aucun marqueur biologique validé

permettant d'évaluer le degré d'oxydation nucléaire des spermatozoïdes humains n'était réalisable. Les dosages de peroxydation des lipides (MDA ou BODIPY), d'oxydation globale (Total antioxidant capacity ou TAC) ont été développés sans consensus obtenu. Récemment, une équipe propose la mesure du potentiel d'oxydo-réduction dans le liquide séminal par la technique MiOXSYS comme aide au diagnostic du stress oxydant (Agarwal *et al.*, 2017). La première détection du 8-OHdG, marqueur le plus précoce de l'oxydation nucléaire, a été réalisée par HPLC (high-performance liquid chromatography) par Ni *et al.* et Shen *et al.* en 1997, rapidement abandonnés du fait de l'oxydation spontanée induite par la technique (Kasai, 2002; Kao *et al.*, 2008). Depuis 2002, des kits permettent la détection du 8-OHdG (kit OxyDNA Test®). Devant l'absence de consensus de ces tests, et face à un besoin diagnostic, notre équipe de recherche a mis au point l'immunodétection du 8-OHdG sur un modèle murin (Noblanc *et al.*, 2013).

Trente à 60% des patients infertiles présenteraient une oxydation de l'ADN spermatique (Aitken and Baker, 2013; Aitken *et al.*, 2014). L'oxydation est la cause majeure de la fragmentation de l'ADN du spermatozoïde (Tremellen, 2008; Brugnon *et al.*, 2013; Aitken *et al.*, 2014) avec une corrélation positive entre le taux de spermatozoïdes oxydés et l'index de fragmentation de l'ADN spermatique (Fraga *et al.*, 1991; Kodama *et al.*, 1997; Bisht and Dada, 2017). Les mutations issues d'un état de stress oxydant, altèrent non seulement l'intégrité et la fidélité de l'information génétique du zygote, mais peuvent également compromettre le développement embryonnaire préimplantatoire, le développement fœtal et augmenter le risque de fausses couches (Aitken *et al.*, 2014). Enfin, il est démontré que le taux d'oxydation spermatique était corrélé positivement au degré de fragmentation embryonnaire et négativement au taux d'obtention de blastocystes (Meseguer *et al.*, 2008). Il est à noter que les dommages à l'ADN dus au stress oxydant peuvent se produire à la fois sur l'ADN nucléaire et sur l'ADN mitochondrial. L'ADN nucléaire étant d'ailleurs moins sensible aux lésions induites par le peroxyde d'hydrogène que l'ADN mitochondrial, probablement du fait de sa condensation extrême par les protamines (Sawyer *et al.*, 2003).

FIGURE 27



Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques
(Favier *et al.* 2003)

III. Les systèmes de réparation des dommages nucléaires spermatiques

Les anomalies de l'ADN spermatique peuvent être réparées, corrigées en fonction du degré d'atteinte. En effet, l'oxydation est une des altérations majeures, elle peut être précurseur ou concomitante à la décondensation ou la fragmentation de l'ADN spermatique. Les spermatozoïdes ont une faible activité transcriptionnelle et un volume cytoplasmique limité. Ils sont dans l'incapacité de répondre à un stress oxydant en produisant *de novo* des antioxydants ou en réparant le matériel cellulaire altéré. Bien que des antioxydants soient présents dans le spermatozoïde, le liquide séminal est la meilleure protection des gamètes contre les ERO. En cas de protection insuffisante, il existe des mécanismes de réparation spermatique et si besoin un relai ovocytaire.

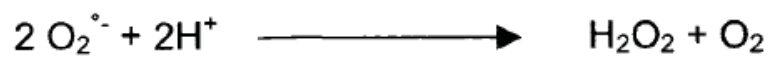
III.1. Les antioxydants (AO)

Certains antioxydants (AO) sont présents dans les spermatozoïdes (intrinsèques), mais le liquide séminal est la meilleure protection des gamètes contre les ERO (extrinsèques). Les AO agissent en interrompant les réactions en chaîne aboutissant à la production des ERO. Ils peuvent être divisés en deux groupes en fonction de leur mode d'action : les AO préventifs sont des métaux lourds chélateurs et les protéines de liaison telles que la lactoferrine et la transferrine, qui préviennent la formation des ERO. Les AO détoxifiants, tels que les vitamines C et E, qui suppriment les ERO déjà formés. Il existe de nombreux travaux évaluant l'efficacité de ces AO. Cependant aucun consensus n'a été établi du fait de l'hétérogénéité des études concernant les effectifs et les étiologies des patients, des dosages, de la durée et de la nature des AO (Gharagozloo and Aitken, 2011; Aitken *et al.*, 2016).

a. AO Enzymatiques

On retrouve plusieurs familles enzymatiques présentes dans le tractus génital masculin, le liquide séminal et les spermatozoïdes. Les principales enzymes antioxydantes directement impliquées dans la neutralisation des ERO sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion réductase (GRx). C'est un système de

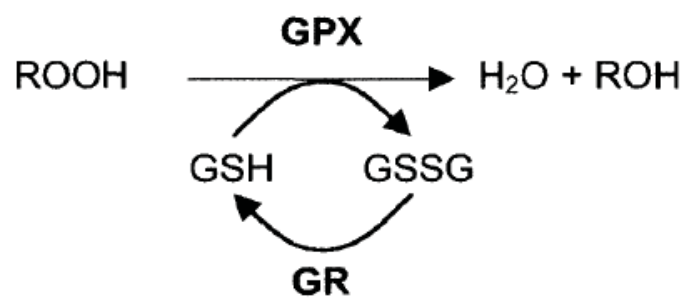
FIGURE 28



Réaction de dismutation de l'anion superoxyde catalysée par les superoxydes dismutases



Réaction catalysée par la catalase



Réaction catalysée par la glutathion peroxydase

GPX : Glutathion peroxydase ; GR : Glutathion réductase ;
GSH : Glutathion réduit ; GSSG : Glutathion oxydé

défense primaire, préventif, agissant en limitant la production de ERO par limitation de la phase d'initiation des réactions d'oxydation (Favier A, 2003 ; Figure 27).

Les superoxydes dismutases (SOD), de la famille des métalloprotéines, protègent l'organisme de l'action des anions superoxydes. Elles accélèrent la dismutation des $O_2^{\bullet -}$ en H_2O_2 et en O_2 , prévenant ainsi la peroxydation lipidique et améliorant la mobilité. Il existe des corrélations directes entre le maintien de la mobilité des spermatozoïdes et leur activité SOD (Alvarez *et al.*, 1987).

Les glutathions peroxydases (GPX) sont les principaux agents réducteurs de l'organisme. Ils agissent comme AO détoxifiant dans le testicule et l'épididyme. Cette enzyme sélénodépendante participe au recyclage du glutathion et réduit la peroxydation lipidique. Le GPx agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation de H_2O_2 en H_2O et O_2 . Lors de cette réaction deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG). La glutathion réductase quant à elle a pour rôle de régénérer les SH à partir de GSSG grâce à la NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire de glutathion étant limitée ; il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction. Leur action sur la membrane du spermatozoïde, en réduisant l' H_2O_2 , confère une protection des lipides préservant ainsi la vitalité et la mobilité spermatique. Le glutathion est le principal protecteur endogène contre les dégâts liés aux radicaux libres et maintient les AO exogènes dans leur forme réduite. Combiné à un apport de vitamine C et E, on observe une augmentation de la numération de et une diminution de la fragmentation de l'ADN spermatique (Agarwal and Allamaneni, 2004; Ménéz *et al.*, 2007). L'inhibition spécifique des GPX *in vitro* induit une forte peroxydation lipidique des spermatozoïdes, suggérant ainsi un rôle essentiel de cette famille (Drevet, 2006).

Les peroxyredoxines sont six enzymes antioxydantes capables de réduire des peroxydes tels que l' H_2O_2 , les lipides hydroperoxydés et l' $ONOO^-$ présentent dans le spermatozoïde et le liquide séminal (Rhee and Woo, 2011). Les peroxyredoxines 1 et 6 ont été retrouvées diminuées et hautement oxydées dans les spermatozoïdes de patients infertiles (Fernandez and O'Flaherty, 2018). Ces mêmes auteurs ont démontré le rôle essentiel de la

Tableau 1

Les antioxydants
métaboliques

AO METABOLIQUES	Rôle	Références
Glutathion réduit (GSH)	Réduit le peroxyde d'hydrogène et/ou des peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la GPx Réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines C et E, abaissant ainsi la peroxydation lipidique Le rapport glutathion réduit/oxydé : marqueur du stress oxydant (plus l'H ₂ O ₂ est présent, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté)	Ji <i>et al.</i> 1992 ; Agarwal A and Sekhon LH, 2010.
Coenzyme Q10	Transporte les électrons au niveau de la chaîne mitochondriale Rôle d'apport énergétique pour la pièce intermédiaire Stabilise les lipoprotéines de la membrane cellulaire	Lewin A, Lavon H 1997 ; Balercia <i>et al.</i> 2009
Carnitine	Fournissant d'énergie spermatique : mobilité et la maturation spermatique. Inhibe la peroxydation des lipides et protège l'ADN spermatique et les membranes de l'atteinte oxydative.	Sigman <i>et al.</i> 2006
Cystéines	Cofacteur du GPX intracellulaire et augmentent la quantité de GPX synthétisées La N-acetyl-cystéine agit par deux mécanismes complémentaires : stimule la quantité d'agents réducteurs produits et met les spermatozoïdes à l'abri des radicaux libres.	Safarinejad and Safarinejad, 2009 ; Ciftci <i>et al.</i> 2009
Acide folique	Vitamines du groupe B, hydrosolubles Important dans la synthèse de l'ADN et les fonctions cellulaires en participant à la production de pyrimidine et de purine	Tremellen <i>et al.</i> 2007
Hypotaurine	Antioxydant avec des effets sur l'intégrité et la fonctionnalité de la membrane plasmique Présente naturellement en concentration élevée dans le sperme et le tractus génital des mammifères Agit <i>in vivo</i> comme piègeur des radicaux hydroxyles, protégeant ainsi les lipides de la membrane plasmique Son oxydation résulte en la formation de la taurine	Holmes RP <i>et al.</i> 1992 ; Guerin P, Menezes Y, 1995 ; Yun JI <i>et al.</i> 2013

Tableau 2

Les antioxydants
nutritifs

AO NUTRITIFS	Rôle	Références
vitamine E ou α-tocophérol	AO qui agit sur la membrane du spermatozoïde en neutralisant l'H ₂ O ₂ et en dégradant les radicaux libres Arrête la chaîne de propagation de la lipoperoxydation. Les tocophérols inhibent les oxydations induites par l'oxygène singulet. L'α-tocophérol peut neutraliser 40 à 120 molécules d'oxygène avant d'être détruit. Cette activité est 50 X moindre vs celle des caroténoïdes	Suleiman <i>et al.</i> 1996 ; Omu <i>et al.</i> 2008
Vitamine C ou acide ascorbique	La plus importante des vitamines hydrosolubles Cofacteur essentiel des réactions d'hydroxylation Réagit avec OH ⁻ , O ₂ ⁻ et H ₂ O ₂ dans le fluide extracellulaire comme donneur d'électrons Permet également la régénération de la vitamine E à l'interface membrane/cytosol Protège les membranes de l'attaque peroxydative en piégeant les radicaux peroxydes ROO [•] , avant qu'ils puissent initier les peroxydations	Galatioto <i>et al.</i> , 2008 ; Tremellen <i>et al.</i> , 2007
Caroténoïdes	Puissant AO Pigments naturels variant du jaune-orangé au rouge-violet à l'état libre 10% des caroténoïdes sont capables d'être converti en vitamine A, notamment l'alpha-carotène et le bêta-carotène La vitamine A est une vitamine liposoluble, dans l'organisme sous forme de rétinol, de rétinol, d'acide rétinoïque et de rétinyl-phosphate. Capables de prévenir et d'interrompre la peroxydation en neutralisant l'oxygène singulet et les radicaux libres. Les capacités AO diffèrent selon la structure moléculaire, la pression d'oxygène et la présence concomitante d'autres nutriments AO	Galatioto <i>et al.</i> 2008 ; Ménézo <i>et al.</i> 2007
Flavonoïdes	Famille des polyphénols Stabilisent les radicaux peroxydes tout en désactivant les DAO. Peuvent aussi chélater les métaux et inhiber la lipoxigénase Le polyphénol (AOH) cède un atome d'hydrogène aux radicaux libres Sa forme oxydée (AO [•]) est ensuite stabilisée par dimérisation.	Sermondade N <i>et al.</i> 2012
Micronutriments tels que le zinc, le fer, le sélénium et le cuivre	Le zinc : essentiel pour la condensation de la chromatine spermatique, la réaction acrosomique et la stabilisation de la chromatine Permet la stabilisation de la structure membranaire, participe à la structure et la fonction de la superoxyde dismutase	Wong <i>et al.</i> 2002 ; Safarinejad and Safarinejad, 2009

peroxyrédoxine 6 dans la vitalité et le maintien de l'intégrité de l'ADN spermatique face aux dommages oxydants.

Enfin, les catalases agissent en facilitant la décomposition de H_2O_2 en H_2O et en O_2 (Jeulin *et al.*, 1989). Des travaux récents ont mis en évidence une relation entre la tératozoospermie, les enzymes antioxydantes du liquide séminal et les dommages à l'ADN (Ammar *et al.*, 2019). Les réactions catalysées par les principaux AO enzymatiques sont illustrées dans la figure 28.

b. AO Non enzymatiques

Les antioxydants non enzymatiques sont également divisés en antioxydants intrinsèques, notamment métaboliques et antioxydants extrinsèques, notamment nutritifs. Dans les AO métaboliques on retrouve notamment l'acide lipoïde, le glutathion, la L-arginine, le coenzyme Q10, la mélatonine, l'acide urique, la bilirubine, les protéines chélatantes des métaux et la transferrine. Par exemple, l'arginine, essentielle à la mobilité spermatique, à la capacitation et à la réaction acrosomique, est impliquée dans la réponse inflammatoire *via* la synthèse de monoxyde d'azote. Les antioxydants nutritifs, sont des composés qui ne peuvent pas être produits dans le corps mais doivent être fournis par le biais d'aliments ou de suppléments, comme les vitamines E et C, les caroténoïdes, les métaux (sélénium, manganèse, zinc) et les flavonoïdes. Les tableaux 1 et 2 synthétisent les principaux AO non enzymatiques intervenant dans la reproduction humaine.

Ces AO constituent un système de défense car ces molécules agissent comme « chain-breaking », c'est-à-dire qu'elles bloquent les réactions de propagations d'oxydation, permettant ainsi d'éviter le passage de formes peu réactives (tel $l'O_2^-$) à très réactives (tel que $OH^\bullet$).

Dans le liquide séminal on retrouve ces systèmes AO non enzymatiques, de diverses natures, incluant des vitamines (C et E), des acides aminés (taurine et hypotaurine), des protéines et peptides (albumine), des caroténoïdes, des flavonoïdes, des métaux lourds de transition (zinc et manganèse), du sélénium et de la carnitine. Leur activité est significativement diminuée dans le liquide séminal d'hommes infertiles, reflétant un rôle majeur dans la protection des spermatozoïdes (Lewis *et al.*, 1997; Song *et al.*, 2006; Tremellen, 2008).

FIGURE 29

Type of base lesion		Name	Physiological substrates	Mono (M)/ bi(B) functional	Mouse knockout (ko)/ knockdown (kd) phenotype
Uracil in ssDNA dsDNA	UNG	Uracil-N glycosylase	U, 5-FU, ss and dsDNA	M	ko: viable, B-cell lymphomas, disturbed antibody diversification
	SMUG1	Single-strand-specific monofunctional uracil DNA glycosylase 1	U, 5--hmU, 5-FU, ss and dsDNA	M	kd: moderate increase in mutation frequency (C → T)
	MBD4	Methyl-binding domain glycosylase 4	T, U, 5-FU, εC, opposite G, dsDNA	M	ko: viable, elevated mutation frequency (C → T)
Pyrimidine derivates in mismatches	TDG	Thymine DNA glycosylase	T, U, 5-FU, εC, 5-hmU, 5-fC, 5-caC; opposite G, dsDNA	M	ko: embryonic lethal, aberrant DNA methylation and imbalanced chromatin marks in CpG-rich promoters
Oxidative base damage	OGG1	8-OxoG DNA glycosylase 1	8--oxoG, FaPy, opposite C, dsDNA	B	ko: viable, accumulation of 8-oxoG, elevated mutation frequency (G → T)
	MYH	MutY homolog DNA glycosylase	A opposite 8--oxoG, C or G, 2--hA opposite G, dsDNA	M	ko: viable, see OGG1
Alkylated purines	MPG	Methylpurine glycosylase	3--meA, 7-meG, 3-meG, hypoxanthine, εA, ss and dsDNA	M	ko: viable, elevated levels of ethenoA and hypoxanthine
Oxidized, ring-fragmented or --saturated pyrimidines	NTHL1	Endonuclease III-like 1	Tg, FaPyG, 5-hC, 5-hU, dsDNA	B	ko: viable
	NEIL1	Endonuclease VIII-like glycosylase 1	Tg, FaPyG, FaPyA, 8-oxoG, 5--hU, 5--hC, ss and dsDNA	B	ko: metabolic syndrome, increased damage levels in mitochondrial DNA; kd: hypersensitive to γ radiation
	NEIL2	Endonuclease VIII-like glycosylase 2	As NTHL1 and NEIL1	B	Unknown
	NEIL3	Endonuclease VIII-like glycosylase 3	FaPyG, FaPyA, prefers ssDNA	B	ko: normal

Mammalian DNA glycosylases, their main substrates, modes of action, and mutant phenotypes

U, uracil; , A, adenine; , T, thymine; , C, cytosine, G, guanine; , ss single stranded; , ds, double stranded; , 5--hm, 5--hydroxymethyl; , 5-FU, 5-fluorouracil; , ε, etheno; , 5-fC, 5-formylcytosine; , 5-caC, 5-carboxylcytosine; , 8--oxoG, 8--oxo-7,8-dihydroguanine; , Tg, thymine glycol; , FaPy, 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine; , me, methyl; , h, hydroxyl (D'après Angelika L. Jacobs and primo Schar; 2012)

III.2. Mécanismes intrinsèques de réparation des dommages à l'ADN spermatique

a. Mécanismes de réparation du spermatozoïde

Un des marqueurs principaux du stress oxydant nucléaire est la production de bases guanosine oxydées appelées 8-OHdG (8-oxo-7,8-dihydro-2'guanosine).

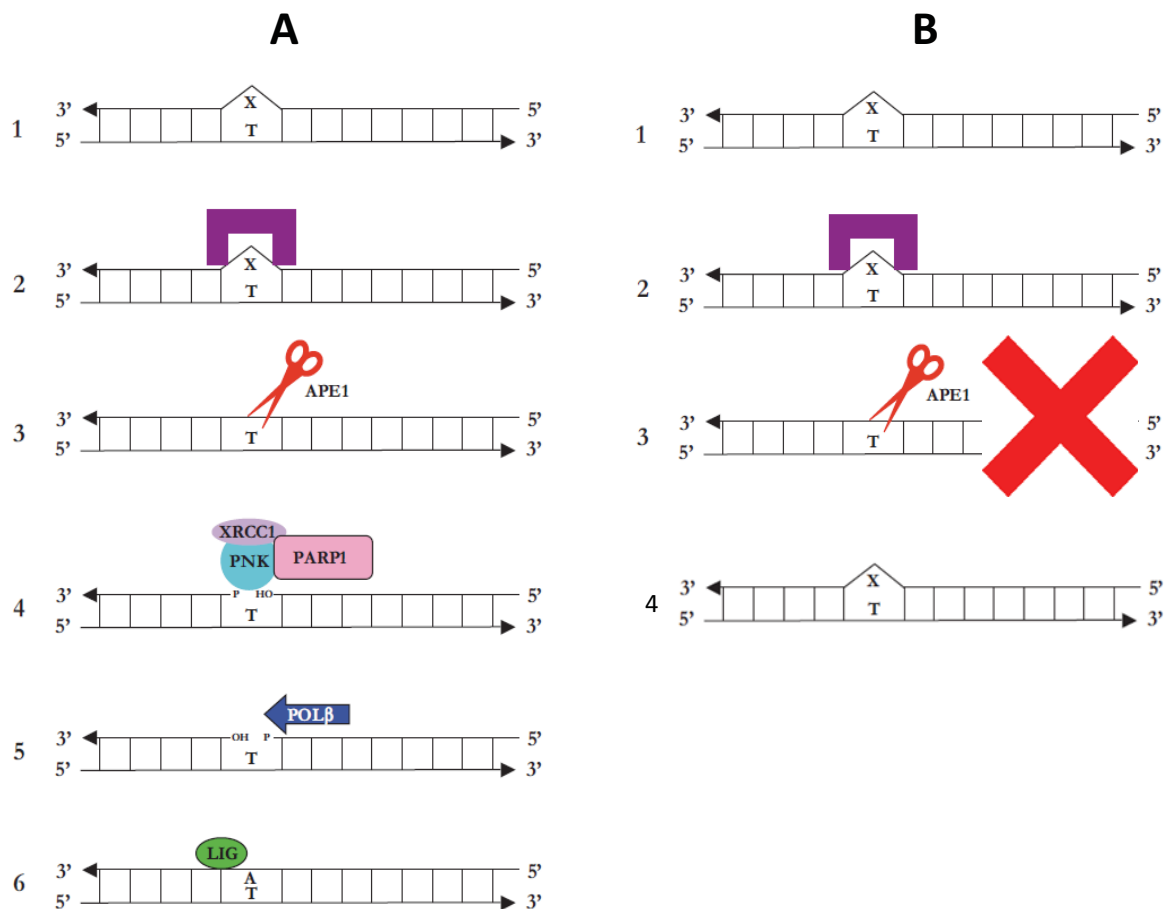
BER : Base excision repair

Les bases oxydées sont généralement réparées par le système BER. Les résidus oxydés sont fortement délétères à l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes. Une dysfonction de ce système entraîne une absence de réparation de la base oxydée pouvant mener à la décondensation et/ou la fragmentation de l'ADN spermatique. Ce système de réparation coupe spécifiquement (hydrolyse) la base anormale et la remplace par une base normale. Ce système peut assurer les réparations par excision de mutations endogènes concernant jusqu'à 4 nucléotides. L'ADN glycosylase coupe la liaison N-glycosidique entre la base anormale et le désoxyribose. Il y a uniquement extraction de la base sans coupure de la liaison phosphodiester. Ensuite, une endonucléase 3'-5' coupe la liaison phosphodiester adjacente. L'ADN polymérase bêta enlève le site et synthétise le morceau d'ADN manquant. Enfin, le phénomène de ligation permet de retrouver un ADN normalement constitué grâce à une ADN-ligase qui remet en place la liaison phosphodiester manquante. Chez l'Homme, il existe actuellement 11 ADN glycosylases connues (Jacobs and Schär, 2012 ; Figure 29). Le 8-OHdG est principalement réparé par l'ADN glycosylase, OGG1. Les autres éléments du système BER ne sont pas exprimés dans le spermatozoïde humain, notamment la protéine AP1 nécessaire à la synthèse d'extrémités 3'-OH, il est donc impossible pour le spermatozoïde d'insérer un nouveau nucléotide en lieu et place d'un 8-OHdG (Hoeijmakers, 2001; Pourquier and Robert, 2011; Smith *et al.*, 2013 ; Figure 30). Cela implique que toute formation de résidus 8-OHdG dans l'ADN du spermatozoïde humain doit être corrigée par l'ovocyte au moment de la fécondation ou avant la phase de réplication du zygote.

NER : Nucleotide excision repair (Global genome repair GGR)

En plus du système BER qui possède des enzymes spécifiques pour reconnaître les lésions de l'ADN, le système NER (Réparation par excision de nucléotides) permet de reconnaître et de

FIGURE 30



Spermatogenèse défectueuse

A- Réparation par excision de base (BER) dans les cellules somatiques

La base endommagée (X) est éliminée par une ADN glycosylase spécifique et l'ADN est incisé par l'endonuclease APE1 au niveau du site abasique formé. Les protéines XRCC1 et PARP1 interviennent alors et recrutent une polynucléotide kinase qui phosphoryle l'extrémité 5-OH et déphosphoryle l'extrémité 3-P au niveau de la coupure. Cette étape est indispensable pour la restauration de la liaison phosphodiester par l'ADN polymérase. La base manquante est simplement remplacée par l'ADN polymérase et la ligation est réalisée par l'ADN ligase 3.

B- Système d'excision de base (BER) dans les spermatozoïdes

La protéine AP1 du système BER, nécessaire à la synthèse d'extrémités 3'-OH, n'étant pas exprimés dans le spermatozoïde humain il est impossible pour le spermatozoïde d'insérer un nouveau nucléotide et donc d'éliminer la base endommagée.

(D'après Pourquier et Robert, 2011)

réparer par excision les lésions volumineuses qui déforment structurellement la double hélice. D'après (Stringer *et al.*, 2018), les systèmes de réparations BER et NER sont complémentaires en particulier pour la réparation des dommages oxydants de l'ADN. NER répare préférentiellement les lésions dues aux ultraviolets et aux chimiothérapies comme la Cisplatine. Il y a reconnaissance et ouverture de l'hélice formant une « bulle d'ADN » dénaturée. Puis il y a incision de l'oligonucléotide contenant la lésion, resynthèse de la portion excisée et ligation pour le rétablissement de la continuité du brin (Schärer, 2003). C'est une voie complexe impliquant la présence de 30 protéines. La nucléase d'excision humaine enlève au niveau de l'erreur toute ou partie d'une série de nucléotides encadrant cette erreur. Après excision des deux côtés de la lésion, des oligos de 24-32 nucléotides sont enlevés. Puis les DNA polymérases delta et epsilon réalisent les réparations. NER « global » intervient sur l'ADN génomique indépendamment de la transcription (Nospikel, 2009).

Expression des enzymes antioxydantes

Il est observé chez les patients infertiles un polymorphisme des gènes codant pour des antioxydants tels que Nrf2, SOD, NOS, GPx, CAT (Yu *et al.*, 2012; Yu and Huang, 2015). Leur expression est dépendante des ERO environnementaux mais également de l'expression de gènes intervenant dans le cycle cellulaire (Kang and Rosenwaks, 2018). En effet P53 permet la régulation et l'activation de certains gènes antioxydants notamment les gènes codants pour Nrf2, GPx et l'aldehyde deshydrogénase 4. Son rôle est crucial lors de la spermiogenèse, durant la prophase de méiose, où l'ARNm et la protéine P53 sont présents dans les spermatocytes primaires. La perte de fonctionnalité de P53 est associée à une baisse des capacités antioxydantes et donc à l'apparition de dommages oxydants à l'ADN (Menezo, 2006; Bisht and Dada, 2017).

b. Les mécanismes de réparation ovocytaire

Il est maintenant admis que le développement embryonnaire préimplantatoire précoce est presque strictement sous influence maternelle jusqu'à l'activation du génome paternel. Il est donc dépendant de la qualité de l'ovocyte à savoir le contenu en protéines et en ARNs messagers dits « house-keeping ». Il est clairement décrit qu'à la faible qualité spermatique peuvent être associées notamment des anomalies du centrosome affectant la première

division cellulaire, des insuffisances d'activation ovocytaire (liée à la phospholipase zêta), des anomalies chromosomiques et un impact négatif des dommages à l'ADN spermatique, notamment la fragmentation (Guérin *et al.*, 2005). Ces anomalies de l'ADN spermatique sont physiologiquement réparées par l'ovocyte juste après la fécondation. Mais au-delà d'un certain seuil d'altérations, dépendant de la qualité ovocytaire et bien sûr de l'âge maternel, ces dommages ne pourront être totalement réparés, ce qui affectera *de facto* la qualité embryonnaire.

La présence de sites abasiques, non réparés par l'ovocyte notamment par le système BER peut conduire la fragmentation de l'ADN du zygote (Wood *et al.* 1992). L'ovocyte contient tous les éléments de réparation des systèmes BER et NER. Des études ont démontré que le degré d'oxydation des spermatozoïdes affecterait l'aptitude de l'ovocyte à réaliser son activation suite à la fécondation (Morado *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2015).

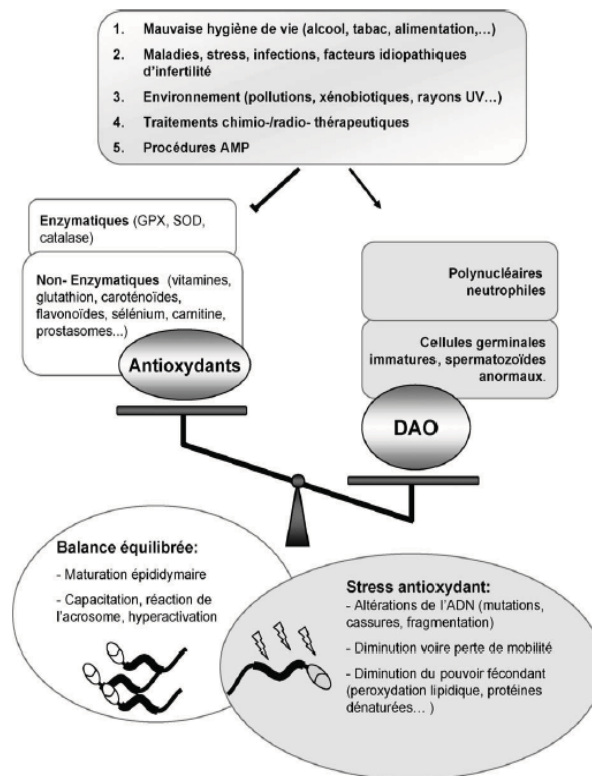
Différents types d'ADN glycosylases reconnaissent et éliminent différents types de bases endommagées (par exemple, uracile glycosylase, 3-méthyladénine glycosylase et UV-endonucléases) et la spécificité de la voie de réparation est déterminée par le type de glycosylase impliqué. Certaines espèces oxydées comme les cyclopurines challengent particulièrement ce système. Celles-ci se caractérisent par la formation d'une deuxième liaison entre la purine et le désoxyribose dans le squelette de l'ADN, ce qui les rend difficiles d'accès par les enzymes du système BER, alors qu'elles constituent de bons substrats pour NER. De même, en cas de forte peroxydation des lipides le malondialdéhyde (MDA) mène à la formation d'adduit de l'ADN rendant le système BER inefficace, alors qu'ils ne sont que des adduit volumineux pour le système NER.

Des altérations spontanées de l'ADN peuvent se produire lors de la réplication de l'ADN en raison d'une mauvaise incorporation de dNTP. Lorsqu'une base est anormalement placée, le triplet correspondant ne sera pas reconnu. La voie de la réparation par mismatch (MMR) permet d'enlever les nucléotides mal assemblés et répare l'ADN (par exemple, le complexe MSH2 – MSH6 initie la réparation des petits mésappariements de nucléotides). Ce système peut aussi réparer les erreurs d'oxydations de type 8-oxo-G, O6-MeG, o4-MeT. Là encore, les bases endommagées sont éliminées par une ADN glycosylase spécifique du type de

dommage. L'ADN est incisé par l'endonucléase APE1 au niveau du site abasique formé. Les protéines XRCC1 et PARP1 interviennent alors et recrutent une polynucléotide kinase qui phosphoryle l'extrémité 5'OH et déphosphoryle l'extrémité 3'P au niveau de la coupure. C'est une étape indispensable pour la restauration de la liaison phosphodiester par l'ADN polymérase. La persistance d'une lésion de l'ADN spermatique est révélatrice d'un déficit du MMR à réparer les gènes dont le rôle est primordial dans la recombinaison méiotique. Les protéines MMR, Mlh1 et Msh2, ont été rapportées comme déficientes en cas d'infertilité, pouvant perturber les synapses chromosomiques via l'inactivation de P53, gardien du cycle cellulaire (Devouassoux-Shisheboran *et al.*, 2001).

En 2005, l'équipe de Tesarik *et al.*, en 2005, amène une nouvelle hypothèse selon laquelle l'hormone de croissance (Growth Hormone – GH) améliorerait la qualité ovocytaire. L'une des cibles de la GH présent dans l'ovocyte est la stimulation des mécanismes de réparation, pouvant potentiellement améliorer les grossesses évolutives en cas d'état de stress cellulaire ou de dommages à l'ADN, notamment en ce qui concerne la fragmentation (Thompson *et al.*, 2000). Une augmentation d'expression de certains gènes clés impliqués dans le contrôle et la réponse au stress cellulaire (cf : GADD45- DNA damage inducible gene 45 et APEN- apurinic endonuclease) a été mise en évidence. Leur action inhibe la croissance mitotique et active les enzymes de réparation de l'ADN et des facteurs de transcription. En effet, dans les cas de patientes considérées comme « faibles répondeuses », une supplémentation en GH améliore significativement les taux de grossesse clinique et de naissance vivante *versus* un groupe placebo (Tesarik *et al.*, 2002; Duffy *et al.*, 2010).

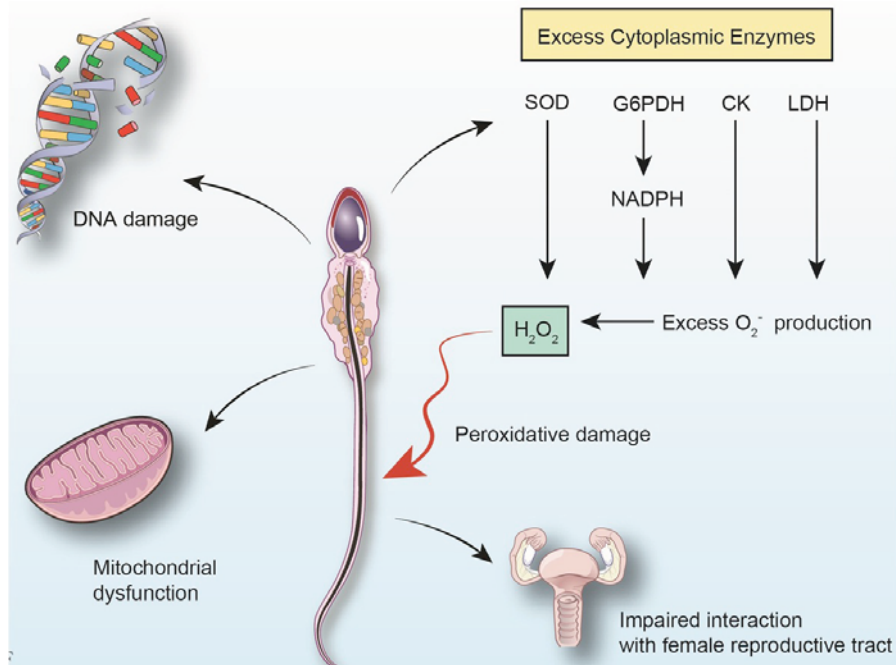
FIGURE 31



Résumé de l'équilibre entre la production de DAO et les systèmes antioxydants

AMP: Assistance médicale à la procréation ; DAO: Dérivés actifs de l'oxygène (Rejraji *et al.* 2009)

FIGURE 32



Spermatogenèse défectueuse

Illustration des effets de l'excès de cytoplasme résiduel (ECR)

- Peroxydation des lipides membranaires
- Dommages à l'ADN
- Dysfonction mitochondriale
- Altération de fonction du spermatozoïde dans les voies génitales féminines (D'après Rengan *et al.* 2012)

IV. Les étiologies des altérations du noyau spermatique en lien avec la fertilité

L'équilibre entre la production d'ERO et les systèmes antioxydants est résumé dans la figure 31 (Pons-Rejraji *et al.*, 2009). En effet, pléthore d'étiologies peuvent être à l'origine des différents dommages de l'ADN spermatique. L'étiologie peut être unique et indépendante ou le plus souvent multiple et interdépendante. Un déséquilibre ou des mécanismes de régulation défectueux sont des étiologies intrinsèques des altérations du noyau spermatique. Je développerai ici différentes étiologies extrinsèques retrouvées dans la population de patients infertiles.

IV.1. Les étiologies intrinsèques

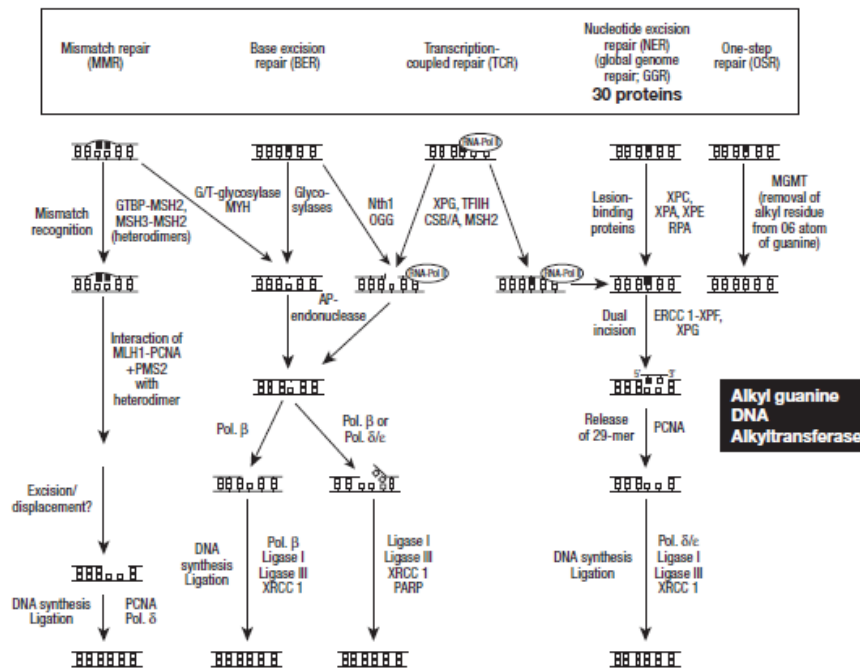
a. Spermatogenèse défectueuse

Au cours de la spermatogenèse, les spermatides allongées perdent physiologiquement leur cytoplasme, condition nécessaire pour qu'ils acquièrent un pouvoir fécondant. Cependant, les spermatozoïdes endommagés peuvent conserver un excès de cytoplasme autour de la pièce intermédiaire. On parle d'excès de cytoplasme résiduel (ECR). L'ECR active le système de la NADPH, qui aboutit à une production d'espèces réactives de l'oxygène. La présence de quantité élevée de cellules germinales ou de spermatozoïdes morphologiquement anormaux dans le sperme est généralement associée à un stress oxydant.

Normalement, les spermatozoïdes produisent un faible niveau d'ERO par leurs mitochondries. Physiologiquement les ERO déclenchent et modulent la phosphorylation de la tyrosine, pour exemple, qui suscite des fonctions essentielles comme la capacitation et la réaction acrosomique. Lorsque les niveaux des ERO sont élevés, comme c'est le cas avec l'ECR, les spermatozoïdes sont limités dans leur capacité à éradiquer le surplus. Ceci est généralement dû à la présence de chaînes de transport d'électrons dans la membrane plasmique, les oxydases ou oxydoréductases. L'ECR peut être caractérisé par des dommages de l'ADN mitochondrial et nucléaire avec des lésions membranaires et fonctionnelles notamment dans les voies génitales féminines (Rengan *et al.*, 2012 ; Figure 32). L'ECR contient un niveau élevé de G6PDH, entraînant une plus grande production de NADPH lequel

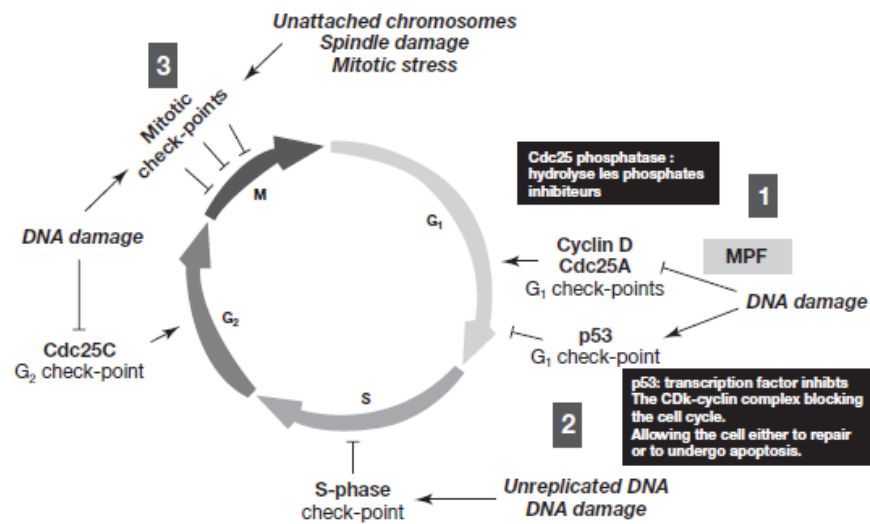
FIGURE 33

A



Systèmes ovocytaires de réparation de l'ADN spermatiques

B



Les points de contrôles cellulaires

A. Les différents types de systèmes ovocytaires de réparation de l'ADN spermatiques

B. Localisation temporelle des altérations de l'ADN spermatique et des points de contrôles au niveau cellulaire

(Communication de Menezo Y 2006, d'après Rajewsky et Muller 2005)

est à l'origine des ERO. L'anion superoxyde, $O_2^{\cdot-}$ est converti en H_2O_2 via la SOD, enzyme couramment retrouvée dans l'ECR.

b. Les mécanismes de réparation insuffisants ou défectueux

Les systèmes de réparations spermatiques ou ovocytaires cités dans la partie III.2 peuvent être défectueux ou insuffisants.

Certains éléments du système BER n'étant pas exprimés dans le spermatozoïde humain, notamment la protéine AP1 nécessaire à la synthèse d'extrémités 3'-OH, il est impossible pour le spermatozoïde d'insérer un nouveau nucléotide (Hoeijmakers, 2001; Pourquier and Robert, 2011; Smith *et al.*, 2013). Cela implique que toute formation de résidus 8-OHdG dans l'ADN du spermatozoïde humain doit être corrigée par l'ovocyte au moment de la fécondation ou avant la phase de réplication du zygote. Si la réparation ovocytaire est dépassée ou défectueuse cela peut conduire à la fragmentation de l'ADN du zygote (Wood *et al.*, 1992). Il a été démontré que le degré d'oxydation des spermatozoïdes affecterait également l'aptitude de l'ovocyte à réaliser son activation suite à la fécondation (Morado *et al.*, 2013 ; Park *et al.*, 2015).

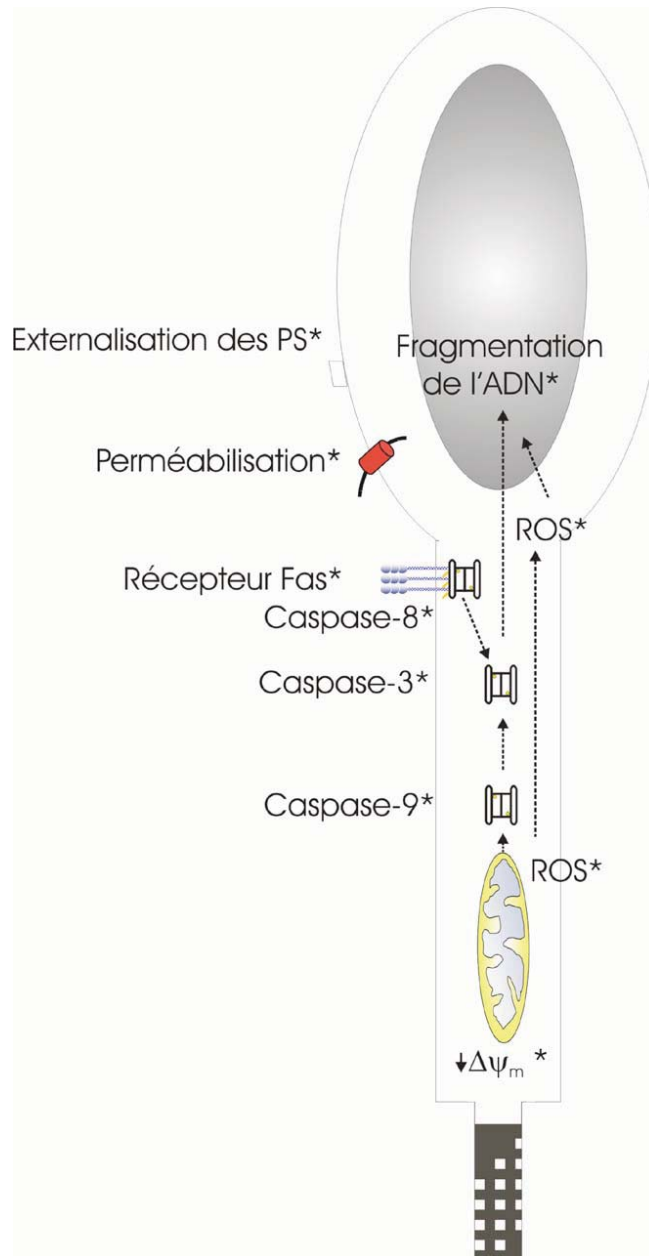
Dans le cas où les mécanismes de réparation par l'ovocyte ne suffisent pas, l'embryon peut échouer à se développer ou à réaliser sa nidation. La persistance de résidus 8-OHdG non réparés a le potentiel pour développer des mutations *de novo*, qui éventuellement peuvent conduire à l'apparition de pathologies dans la descendance. Il existe un « Check point » des dommages en phase G1 et d'autres en phase S et G2 du cycle cellulaire. Des systèmes de destruction en cas d'erreur importante non réparables existent cependant (Menezo, 2006); Figure 33 A et B).

c. Apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée permet d'éliminer physiologiquement de cellules surnuméraires, âgées, endommagées, dans toutes les cellules de l'organisme, y compris les cellules germinales.

Une apoptose est observée lors d'une spermatogenèse normale efficace dans le testicule adulte. Elle permet de contrôler l'expansion clonale des cellules germinales, le maintien du ratio optimal entre le nombre de cellules de Sertoli et le nombre de cellules germinales, la

FIGURE 34



Représentation schématique des voies apoptotiques hypothétiques présent dans le sperme éjaculé de patients infertiles

Les voies apoptotiques extrinsèques débutent par l'engagement des récepteurs de mort (ex. Fas), suivies par l'activation de la caspase-8, puis de la caspase-3, qui précède la fragmentation de l'ADN. Ces voies extrinsèques provoquent également la libération mitochondriale de facteurs proapoptotiques, pour conduire à l'activation de la caspase-3. L'implication des mitochondries dans l'apoptose est associée à des altérations fonctionnelles mitochondriales, caractérisées par une chute du potentiel de membrane mitochondrial. * : Marqueurs associés à l'apoptose retrouvés dans spermatozoïdes de patients infertiles. $\Delta \psi_m$: potentiel membranaire mitochondrial ; PS : Phosphatidylsérine ; ROS : Espèces réactives de l'oxygène (D'après Marchetti and Marchetti, 2005)

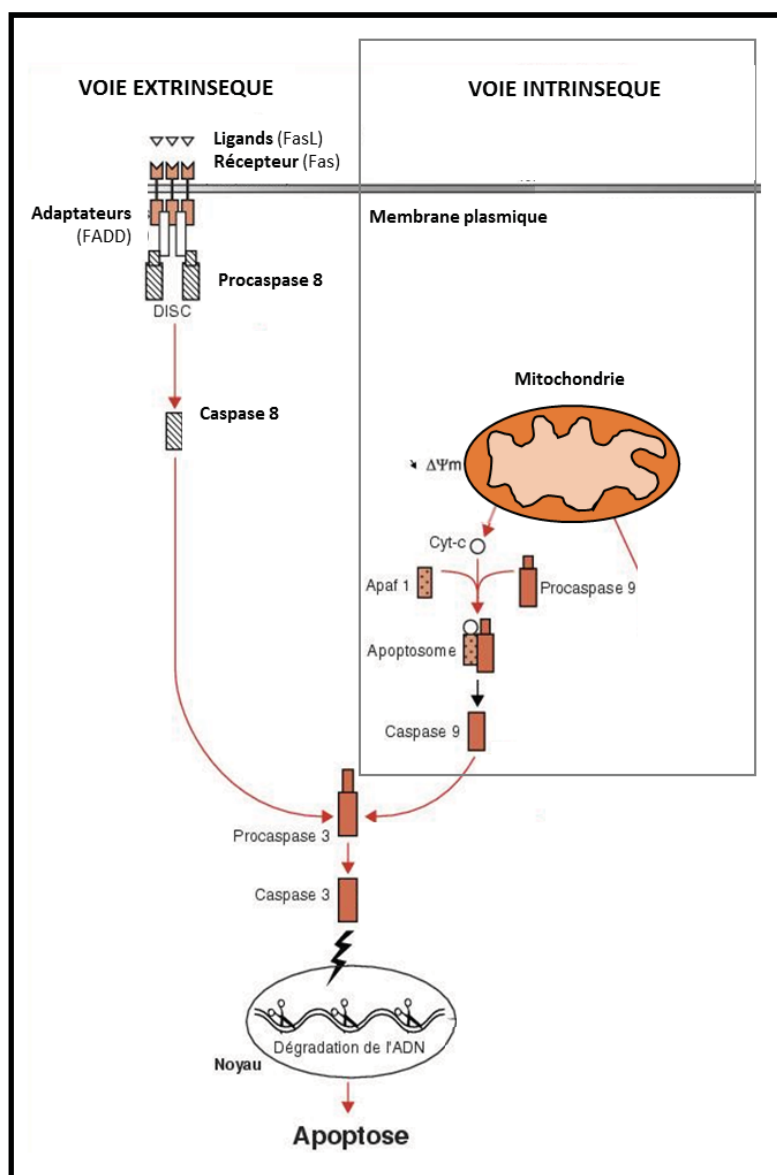
formation de la barrière hémato-testiculaire *via* la formation de jonctions serrées entre les cellules de Sertoli (Johnson, 1986; Print and Loveland, 2000). Enfin, l'apoptose rend compte de l'élimination des cellules germinales avec des anomalies de réarrangements de la méiose ou des cassures de l'ADN (Blanco-Rodríguez *et al.*, 2003) et des corps résiduels lors de la spermiogenèse (Tesarik *et al.*, 2002).

L'excès ou le défaut d'apoptose s'inscrit dans la physiopathologie de nombreux états pathologiques comme l'infertilité masculine (Jacobson *et al.*, 1997). Les altérations oxydantes des spermatozoïdes décrites ci-dessus peuvent conduire à des pertes de fonction et d'intégrité, voire à la mort cellulaire notamment par l'intermédiaire de l'apoptose.

L'ultime étape de l'apoptose est la dégradation des corps apoptotiques par les cellules avoisinantes ayant des fonctions de phagocytose. Morphologiquement on retrouve une réduction du volume de la cellule (pycnose), de la condensation de la chromatine, de la fragmentation du noyau (karyorrhexis). Des signes biochimiques sont aussi caractéristiques tels que l'activation des caspases, la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, la chute du potentiel de membrane mitochondriale interne, la fragmentation de l'ADN et l'exposition des phosphatidylsérines sur le feuillet externe de la membrane plasmique (Marchetti, 2005). Ce dernier propose une représentation schématique des voies apoptotiques hypothétiques présentes dans les spermatozoïdes des patients infertiles (Figure 34).

Ainsi, les ERO peuvent endommager l'ADN spermatique directement ou indirectement à travers l'activation des caspases et endonucléases spermatique. Les ERO peuvent initier l'apoptose en activant l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP) par action directe (Skulachev, 1996; Mruk and Cheng, 2015). Selon certains auteurs, l'ouverture du pore induit par les ERO serait consécutive à l'oxydation d'un groupement thiol constituant ce pore (Vercesi *et al.*, 1997 ; Kowaltowski *et al.*, 2001). C'est la voie intrinsèque d'activation de l'apoptose. L'activation des PTP provoque un gonflement mitochondrial résultant de l'entrée dans la matrice de composés osmotiquement actifs. Suite à ce gonflement, la membrane externe peut se rompre et entraîner la sortie de molécules pro-apoptotiques comme le cytochrome C. Celui-ci est alors relargué et interagit avec Apaf-1 (Apoptosis Activating Factor-1) et la pro-caspase 9. Ce qui a pour conséquence l'activation de la cascade des caspases déclenchant l'apoptose (Green and Reed, 1998), formant ainsi l'apoptosome et la

FIGURE 35



Voies extrinsèque et intrinsèque d'induction de l'apoptose

La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort, tels que Fas, est activée après fixation de leurs ligands respectifs (FasL) et formation du complexe DISC (*death inducing signalling complex*). Ce dernier induit l'activation de la procaspase initiatrice 8.

La voie intrinsèque ou voie mitochondriale est caractérisée notamment par une dépolarisation de la membrane mitochondriale externe ($\downarrow \Delta\Psi_m$) et la libération du cytochrome c (Cyt-c) dans le cytosol. Ce dernier s'associe avec la protéine adaptatrice Apaf1 (*apoptotic protease-activating factor-1*) et la procaspase 9, pour former l'apoptosome. La procaspase 9, après clivage de son prodomaine N-terminal, est alors activée en caspase 9 inductrice. Par ailleurs, d'autres protéines pro-apoptogènes peuvent être libérées de la mitochondrie vers le cytosol : l'AIF (*apoptosis-inducing factor*) et l'EndoG (*endonuclease G*) qui induisent le clivage de l'ADN.

Les deux voies aboutissent à l'activation de la procaspase 3 en caspase 3 exécutive, responsable de l'activation d'enzymes qui induisent le clivage nucléotidique. Ces deux voies apparaissent non exclusives ; FADD : *Fas-associated death domain* (D'après Blondel B et al. 2006).

caspase 9 activée. L'ouverture du PTP est très finement régulée. Le calcium matriciel apparaît comme étant son inducteur le plus puissant, nécessaire et suffisant (Bernardi, 1999).

Les ERO sont naturellement générés par le spermatozoïde afin d'induire la phosphorylation de la tyrosine de la sous unité p105 du facteur nucléaire NF-Kappa B et de la protéine Ezrine, nécessaire pour la capacitation. Or cette même protéine, encore appelée cytovilline, interagit avec Fas, un ligand de surface déclencheur de l'apoptose. Cette voie apoptotique extrinsèque débute ainsi par l'engagement des récepteurs de type Fas (Apoptosis stimulating fragment ou fragment inducteur de l'apoptose), suivies par l'activation de la caspase-8, puis de la caspase-3, qui précède la fragmentation de l'ADN (Marchetti *et al.*, 2004; Marchetti, 2005; Marchetti and Marchetti, 2009). Ces voies extrinsèques provoquent également la libération mitochondriale de facteurs proapoptotiques, pour conduire à l'activation de la caspase-3. Il y a donc une boucle d'autoactivation rétroactive des caspases effectrices vers la mitochondrie. L'implication des mitochondries dans l'apoptose est associée à des altérations fonctionnelles mitochondriales, caractérisées par une chute du potentiel de membrane mitochondrial (Bisht and Dada, 2017). De nombreuses études suggèrent que le système Fas– Fas Ligand est important pour le privilège immunitaire conféré au testicule et qu'il contrôle également l'apoptose testiculaire. Fas (CD95/APO-1) est un récepteur de mort, protéique et transmembranaire qui appartient à la superfamille des récepteurs du TNF/NGF (*Tumor Necrosis Factor* et *Nerve Growth Factor*). L'interaction spécifique de Fas avec son ligand, Fas ligand (FasL), conduit au suicide de la cellule qui porte le récepteur Fas à travers le recrutement de molécules de signalisation par la portion intramembranaire de Fas (Filippini *et al.*, 2001). Les voies extrinsèques et intrinsèques se rejoignent au niveau de l'activation de la caspase 3 qui clive ses substrats et induit l'apoptose (Figure 35).

IV.2. Les étiologies extrinsèques

Les altérations du noyau spermatiques sont nombreuses et variées, souvent associées. Je vais m'intéresser tout particulièrement au mode de vie, à la prise de toxiques, aux expositions environnementales, aux effets des thérapeutiques et l'influence de pathologies courantes à la fois du tractus génital mais aussi systémiques. Enfin j'évoquerai les effets des

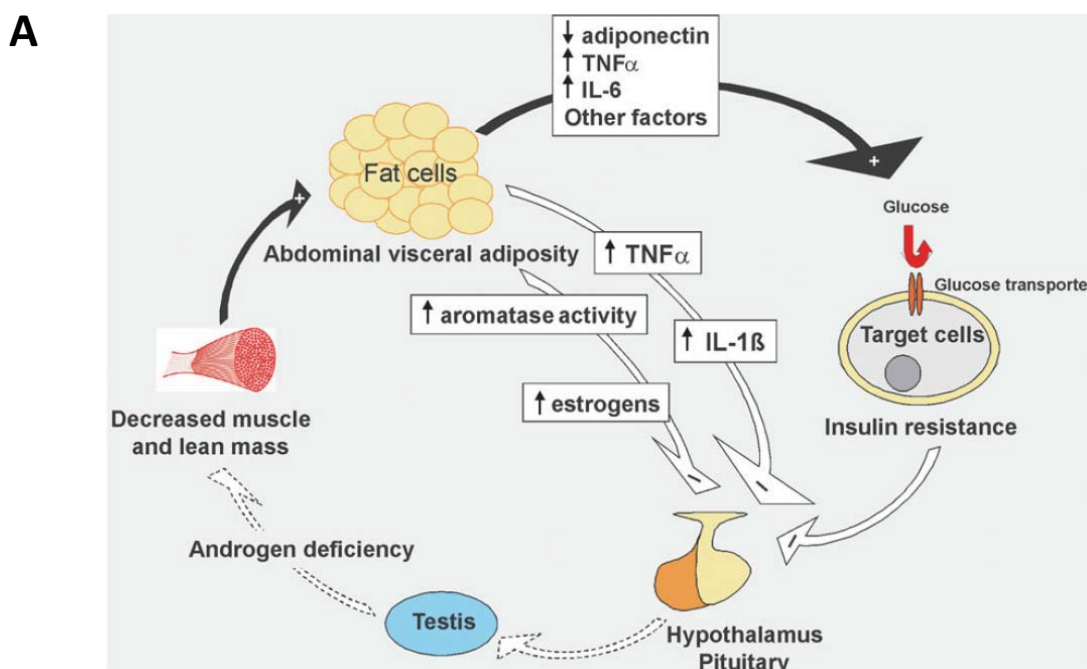
techniques mises en œuvre en AMP pouvant être elles-mêmes sources de fragmentation, de décondensation anormales et/ou d'oxydation de l'ADN spermatique.

a. Age

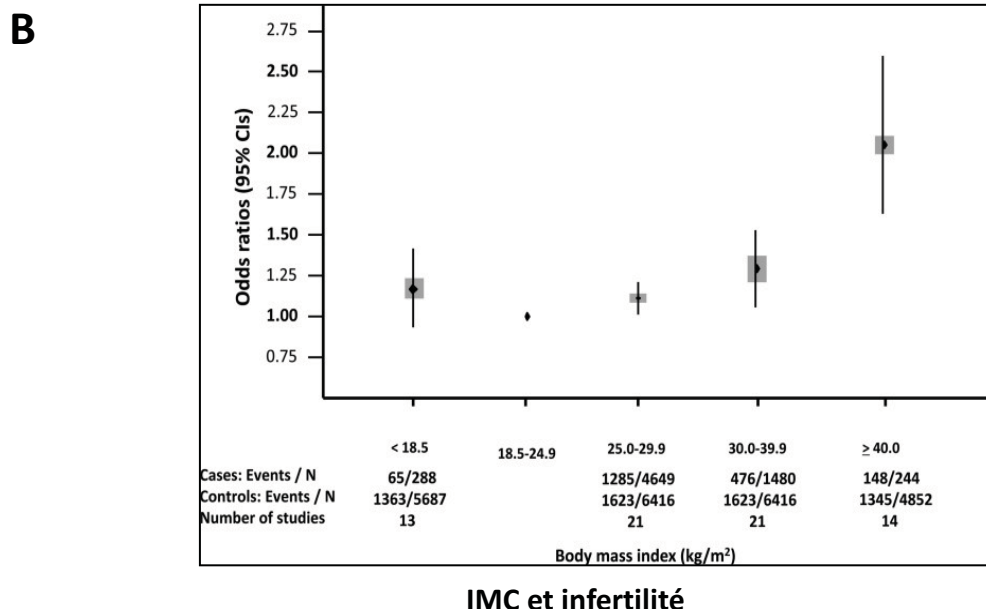
Au-delà de 37 ans on observe une diminution de la stéroïdogénèse. Le vieillissement testiculaire se manifeste par une diminution de la fonction gonadique, soit une diminution de la production de testostérone. En parallèle, l'augmentation de la concentration plasmatique de FSH et la diminution de la concentration circulante en inhibine B chez les sujets « agés » rendent compte des altérations fonctionnelles des tubes séminifères (Haidl *et al.*, 1996). Des modifications histologiques avec de grandes variations interindividuelles, sont observées avec un appauvrissement progressif de la vascularisation liée à une sclérose artériolaire et une diminution progressive de la densité des capillaires entourant les tubes séminifères (Takizawa and Hatakeyama, 1978). En observation morphologique, on retrouve une baisse du nombre de cellules de Leydig, de Sertoli et de la production de spermatozoïdes accompagnées d'un épaissement de la membrane basale (Johnson, 1986). Ces auteurs suggèrent un lien entre l'âge paternel et modifications de l'environnement testiculaire, particulièrement l'augmentation des ERO produites par les mitochondries (Escobar-Morreale *et al.* 2017).

Il n'y a pas chez l'homme comme chez la femme d'arrêt brutal des fonctions gonadiques endocrine et exocrine. On observe dans une méta-analyse (Kidd *et al.*, 2001) une diminution des caractéristiques spermatiques particulièrement du volume, de la mobilité ainsi que du pourcentage de formes typiques. En effet, il a été mis en évidence une baisse de la mobilité de 0.6% par an (soit 12% entre 30 et 50 ans) et une augmentation de la tératozoospermie de 0.9% par an (soit 18% de 30 à 50 ans) (Auger *et al.*, 1995). Les variations de la numération spermatiques sont plus discutées. En effet, tout récemment, l'équipe de Kaarouch, ne met pas en évidence de différence significative des caractéristiques spermatiques standards entre des patients âgés de plus de 40 ans et de moins de 40 ans pris en charge en FIV (Kaarouch *et al.*, 2018). Cependant, cette même équipe a mis en évidence une augmentation significative de la fragmentation de l'ADN spermatique (de 41% vs 25% pour les patients de moins de 40 ans), de la décondensation de l'ADN spermatique (43% vs 23% pour les moins

FIGURE 36



Adiposité abdominale et hypogonadisme associée à l'obésité masculine (MOSH)



IMC et infertilité

A. L'interaction entre adiposité abdominale et hypogonadisme associée à l'obésité masculine (MOSH) : La carence en androgènes diminue la masse musculaire et la masse maigre, augmentant ainsi la quantité relative de tissu adipeux viscéral. La graisse viscérale facilite le déficit en androgènes par inhibition de la sécrétion de gonadotrophines au niveau hypothalamo-hypophysaire par l'action combinée d'une augmentation de l'activité l'aromatase, la production d'œstrogènes, l'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. (D'après Escobar-Morreale *et al.* 2014).

B. IMC et infertilité : Numération spermatique (Sermondade *et al.* 2013)

de 40 ans) et de la proportion de spermatozoïdes aneuploïdes (14% vs 4% retrouvés chez les moins de 40 ans).

A âge féminin constant, on observe en reproduction naturelle, une diminution de chances de grossesse (de 32 à 17%) et une augmentation de risques de fausses couches spontanées (de 42% à 60%) lorsque l'âge paternel est supérieur à 40 ans. De même, en AMP, des travaux rapportent une augmentation de 60% du délai nécessaire pour concevoir entre 30 et 50 ans et une diminution des taux de grossesse (Wagner, 2004).

La dégradation de la fertilité masculine avec l'âge s'associe également à une augmentation des risques génétiques pour la descendance (Auroux, 1983). On retrouve tout particulièrement une augmentation de l'incidence des mutations autosomiques dominantes ou des aberrations chromosomiques à l'origine de nombreuses malformations ou perturbations fonctionnelles. Ainsi, au-delà de 44 ans, 13% des gamètes sont porteurs d'anomalies de structures (Martin and Rademaker, 1987).

b. Liées au mode de vie

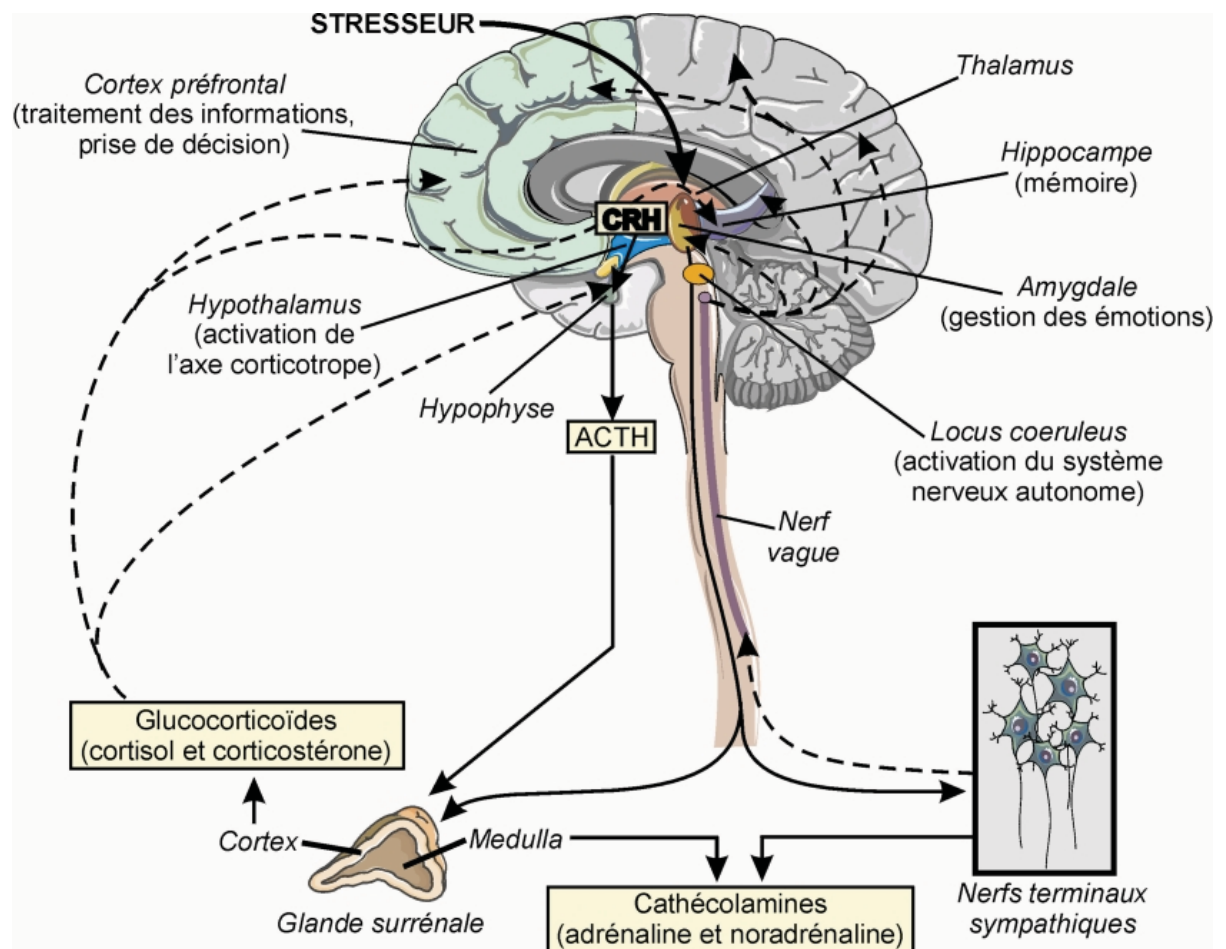
• Impact de l'indice de masse corporelle (IMC)

L'obésité masculine est une cause potentielle d'infertilité et un facteur de mauvais pronostic en AMP. L'obésité masculine ($IMC > 30 \text{ kg/m}^2$) est essentiellement androïde. Escobar-Morreale et al, ont décrit récemment l'interaction entre l'adiposité abdominale et l'hypogonadisme associé à l'obésité masculine (MOSH) (Escobar-Morreale *et al.*, 2017). Ainsi, la carence en androgènes diminue la masse musculaire et la masse maigre, augmentant la quantité relative de tissu adipeux viscéral. Elle induit des altérations de l'axe hypothalamo-hypophysaire secondaires à divers mécanismes endocriniens comme l'augmentation de cytokines inflammatoires, l'aromatisation des androgènes testiculaires et surrénaliens en œstrogènes dans le tissu adipeux excédentaire ou la production excessive d'opioïdes endogènes, inhibant ainsi la sécrétion pulsative de GnRH hypothalamique (Escobar-Morreale *et al.*, 2017 ; Figure 36A).

Un état de stress oxydant systémique est observé en cas d'obésité *via* une activation immunitaire chronique ou/et la production de cytokines pro-inflammatoires par les tissus adipeux ou bien une action locale via l'activation macrophagique dans le liquide séminal et le métabolisme oxydatif dans le sperme. Des anomalies qualitatives et quantitatives du

spermogramme sont aussi retrouvées chez les patients obèses, en particulier associé à une diminution de la numération spermatique et à une augmentation de l'index de fragmentation de l'ADN spermatique (Kort *et al.*, 2006; Cabler *et al.*, 2010; La Vignera *et al.*, 2012). Vujkovic *et al.*, en 2009 rapportent des variations significatives de l'index de fragmentation de l'ADN spermatique et de la numération des spermatozoïdes en fonction du régime alimentaire de patients infertiles. En effet une méta-analyse de 2013 rapporte un risque d'oligozoospermie voire d'azoospermie en fonction de l'IMC (Sermondade *et al.*, 2013 ; Figure 36B). De plus, les toxines environnementales ou perturbateurs endocriniens (PE) sont liposolubles et ont tendance à s'accumuler dans les tissus adipeux. Ainsi, les patients obèses, dont la réserve adipeuse est plus importante sont plus à risque d'être exposé à ces PE. A cela se rajoute l'augmentation de la température testiculaire altérant la spermatogenèse du fait de la diminution de l'activité physique, la position assise prolongée (*via* l'augmentation du tour de taille) et de l'augmentation du tissu adipeux scrotal (Ivell, 2007). Dans le cadre de l'AMP, une mauvaise alimentation source d'obésité chez l'homme réduit significativement les taux de naissances vivantes par cycle (Campbell *et al.*, 2015; Gaskins and Chavarro, 2018). Les effets de la chirurgie bariatrique sont controversés mais plusieurs auteurs rapportent une augmentation significative des taux de testostérone sérique ainsi que de la concentration, la vitalité et le pourcentage de formes typiques ainsi qu'une baisse la fragmentation de l'ADN spermatique (El Bardisi *et al.*, 2016; Samavat *et al.*, 2018). Une empreinte nutritionnelle paternelle a été mise en évidence par plusieurs auteurs. En effet, il a été observé qu'un père suivant un régime hyper-lipidique donne naissance à des petites filles obèses et diabétiques à l'âge adulte (Ng *et al.*, 2014). De plus le fait d'avoir un parent obèse est un facteur de risque d'obésité pour la descendance (Whitaker *et al.*, 1997). Cependant, il est a noté qu'il en est de même en cas de maigreur importante chez l'homme ($IMC < 18,5 \text{ kg/m}^2$) quelle que soit l'étiologie qui peut aller de la cachexie néoplasique ou infectieuse, aux malabsorptions digestives, en passant par les maladies psychiatriques ou bien liées à une mauvaise alimentation voire un excès d'activité physique. En effet, chez ces mâles maigres, on retrouve des profils hormonaux et des caractéristiques spermatiques identiques que chez les patients obèses (Qin *et al.*, 2007).

FIGURE 37



Mécanismes d'action du stress sur l'axe hypothalamo-hypophysaire
(D'après De Kloet et al. 2005)

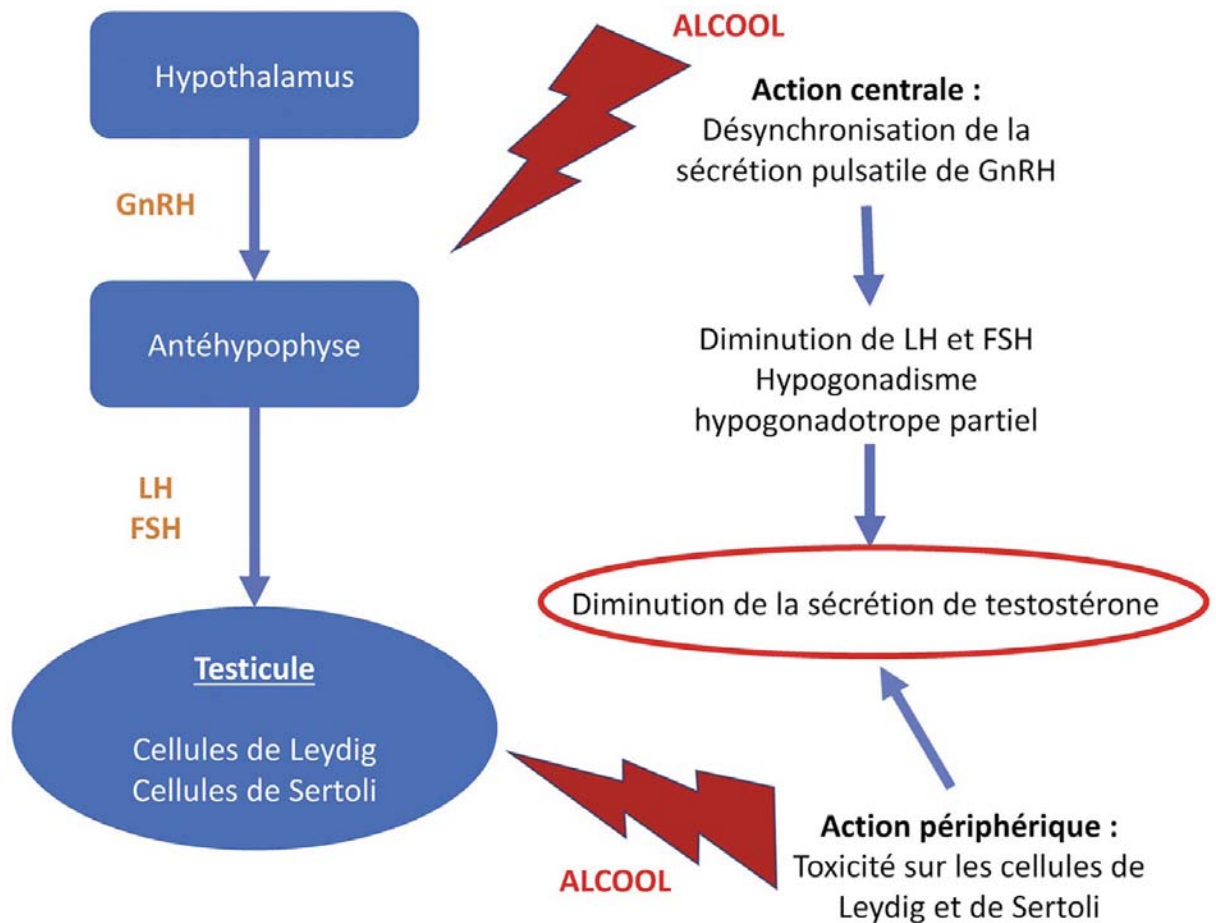
- **Stress**

Le stress est un phénomène d'adaptation du corps qui permet à chaque individu de réagir à son environnement. En 1935, Hans Selye découvre le syndrome général d'adaptation modulé par l'intensité et la durée des facteurs stressant qui sollicite le système hypothalamo-sympathico-adrénergique et le système hypothalamo-hypophyso-surrénal avec une sécrétion importante de catécholamines (De Kloet *et al.*, 2005; Szabo *et al.*, 2012 ; Figure 37). En cas de stress chronique, l'organisme est submergé d'hormones, en permanence activé, s'épuise, ce qui peut aboutir à l'apparition de pathologies chroniques systémiques. Cette action systémique du stress a des conséquences sur la fertilité masculine et tout particulièrement sur les spermatozoïdes. Le stress dans l'infertilité reste encore difficile à diagnostiquer. Néanmoins, une revue de la littérature récente sur la prévalence des troubles psychologiques sur les symptômes d'infertilité a conclu que 25% à 60% des individus infertiles signalent des symptômes psychiatriques et que leurs niveaux d'anxiété et de dépression sont significativement plus élevés que chez les témoins fertiles (De Berardis *et al.*, 2014). Le mécanisme biologique par lequel le stress peut intervenir dans l'infertilité reste à encore à découvrir. Cependant, il est maintenant admis que, physiologiquement, un stress psychologique influence les taux de cortisol, de prolactine, de progestérone et de testostérone (Demyttenaere *et al.*, 1994). En 2010, une étude cas-témoins rapporte une altération de la fertilité chez des patients rapportant un stress modéré à important (El-Helaly *et al.*, 2010). Ainsi, d'autres auteurs rapportent une relation inverse entre l'état de stress émotionnel et les caractéristiques spermatiques (volume de l'éjaculat et le pourcentage de forme typique). Les « burnout » ou stress au travail sont considérablement plus élevés chez des patients présentant des antécédents d'infertilité (Sheiner *et al.*, 2002). Enfin, le stress, y compris la fatigue ou les préoccupations professionnelles et familiales peuvent, bien sûr, altérer la sexualité et entraîner une perte d'intérêt sexuel, la peur de l'échec voire une rupture de la relation sexuelle menant de ce fait à l'infertilité du couple.

- **Hyperthermie**

De nombreuses situations sont susceptibles d'altérer la température scrotale et de perturber la spermatogenèse comme des sources endogènes de chaleur (obésité androïde, varicocèle, épisodes fébriles, cryptorchidie, ...) ainsi que des sources exogènes de posture (station assise

FIGURE 38



**Mécanismes d'action et effets physiopathologiques de l'alcool
sur la fertilité masculine**

GnRH : gonadotrophine releasing hormone ; LH : luteinizing hormone ; FSH : follicle-stimulating hormone (D'après Bendayan M *et al.* 2017)

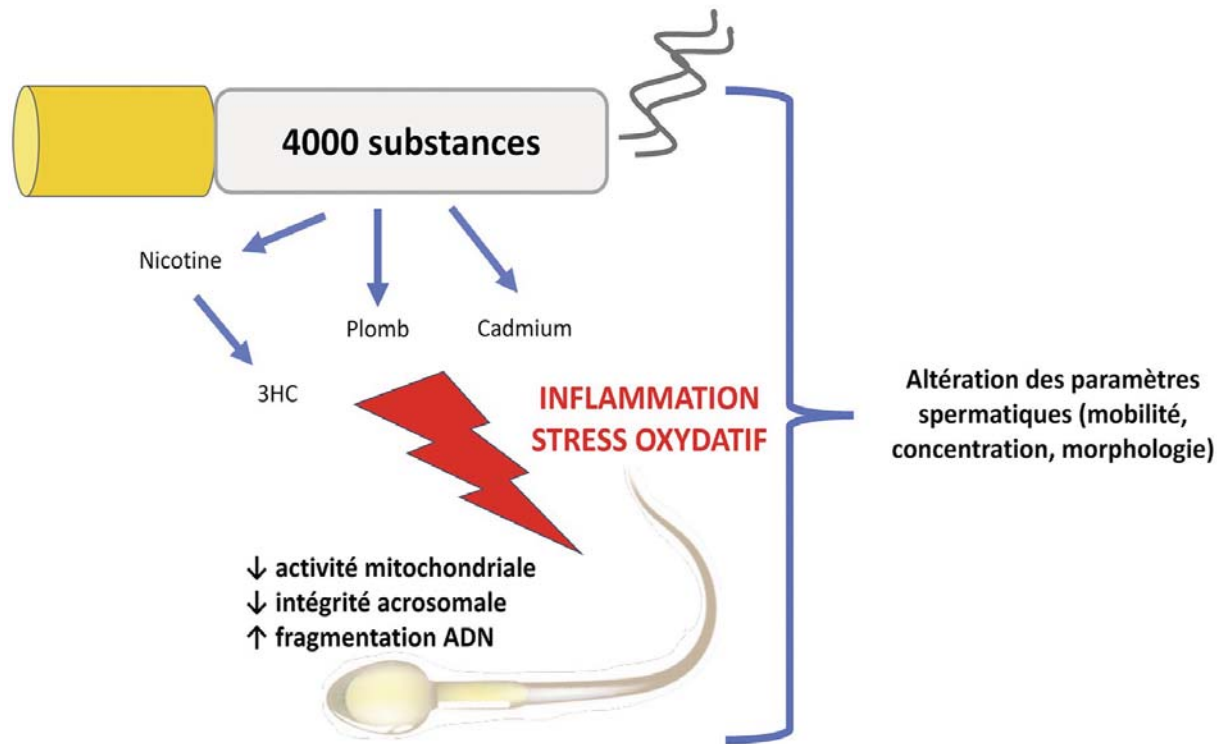
prolongée, jambes croisées, vêtements trop serrés...) ou liées à une activité de loisir (sauna, bains chaud, cyclisme, ...) ou professionnelle (boulangers, restaurateurs, sidérurgiste, conducteurs de véhicules, ... ; Miesusset *et al.*, 2007). Les cellules germinales sont vulnérables et sensibles aux variations de température en raison de leur intense activité mitotique (Shiraishi *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013). Ces effets négatifs sur la qualité et la quantité des spermatozoïdes sont observés en fonction de l'intensité et de la durée d'exposition (Durairajanayagam *et al.*, 2015). L'hyperthermie scrotale induit une apoptose des cellules germinales et une fragmentation de l'ADN spermatique. Une équipe a démontré que même une légère augmentation quotidienne de la température testiculaire pouvait être un mode de contraception potentiel pour les hommes (Miesusset and Bujan, 1995).

c. Consommation de toxiques

- **Alcool**

Selon le rapport de l'institut national de prévention et d'éducation pour la santé INPES (Baromètre santé 2014), 4.6 millions de français consommeraient de l'alcool de manière quotidienne. Les effets de l'éthanol sur l'axe gonadotrope peuvent être centraux ou périphériques. L'alcool agit sur l'axe hypothalamo-hypophysaire en désynchronisant la sécrétion pulsatile de la GnRH (Gonadotrophin releasing hormone) et en générant un hypogonadisme hypogonadotrope partiel (Emanuele and Emanuele, 2001). Une atrophie testiculaire peut aussi être induite ainsi qu'une altération des cellules de Leydig et de Sertoli. De ce fait on observe chez certains patients une augmentation des taux de LH (Luteinizing hormone) et de FSH (follicle-stimulating hormone) associée à une baisse de la testostérone plasmatique, secondaire à un effet testiculaire dû à la consommation d'alcool (Bendayan *et al.*, 2018) (Figure 38). Très tôt, d'après une récente méta-analyse, une exposition alcoolique périnatale aboutit chez le petit garçon à une diminution de la concentration en testostérone, une diminution du volume testiculaire et à une hypospermie associée à une oligospermie (Akison *et al.*, 2019). Plusieurs études retrouvent une altération du spermogramme et du spermocytogramme notamment une diminution significative de la numération spermatique, de la mobilité progressive, de la vitalité ainsi que du pourcentage de forme typique chez les hommes consommant plus de 18 centilitres d'alcool fort par jour depuis plus d'un an (Muthusami and Chinnaswamy, 2005; Gabrielsen and Tanrikut, 2016). Selon Guthauser *et al*

FIGURE 39



Mécanismes d'action et effets physiopathologiques du tabac sur la fertilité masculine

3HC : trans-30-hydroxycotinine (D'après Bendayan M *et al.* 2017)

en 2014, une consommation chronique et excessive d'alcool (plus de 60 grammes par jour soit 6 verres de vin) peut conduire à une azoospermie voir même un arrêt de maturation des cellules germinales à la biopsie testiculaire (Guthauser *et al.*, 2014). Récemment, une équipe a mis en évidence une augmentation de la fragmentation et de la décondensation de l'ADN spermatique en cas de consommation d'alcool (Aboulmaouahib *et al.*, 2018). Une année après l'arrêt de l'intoxication alcoolique, les paramètres spermatiques redeviennent strictement normaux selon les normes du WHO 1999 (Sermondade *et al.*, 2010). Dans le cadre de l'AMP, les chances de succès en FIV (Fécondation *in vitro*) sont aussi touchées par l'alcool. En effet, les taux de naissances vivantes sont significativement diminués lorsque l'homme consomme de l'alcool dans le mois ou la semaine précédant la tentative. Le risque d'échec et le risque de fausse couche précoce sont considérablement augmentés en cas de consommation d'au moins 12 grammes d'alcool par jour pendant au moins 4 jours précédant le recueil de sperme (Klonoff-Cohen *et al.*, 2003).

- **Tabac**

Les mécanismes d'action du tabac sur la spermatogenèse et la qualité spermatique sont multiples. La concentration en métaux lourds comme le plomb et le cadmium anormalement élevée dans le sang et le liquide séminal des fumeurs est un fait. Ainsi une corrélation significative est retrouvée entre les taux de plomb et de cadmium dans le liquide séminal et la concentration, la mobilité et la morphologie spermatique. Un autre mécanisme délétère associé à la consommation de tabac est l'action de la nicotine qui est métabolisée en trans-3'-hydroxycotine (3HC), représenté Figure 39. Sa concentration dans le liquide séminal est corrélée à une baisse de la mobilité spermatique (Pant *et al.*, 2015). De plus, il est maintenant bien documenté que le tabagisme est associé à une inflammation des glandes annexes, provoquant à terme une altération de la qualité fonctionnelle des spermatozoïdes, une diminution de l'intégrité de l'acrosome et de l'activité mitochondriale associée à une augmentation de la fragmentation de l'ADN spermatique (Harlev *et al.*, 2015). Une exposition *in utero* est associée à une puberté précoce, un IMC plus élevé, un petit volume testiculaire associé à une oligospermie et une réduction des hormones liées à la spermatogenèse comme l'inhibine B et la testostérone (Ravnborg *et al.*, 2011). Chez l'homme adulte, de multiples études ont rapportés une diminution significative de la

concentration spermatique, de la mobilité totale et du nombre de spermatozoïdes à forme typiques (Ramlau-Hansen *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2011; Mitra *et al.*, 2012). L'équipe de Ramlau-Hansen *et al.* rapportent également un effet dose. La dose seuil serait de 10 cigarettes par jour pour un effet significatif négatif sur le volume de l'éjaculat, la numération et la mobilité spermatique. Cependant ces auteurs ont mis en évidence un taux de testostérone totale augmenté et une concentration en testostérone libre stable chez les patients fumeurs (Ramlau-Hansen *et al.*, 2007). En outre, le tabac altère la qualité intrinsèque des spermatozoïdes. En effet, la fragmentation de l'ADN spermatique analysée par le test TUNEL est significativement augmentée à 32% chez les fumeurs versus 25,9% chez les non-fumeurs (Sepaniak *et al.*, 2006). De plus, plusieurs auteurs ont mis en évidence l'impact de la consommation de tabac paternelle modifie l'ADN spermatique par l'intermédiaire du stress oxydants, transmissible à la descendance (Linschooten *et al.*, 2013; Beal *et al.*, 2017). En AMP, lors de FIV, on observe une corrélation significative entre la consommation de tabac chez les hommes et le risque de fausses couches spontanées précoces (Firms *et al.*, 2015). En cas d'arrêt d'intoxication tabagique (30 cigarettes par jours pendant 40 ans) Santos *et al.* en 2011, rapportent un effet réversible avec une amélioration de la qualité spermatique : augmentation de la numération de 28,6 à 72,2 millions de spermatozoïdes par éjaculat, de la mobilité de 32,7 à 78,8% et de la vitalité de 40 à 80%.

- **Cannabis**

Le cannabis est la drogue illicite la plus consommée en France. Le delta-9-tetrahydrocannabinol ou THC est la principale substance active, aboutissant à l'activation du système cannabinoïde endogène. Ce THC est responsable de l'inhibition de l'adénylate cyclase et d'une diminution du taux d'AMPc. Ces récepteurs sont ubiquitaires, notamment retrouvés dans le tissu testiculaire et sur les spermatozoïdes, ainsi que dans l'hypothalamus. Le THC joue donc un rôle délétère sur la spermatogenèse par des mécanismes d'action centraux et périphériques (Park *et al.*, 2004). Le THC bloque la libération de GnRH et la production de LH antéhypophysaire. Dans le testicule, on observe une réduction de libération de testostérone par les cellules de Leydig et *via* des récepteurs spécifiques sur les cellules de Sertoli le THC joue un rôle d'activation de l'apoptose pouvant mener à une fragmentation de l'ADN spermatique (Alvarez, 2015). Ainsi plusieurs auteurs ont montré un

effet délétère sur la numération des spermatozoïdes, la vitalité et la mobilité ainsi qu'une altération de la fonction leydigienne par chute des taux de testostérone dans le sérum et ce de manière dose-dépendante (Kolodny *et al.*, 1974; Gundersen *et al.*, 2015).

d. Pollution environnementale

Les molécules toxiques libérées par des produits industriels peuvent augmenter la production des ERO dans les testicules, notamment les perturbateurs endocriniens (PE) tels que les phtalates présentes dans de nombreux objets en plastiques utilisés à des fins domestiques et industrielles qui peuvent altérer la spermatogenèse et endommager l'ADN spermatique. L'exposition à la pollution atmosphérique (hydrocarbures), aux métaux lourds (cadmium, chrome, plomb, manganèse et mercure), et aux xénobiotiques présents dans ou à proximité de notre alimentation (insecticides, pesticides et phtalates) sont des sources de stress oxydant pouvant affecter la fertilité (López-Teijón *et al.*, 2008).

Selon l'hypothèse de Skakkebaek (Skakkebaek *et al.*, 2001) les PE mènent à une dysgénésie testiculaire. Les conséquences sont tout d'abord sur les cellules de Sertoli avec des anomalies de différenciation des cellules germinales pouvant aboutir à une diminution de la qualité spermatique voire une néoplasie testiculaire. En parallèle, cette dysgénésie testiculaire modifie la synthèse d'androgènes des cellules de Leydig aboutissant à une augmentation de l'incidence des cryptorchidies et des hypospadias (Mauduit *et al.*, 2016).

Concernant l'exposition aux pesticides, une méta-analyse ayant inclus neuf études (parmi 90 études revues en détail et publiées entre 1966 et 2008) rapporte des associations significatives entre le travail de la mère et du père dans l'agriculture et la survenue d'hypospades (Rocheleau *et al.*, 2009). Plusieurs auteurs dont l'équipe de Van Tongeren, en 2002, ont utilisé une matrice emplois-exposition pour définir l'exposition professionnelle à sept catégories de substances suspectées d'être des PEs (pesticides, phtalates, composés organochlorés, alkylphénols, composés biphénoliques, métaux lourds, et autres composés). Quelques auteurs rapportent les effets néfastes, mais non unanimes, du bisphénol A sur les paramètres spermatiques et les issues de tentatives d'AMP (Mínguez-Alarcón *et al.*, 2016).

Garlantezec et Multigner rapporte une relation entre infertilité et exposition chronique aux pesticides ou aux solvants dans certaines professions (agriculteurs, fondeurs, horticulteurs, coiffeurs, travailleurs en usine de chaussures et de transformation d'aliments, femmes de

ménage et infirmières) (Garlantézec *et al.*, 2013; Warembourg *et al.*, 2017). Parmi les pesticides qui ont été le plus utilisés dans le monde et tout particulièrement en France pour les cultures céréalières, on retrouve l'alachlore (2-chloro-N(2,6-diethylphenyl)-N-(methoxymethyl) acétamide) et le glyphosate (N-(phosphonométhyl)glycine, C₃H₈NO₅P). Ils ont longtemps fait partie des mélanges de pesticides afin de réduire leurs concentrations, avant d'être complètement interdit dans l'Union Européenne. La présence de métabolites dans les urines des travailleurs diminue significativement la mobilité spermatique (Swan *et al.*, 2003). Il a été observé une augmentation du stress oxydant et de l'apoptose via la diminution du potentiel membranaire mitochondrial, l'externalisation de la phosphatidylsérine et une augmentation de la fragmentation de l'ADN spermatique (Grizard *et al.*, 2006). Des travaux complémentaires sur des métabolites de l'alachlore dans des concentrations équivalentes à celles mesurées dans des urines d'agriculteurs exposés montrent une baisse significative de la mobilité et de la vitalité des spermatozoïdes associée à une augmentation de la peroxydation des lipides, une diminution du pouvoir fécondant ainsi qu'une fragmentation de l'ADN spermatique (Pons-Rejraji *et al.* données non publiées).

Ondes électromagnétiques

Le rayonnement de type non ionisant émet trop peu d'énergie pour rompre les liaisons chimiques, contrairement aux ondes électromagnétiques de hautes fréquences (1 000 000 MHz). Ainsi, les rayons X, gamma et ultraviolets entraînent la formation de dimères de thymine et thymine-cytosine avec blocage de la réplication de l'ADN et de la transcription, létale pour la cellule. En réalité l'effet des ondes électromagnétiques sur la fertilité masculine et les spermatozoïdes est mal connu. Quelques auteurs rapportent que l'utilisation du téléphone portable peut altérer les caractéristiques spermatiques, en particulier la mobilité, la morphologie et augmente le stress oxydant et la fragmentation de l'ADN spermatique (Zalata *et al.*, 2015). Néanmoins, la durée d'exposition ne semble pas influencer sur ces anomalies (Agarwal *et al.*, 2008b; La Vignera *et al.*, 2012). L'altération de la qualité spermatique par l'utilisation de téléphone portable serait multifactorielle notamment par augmentation de la température locale et du stress oxydant du tissu testiculaire (Zalata *et al.*, 2015).

Tableau 3

Risque d'infertilité après traitement	Cancers de l'enfant et l'adolescent
Elevé (>80% d'infertilité)	Irradiation corporelle totale Radiothérapie localisée pelvienne ou testiculaire Chimiothérapie conditionnant une greffe de moelle osseuse Maladie de Hodgkin Sarcome des tissus mous (stage IV) Sarcome d'Ewing métastatique
Modéré	Leucémie aiguë myéloïde (difficile à évaluer) Hépatoblastome Sarcome osseux Sarcome d'Ewing non-métastatique Sarcome des tissus mous (stade II ou III) Neuroblastome Lymphome non-Hodgkinien Maladie de Hodgkin Tumeur cérébrale : radiothérapie crâniospinale, irradiation cérébrale >24Gy
Faible (<20% d'infertilité)	Leucémie aiguë lymphoblastique Tumeur de Wilms Sarcome des tissus mous (stade I) Rétinoblastome Tumeur cérébrale : chirurgie seule, irradiation cérébrale <24Gy

Evaluation du risque d'infertilité après traitement des cancers fréquemment retrouvés de l'enfant et de l'adolescent
 (D'après Wallace *et al.* 2005)

e. Traitement radiochimiothérapeutique

La chromatine spermatique est susceptible d'être endommagée par les différentes prises en charges thérapeutiques proposées dans le cadre de certaines pathologies, en particulier les cancers. Les affections malignes les plus retrouvées chez les hommes en âge de procréer sont les cancers testiculaires, les maladies de hodgkin et des leucémies (Walsh *et al.*, 2006; Paoli *et al.*, 2016). Wallace *et al* en 2005 a établi une classification du risque d'infertilité après traitement des différents cancers chez l'enfant et l'adolescent (Tableau 3).

- **Radiothérapie**

L'irradiation pelvienne ou testiculaire peut entraîner des effets toxiques directs sur le testicule tout particulièrement durant la période pré-pubertaire. On observe des altérations de l'épithélium germinal dès la dose de 0,15 Gy délivrée. La baisse transitoire du nombre de spermatozoïdes s'observe entre 3 et 12 Gy et devient définitive et irréversible au-delà de 6 Gy. La fonction endocrine testiculaire est altérée au-delà de 20 Gy chez l'enfant irradié en période pré-pubère (Champetier *et al.*, 2010). Les cellules de Leydig sont plus radio-résistantes. En effet, une dose supérieure à 20 Gy est nécessaire pour observer des lésions permanentes avec un retentissement endocrinien sur la synthèse de testostérone. Le taux de testostérone est alors moins impacté que la production spermatique. Le risque principal d'une tentative de procréation trop précoce (délai inférieur à un an après arrêt du traitement) serait le risque de transmission d'anomalies chromosomiques ou géniques à la future descendance. Enfin, l'irradiation pelvienne peut altérer l'érection et l'éjaculation via une réduction du flux vasculaire (Suhag *et al.*, 2015).

- **Chimiothérapie**

Les chimiothérapies ont des effets cytotoxiques sur les tissus testiculaires pubères et pré-pubères. Les spermatogonies sont tout particulièrement lésées. Les cellules germinales ont une sensibilité supérieure à celle des cellules de Leydig ainsi la production de testostérone est peu touchée (Bujan *et al.*, 2013; Suhag *et al.*, 2015). Par ailleurs, la maturation sexuelle des testicules influence le degré d'atteinte gonadique. Le testicule pré-pubère est moins sensible qu'un testicule pubère aux effets cytotoxiques des chimiothérapies. Ainsi on retrouve des hypogonadismes chez des hommes traités pour cancer (Fleishman *et al.*, 2010).

Tableau 4

Niveau de risque	Type de traitement anticancéreux
Elevé Azoospermie définitive	Radiothérapie > 2,5Gy des testicules Chlorambucil (1,4g/m ²) Cyclophosphamide (19g/m ²) Procarbazine (4g/m ²) Melphalan (140 mg/m ²) Cisplatine (500 mg/m ²) Carmustine (1 g/m ²) Lomustine (500 mg/m ²)
Modéré Azoospermie si association avec autres agents stérilisants	Busulfan (600 mg/kg) Ifosfamide (42g/m ²) Carmustine (300mg/m ²) Moutardes azotées Actinomycine D
Faible Diminution réversible des paramètres spermatiques	Carboplatine (2g/m ²) Doxorubicine (770mg/m ²) Thiotépa (400mg/m ²) Cytosine arabinoside Vinblastine (50g/m ²) ; Vincristine (8g/m ²)
Très faible / absence	Amsacrine Bléomycine Dacarbazine Daunorubicine Epirubicine Etoposide Fludarabine Fluorouracile 6-mercaptopurine Méthotrexate Mitoxantrone Thioguanine Prednisone Interféron-alpha
Inconnu Effets sur la production spermatique	Oxaliplatine Irinotecan Anticorps monoclonaux (trastuzumab, bevacizumab, cetuximab) Inhibiteurs de tyrosine kinase (erlotinib, imatinib) Taxanes

Les différents niveaux de risques d'infertilité chez l'homme liés aux principaux traitements anticancéreux
(D'après Lambertini *et al* 2016)

L'intégrité nucléaire du gamète peut être altérée avec un retentissement potentiel sur la future descendance. Ces effets génotoxiques sont différents en fonction du stade de maturation du spermatozoïde avec plusieurs conséquences possibles notamment la fragmentation de l'ADN ou encore un défaut de condensation de la chromatine spermatique. De plus, le système de réparation de l'ADN peut être insuffisant voire inexistant. À partir du stade spermatocyte, la réparation de l'ADN est quasi impossible avec une incapacité de réparation de l'ADN chez le spermatozoïde mature. Ainsi, les agents alkylants additionnent des groupes alkyles aux bases (-CH₃). L'acide nitreux (dérivés des nitrates ou nitrites des produits alimentaires et engrais) conduit à une désamination oxydative de l'adénine en hypoxanthine. Des composés ressemblant à des bases puriques ou pyrimidiques peuvent s'incorporer dans l'ADN de BromoUracile (analogue de la thymine). Des agents intercalants comme le bromure d'ethyidium bloquent la réplication.

Les effets de la chimiothérapie et de la radiothérapie sur l'épithélium germinatif sont molécules, doses et durée dépendantes. La reprise d'une spermatogenèse normale se fait après quelques semaines à quelques années, mais les dommages de l'ADN persistent plus longtemps (Wallace *et al.*, 2005). En effet, des dommages de la chromatine et cassures de l'ADN spermatique sont rapportés jusqu'à 12 mois suivant la fin du traitement (Bujan *et al.*, 2013). En 2016, une équipe a classé les principaux traitements anticancéreux (chimiothérapie et/ou radiothérapie) en fonction de leur risque potentiel sur la fertilité chez l'homme et la femme (Lambertini *et al.*, 2016 ; Tableau 4). Ainsi l'irradiation supérieure à 2,5 Gy des testicules et la famille des alkylants (cyclophosphamide, chlorambucil, melphalan, Procarbazine) sont les thérapeutiques à risque élevé d'azoospermie.

La prise en charge oncologique n'est pas la seule thérapeutique potentiellement gonadotoxique. En effet, certaines pathologies dysimmunitaires ou systémiques requièrent ces traitements. En France, « *Toute personne dont la prise en charge médicale est susceptible d'altérer la fertilité, ou dont la fertilité risque d'être prématurément altérée, peut bénéficier du recueil et de la conservation de ses gamètes ou de ses tissus germinaux, en vue de la réalisation ultérieure, à son bénéfice, d'une assistance médicale à la procréation (AMP), ou en vue de la préservation ou de la restauration de sa fertilité* » (article L.2141-11 du code de la santé publique). Récemment, l'équipe de Choux C *et al.* précise les modalités pratiques de

Tableau 5

Catégorie	Molécule	Exposition paternelle	Fertilité masculine
Immuno-suppresseurs	Azathioprine	Mutagène théorique : Arrêt 3 mois avant conception, Possible si impossibilité de substitution	Pas d'effet
	Ciclosporine Tacrolimus	Conception possible	Pas d'effet
	Cyclophosphamide	Données insuffisantes : Autoconservation à prévoir, arrêt 3 mois avant conception	Infertilité
	Léflunomide	Conception possible	Pas d'effet
	Méthotrexate	Mutagène théorique : autoconservation à prévoir ou arrêt 3 mois avant conception	Altérations réversibles des paramètres spermatiques : Autoconservation à proposer
	Mycophénolate mofétil	Mutagène théorique : autoconservation à prévoir ou arrêt 3 mois avant conception	Pas de variation connue des paramètres spermatiques
	Sirolimus Évérolimus	Peu de données: Eviter la conception sous traitement	Altérations réversibles des paramètres spermatiques : Autoconservation à proposer
Biothérapies anti-TNF	Adalimumab	Conception possible	Pas de données
	Infliximab	Conception possible	Pas de données
	Etanercept	Pas de données	Pas de données
	Golimumab	Pas de données	Pas de données
Autres biothérapies	Abatacept, anakinra, belimumab, canakinumab, eculizumab, rituximab, tocilizumab, ustekinumab	Pas de données	Pas de données

Gonadotoxicité au cours des traitements des pathologies dysimmunitaires et indications de préservation de la fertilité
(D'après Choux C *et al.* 2018)

préservation de la fertilité nécessaire ou non en cas de traitement immunosuppresseurs (Choux *et al.*, 2018) (Tableau 5). Ainsi, avant la mise en route de tous traitements potentiellement gonadotoxiques, voir tératogène, il est nécessaire de réaliser une cryoconservation des spermatozoïdes du fait des risques d'aneuploïdies, des fausses couches voire des malformations potentielles pour la génération à venir.

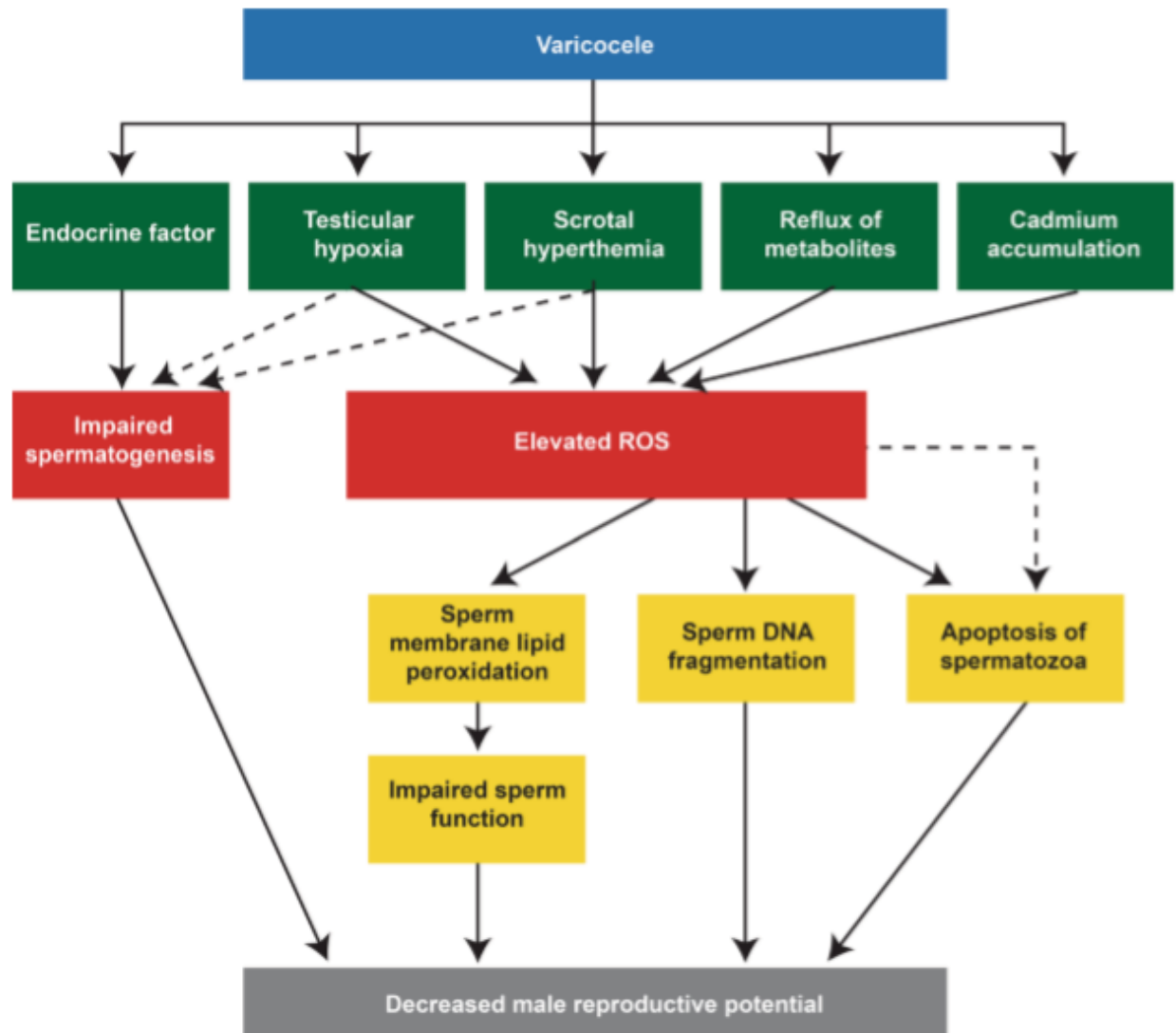
f. Les pathologies du tractus génital masculin

Il existe de nombreuses pathologies du tractus génital masculin pouvant impacter la qualité nucléaire spermatique. On retrouve tout particulièrement les infections, anomalies de migration du testicule, la varicocèle et la torsion testiculaire. Elles peuvent s'accompagner de conditions thermiques défavorables avec une augmentation de la température scrotale entre 1.5°C et 2.5°C, l'environnement est alors généralement fortement oxydé associée à une inflammation voire une surinfection.

- **Les infections du tractus génital masculin**

Plusieurs types de microorganismes peuvent être retrouvés dans le tractus uro-génital chez l'homme en portage chronique ou bien avec une symptomatologie clinique ou spermatique plus ou moins bruyante. Dans le contexte d'infection, l'agent pathogène lui-même peut induire une génération accrue de ERO ou bien les cellules de l'inflammation environnantes pourraient générer des ERO par respiration consommant ainsi les antioxydants présents. Les leucocytes du sperme sont des polynucléaires neutrophiles (60 %) et les macrophages (20-30%). Une large proportion de ces leucocytes peroxydase-positifs proviennent de la prostate et des vésicules séminales. Sous l'action de divers stimuli intracellulaires ou extracellulaires de nature inflammatoire, ils peuvent décharger jusqu'à 100 fois plus de ERO qu'habituellement (Agarwal and Said, 2003). La leucospermie (présence de plus de 1 million de cellules peroxydase positives par millilitre de sperme) génère un stress oxydant capable d'endommager les spermatozoïdes. Plusieurs études ont montré une corrélation entre spermogramme altéré et des niveaux anormalement élevés de ERO, d'IL-6, d'IL-8 et de TNF(Nandipati *et al.*, 2005 ; Lavranos *et al.*, 2012). Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont la source principale, ils produisent l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) *via* la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogène (NADPH) oxydase. C'est l'explosion respiratoire

FIGURE 40



Varicocèle et infertilité

Effets directs (lignes pleines) et indirects (pointillés) du varicocèle en association avec les espèces réactives de l'oxygène et la fragmentation de l'ADN du sperme
(D'après Roque and Esteves 2018, Cho et coll. 2016)

permettant la défense contre les microorganismes du phagocyte dans l'immunité innée. Il est maintenant admis que la présence d'une leucospermie aboutie à un état de stress oxydant avec des répercussions quantitatives et qualitatives sur les caractéristiques spermatiques ainsi que sur les issues des tentatives d'AMP (Damirayakhian *et al.*, 2006; Fraczek and Kurpysz, 2015). En effet, la SOD et le peroxyde d'hydrogène sont produits par exemple par la bactérie *Ureaplasma Urealiticum* fréquemment retrouvé dans le liquide séminal (Potts *et al.*, 2000). La présence de cette même bactérie est retrouvée associée à une augmentation significative de la peroxydation des lipides et de diminution de la mobilité spermatique (Collodel *et al.*, 2015). De plus, une récente étude confirme l'augmentation significative de la fragmentation de l'ADN spermatique en cas de bactériospermie ainsi que des anomalies significatives des paramètres spermatiques notamment la concentration, la mobilité progressive et totale et la condensation du noyau spermatique (Zeyad *et al.*, 2018).

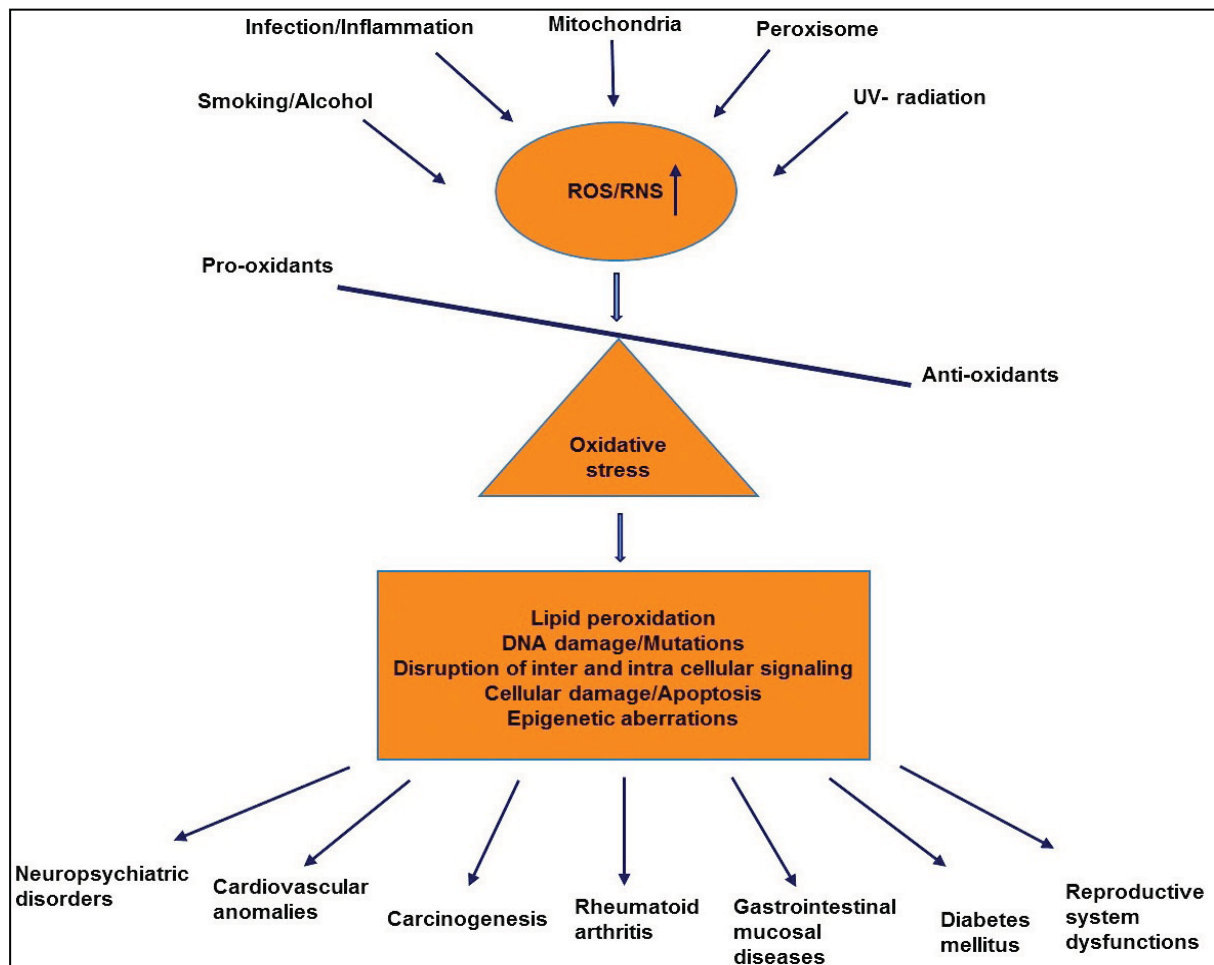
- **Exemple de la varicocèle**

La présence de varicocèle est fréquemment retrouvée dans la population générale (15%), associée à une infertilité primaire dans 35% (Roque and Esteves, 2018). Elle est souvent asymptomatique mais peut s'accompagner d'une altération de la spermatogenèse. Les anomalies retrouvées au spermogramme sont une oligospermie et une asthénozoospermie. Ces anomalies ne sont pas constantes. La majorité des hommes porteurs d'une varicocèle sont fertiles, particulièrement les adolescents, bien qu'ils aient une numération de spermatozoïdes légèrement plus faibles que la population générale (Lopez and Varlet, 2009). Des anomalies de compaction de l'ADN spermatiques ont aussi été rapportées, ainsi qu'une baisse significative du taux de grossesse et de naissance vivante en cas de varicocèle (Shiraishi *et al.*, 2012; Gual-Frau *et al.*, 2015). Six mois après une prise en charge chirurgicale optimale, on observe une amélioration des paramètres spermatiques, notamment de la mobilité et de la tératozoospermie ainsi que des taux de grossesses (Mansour Ghanaie *et al.*, 2012 ; Figure 40).

g. Les pathologies systémiques

Les ERO jouent un rôle important dans la pathogenèse de diverses maladies menant à des réactions en chaînes (Bisht and Dada, 2017 ; Figure 41).

FIGURE 41



**Voie de la génération de stress oxydant médiée par les radicaux libres et son rôle dans
l'exécution de diverses maladies**
(D'après Shilpa Bisht and Rima Dada 2017)

Les cytokines sont des médiateurs solubles produits par les cellules lymphoïdes et non lymphoïdes qui jouent un rôle clé dans les différentes phases des processus innés et acquis de réponses immunitaires. On les retrouve dans le liquide séminal en cas d'inflammation ou d'infection. Dans la dynamique inflammatoire des cytokines, pléthores d'effets sont retrouvés. Par exemple, le facteur de nécrose tumorale alpha (TNFa) est présent comme déclencheur inflammatoire initial, mais il est également un inducteur de chimiokines, participe au chimiotactisme des neutrophiles, améliore l'effet final toxique en induisant l'apoptose. L'interleukine-6 (IL-6) participe au déclenchement de l'inflammation, mais elle provoque également l'activation et la différenciation des leucocytes et participe à l'effet toxique final par surproduction d'ERO. L'interleukine-8 (IL-8) participe au chimiotactisme des neutrophiles vers le site enflammé et active les neutrophiles vers la phagocytose. Ainsi, les cytokines ont un rôle multifactoriel qui peut perturber la fonction de la glande accessoire mâle et être corrélé à une anomalie des caractéristiques spermatiques, persistant plusieurs mois après un traitement bien conduit (Comhaire *et al.*, 1999; Ochsendorf, 1999). Ainsi, un état de stress oxydant est retrouvé lors de toute pathologie locale ou systémique inflammatoire aigue ou chronique.

Aux niveaux physiologiques, les ERO ont un rôle essentiel de médiateurs de signalisation cellulaire, de maintien de l'homéostasie du système cardiovasculaire et de régulation des fonctions vasculaires telles que l'inflammation vasculaire dans l'athérogenèse, la relaxation et la contraction des cellules musculaires lisses. En effet, les oxydations des LDL sont à l'origine de l'initiation de l'athérosclérose. De nombreux auteurs ont montré le rôle du stress oxydant dans la pathogenèse des maladies cardiovasculaires telles que les maladies coronariennes, l'athérosclérose, les lésions ischémiques de reperfusion, les cardiomyopathies, l'arythmie et l'hypertension. Néanmoins, les facteurs de risque cardiovasculaires sont aussi des facteurs de risques de stress oxydant. C'est pourquoi, ces facteurs communs augmentent nettement la production de ERO vasculaires et cause des dommages oxydants systémiques par le mécanisme sous-jacent commun impliquant dysfonctionnement mitochondrial, dégradation d'enzymes, dommages cellulaires et apoptose (Lakshmi *et al.*, 2009).

La peroxydation des lipides ainsi que les caractéristiques spermatiques de la numération, mobilité progressive ainsi que le pourcentage de forme typique sont retrouvés significativement plus altérés chez les patients diabétiques déséquilibrés (hémoglobine glyquée >10%) *versus* les patients présentant un diabète bien contrôlé (La Vignera *et al.*, 2012). La suralimentation, la sédentarité en cas de diabète de type 2 abouti à une surcharge de glucose et d'acide gras, menant à une surproduction de ERO. Récemment, l'équipe de Condorelli rapporte une dégradation des caractéristiques spermatiques chez les patients diabétiques. En cas de diabète de type 2, l'inflammation chronique avec une augmentation important de leucocyte dans l'éjaculat. Celle-ci mène à un état de stress oxydant, traduit par une peroxydation lipidique élevée et présente comme répercussions une baisse de la vitalité spermatique et une augmentation de la fragmentation de l'ADN spermatique. A contrario en cas de diabète de type 1, les voies épидидymaires sont particulièrement touchées, aboutissant à une hypospermie et une mobilité spermatique abaissée (Condorelli *et al.*, 2018).

h. Les procédures d'AMP

Les étapes de centrifugation et de lavage isolent les spermatozoïdes de la protection antioxydante que constitue le fluide séminal. Elles sont connues depuis longtemps pour être source de dommages oxydants (Agarwal *et al.*, 1994). A cela s'ajoute un stress mécanique, sur les gamètes, stimulant la production de ERO (Henkel and Schill, 2003; Henkel *et al.*, 2005; Cocuzza *et al.*, 2007; Tremellen, 2008). L'incubation prolongée dans des milieux capacitants sans antioxydants génère une forte accumulation d'ERO. Il a été démontré qu'une atmosphère réduite en O₂ (5 % au lieu de 20 % en atmosphère normale) améliore la survie des spermatozoïdes et leur pouvoir fécondant en réduisant la production de ERO (Griveau and Le Lannou, 1997a, 1997b; Griveau *et al.*, 1998).

La cryopréservation des spermatozoïdes est actuellement une méthode quotidiennement utilisée pour la préservation de la fertilité masculine. Elle permet de maintenir la viabilité des spermatozoïdes durant une longue période (Feldschuh *et al.*, 2005). L'autoconservation est réalisée avant toute mise en route prise en charge ou mise en route d'un traitement

potentiellement stérilisant (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie, chirurgie ou traitement médicamenteux à risque). Depuis plus de 30 ans, en France les CECOS représentent l'infrastructure clinico-biologique gérant les autoconservations et de don de gamètes. Malgré les progrès dans le domaine de la cryobiologie, les étapes de congélation et de décongélation affectent toujours l'intégrité des spermatozoïdes occasionnant alors des troubles de la fécondation. En effet, au cours de la cryopréservation, les spermatozoïdes sont soumis à un stress physique lié aux chocs thermiques et aux variations d'osmolarité dues à l'addition et au retrait du milieu cryoprotecteur. La cryopréservation des spermatozoïdes induit à la fois une forte production de ERO et une diminution de la quantité et de l'activité des antioxydants lors des étapes de congélation et décongélation (Watson, 2000). Il s'ensuit alors une diminution forte de la proportion de cellules vivantes et des modifications structurales, notamment au niveau membranaire, et fonctionnelles qui se traduisent par une diminution de la vitalité, de la mobilité et du pouvoir fécondant (Agarwal *et al.*, 2008b). L'induction de ce stress oxydant entraîne des perturbations au niveau des membranes plasmique, acrosomique et mitochondriale, ainsi que de l'ADN des spermatozoïdes, et finalement peut conduire à leur mort par apoptose (Pons-Rejraji *et al.*, 2009). En effet, après décongélation, il existe un accroissement de la fraction de spermatozoïdes présentant des signes caractéristiques de l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose, et une fragmentation de l'ADN au niveau nucléaire (Zribi *et al.*, 2010). Une forte proportion des spermatozoïdes cryopréservés ne sont pas viables (en moyenne 50 %). De plus, il est toujours observé après décongélation une augmentation du taux de spermatozoïdes sans acrosome (Cormier *et al.*, 1997). Il a également été observé qu'une fraction des spermatozoïdes congelés vivants possède des caractéristiques similaires à celle de la capacitation des spermatozoïdes frais: la cryocapacitation. Les spermatozoïdes capacités prématurément ou ayant fait leur réaction acrosomique ont un temps de survie limité, et ont un pouvoir fécondant réduit de manière significative, diminuant d'autant la probabilité de réussite de la fécondation (Medeiros *et al.*, 2002). Ces résultats sont d'autant plus importants que lors des procédures d'ICSI, les barrières naturelles de sélection que sont la zone pellucide et la membrane plasmique ovocytaires sont éliminées (Agarwal *et al.*, 2008a; Tremellen, 2008).

V. Prise en charge des anomalies nucléaires spermatiques

V.1. Supplémentation AO orale

De nombreuses études montrent une amélioration de la qualité du sperme suite à la prise d'une supplémentation en antioxydants (Agarwal and Said, 2003; Agarwal *et al.*, 2008a; Chi *et al.*, 2008). Néanmoins, ces résultats doivent être interprétés avec une certaine réserve. En effet, peu de travaux sont réalisés en double aveugle avec l'utilisation d'un traitement placebo. Les posologies et les durées de traitement, les caractéristiques de sujets inclus sont variables. Il faut cependant mettre en évidence que la présence excessive d'antioxydants entraîne un déséquilibre la balance pro/antioxydants induisant des effets délétères sur la fertilité masculine, tels qu'une condensation insuffisante de l'ADN, des problèmes de maturation et une action pro-oxydante de certains antioxydants comme par exemple l' α -tocophérol (Cocuzza *et al.*, 2007; Ménézo *et al.*, 2007).

Une supplémentation alimentaire en vitamines C et E et en micronutriments tels que le folate, le zinc et le sélénium, améliore la qualité des spermatozoïdes en diminuant la fragmentation de l'ADN et la peroxydation lipidique membranaire et augmente ainsi le taux de grossesses (Greco *et al.*, 2005; Agarwal *et al.*, 2008a). Un essai thérapeutique randomisé en double aveugle a démontré que l'injection intramusculaire quotidienne de 600 mg de glutathion pendant deux mois améliorait la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes chez des hommes infertiles porteurs d'une varicocèle unilatérale, ou d'un syndrome inflammatoire génital associé à un spermogramme altéré (Showell *et al.*, 2011).

Une méta-analyse Cochrane en 2014 a permis d'éclairer l'utilisation de cocktails d'AO pour le traitement de l'hypofertilité masculine. Elle rapporte une augmentation significative du taux de grossesse chez les hommes prenant des antioxydants. Ainsi, 96 grossesses ont été enregistrées dans 15 articles sur 964 couples considérés (Showell *et al.*, 2014). L'utilisation des antioxydants était associée à une augmentation significative du taux de grossesses par rapport au groupe témoin (OR : 4,18, IC : 2,65-6,59). Trois articles analysaient les taux de grossesses menées à terme. Vingt grossesses étaient retrouvées sur un total de 214 couples. Le traitement antioxydant de l'homme augmentait de façon significative le taux de grossesse menées à terme, par rapport au groupe contrôle (OR : 4,85, IC : 1,92-12,24). De plus, la

FIGURE 42



Nutrition et fertilité

Les facteurs liés à la nutrition associés à l'infertilité masculine. rapportés par Salas Huetos *et al.* 2017. Différentes couleurs indiquent le type d'association avec infertilité masculine: association positive en vert et association négative en orange (D'après Salas Huetos *et al.* 2017)

mobilité des spermatozoïdes à 3, 6 et 9 mois de traitement est améliorée. Les études à 3 mois (n = 302 dans le groupe traité par antioxydants, n = 212 dans le groupe contrôle) montraient une amélioration de la mobilité des spermatozoïdes dans le groupe traité. En dépit des effectifs plus faibles suivis à 6 et 9 mois, une amélioration de la mobilité des spermatozoïdes était confirmée à 6 et 9 mois. En outre, à 6 et 9 mois de traitement aucun effet significatif concernant la concentration des spermatozoïdes à 3 mois (7 articles incluant 320 patients) n'a été rapporté. En revanche, l'amélioration de la concentration des spermatozoïdes dans le groupe traité par rapport au groupe placebo devenait significative à 6 mois de traitement (6 articles, n = 825) et 9 mois (3 articles, n = 322). Enfin, un effet bénéfique de l'apport en vitamine E et C sur le taux de fragmentation de l'ADN du spermatozoïde a été rapporté dans un seul article. Cette méta-analyse ne retrouve pas d'effets indésirables des traitements AO.

Récemment, Salas-Huetos *et al.*, ont mis en évidence qu'une alimentation saine des hommes peut améliorer la qualité du sperme et les taux de fécondité. Ainsi les régimes sains riches en certains nutriments tels que les acides gras oméga-3, certains antioxydants (vitamine E, vitamine C, β -carotène, sélénium, zinc, cryptoxanthine et lycopène), d'autres vitamines (vitamine D et folate) et pauvres en acides gras saturés et en acides gras *trans* sont associés à des caractéristiques spermatiques normales. Poissons, fruits de mer et fruits de mer, volaille, céréales, légumes et fruits, produits laitiers maigres et écrémés le lait sont corrélés positivement à plusieurs paramètres spermatiques. Cependant, les régimes riches en viande transformée, en soja, en pommes de terre, en produits laitiers, fromage, café, alcool, boissons sucrées et sucreries ont été associés à des anomalies du spermogramme. En ce qui concerne la fécondité, une consommation élevée d'alcool, de caféine et de viande rouge par les hommes a une influence négative sur les chances de grossesse ou les taux de fécondation (Salas-Huetos *et al.*, 2017 ; Figure 42).

V.2. Supplémentation des milieux

Aujourd'hui la plupart des milieux de congélation contiennent des AO. L'addition d'antioxydants (vitamines C et E, glutathion, hypotaurine, albumine ou N-acétyl-cystéine) dans les milieux d'incubation ou de conservation protège significativement les

spermatozoïdes de la fragmentation de l'ADN, de la peroxydation lipidique et de la perte de motilité. La supplémentation en SOD et en catalase dans les milieux de cryopréservation et d'incubation induit une diminution du stress oxydant et améliore la motilité et la qualité des spermatozoïdes (Rossi *et al.*, 2001; Agarwal and Said, 2003; Henkel and Schill, 2003; Chi *et al.*, 2008; Tremellen, 2008).

Dans la littérature les auteurs s'accordent à dire que les antioxydants préviennent la réduction de la qualité spermatique comme la mobilité et la vitalité, ou encore des dommages causés à l'ADN (Agarwal *et al.*, 2008a). Une étude récente menée dans le service d'AMP du CHU Estaing de Clermont-Ferrand dans le cadre d'un protocole hospitalier de recherche clinique, et paru en 2013, visait à évaluer simultanément les avantages d'une migration sur gradient de densité avant ou après cryopréservation, et les effets d'une supplémentation en hypotaurine des milieux utilisés lors des traitements et de la cryopréservation des spermatozoïdes (Brugnon *et al.*, 2013). La faible concentration d'hypotaurine et la concentration élevée de taurine dans les spermes des patients infertiles rapportées dans l'étude de Holmes *et al.* 1992, suggère que l'oxydation de l'hypotaurine en taurine s'est produite. Le manque d'hypotaurine dans les spermes de ces patients pourrait expliquer que leurs spermatozoïdes sont moins protégés contre le stress oxydant occasionné par la congélation (Holmes *et al.*, 1992). Brièvement, les résultats de notre équipe montrent un effet bénéfique de l'hypotaurine sur la vitalité des spermatozoïdes et le nombre de spermatozoïdes ne présentant pas de marqueurs apoptotiques (externalisation de la phosphatidylsérine au niveau de la membrane plasmique, élévation du potentiel mitochondrial et fragmentation d'ADN spermatique). De plus, la supplémentation en antioxydant a réduit significativement les altérations de la membrane plasmique suite à une congélation-décongélation, d'autant plus quand une migration sur gradient de densité a été réalisée avant la congélation (Brugnon *et al.*, 2013). Il est à noter un manque d'études prospectives randomisées comparant à un placebo, les différentes supplémentations aussi bien orales ou des milieux de congélation. Amidi *et al.* dans une revue récente confirme les bénéfices apportés par les supplémentations orales ou dans les milieux de congélation en AO comme les vitamines C et E, le glutathion, SOD, CAT... voir même avec une supplémentation naturelle issue des plantes (Amidi *et al.*, 2016).

V.3. Prise en charge globale et adaptée

La prise en charge des patients infertiles doit être globale, voir multidisciplinaire et adaptée à chaque patient. Les étiologies des dommages à l'ADN spermatique doivent être recherchées pour pouvoir poser un diagnostic. Les étiologies évitables liées au mode de vie ou à des consommations de toxiques doivent être corrigées (www.mangerbouger.fr). L'équipe d'Oostingh en 2017, valide par son étude l'impact fondamentale de la qualité alimentaire sur la fertilité masculine. Il retrouve une corrélation entre un régime alimentaire sain et des paramètres spermatiques normaux (Oostingh *et al.*, 2017). La consommation insuffisante en légumes, fruits, céréales, en oméga 3 et riche en matière grasses, pommes de terre, acides gras saturés, sucre et alcool s'avère délétère pour la fertilité masculine (Salas-Huetos *et al.*, 2017). Aux Pays-Bas, grâce à une prise en charge globale personnalisée du couple en période périconceptionnelle, dans l'objectif d'améliorer l'alimentation et le mode de vie, des résultats bénéfiques ont été observés en termes de grossesse (van Dijk *et al.*, 2017). Ainsi, dans le PNNS (Plan National Nutrition Santé), lancé en 2001, la nutrition correspond à l'équilibre entre les apports liés à l'alimentation et les dépenses occasionnées par l'activité physique. Ce plan de santé publique vise à améliorer l'état de santé de la population mais est totalement adapté à la fertilité. Il ne doit pas être exclusivement masculin. La femme doit aussi suivre une bonne hygiène de vie pour optimiser ses chances de grossesse. L'OMS recommande en préconceptionnel une supplémentation orale quotidienne en acide folique (0.4 mg) en prévention primaire des malformations du tube neural comme le spina bifida.

Matériels et Méthodes

I. Patients et prélèvements

Les échantillons spermatiques ont été obtenus de patients venus au laboratoire de spermiologie et de biologie de la reproduction au CHU de Clermont-Ferrand pour réaliser des examens spermiologiques ou pour une prise en charge dans le cadre d'une infertilité en AMP.

Auparavant, les patients ont été vus en consultation par un biologiste pour les informer des objectifs et du déroulement du projet de recherche, en accord avec la déclaration d'Helsinki de 1975 sur l'expérimentation humaine. Un consentement éclairé et une notice d'information écrite sont établis et remis à la fin de la consultation, quant à l'utilisation des échantillons biologiques en recherche. Lors de l'inclusion, une consultation médicale a permis de préciser les caractéristiques cliniques des patients et de la tentative dans le logiciel JFIV (Age, IMC, consommation de toxiques, type d'infertilité, antécédents médicaux, traitements).

Les prélèvements sont alors inclus au CRB Germethèque et sont conservés et utilisés dans le but de la recherche scientifique et du développement biotechnologique. Ce projet ayant été soumis et validé par le comité scientifique du CRB (CPP Sud-Est 6, DC2008-DC58). Aucune indemnisation n'était prévue, étant donné que les analyses sont réalisées sur les reliquats du sperme.

II. Traitements des échantillons et examens de spermiologie diagnostique

II.1. Mesure des paramètres conventionnels spermatiques par spermogramme-spermocytogramme

Le recueil et l'analyse spermiologique ont été réalisés selon les recommandations de l'OMS 2010. L'éjaculat a été obtenu par masturbation en respectant 2 à 7 jours d'abstinence sexuelle. Après liquéfaction (20 à 60 min à 37°C dans une étuve sèche), une analyse spermiologique a été réalisée. Elle visait à quantifier et qualifier le volume, le pH et la viscosité de l'éjaculat, ainsi que le nombre (numération) et la concentration des spermatozoïdes et de cellules rondes, la proportion des spermatozoïdes vivants et mobiles.

La numération de spermatozoïde a été déterminée par comptage en cellule de Thoma. La mobilité des spermatozoïdes a été appréciée entre lame et lamelle avec détermination du pourcentage de spermatozoïdes rapides et progressifs (a); lents et progressifs (b) ; mobiles et non progressifs (c) et immobiles (d). Enfin, la vitalité a été estimée après coloration à l'éosine nigrosine (Kit Vitalscreen, FertiPro, JCD, France). Un compte des cellules rondes (cellules germinales et polynucléaires neutrophiles) a été réalisé sur cellule de Thoma et le pourcentage de polynucléaires neutrophiles a été apprécié après une coloration à la benzidine-cyanosine (Kit Leucosreen, FertiPro, JCD, France).

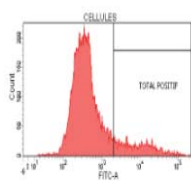
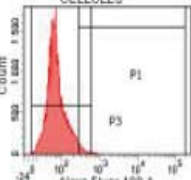
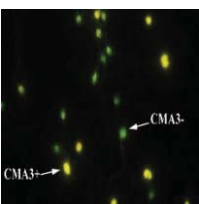
Selon les dernières recommandations de l'OMS en 2010 ("WHO | WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen," 2010), un sperme normal présente les caractéristiques suivantes : volume $\geq 1,5\text{ml}$; pH $\geq 7,2$; nombre total de spermatozoïdes par éjaculat $\geq 39.10^6$ spermatozoïdes par éjaculat ; concentration de spermatozoïdes $\geq 15.10^6$ spermatozoïdes/ml ; vitalité $\geq 58\%$; mobilité totale (a+b+c) $\geq 40\%$ et progressive (a+b) $\geq 32\%$.

Le spermocytogramme, examen cytologique des spermatozoïdes, a été pratiqué sur des cellules fixées sur une lame, après coloration modifiée de Harris-Shorr. Cet examen permet notamment de détecter une éventuelle tératozoospermie qui se caractérise par la présence de moins de 4% de spermatozoïdes de forme typique (morphologie normale) ainsi que l'index de tératozoospermie (TZI) (somme des anomalies constatées sur chaque spermatozoïde vs le nombre de spermatozoïdes observés) selon la classification de Kruger (Menkveld *et al.*, 1996).

II.2. Le test de migration survie

Les spermatozoïdes ont été sélectionnés et séparés du liquide séminal par une migration sur gradient discontinu de densité (Test de migration survie ou TMS). Cette sélection a été réalisée par l'utilisation du milieu Puresperm® (Nidacon International, Molndal, Suède) 100%, dilué avec du milieu Sperm Preparation® (Origio Malov, Danemark) équilibré (5% CO₂, 37°C, pendant 4h) pour obtenir un gradient à deux couches : 90 et 45%. La suspension de sperme a été déposée sur ce gradient à 2 couches et soumise à une centrifugation (750g, 20 min, à température ambiante- TA). La fraction de haute densité contenant le culot de

FIGURE 43

Paramètres nucléaires spermatiques	Marqueurs	Détection	Seuil pathologique	Exemples de résultats
Oxydation de l'ADN	Immunohistochimie 8-oxo-7,8-dihydro-2'guanosine (8-OHdG)	Cytométrie en flux	> 65,8 % + MIF > 552 UA Vorilhon <i>et al.</i> 2018	
Fragmentation de l'ADN	In Situ Cell Death Detection Fluorescein TUNEL	Cytométrie en flux	16,8% Sharma <i>et al.</i> 2016	
Compaction de l'ADN	Histochimie à fluorescence CMA3	Microscope à épifluorescence	30% Sakka <i>et al.</i> 1998	

Résumé des techniques employées pour le marquage de la qualité nucléaires spermatiques

Oxydation de l'ADN spermatique : Immunodétection en cytométrie en flux du 8-OHdG. Le seuil pathologique correspond à l'association d'un taux de spermatozoïdes oxydés supérieur à 65,8% et d'une moyenne d'intensité de fluorescence (MIF) supérieur à 552 UA (unités arbitraire) selon Vorilhon *et al.* 2018.

Fragmentation de l'ADN spermatique : Technique TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*). La détection est réalisée par cytométrie en flux. Le seuil pathologique est établi à un taux spermatozoïdes fragmentés supérieur à 16,8%, selon Sharma *et al.* 2016.

Compaction de l'ADN spermatique : CMA3. La détection est réalisée par un microscope à épifluorescence. Le seuil pathologique est établi à un taux de spermatozoïdes compactés supérieur à 30% selon Sakka *et al.* 1998.

spermatozoïde a été récupérée puis lavée dans 3ml du milieu Sperm Preparation® équilibré à 750g, durant 8 min à TA.

II.3. La congélation – décongélation des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes ont été congelés dans du milieu cryoprotecteur Cryosperm® (Origio Malov, Danemark) selon les recommandations du fournisseur. Le milieu cryoprotecteur a été ajouté progressivement, volume à volume, à TA. Après 15 min d'équilibration, les échantillons ont été conditionnés dans des paillettes de haute sécurité de 300µl (CryobiosystemTM, France) identifiées au préalable. Puis la congélation programmée des paillettes a été réalisée à l'aide du congélateur programmable Nano-Digitcool® (CryobiosytemTM, France). Le programme de congélation a été progressif (programme informatisé) et contrôlé. Les paillettes sont ensuite plongées dans l'azote liquide et conservées dans de l'azote liquide jusqu'à décongélation dans une cuve de stockage dédiée à -196°C.

Lors de la décongélation, les paillettes ont été placées à l'étuve à 37°C pendant 1 min. Puis une addition lente et progressive de milieu Sperm Preparation® a été réalisée afin d'effectuer un premier lavage par centrifugation (750g, 5min, TA) qui permet d'éliminer le cryoprotectant. Enfin, un autre lavage a été réalisé avant aliquotage des spermatozoïdes pour les différentes analyses.

III. Mise au point et analyses des altérations nucléaires spermatiques

La figure 43 résume les techniques employées dans mon travail de thèse pour les marquages de qualité nucléaire spermatique.

III.1. Oxydation de l'ADN spermatique par immunodétection du 8-OHdG

Cette technique a été optimisée durant le par cours de cette thèse. En effet, nous avons mis au point l'immunodétection du 8-OHdG pour le spermatozoïde humain, à partir d'un

protocole développé chez la souris (Noblanc *et al.*, 2013) utilisant un marquage « peroxydase » et une révélation par microscopie visible. Le passage à la détection *via* immunohistochimie fluorescente et l'automatisation de l'évaluation *via* le recours à la cytométrie en flux demandé de nombreux ajustements pour être reproductibles et robustes, notamment la décondensation du noyau, la fixation et la conservation des spermatozoïdes, ainsi que la mise au point des contrôles positifs et négatifs.

Dénaturation et fixation des spermatozoïdes

Dix millions de spermatozoïdes par conditions ont été lavés par centrifugation dans du PBS 1X (solution saline tamponnée au phosphate, pH 7,4) à 1000 g pendant 5 min. Les spermatozoïdes ont été remis en suspension dans un tampon de décondensation composé de dithiothréitol à 2 mM et de Triton X-100 à 0,5%, puis incubés 10 min à TA dans l'obscurité. Chaque échantillon est divisé en trois fractions comprenant : un contrôle négatif, un contrôle positif et l'échantillon test. Pour le contrôle positif les spermatozoïdes ont été traités pendant 1h à TA dans l'obscurité avec une solution de H₂O₂ à 8M. Après un lavage dans du PBS 1X-Triton X-100 à 0,1%, la fixation a été réalisée dans du paraformaldéhyde à 4% à 4°C pendant 15 min. Afin d'estimer la stabilité de la fixation dans le temps, des spermatozoïdes dénaturés et fixés ont été stockés dans une solution de PBS 1X - Azide de sodium à 0,01% (Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne) pendant 15 et 30 jours dans des conditions d'obscurité à 4°C.

Protocoles I et II : Immunodétection par microscopie, mise au point technique et validation intra-méthodes

Les spermatozoïdes fixés ont été remis en suspension dans du PBS 1X et répartis sur la lame Super Frost® (Thermo Scientific). L'inactivation des peroxydases d'endogène a été réalisée par une incubation dans du H₂O₂ à 0,3% pendant 30 min. Après un lavage, les spermatozoïdes ont été incubés dans une solution de saturation (NGS 1,5%, sérum de chèvre normal) à TA pendant 30 min. L'incubation avec l'anticorps primaire, l'anticorps monoclonal (1:1000) 8-OHdG (ADN/ARN Damage Anticorps-15A3, NB110-96878, Novus biologique, France) a été effectuée pendant une nuit à 4°C. L'incubation avec les anticorps secondaires a été réalisée pendant 1h avec de la Peroxydase de raifort [HRP] PARIS Anticorps, France) pour le protocole I (1:500) pour l'IgG anti-souris, ou avec (1:1000) IgG anti-souris de chèvre Alexa

Fluor®488 Anticorps (H+L) (Molecular Probes®, Eugene, USA) pour le protocole II. La détection du signal a été obtenue en utilisant le kit de substrat Vector Nova Red pour la révélation de la peroxydase (Vector Laboratories, AbCys, Paris, France) pour le protocole I. Chaque échantillon a été étalé sur deux lames et lu par deux observateurs différents en aveugle (200 spermatozoïdes par lame). Les images ont été acquises avec une caméra numérique Carl Zeiss Axiocam sur un microscope Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss, Allemagne). Les objectifs utilisés étaient Zeiss X40 et X63. L'acquisition des images a été réalisée avec Zeiss Axiovision et analysée avec Image J (Institut national de la santé des États-Unis).

Protocoles III et IV : Détection par microscopie à épifluorescence et cytométrie en flux (CFM), validation intra-méthodes

Pour le protocole III, après un lavage et une saturation en NGS à 1,5% à TA pendant 1h, les spermatozoïdes ont été incubés avec l'anticorps monoclonal (1/1000) anti-8-OHdG (ADN/ARN Dommage Anticorps-15A3, NB110-96878, Novus biologique, France) pendant une nuit à 4°C. Un anticorps secondaire a été appliqué pendant 90 min à TA dans l'obscurité (anticorps Alexa Fluor®488 de chèvre anti-IgG de souris (H+L), Molecular Probes®, Eugene, USA). Pour le protocole IV, nous avons utilisé le test commercialisé « OxyDNA assay » selon les recommandations du fabricant (EKF Diagnostics, Biotrin International, Dublin, Irlande).

Toutes les analyses de CMF ont été effectuées sur un SORP BD FACSAria (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, États-Unis) en utilisant une buse de 85 µm. Le cytomètre était équipé de 5 lasers. Nous avons utilisé un laser ultraviolet (UV) (OPSL 3.6, 355nm, 100mW, Coherent), un laser bleu (Sapphire, 488nm, 100mW, Coherent) et un laser rouge (OBIS, 633nm, 100mW, Coherent). L'acquisition et l'analyse des données ont été réalisées à l'aide de BD FACSDiva 7.0 et d'Infinicyt Software (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, États-Unis). Au moins 50 000 événements par échantillon ont été enregistrés. Les paramètres morphologiques FSC (forward-scattered light) et SSC (side-scattered light) ont été détectés sur une échelle linéaire. En utilisant le PI (Iodure de Propidium) et le Hoechst, les spermatozoïdes morts et anucléés ont été exclus. Un seuil positif a été établi grâce aux contrôles négatifs et positifs, nous permettant d'identifier le pourcentage de spermatozoïdes avec un ADN oxydé pour chaque patient et une moyenne d'intensité de fluorescence (MIF=Mean Intensity of Fluorescence). Les patients présentant un pourcentage de spermatozoïde oxydé supérieur à

65,8% associé à une MIF supérieure à 552 ua (unité arbitraire) ont été notés dans mon travail « Oxydation + » par rapport au groupe « Oxydation - » (Vorilhon *et al.*, 2018).

Expérience de compétition

Pour évaluer la spécificité, la sensibilité et comparer les deux méthodes en FCM, des tests de compétition ont été réalisées. La 3-désoxyguanosine (3-dG) et la 2'-désoxy-8-hydroxyguanosine exogènes (8-OH-dGuo, Institut Biolog Life Science, Bremen, Allemagne) ont été incubées à l'obscurité avec l'anticorps primaire du protocole III et FITC -conjugué dans le protocole IV. A partir d'une concentration initiale de 50 mM (PBS 1X et DMSO, diméthylsulfoxyde), différentes concentrations ont été utilisées : 50 nmol, 500 nmol, 1 μ mol et 2,5 μ mol.

III.2. Fragmentation de l'ADN spermatique

- **Technique TUNEL**

La fragmentation de l'ADN peut donner des cassures simples ou doubles brins qui peuvent être détectées en marquant les terminaisons 3'-OH libres avec des nucléotides modifiés (d-UTP : deoxyuridine triphosphate) lors d'une réaction par l'enzyme terminale désoxynucléotidyl transférase (TdT). La technique TUNEL (Terminal deoxynucléotidyl transferase dUTP nick endlabeling) consiste en un marquage de ces extrémités médiées par la TdT. La mesure de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes est réalisée à l'aide du Kit de détection TUNEL (Cell Death Kit detection POD®, Roche, France).

Après lavage par centrifugation (500g, 5 min, TA, PBS), 1.10^6 spermatozoïdes ont été fixés dans une solution de paraformaldéhyde 4%. Après lavage dans du PBS-BSA 1%, les spermatozoïdes ont été resuspendus dans une solution de perméabilisation contenant 0,1% de Triton-X dans 0,1% de sodium citrate durant 3 min dans de la glace. Après lavage (500g, 5 min, TA), la réaction de marquage est réalisée une incubation d'1 heure à 37°C des spermatozoïdes dans 100 μ l d'une solution contenant 50 μ l de la solution enzymatique (Tdt, Roche, France) et 50 μ l de la solution de marquage (dUTP, Roche, France) fournies dans le kit. Puis, la suspension cellulaire est lavée dans du PBS-BSA 1% et contremarquée par du PI afin de contrôler l'efficacité de la perméabilisation. L'analyse par CMF a été réalisée sur un

minimum de 20 000 spermatozoïdes en utilisant un cytomètre en flux Coulter Epics XL. Les fluorochromes ont été excités à une longueur d'onde de 488nm par un laser argon. Les fluorescences verte (FITC) et rouge (PI) ont été respectivement détectées en FL1 par un filtre de bande passante de 525nm et en FL3 par un filtre de bande passante de 620nm. Les signaux de fluorescence détectés par FL1 et FL3 ont été enregistrés après amplification logarithmique et le pourcentage de cellules marquées a été calculé par le logiciel du cytomètre en flux. Avant l'analyse des échantillons à analyser, 2 types d'échantillons ont été mesurés successivement pour le réglage du cytomètre : spermatozoïdes non marqués, permettant la détection de la fluorescence non spécifique (contrôle négatif) ; spermatozoïdes utilisés comme contrôles positifs pour effectuer la compensation électronique. Le résultat rendu est exprimé en pourcentage de spermatozoïdes présentant une fragmentation de l'ADN.

Une valeur référence de 16,8% de spermatozoïdes positifs a été observée avec une spécificité de 91,6% et une valeur prédictive positive de 91,4% (Sharma *et al.*, 2016). Les patients présentant un pourcentage de spermatozoïde fragmenté supérieur à 16,8% ont été notés dans mon travail « Fragmentation + » par rapport au groupe « Fragmentation - ».

- **Par Comet**

Des culots de 5 millions de spermatozoïdes ont été lavés en PBS puis mis à sec dans un cryotube à – 80°C. La fragmentation de l'ADN spermatique a été évaluée par un test COMET alcalin par les laboratoires CIMAB de Barcelone et Androgen, La Coruna, Espagne, (Prof. J. Alvarez). Les pourcentages de fragmentation de l'ADN spermatique nous ont été transmis pour chaque patient. Les échantillons ont été expédiés vers l'Espagne sous carboglace pour permettre une conservation optimale durant tout le transport.

III.3. Mesure de la Condensation/Protamination de la chromatine spermatique par Chromomycine A 3

La compaction de l'ADN spermatique a été déterminée par un marquage à la Chromomycine A3. La Chromomycine A3 est un fluorochrome qui se fixe spécifiquement sur les séquences

riche en Guanosine-Cytosine (G-C) utilisé pour évaluer un déficit de protamination (Talebi *et al.*, 2008).

Après lavage, entre 200 000 et 500 000 spermatozoïdes ont été étalés sur des lames de verre, et fixés dans du méthanol /acide acétique glacial (3:1) à 4° C pendant 5 min. Pour le marquage, les lames sont traitées pendant 20 min avec 100µL de solution de CMA3 (0,25 mg/mL de McIlvaine buffer, pH 7,0 et 10mM de MgCl₂) en chambre humide. Les lames sont rincées dans un tampon et montées avec une solution 10% DABCO 2,2M - 90% glycérol. Un minimum de 200 spermatozoïdes a été évalué en aveugle sur chaque lame par microscopie à épifluorescence (x100) par deux lecteurs différents. Deux types de modèles de coloration ont été identifiés, à savoir une fluorescence jaune vif de la tête du spermatozoïde qui témoigne d'une chromatine anormalement compactée, et une coloration jaune terne qui indique que la chromatine est normalement compactée.

La littérature fixe le seuil pathologique suivant : lorsque la valeur est supérieure à 30% de spermatozoïdes positifs au test à la CMA3, on observe un taux de fécondation plus faible en ICSI (Sakkas *et al.*, 1996, 1998). Les patients présentant un pourcentage de spermatozoïdes décondensés supérieur à 30% ont été notés dans mon travail « Décondensation + » par rapport au groupe « Décondensation - ».

III.4. Analyse des vacuoles

Une analyse structurale et fonctionnelle des spermatozoïdes a été effectuée avec la technique microscopique MSOME (motile sperm organelle morphology examination). La suspension de spermatozoïdes à analyser a été déposée dans une microgoutte de 5µl de PVP (Polyvinylpyrrolidon, Clinical Grade®, Origio, France) dans une boîte en verre stérile recouvert d'huile minérale (Ovoil®, Vitrolife, Suède). Les spermatozoïdes ont été analysés en contraste interférentiel de Nomarski avec un objectif sec de x6300 (Peer *et al.*, 2007). Les spermatozoïdes sont classés en 2 groupes à l'aide d'un microscope inversé avec contraste de phase d'Hoffman et de Nomarski équipé d'un micromanipulateur AM 6000 Leica (Leica, France) : groupe anormal : présence d'une grande vacuole ou de 2 petites vacuoles ou plus ; groupe normal : absence de vacuole ou présence d'une petite vacuole.

III.5. Mesure de l'expression de marqueurs de la capacitation et de l'acrosome

- **Marqueurs terminaux de capacitation**

La phosphorylation des protéines spermatiques a été évaluée après 0h et 3h d'incubation des spermatozoïdes dans un milieu capacitant dans une atmosphère à 37°C et 5% CO₂. La détection de la phosphorylation des résidus tyrosines (P-Tyr) des protéines spermatiques a été réalisée par western blot utilisant un anticorps monoclonal de souris antiphosphotyrosine (clone 4G10®, Upstate biotechnologie Inc, Lake Placid NY, USA). L'intensité de la phosphorylation a été évaluée par densitométrie après avoir scanné les films. Au début et à la fin de l'incubation, les spermatozoïdes ont été lavés avec 1 mL de HBS 1X, centrifugés (500g, 5 min) et les protéines culotées sont resolubilisées et dénaturées dans du tampon d'électrophorèse en présence d'inhibiteurs de phosphatases, pendant 5min à 100°C. L'équivalent de 250 000 spermatozoïdes a été déposé sur un gel d'acrylamide 7%. Les protéines ont été séparées par migration en Sodium Dodecyl Sulfate méthode Page (SDS-page), puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. Une coloration au Rouge Ponceau a été réalisée au préalable afin de s'assurer que le processus de transfert c'est bien déroulé. Les membranes ont été ensuite saturées par une solution de lait écrémé (déshydraté) diluée dans du tampon Tris Buffer Saline (TBS) contenant 0,1% de Tween® 20 (TTBS) durant 1h à TA et sous agitation (SA) (Pons-Rejraji *et al.*, 2009). Les membranes ont été mises ensuite à incuber 1h à TA et SA dans une solution d'anticorps anti-phosphotyrosines diluée au 1/10 000 dans du TTBS 1X. Elles ont ensuite été rincées dans du TTBS puis incubées 1h (à TA et SA) dans une dilution 1/10 000 de l'anticorps anti-IgG de souris couplé à une peroxydase (HorseRadish Peroxydase-conjugated goat antimouse IgG, Jackson Immuno research WestGroove PA, USA). Les membranes ont été lavées dans du TTBS et les bandes marquées visualisées par ECL (EnhancedChimiLuminescence) après exposition d'un film (Scientific Imaging Film, Kodak) dans une cassette (BioMax Kodak). Afin de relier le signal anti-phosphotyrosine à la quantité de protéines spermatiques déposée, les mêmes membranes ont été traitées selon un protocole d'immunodétection identique mais en utilisant un anticorps anti- α -tubuline. Les films à rayon X représentant les profils de tyrosines phosphorylées et de tubulines ont été scannés, quantifiés par densitométrie et le

signal anti-phosphotyrosine ayant été pondéré par le signal anti-tubuline (Pons-Rejraji *et al.*, 2011).

- **Evaluation de l'état de l'acrosome par PSA-FITC**

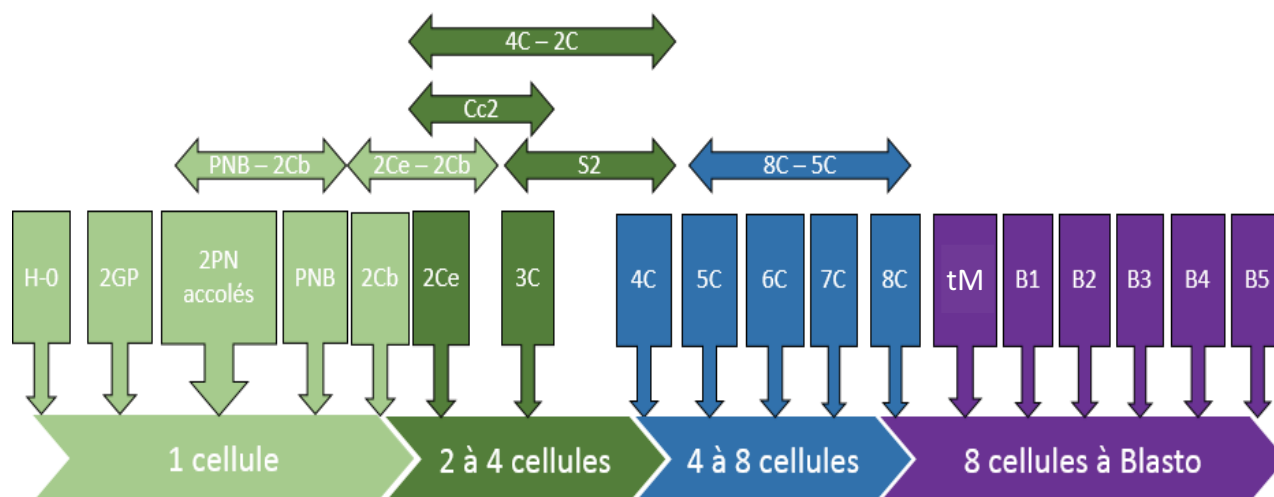
L'agglutinine PSA couplée à un marqueur fluorescent (Fluorescéine IsoThioCyanate, FITC) se lie à des résidus mannose présents dans la membrane externe et à l'intérieur de la vésicule acrosomique du spermatozoïde humain et permet ainsi de visualiser la présence de l'acrosome en microscopie à épi-fluorescence. Après lavage, 200 000 spermatozoïdes ont été déposés sur lame, séchés puis fixés 30 min dans du méthanol 96% à -20°C. Les lames après fixation ont été incubées en présence d'une solution de PSA-FITC 2mg/mL - PBS 1X dans une atmosphère saturée en humidité et à l'obscurité durant 30 min à 4°C. Les lames ont été rincées puis séchées verticalement. Une solution 10% DABCO 2,2M - 90% glycérol a été déposée entre lame et lamelle afin de prévenir la perte de fluorescence. Un total de 200 spermatozoïdes par lame a été compté par immersion (x1000) pour chaque procédure en aveugle par 2 lecteurs. Les spermatozoïdes présentant une fluorescence marquée sur la moitié supérieure de la tête (région acrosomique) ont conservé leur membrane acrosomique, tandis que ceux dépourvus de fluorescence ou présentant une fluorescence sur le segment équatorial sont considérés comme dépourvus de membrane acrosomique (Bucci *et al.*, 2013).

III.6. Impact sur le développement embryonnaire et les issues en AMP

- **Cinétique de développement embryonnaire précoce PrimoVision™**

Les étapes de la cinétique de développement embryonnaire précoce ont été observées par deux lecteurs expérimentés, annotées et qualifiées en double aveugle par une prise continue d'images (une image toutes les dix minutes) de l'embryon en culture à l'aide de la technique « Time Lapse » *via* des unités PrimoVision™. La culture embryonnaire a été réalisée en milieu unique (G-TL®, Vitrolife) et en atmosphère contrôlée en température (37°C), O₂ (5%) et CO₂ (6%). L'étude de l'impact de la qualité nucléaire des spermatozoïdes humains sur le développement embryonnaire nommée PRIMOSPERMO a été réalisée dans le cadre d'un Projet Hospitalier de Recherche Clinique (PRHC) local.

FIGURE 44



Cinétique de développement embryonnaire précoce

Schéma représentatif des différentes étapes clés de l'évaluation des cinétiques de développement embryonnaire :

- H-0 correspond à l'heure moyenne entre l'injection du premier et du dernier ovocyte.
- Le premier marqueur (**2GP**) correspond à l'apparition du 2^{ème} globule polaire, puis le pronoyau paternel et le pronoyau maternel s'accolent (**2PN accolés**), se centrent (**PN centrés**) puis disparaissent (**PNB**). L'embryon est au stade zygote, une cellule.
- Le début de la première division cellulaire est marquée **2cb**, et de termine par **2Ce**. L'intervalle entre la fusion des PN et le début de la 1^{ère} division cellulaire est noté **PNB-2Cb**. L'embryon est alors au stade 2 cellules. La durée de la 1^{ère} division cellulaire est notée **2Ce-2Cb**.
- La durée du stade 2 cellules **Cc2** correspond à la fin du stade 2 cellules jusqu'au stade 3 cellules **3C**. La synchronisation de la division des 2 premiers blastomères **S2** correspond à la durée entre le stade 3 et 4 cellules. La durée du 2^{ème} cycle cellulaire **4C-2C** correspond à l'intervalle entre le stade 2 et 4 cellules **4C**.
- La synchronisation de la 3^{ème} phase de division cellulaire **8C-5C** correspond à l'intervalle entre le stade 5 cellules **5C** et le stade 8 cellules **8C**. Les passages au stade 6 et 7 cellules sont aussi annotés **6C** et **7C**.
- Après le stade 8 cellules, le début de la compaction du stade morula de l'embryon est annoté **tM**. Enfin, le stade blastocyste avec le début de l'expansion de la cavité coelomique ou le blastocèle est notée **B1**.
- Les différents stades de blastocystes sont annotés selon la classification de Garner et Schoolcraft, 1999; noté **B2, B3, B4 et B5**.
- Des anomalies de développement embryonnaire, morphologique, nucléaire ou de division cellulaire sont aussi annotées au décours.

Les différentes étapes et intervalles mesurés sont représentés dans la figure 44.

L'horaire initial de cinétique (H-0) correspondait à l'heure moyenne entre l'injection du premier et du dernier ovocyte en ICSI.

Les phénomènes du développement embryonnaire que nous avons annotés étaient l'apparition du 2ème globule polaire (2GP), puis l'observation du pronoyau paternel et du pronoyau maternel (2PN) accolés et centrés. Enfin, la disparition des deux pronucléi (PNB pour PN blind out) lors de la syngamie a aussi été évaluée.

La première division mitotique se caractérisait par l'apparition de deux cellules débutantes (2Cb pour « beginning »), et se terminait par deux cellules bien individualisées (2Ce pour « ending »). L'intervalle entre la fusion des deux PN et le début de la 1^{ère} division cellulaire était annoté PNB-2Cb. L'embryon était alors au stade 2 cellules. La durée de la 1^{ère} division cellulaire était caractérisée par l'intervalle entre 2Cb et 2Ce (2Ce - 2Cb).

La durée du stade 2 cellules (Cc2) correspondait à la fin du stade 2 cellules jusqu'au stade 3 cellules 3C. La synchronisation de la division des 2 premiers blastomères (S2) correspondait à la durée entre le stade 3 et 4 cellules. La durée du 2^{ème} cycle cellulaire (4C-2C) correspondait à l'intervalle entre le stade 4 (4C) et 2 cellules.

La synchronisation de la 3^{ème} phase de division cellulaire (8C-5C) correspondait à l'intervalle entre le stade 5 cellules (5C) et le stade 8 cellules (8C). Les passages au stade 6 et 7 cellules étaient aussi annotés 6C et 7C. Après le stade 8 cellules, le début de la compaction du stade morula de l'embryon était annoté tM. Enfin, le stade blastocyste avec le début de l'expansion du blastocèle était noté B1. Les différents stades de blastulation ont été annotés B2, B3, B4 et B5 selon la classification de Gardner (Gardner and Schoolcraft, 1999).

Afin de caractériser avec précision le blastocyste à J5, un score alphanumérique lui a été attribué. Trois parties de l'embryon ont été codifiées, le degré d'expansion du blastocyste, le bouton embryonnaire et le trophoctoderme. B pour blastocèle a été noté de 1 à 6, selon le degré d'expansion du blastocèle et son stade de développement. Le blastocyste jeune a été noté B1 si le volume du blastocèle était inférieur à 50%, B2 si le volume était supérieur à 50%. Le blastocyste B3 était en voie d'expansion, alors que le B4 expansé était caractérisé par une zone pellucide amincie. Le B5 était en voie d'éclosion et le B6 éclos. A partir du stade B3 la masse cellulaire interne ainsi que le trophoctoderme ont été caractérisés selon le nombre et l'aspect des cellules. Le bouton embryonnaire a été noté A si celui-ci était

compact, composé de nombreuses cellules et bien individualisé. Il a été noté B s'il était moins organisé avec moins de cellules légèrement regroupées. Il a été noté C, s'il était peu visible et formé de peu de cellules. Le trophoctoderme a été noté A si les cellules formaient un épithélium festonné, cohésif. Il a été noté B si l'épithélium était irrégulier et peu cohésif. Il était noté C si l'épithélium avait un aspect lisse, composé de peu de cellules.

Des anomalies de développement embryonnaire, morphologique, nucléaire ou de division cellulaire ont aussi été annotées au décours : le passage de 1 à 3 cellules ou 2 à 5 cellules, la fragmentation importante des blastomères, la présence de vacuoles, l'aspect dégénératif ou lysé post-injection, la présence de 1PN, 3 PN et plus.

- **Les résultats des issues des tentatives d'ICSI**

Les résultats d'issues des tentatives ont été caractérisés par le taux de fécondation après injection, le taux d'obtention de blastocystes, de « Top Blastosyctes » (ou « TB ») et de grossesse débutante. Un blastocyste de qualité optimale ou « TB » à J5 correspondait dans cette étude à un blastocyste euploïdie de stade B3, B4 ou B5 avec un bouton embryonnaire et un trophoctoderme classés A, B ou C sans anomalie de division (Gardner and Schoolcraft, 1999).

IV. Analyses statistiques

Les variables continues ont été présentées sous forme de moyenne et erreur standard (SEM), sous réserve de la normalité de leur distribution statistique (test de Shapiro-Wilk au besoin ; Bland and Altman, 1986). Les variables qualitatives ont été exprimées en termes d'effectifs ou en pourcentages associés. Les comparaisons entre groupes concernant les paramètres de nature quantitative ont été appréciées par les tests t de Student ou de Mann-Whitney si les conditions d'application du t-test n'étaient pas satisfaites (normalité et homoscedasticité étudiée par test de Fisher-Snedecor). Les analyses de type courbe ROC ont été effectuées. Les résultats ont été exprimés en termes d'AUC et IC à 95%. Ces analyses ont été complétées par une analyse factorielle discriminante (FDA) utilisée pour déterminer quels paramètres distinguent les caractéristiques spermatiques (les règles de discrimination reposent sur des combinaisons linéaires des variables observées, appelées facteurs

discriminants). Les paramètres choisis pour être inclus dans le processus de la FDA ont été retenus en fonction des résultats univariés et de la pertinence biologique. Une FDA est une discrimination supervisée et peut être considérée comme une technique de classification. L'étude analytique des équations impliquées montre que les facteurs discriminants minimisent la distance de Mahalanobis dans chaque groupe et maximisent la distance entre les groupes, en fournissant des groupes compacts aussi dispersés que possible dans l'espace. Les comparaisons entre groupes concernant des paramètres qualitatifs ont été réalisées par le test du Chi2 ou le cas échéant par le test exact de Fisher. Les relations entre variables de nature quantitative ont été explorées par coefficients de corrélation (Pearson ou Spearman). Les matrices de corrélation ont été représentées sous forme de *heatmap*. Enfin, pour déterminer la concordance statistique entre les variables qualitatives, les coefficients de corrélations (Pearson et Spearman selon la distribution statistique) et le coefficient de concordance (de LIN) ont été calculés. Des représentations graphiques de Bland-Altman ont été réalisées pour étudier ces concordances. Les résultats associés aux biais et à l'accord de limites ont été analysés. Ces analyses ont été complétées par le calcul de la différence entre deux techniques (delta = valeurs absolues entre deux techniques). Les résultats ont été exprimés avec un intervalle de confiance de 95%. La variabilité selon les opérateurs ou les lames par échantillons a également été présentée grâce au coefficient de variation.

Tous les tests statistiques ont été considérés pour un risque d'erreur de première espèce bilatéral de 5%. Comme discuté par Feise, l'ajustement du risque d'erreur de 1^{ère} espèce n'a pas été proposé systématiquement, mais au cas par cas selon les considérations cliniques et non uniquement statistiques (par exemple correction de Sidak pour l'étude des corrélations) ; une attention particulière a été portée à l'étude des tailles d'effet (Feise, 2002). Les logiciels « GraphPad PRISM® 5 » (La Jolla, Californie, États-Unis), STATA® (Version 13, StataCorp, College Station, Texas, États-Unis) et le système SAS (SAS v9.4, SAS institut Inc., Cary, NUC, USA) ont été utilisés pour effectuer l'analyse statistique et générer les graphiques associés.

Résultats

I. Oxydation de l'ADN spermatique

Stress oxydant : Un test diagnostique pour débiter

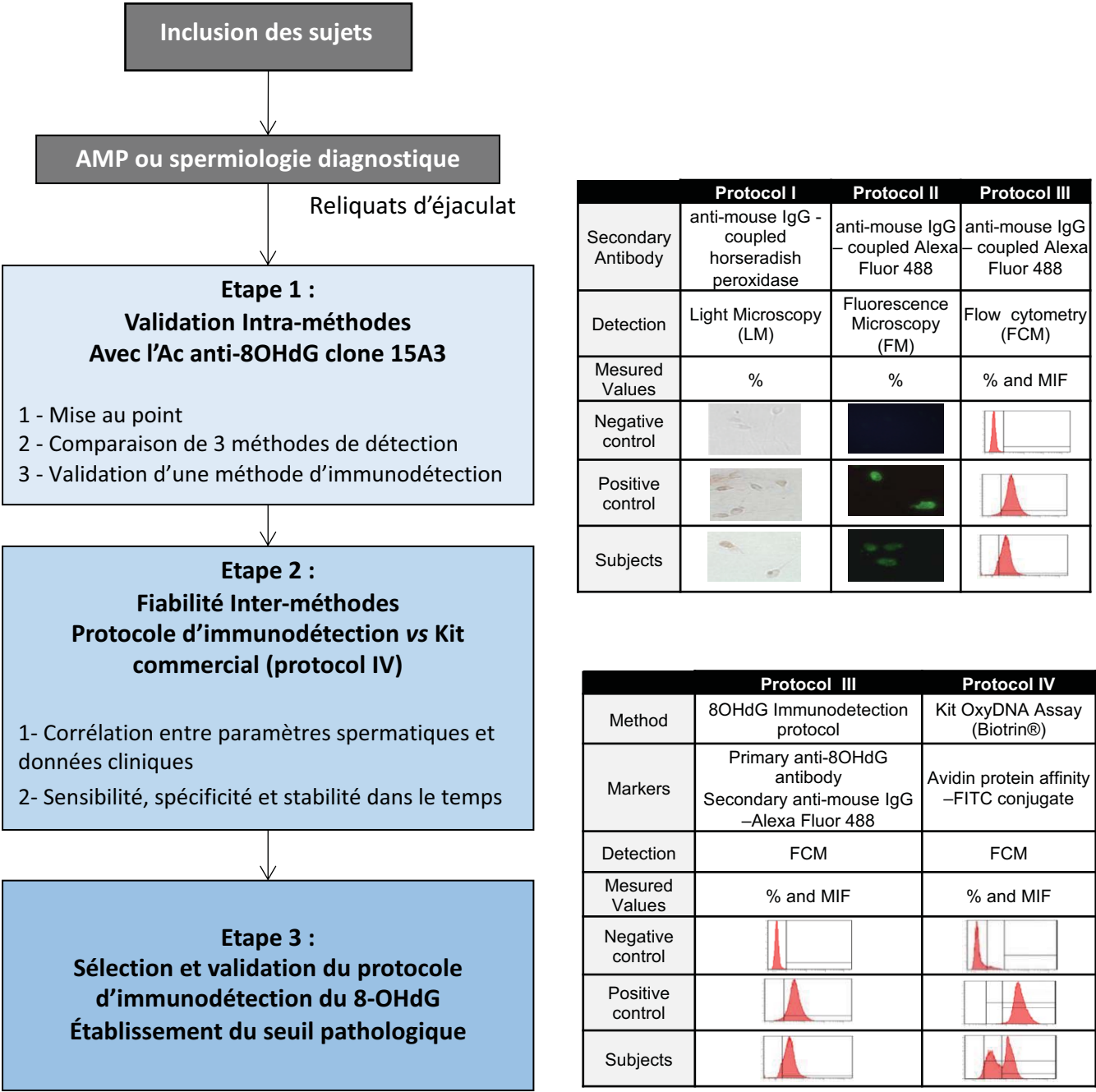
De façon conventionnelle, la fertilité masculine est évaluée quotidiennement en spermologie diagnostique grâce à la réalisation d'un spermogramme-spermocytogramme. Le volume, la numération, la vitalité, la mobilité ainsi que la morphologie sont analysés suivant en cela les recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé ("WHO | WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen," 2010). Or cette prise en charge bien que très répandue de nos jours, semble insuffisante pour qualifier et expliquer une infertilité masculine. En effet, un grand nombre de patient présentant un examen spermologique standard sans anomalies n'arrivent pas à procréer (Garrido *et al.*, 2004). D'où l'intérêt grandissant ces dernières années de mettre au point des tests reproductibles et spécifiques permettant de qualifier l'intégrité structurelle et fonctionnelle de l'ADN spermatique chez l'homme garant d'un développement embryonnaire normal et de la transmission à la descendance d'un génome paternel exempt d'altérations.

Comme cité plus haut, le stress oxydant est un facteur majeur à l'origine d'infertilité masculine, notamment, du fait de la décondensation et de la fragmentation de l'ADN spermatique qu'il peut générer (Agarwal *et al.*, 2008b). La détection du résidu 8-OHdG est à ce jour le marqueur le plus pertinent et le plus précoce pour qualifier les dommages oxydants de l'ADN spermatique (Tremellen, 2008). Depuis 2002, sont apparus sur le marché des kits permettant la détection du 8-OHdG tel que le kit OxyDNA Test® (Biotrin). Ces kits sont largement controversés quant à leur spécificité (Cambi *et al.*, 2013) ce qui pose la question de la pertinence de leur utilisation en routine en clinique. Récemment, notre équipe de recherche a mis au point l'immuno-détection du 8-OHdG sur spermatozoïdes murins (Noblanc *et al.*, 2013). A partir de ce protocole, et dans le cadre d'une collaboration entre un groupe de recherche australien (Prof R. John Aitken, Université de Newcastle, NSW, AU) et une société américaine de biotechnologie (Celloxess Inc., NJ, USA) l'objectif de mon travail a été de développer un test diagnostique mesurant l'oxydation de l'ADN spermatique chez l'homme par l'immunodétection des résidus 8-OHdG, pour une utilisation en routine

FIGURE 45

Schéma expérimental

Diagnostic de l’oxydation de l’ADN spermatique chez l’homme et détermination du seuil par immunodétection du résidu 8-OHdG et cytométrie en flux



hospitalière et de proposer un seuil critique en relation avec les paramètres spermatiques et les caractéristiques cliniques des patients pris en charge pour infertilité.

Schéma expérimental (Figure 45) : Diagnostic de l'oxydation de l'ADN spermatique chez l'homme et détermination du seuil par immunodétection du résidu 8-OHdG.

Accuracy of human sperm DNA oxidation quantification and threshold determination using an 8-OHdG immuno-detection assay

S. Vorilhon^{1,2}, F. Brugnon^{1,2,7}, A. Kocer², S. Dollet^{2,7}, C. Bourgne³, M. Berger³, L. Janny^{1,2}, B. Pereira⁴, R.J. Aitken⁵, A. Moazamian⁶, P. Gharagozloo⁶, J. Drevet^{2,*}, and H. Pons-Rejraji^{1,2,7}

¹CHU Clermont Ferrand, CHU Estaing, Laboratoire de Biologie du Développement et de la Reproduction, AMP, CECOS, F-63003 Clermont-Ferrand, France ²Université Clermont Auvergne, CNRS UMR6293, INSERM U1103, GReD, F-63000 Clermont-Ferrand, France ³CHU Clermont Ferrand, Hôpital Estaing, Laboratoire d'Hématologie Biologique, F-63003 Clermont-Ferrand, France ⁴CHU Clermont-Ferrand, DRCL, 'Délégation Recherche Clinique et Innovation', Clermont-Ferrand, France ⁵Priority Research Centre in Reproductive Science, Discipline of Biological Sciences, University of Newcastle, Callaghan, NSW 2308, Australia ⁶CellOxess LLC, 830 Bear Tavern Road, Ewing, NJ 08628, USA ⁷Present address: Université Clermont Auvergne, UFR Médecine, INSERM I240, IMoST., F-63000 Clermont-Ferrand, France

*Correspondence address. GReD laboratory, Université Clermont Auvergne, CNRS UMR6293, INSERM U1103, Bâtiment CRBC, 28, Place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand, France. E-mail: joel.drevet@uca.fr

Submitted on July 18, 2017; resubmitted on January 29, 2018; accepted on February 3, 2018

STUDY QUESTION: Can a discriminant threshold be determined for human sperm DNA oxidation?

SUMMARY ANSWER: A discriminant threshold was found with 65.8% of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)-positive sperm cells and a mean intensity of fluorescence (MIF) of 552 arbitrary units.

WHAT IS KNOWN ALREADY: Oxidative stress is known to interfere with sperm quality and fertilizing capacity. However, current practice does not include the routine determination of oxidative DNA damage in spermatozoa; optimized consensus protocols are lacking and no thresholds of normality have been established.

STUDY DESIGN, SIZE, DURATION: Intra- and inter-method comparisons between four protocols (I–IV) were conducted to determine the most relevant and efficient means of assessing human sperm 8-OHdG content. Tests of assay repeatability, specificity, sensitivity and stability were performed to validate an optimized methodology for routine diagnostic use.

PARTICIPANTS/MATERIALS, SETTING, METHODS: This prospective study compared three immuno-detection methods including immunocytochemistry, fluorescence microscopy and flow cytometry. Sperm DNA oxidation for 80 patients was determined relative to semen parameters and clinical conditions, using the selected immuno-detection protocol in comparison with a commercial kit. These patients (age 35 ± 1 years: mean $\pm$ SEM) presented with normozoospermic ($n = 40$) or altered parameters (necro- or/and astheno- or/and teratozoospermia or/and leukocytospermia).

MAIN RESULTS AND THE ROLE OF CHANCE: Significant positive Pearson and Spearman correlations were determined for 8-OHdG values and sperm parameters using protocol III. A notable high and positive correlation was revealed for MIF with BMI and leukocyte concentration. Protocol III was the most discriminating method regarding assay repeatability, specificity, sensitivity, stability and reliability for sperm parameter alterations, in particular leukocytospermia according to parametric or non-parametric tests, effect-size determinations and factorial analysis such as principal component analysis and factor discriminant analysis. Of interest is that 39% of the subjects with 'pathological' sperm DNA oxidation values were normozoospermic.

LIMITATIONS, REASONS FOR CAUTION: The oligozoospermic population was not evaluated in this study because insufficient material was available to carry out the comparisons. However, spermatozoa concentration was taken into account in the statistical analysis.

WIDER IMPLICATIONS OF THE FINDINGS: Our study is the first validation of a protocol to determine a discriminant threshold for human sperm DNA oxidation. The protocol's detection accuracy for 8-OHdG human sperm DNA residues, stability over time, and relationship to human sperm quality were demonstrated. The assay should find application in the diagnosis of male factor infertility associated with oxidative stress.

STUDY FUNDING/COMPETING INTEREST(S): This work was funded by institutional grants from the CNRS, INSERM and Université Clermont Auvergne (to J.R.D.) and by Clermont-Ferrand Hospital-CECOS research funds (to L.J. and F.B.). P.G., A.M., R.J.A. and J.D. are, respectively, CEO, scientific director and scientific advisors of a US-based biotech company (Celloxess, Princeton, NJ, USA) involved in preventative medicine with a focus on the generation of antioxidant oral supplements.

Key words: 8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) / human spermatozoa / DNA oxidation / pathological threshold / percentage of 8-OHdG-positive spermatozoa / fluorescence / leukocyte concentration / stability / repeatability

Introduction

Oxidative stress (OS) is the major contributing cause of damage to sperm DNA (Aitken, 1994; Lewis et al., 1995; Fisher and Aitken, 1997; Irvine et al., 2000; Aitken et al., 2012, 2014). An early marker of DNA oxidation is the formation of base adducts such as 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) (De Iulius et al., 2009). DNA oxidation triggers activation of the base excision repair pathway (BER), which eliminates oxidized residues, such as 8-OHdG, via the 8-oxoguanine glycosylase I (OGGI) enzyme, and inserts a new nucleotide on free 3'-OH ends using the APEI protein (Smith et al., 2013). APEI is not present in human spermatozoa, making it impossible to complete the BER pathway, which remains halted at the generation of an abasic site (Hoeijmakers, 2001; Smith et al., 2013). However, the oocyte does possess APEI and XRCC1, permitting continuation of the BER pathway and effective DNA repair following fertilization (Lord and Aitken, 2015). Since the oocyte is deficient in OGGI (Wood et al., 1992; Lord and Aitken, 2015), non-resolution of sperm DNA 8-OHdG adducts means they will persist in the zygote and create the opportunity for mutations to occur (typically transversion mutations) prior to the initiation of embryonic development (Wood et al., 1992; Lord and Aitken, 2015). Consistent with this situation, it has been reported that high sperm DNA oxidation can impair the oocyte's ability to activate a normal developmental program (Morado et al., 2013; Park et al., 2015). In this context, assessment of sperm DNA oxidation should be of interest to manage male factor infertility associated with OS.

A limited number of reports have shown that 8-OHdG levels are negatively correlated with male fecundity (Fraga et al., 1991; Loft et al., 2003; Lewis and Aitken, 2005) and sperm quality (Cambi et al., 2013). However, others have found no correlation between oxidative DNA alterations and semen parameters (Thomson et al., 2009; Montjean et al., 2010; Zribi et al., 2011). These discrepancies underpin the lack of consensus regarding the predictive utility of such evaluations and stem from differences in several parameters including: the type of assays used to evaluate DNA oxidation, operator bias, variable patient selection criteria and the sperm isolation protocols used. The literature reveals several methods to detect sperm DNA oxidation, particularly the detection of 8-OHdG residues. Recently, the specificity and reliability of commercially available kits for the detection of human sperm DNA 8-OHdG residues have been questioned (Cambi et al., 2013) revealing the lack of a proper and reliable tool to evaluate sperm DNA oxidation. The aims of this study were to validate a standardized protocol using specific 8-OHdG immuno-detection, compare its

accuracy with the commercial OxyDNA Test[®] and examine its output in relation to various parameters of sperm quality. The assay we have developed has allowed us to propose a discriminant threshold of human sperm DNA oxidation that should find application in the diagnosis of male factor infertility associated with OS.

Material and Methods

Patient samples and ethics statement

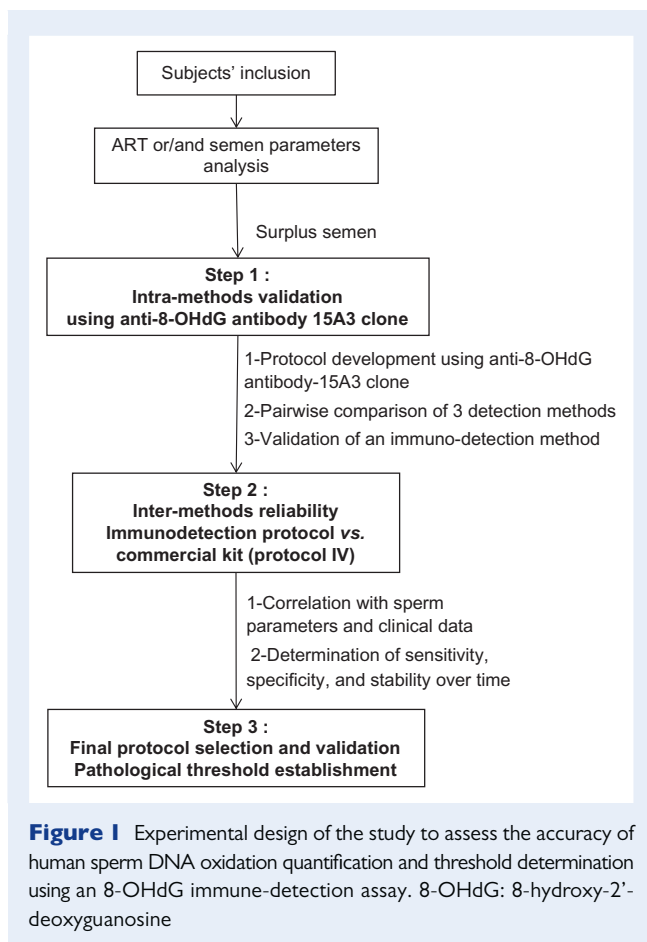
Samples were obtained from men undergoing routine semen analysis at the Center for Reproductive Medicine, Clermont-Ferrand, France between May 2014 and November 2017. Patients were recruited in accordance with the 1975 Declaration of Helsinki principles on human experimentation. Only surplus semen was used in this study. Written informed consent was obtained from each man prior to inclusion of any sperm sample in the 'Germethèque' biobank. This study was approved by the 'Germethèque' Scientific Committee and the Ethical Committee under the French Institute Review Board reference CPP Sud-Est 6, DC2008-DC58. Patient clinical data, notably fecundity (having had a child naturally, $n = 22$), were compiled during medical counseling. Semen samples were collected and conventional semen analysis was performed in accordance with the World Health Organization 2010 guidelines (WHO, 2010). Leukocytes were detected using the LeucoScreen Kit (FertiPro N.V., Belgium).

Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France) with the exception of monoclonal anti-8-OHdG antibody (mouse anti-8-OHdG monoclonal antibody DNA/RNA Damage Antibody-15A3, NBI10-96878, Novus Biological[®], France), polyclonal anti-mouse IgG-coupled horse-radish peroxidase [HRP] (P.A.R.I.S Anticorps, France), Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse IgG secondary antibody (Molecular Probes[®], Eugene, OR, USA), OxyDNA Test[®] (EKF Diagnostics, Biotrin International, Dublin, Ireland), Vector Nova Red substrate kit (Vector Laboratories, AbCys[®], Paris, France), Super Frost[®] slides (Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France), exogenous 8-OHdG and 3-deoxyguanosine (3-dG, Biolog Life Science Institute[®], Bremen, Germany) and H₂O₂ (Gilbert, Herouville-Saint-Clair, France).

Experimental design

The experimental design is described in Fig. 1 and Supplementary Fig. S1. In the first set of experiments, we carried out an intra-methods comparison between three methods of detection (pairwise) using the same anti-8-OHdG primary antibody and light microscopy (LM, protocol I), fluorescence



microscopy (FM, protocol II) and flow cytometry (FCM, protocol III). In the second set of experiments, we assessed the reliability of values obtained with protocol III and those obtained with the OxyDNA Test® (protocol IV). Using FCM for both protocols III and IV, the percentage of 8-OHdG-positive spermatozoa and the mean intensity level of fluorescence (MIF) were evaluated.

8-OHdG detection

For all four conditions, PBS-washed samples were incubated for 10 min in the dark in a decondensation buffer comprising 2 mM dithiothreitol (DTT), 0.5% Triton X-100 and 1× PBS, as previously described (Noblanc *et al.*, 2012), followed by fixation with 4% paraformaldehyde. For protocols I, II and III, spermatozoa were incubated in 1.5% normal goat serum saturation solution. Incubations with anti-8-OHdG monoclonal antibody (1:1000) and secondary (1:500 and 1:1000 for IgG-coupled [HRP] and Alexa Fluor 488, respectively) antibodies were conducted overnight and for 90 min, respectively. For protocol I, peroxidase signal detection was achieved using the Vector Nova Red substrate kit. For both protocols I and II each sample was spread on two Super Frost® slides and the slides were read 'blind' by two different observers. Spermatozoa were considered as 8-OHdG-positive when a spot of peroxidase (pink-brown color) or green fluorescence was observed (Supplementary Fig. S1). In protocol IV, the OxyDNA Test® was used per the manufacturer's indications. For each assay, control incubations were conducted comprising a negative control untreated with anti-8-OHdG primary antibody or the binding conjugate, and a positive control treated with an 8 M H₂O₂ solution for 1 h before fixation. The specificity and sensitivity of protocols III and IV were controlled ($n = 3$) by

pre-incubating anti-8-OHdG antibody or FITC-conjugate with increasing concentrations of exogenous 8-OHdG or 3-dG (negative control) for 3 h. To measure signal stability as a function of time, spermatozoa underwent fixation and were then stored in a 0.01% sodium azide/PBS solution for 0, 15 and 30 days before final labeling. An analysis was then performed to compare any changes in oxidized sperm percentage and MIF. Tests of intra- and inter-assay repeatability were also performed to determine coefficient of variation (CV) using five sperm samples assayed in triplicate (intra-assay CV) on three different days (inter-assay CV).

Analyses of Protocols III and IV were performed on a BD FACS Aria SORP (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) cell sorter using an 85 µm nozzle. The forward-scattered light and side-scattered light were detected on a linear scale and used to gate sperm cells. Sperm cell gating was confirmed by microscopy after cell sorting. Cytometry detection using protocol IV differentiated two subpopulations (Supplementary Fig. S1). Throughout this work, we have considered both the total fluorescent sperm population termed 'IV population' and the subpopulation with the highest MIF termed 'HF IV' (HF for highly fluorescent).

Statistical analysis

All analyses were performed using GraphPad PRISM® 5 (La Jolla, CA, USA) and STATA® (version 13, StataCorp, College Station, TX, USA) software. Data were presented as the mean ± SEM or median [interquartile range]. Concordance and correlations tests were studied using Bland-Altman test and Lin's concordance coefficient [κ_{LIN}] (Bland and Altman, 1986) and, Pearson or Spearman (rho coefficient) correlations, respectively. For each pairwise comparison, the statistical difference was evaluated using parametric (Student's *t*-test) or non-parametric (Wilcoxon test) paired tests and effect-size (ES) values (Cohen, 1998). Receiver operating characteristic (ROC) curve analyses were performed using AUC and 95% CI. Then, the optimal threshold to predict a pathological state was determined according to biological and clinical relevance and according to usual indexes recommended in the literature. These usual inferential analyses were followed by factorial analysis: principal component analysis (PCA) used to study relationships between quantitative parameters, and factor discriminant analysis (FDA). Statistical analysis details are described in Supplementary Data.

Results

Intra-methods and inter-methods comparisons

Protocols I (LM) and II (FM) were moderately, but significantly concordant with a Bland-Altman bias of measure of 4.7 [−36.51 to 45.84] (Table I). Protocols II and III (FCM) were both significantly and substantially positively correlated ($P = 0.004$) and concordant ($\kappa_{LIN} = 0.66$, $P < 0.001$) with a Bland-Altman bias of 2.4 [−26.66–31.34] which was highly reliable giving comparable values for the proportion of 8-OHdG-positive spermatozoa, for both subjects and positive controls.

The mean percentage of 8-OHdG-positive spermatozoa labeled with protocol IV was significantly higher than with protocol III (84.9% vs. 66.6% $P < 0.001$, Table I) and very weakly concordant ($\kappa_{LIN} = 0.28$, $P < 0.001$, Bland-Altman bias of −17.6 [−61.4–26.1]) and correlated ($r = 0.41$, $P = 0.0002$). MIF values were not significantly different, but the two methods were neither significantly correlated nor concordant between themselves: 830 vs. 937 arbitrary units (a.u.) for protocols IV and III, respectively (Table I). Flow cytometry detection using

Table 1 Intra-method validation using the same primary anti-8-OHdG antibody (Protocols I vs. II vs. III), and inter-methods validation using anti-8-OHdG immunodetection (Protocol III) vs. the OxyDNA Test® (Protocol IV)

	Protocol I vs. Protocol II	Protocol II vs. Protocol III	Protocol III vs. Protocol IV	
<i>n</i>	10	15	80	
Positive controls Mean ± SEM				MIF (a.u.)
[C1]	8-OHdG spz (%) 97.0 ± 3.0 [90.2–103.8]	8-OHdG spz (%) 72.9 ± 5.0 [62.1–83.7]	8-OHdG spz (%) 83.5 ± 1.7 [80.1–87.0]	1986 ± 277 [1434–2538]
Subjects Mean ± SEM				2867 ± 121** [2625–3109]
[C1]	8-OHdG spz (%) 70.7 ± 8.2 [52.2–89.2]	8-OHdG spz (%) 52.8 ± 4 [44.3–61.3]	8-OHdG spz (%) 66.6 ± 2.6 [61.4–71.8]	MIF (a.u.) 937 ± 126 [685–1208]
830 ± 53 [726–936]				
Concordance				
Kappa UN	0.57***	0.66***	0.28***	0.06
Bland and Altman Bias	4.7	2.4	−17.6	115.6
Pearson or Spearman correlation				
<i>r</i>	0.61	0.69***	0.41***	0.09

Intra-methods and inter-method validations were determined by comparing pairwise protocols I vs. II ($n = 10$), protocols II vs. III ($n = 15$), and protocols III vs. IV ($n = 80$) by considering for subjects and controls: statistical difference using parametric (Student's *t*-test) or non-parametric (Wilcoxon test) paired tests according to statistical distribution and number of subjects; Statistical concordance coefficient (Kappa LIN) and Bland–Altman test (Bland and Altman Bias). Kappa LIN values are usually formed in a scheme where -0.20 is negligible, 0.21 – 0.40 weak, 0.41 – 0.60 moderate, 0.61 – 0.80 substantial and >0.8 excellent concordance. The Bland–Altman test measured the difference between the two methods, also called 'bias of measure'; Pearson or Spearman correlations (r) according to statistical distribution and number of subjects. Values are mean $\pm$ SEM for percentage (%) of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine-positive spermatozoa (8-OHdG spz) and the mean intensity of fluorescence (MIF) using arbitrary units (a.u.) with agreement limits corresponding to 95% CI.

*
**
*** indicate significant difference.

protocol IV distinguished two populations with different fluorescent intensity profiles (Supplementary Fig. S1). Comparison of only the highly fluorescent (HF) subpopulation revealed the protocol IV values were also neither significantly concordant ($\kappa_{\text{LIN}} = 0.051$, $P = 0.515$) nor correlated ($r = 0.074$, $P = 0.516$) with protocol III, with a very high bias of 23.6% [−44 to 91.3]. These results were confirmed by the individual distribution profiles (Supplementary Fig. S2) showing no similarity in the staining profiles of protocols III and IV. This was notable for the 8-OHdG-positive sperm percentage.

The discordance between the three profiles suggests that protocols III and IV did not detect the same target in the human sperm nucleus. Competition experiments with exogenous 8-OHdG and 3-dG confirmed this hypothesis (Supplementary Fig. S3). Indeed, we observed a significant and dose-dependent shift in the percentage of 8-OHdG-positive cells detected using protocol III when pre-incubation with exogenous 8-OHdG was performed (from 83.6% for the basal condition to 39.7% when 2.5 μmol of competitor was employed $P < 0.001$, Supplementary Fig. S3). On the contrary, there was no change to the 8-OHdG-positive percentages when an identical competition was carried out with protocol IV. Although MIF values were decreased for both protocols, the measured effects were not statistically significant due to inter-individual variability ($P = 0.14$ and $P = 0.74$ for protocols III and IV, respectively). In contrast, when pre-incubation was carried out with an unrelated 3-dG residue we observed no impact on either the percentage or on the MIF in either protocol III or IV. These results highlighted the higher sensitivity and specificity of protocol III compared with protocol IV for the detection of human sperm 8-OHdG residues.

Correlative analyses and reliability of 8-OHdG levels with sperm and clinical parameters

Using protocol III, a significant positive correlation was observed between MIF and BMI ($r = 0.6$, $P < 0.001$, Table II) as overweight patients showed a significantly higher MIF compared with the normal-weight group ($P < 0.01$, Table II). The MIF showed a significant positive correlation with round cell concentration ($r = 0.26$, $P < 0.05$ Table II and PCA, Supplementary Fig. S3B, sperm concentration ($r = 0.25$, $P < 0.05$) and polymorphonuclear neutrophil cell (PMN) concentration ($r = 0.5$, $P < 0.001$). Furthermore, we revealed significant differences in 8-OHdG⁺ spermatozoa percentage and/or MIF for all sperm parameters investigated, i.e. necrozoospermia ($P < 0.05$), asthenozoospermia ($P < 0.01$), teratozoospermia ($P < 0.05$) and leukocytospermia ($P < 0.001$) subjects in comparison with respective control groups (Table II). The highest ES was observed for leukocytospermia subjects with a value of 1.82 [1.12; 2.52] in comparison with subjects with a normal seminal PMN concentration (Table II). When subjects with altered sperm parameters (irrespective of the alteration) were compared to normozoospermic subjects, a significant difference in MIF was also seen with an ES = 0.6 ([0.15; 1.05], $P < 0.01$). We did not determine any significant difference between fecund or infecund subject groups regarding percentage ($P = 0.75$) or MIF ($P = 0.26$). Using protocol IV, neither the 8-OHdG spermatozoa percentage nor the MIF showed any significant correlation with sperm parameters, fecundity or clinical data (Table II and PCA analysis: Supplementary Fig. S3B).

ROC curve analysis was used to determine the empirical optimal cut point in relation to sperm parameters. With regard to protocol III, optimal cut-off points of 65.8% for 8-OHdG-positive sperm with a MIF of 552 a.u. were determined, with an AUC of 0.62 ([0.49; 0.74]; sensitivity = 0.54; specificity = 0.72, Fig. 2A) and 0.57 ([0.44; 0.70]; sensitivity = 0.72; specificity = 0.46) for MIF and percentage, respectively. Using this threshold, we clearly distinguished two major subpopulations within the value distributions presented (Fig. 2B): in the first, 23 subjects had DNA sperm oxidation values higher than the cut-off (light gray area surrounded by a red line box), 61% possessed altered sperm parameters, notably leukocytospermia (71%); in the second, 47 subjects had a MIF below or equal to 552 a.u., regardless of the positive spermatozoa proportion (dark gray area surrounded by a blue line), 40% presented with altered sperm parameters and of these 89% had teratozoospermia. Only two patients exhibited leukocytospermia. It follows that 39% of the subjects with 'pathological' sperm DNA oxidation were otherwise normozoospermic.

With regard to protocol IV, ROC analysis allowed us to determine an empirical threshold for MIF and percentage of 758 a.u. and 84.4%, respectively, but their AUC were not correct. Moreover, the value distribution analysis (Fig. 2C) did not reveal any significant discrimination regarding global sperm alteration.

The protocol III thresholds determined for 8-OHdG and MIF were particularly discriminating with regard to PMN concentration and leukocytospermia as shown by the high sensitivity (0.86) and specificity (0.79) of the ROC curve (AUC = 0.87 [0.76; 0.99], Fig. 3A) and the factorial discriminant analysis (FDA, Fig. 3B and C). Indeed, we observed that each subject represented by a point in FDA was discriminated satisfactorily according to PMN concentration, clearly distinguishing two populations. This was not the case for protocol IV, with respect to either the total or the HF population (FDA representations show all the points gathered at the center of Fig. 3C).

Stability and repeatability assays

To determine signal stability over the time, fixed spermatozoa were stored in 0.01% sodium azide solution in PBS for 0, 15 and 30 days before labeling. With protocol III, the first significant alteration to MIF and oxidized sperm proportions appeared after 30 days of storage for both subject samples and positive controls (Supplementary Fig. S4A and B). With protocol IV, a significant increase was observed for the oxidized sperm proportion from Day 15 for the positive controls ($P < 0.05$ Supplementary Fig. S4C). Finally, intra- and inter-assay CVs (Supplementary Table S1) were determined using protocol III. The CVs were less than or equal to 7.5% for both percentage and MIF values for patients and H₂O₂ control values, indicating an acceptable repeatability for diagnostic use.

Discussion

Protocols I, II and III showed consistent reliability. However, several practical characteristics concerning protocols I and II render them difficult for continued diagnostic application. Peroxidase detection coupled with light microscopy is time-consuming, has a long learning curve, and observers must be experienced in order to read 8-OHdG sperm labeling in a consistent manner without introducing inter-operator

Table II Relationship between sperm DNA oxidation and clinical and sperm parameters.

	Mean ± SEM	Protocol III Anti 8-OHdG antibody			Protocol IV Kit	
		% 8-OHdG spz	MIF	EFFECT-SIZE	% 8-OHdG spz	MIF
Clinical parameters						
				Spearman <i>r</i> correlation		
Age (Y)		<i>r</i> = −0.19	<i>r</i> = 0.06		<i>r</i> = −0.15	<i>r</i> = 0.09
<35 (<i>n</i> = 41)	30.8 ± 0.5	71 ± 3	850 ± 148		87.6 ± 1.4	836 ± 86
35–44 (<i>n</i> = 29)	37.7 ± 0.5	60 ± 5	940 ± 224		78.9 ± 3.6	831 ± 67
≥45 (<i>n</i> = 10)	49.0 ± 1.3	65 ± 9	1286 ± 502		78.5 ± 7.9	850 ± 142
BMI		<i>r</i> = 0.21	<i>r</i> = 0.6***		<i>r</i> = 0.07	<i>r</i> = −0.05
Normal (<i>n</i> = 14)	22.8 ± 0.4	63.4 ± 6	379 ± 65		86.4 ± 1.7	794 ± 105
≥25 kg/m ² (<i>n</i> = 20)	28.7 ± 1.1	66.6 ± 6	1478 ± 373**		77.3 ± 5.7	871 ± 128
Semen parameters						
				Spearman <i>r</i> correlation		
Vitality (%)		<i>r</i> = 0.04	<i>r</i> = −0.08		<i>r</i> = −0.01	<i>r</i> = −0.28
Control <i>n</i> = 39	47.6 ± 1.2	71.9 ± 3.3	1068 ± 201		86.2 ± 2.0	805 ± 71
Necrozoospermia <i>n</i> = 8	49 ± 2.7	50.5 ± 8.5*	768 ± 301	−0.25 [1.01; 0.52]	79.1 ± 4.5	1093 ± 131
Progressive motility (%)		<i>r</i> = 0.05	<i>r</i> = −0.13		<i>r</i> = 0.07	<i>r</i> = 0.06
Control <i>n</i> = 68	49.3 ± 1.1	66.7 ± 2.7	877 ± 142		84.3 ± 1.8	835 ± 57
Asthenozoospermia <i>n</i> = 12	22.5 ± 2.2	65.9 ± 8.4	1277 ± 236**	0.35 [0.26; 0.97]	77.4 ± 6.3	808 ± 140
Typical morphology (%)		<i>r</i> = 0.12	<i>r</i> = −0.04		<i>r</i> = 0.25	<i>r</i> = 0.17
Control <i>n</i> = 54	11.8 ± 0.9	70.2 ± 2.9	985 ± 168		84.6 ± 2.5	883 ± 71
Teratozoospermia <i>n</i> = 26	1.6 ± 0.2	59.4 ± 5.1*	843 ± 176	−0.13 [−0.59; 0.34]	80.6 ± 2.2**	727 ± 66
Sperm concentration (×10 ⁶ /ml)		<i>r</i> = 0.21	<i>r</i> = 0.25*		<i>r</i> = 0.19	<i>r</i> = 0.03
Round cell concentration (×10 ⁶ /ml)		<i>r</i> = 0.07	<i>r</i> = 0.26*		<i>r</i> = −0.05	<i>r</i> = −0.19
PMN concentration (×10 ⁶ /ml)		<i>r</i> = 0.19	<i>r</i> = 0.5***		<i>r</i> = −0.11	<i>r</i> = −0.07
Control <i>n</i> = 38	0.2 ± 0.3	66.9 ± 3.5	609 ± 75		84.4 ± 2.0	819 ± 57
Leukocytospermia <i>n</i> = 14	9.0 ± 4.0	72.4 ± 7.0	2435 ± 488***	1.82 [1.12; 2.52]	82.4 ± 6.2	819 ± 165

PMN: polymorphonuclear neutrophil cells.

Relationship between sperm DNA oxidation and clinical and sperm parameters were measured using Spearman correlations (*r*), parametric or non-parametric tests according to statistical distribution and number of subjects (*n*) and the effect-size determination. Data are presented as the mean $\pm$ SEM with agreement limits corresponding to 95% CI. *, **, *** indicate significant difference with $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$ in comparison with respective normal groups. Numbers in bold characters are statistically significant.

variability. Detection by FCM in protocol III is impartial and enables evaluation of a large number of cells over a short period of time.

Our study shows a relatively high percentage of positive sperm cells identified by all the protocols when compared with previously reported observations (Meseguer et al., 2008; Zribi et al., 2010, 2011; Cambi et al., 2013). The DNA decondensation pretreatment could partly explain this situation, by increasing antibody access to DNA 8-OHdG sites. This step was optimized in order to ensure access of the anti-8-OHdG antibody and OxyDNA conjugate to most sites of DNA oxidation in sperm chromatin with the goal of obtaining the best signal with the lowest concentration of antibody or conjugate (data not shown). We also reduced the time of decondensation to 10 min with 2 mM DTT to preserve head morphology without seeing a significant difference in labeling in comparison with the 45-min incubation currently used (Twigg et al., 1998; De Iuliis et al., 2009; Muratori et al., 2015).

Moreover, we defined 8-OHdG positivity as any spermatozoa with a spot of fluorescence rather than previous methods that defined positivity when over 50% of the head was stained (Park et al., 2015). This was adopted to give the most sensitive indication of oxidative damage and to derive an objective threshold value for determining correlations with

sperm quality. In a similar manner, the 8 M H₂O₂ pretreatment was selected for the positive control after comparison with different published oxidative conditions including various concentrations of H₂O₂ (25 μ M (Cambi et al., 2013), 5 mM (Santiso et al., 2010), 4 M (Zribi et al., 2011); Fenton chemistry (De Iuliis et al., 2009; Micillo et al., 2016); or, pesticide-mediated endocrine disruption (Bagchi et al., 1995; Grizard et al., 2007)). To the best of our knowledge, no previous studies have tested 8 M H₂O₂ pretreatment, however we found that 8 M H₂O₂ (1 h, at room temperature, in the dark) provided the most consistent intra- and inter-CV on both the 8-OHdG-positive sperm percentage and MIF (2.2% and 6.9%, respectively for protocol III) regardless of the initial sperm sample quality and/or protocol. As shown (Supplementary Fig. S1) on visible or epifluorescence photographs, or on FCM histograms, sperm morphology was conserved in these conditions. Moreover, in order to verify nuclei structure integrity, in few experimentation sperm cells were countermarked using Hoechst and observed using confocal microscope. The fact that the treatment is performed on raw semen samples may also partly explain why such a high concentration of H₂O₂ had to be used for the positive controls.

The competition assay using the OxyDNA Test® (protocol IV) and high level of exogenous 8-OHdG revealed the test's poor sensitivity

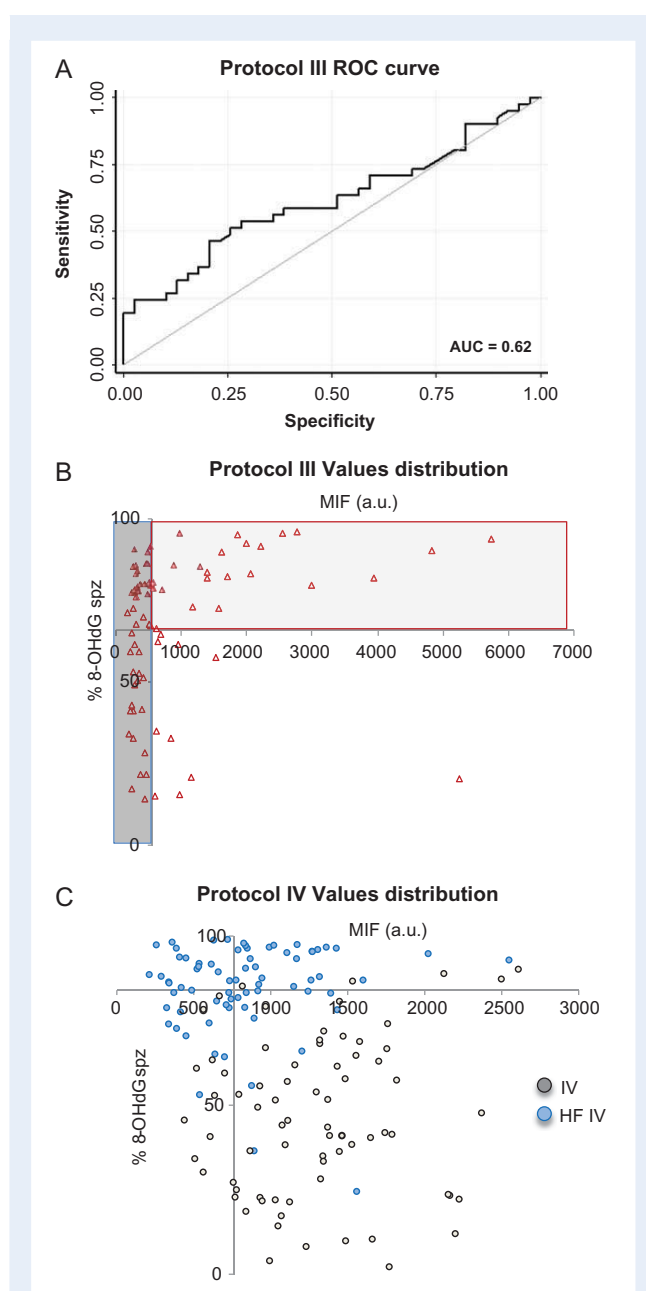


Figure 2 Human sperm DNA oxidation threshold related to sperm parameters. **A:** Receiver operating characteristic (ROC) curve illustrating the relationship between mean intensity level of fluorescence (MIF) (determined using protocol III) and sperm alterations. **B** and **C:** respective (B & C) distributions of the percentage of 8-OHdG-positive spermatozoa in the 80 subjects related to their MIF determined by protocols III and IV. In B, two mean populations were clearly distinguished: subjects with higher DNA sperm oxidation values than the mean for both percentage (66%) and MIF (552 a.u.) (light gray area surrounded by a red line box); subjects with a MIF under or equal to 552 a.u. regardless of the positive spermatozoa proportion (dark gray area surrounded by a blue line). In C, the distribution of marked sperm cell values did not distinguish any particular profile. au: arbitrary units. spz: spermatozoa.

and specificity, whereas a significant and dose-dependent shift was observed with protocol III. Similar results were reported earlier by Cambi *et al.* (2013), raising the question of the pertinence of the OxyDNA assay's conjugate for DNA 8-OHdG. Moreover, neither the 8-OHdG spermatozoa percentage nor the MIF determined using protocol IV showed any significant correlation with clinical endpoints, patient fertility or sperm quality. Therefore, data from the competition assay, similar to the stability and repeatability assays, demonstrated the superiority and the accuracy of protocol III to detect human sperm 8-OHdG.

Using protocol III, we observed significant correlations between sperm DNA oxidation and alterations in sperm parameters. Most notable was the positive correlation between MIF, PMN concentration and BMI, consistent with inflammatory and oxidative states. Even though this was expected since PMN are known to be a major source of reactive oxygen species in semen, our data clearly confirm that sperm DNA oxidation is related to a high PMN concentration. Previous studies have already reported relationships between sperm DNA oxidation and isolated sperm parameters including sperm concentration (Kodama *et al.*, 1997; Ni *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2015; Micillo *et al.*, 2016), sperm motility (Shen *et al.*, 1997; Kao *et al.*, 2008; Meseguer *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2012; Cambi *et al.*, 2013) or sperm morphology (Cambi *et al.*, 2013). In Meseguer *et al.* (2008) a correlation between asthenozoospermia and oxidative stress was found when using both the average 8-OHdG signal intensity and the percentage of positive cells, but the authors did not propose a threshold. We are the first to propose thresholds for the percentage of 8-OHdG-positive cells and the average intensity of the signal generated per cell. Optimal cut-off points of 65.8% for 8-OHdG-positive sperm with a MIF of 552 a.u. were determined, with AUC of 0.62 and 0.57 for MIF and percentage, respectively. Even if AUC were moderate, MIF and percentage values were complementary to each other, MIF bringing a good specificity (0.72) and the percentage a good sensitivity (0.72). Of interest was the observation that 39% of the subjects with what we could define as 'pathological' sperm DNA oxidation were otherwise normozoospermic. This suggests that motile, fertile spermatozoa could still possess high levels of oxidative DNA damage. It is also worth noting that some leukocytospermic patients did show a normal DNA oxidation value and conversely others with oxidized sperm DNA showed a normal PMN concentration revealing inter-individual variation. Consequently, human sperm DNA 8-OHdG detection should not be seen as a unique definitive marker of sperm DNA integrity. It should be used in combination with conventional sperm quality indicators such as those included in the WHO standardized checklist together with a sperm DNA fragmentation assay. Indeed, base oxidation is a precocious indicator of DNA oxidative damage. Depending on the level of oxidative stress it may or may not be associated with sperm nuclear decondensation and fragmentation conditions that have in turn been associated with male infertility. Regardless, an oxidized sperm nucleus will challenge the oocyte BER pathway, which may result in an increase in the mutational load subsequently carried by the offspring (Aitken, 1999; Crow, 2000; Baker and Aitken, 2005). In our technical validation study we did not observe significant correlation between sperm DNA oxidation and male fecundity. However, having a child is not a presage of current sperm quality or the absence of transgenerational impact.

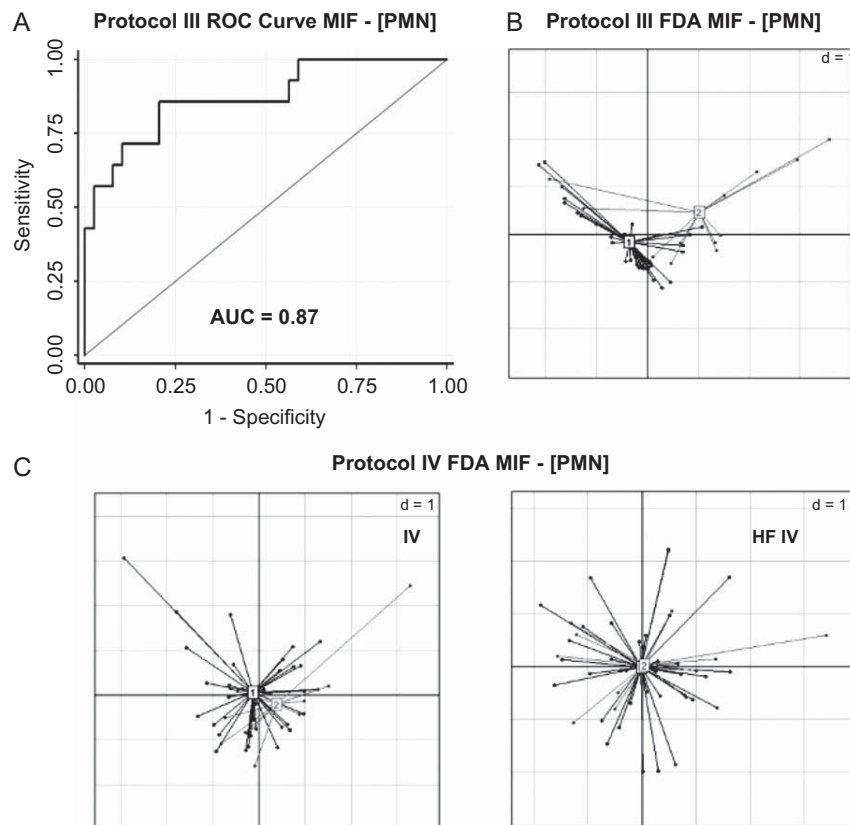


Figure 3 Discrimination related to polymorphonuclear neutrophil cell concentration. **A:** ROC curve illustrating the relationship between MIF determined using protocol III and polymorphonuclear neutrophil cell (PMN) concentration. **B** and **C:** factor discriminant analysis representing MIF values obtained using protocol III (**B**) or IV (**C**, IV for total population and HF IV for HF subpopulation) according to whether the subject has a normal PMN concentration (group 1) or is leukocytospermic (group 2). IV population: total fluorescent sperm population. HF IV: subpopulation with the highest fluorescence intensity mean termed (HF: highly fluorescent).

Other parameters come into play in accomplishing a pregnancy including the oocyte's repair power. In order to investigate these aspects, complementary investigations are now necessary and should focus on deciphering the relationship existing between sperm DNA oxidation and its impact on embryo development and the offspring's future health.

Conclusion

Our study is the first validation of a protocol to assess human sperm DNA oxidation levels using the anti-8-OHdG antibody and FCM to determine an associated discriminant threshold in relation to sperm quality. We have demonstrated the protocol accuracy with regard to 8-OHdG detection in human sperm. The stability over time (up to 30 days) and good intra- and inter-assay CV provide additional, supporting arguments for potential practical routine diagnostic use. In addition, this test could be a helpful decision-making tool regarding whether or not to pursue therapeutic intervention such as the use of oral antioxidant supplementation. Since over-supplementation of antioxidants could exacerbate sperm DNA decondensation (Agarwal and Allamaneni, 2004;

Greco et al., 2005; Ménéz et al., 2007; Lanzafame et al., 2009; Ross et al., 2010; Gharagozloo and Aitken, 2011; Showell et al., 2014) it is critical to know when to apply such therapeutic intervention. However, when antioxidant use is relevant, it may improve live birth rates and increase clinical pregnancy rates, as suggested by the Cochrane review (Showell et al., 2014). Therefore, a reliable, accurate and sensitive human sperm DNA 8-OHdG detection assay, such as the one described here, could be a pertinent addition to the andrology clinician's toolbox.

Supplementary data

Supplementary data are available at *Human Reproduction* online.

Acknowledgements

The authors would like to thank Christelle Damon-Soubeyrand, Caroline Vachias, Alexandre Champroux for expert technical assistance during the course of the study.

Authors' roles

S.V. designed the study, performed the research, performed the statistical analyses and wrote the article in collaboration with H.P. F.B. contributed to design the study, interpret data and write the manuscript in collaboration with H.P. and S.V. A.K. contributed to interpretations and manuscript revision. S.D. performed the research and contributed to interpretations. C.B. and M.B. contributed to realize FCM analysis and interpretations. L.J. contributed to interpretations and to manuscript revision. B.P. performed the statistical analyses in collaboration with S.V. and H.P. and contributed to write manuscript. R.J.A., A.M., and P.G. contributed to the development of the assay and to manuscript revision. J.R.D. contributed to design the study, interpret and write the manuscript in collaboration with H.P. and S.V. H.P. designed the study, performed the research, performed the statistical analyses and wrote the article in collaboration with S.V.

Funding

This work was funded by institutional grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and Université Clermont Auvergne (to J.R.D.) and by Clermont-Ferrand Hospital-Centre d'Etude et de Conservation des Oeufs et du Sperme humains research funds (to L.J. and F.B.).

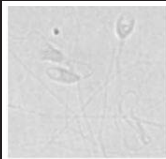
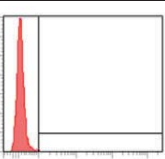
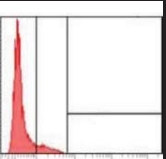
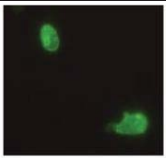
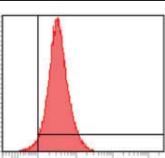
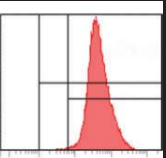
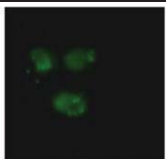
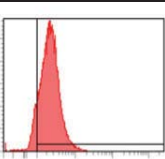
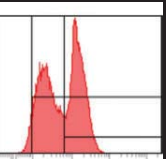
Conflict of interest

P.G. is the Managing Director of CellOxess LLC (New-Jersey, USA), a US-based Biotech which has a commercial interest in the resolution of oxidative stress. A.M. is an employee of CellOxess LLC, while J.R.D. and R.J.A. are honorary members of the CellOxess scientific advisory board.

References

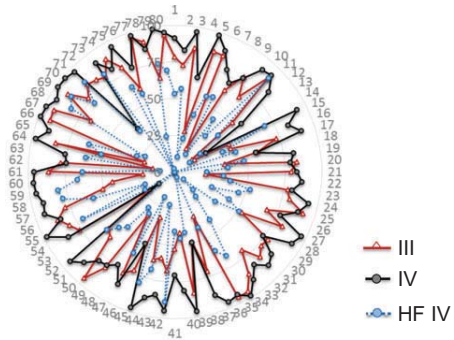
- Agarwal A, Allamaneni SSR. The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review. *Minerva Ginecol* 2004;**56**:235–245.
- Aitken RJ. A free radical theory of male infertility. *Reprod Fertil Dev* 1994;**6**: 19–23; discussion 2324.
- Aitken RJ. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon – a cell in crisis? *J Reprod Fertil* 1999;**115**:1–7.
- Aitken RJ, Jones KT, Robertson SA. Reactive oxygen species and sperm function—in sickness and in health. *J Androl* 2012;**33**:1096–1106.
- Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Iuliis GN. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl* 2014;**16**:31–38.
- Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Stohs SJ. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology* 1995;**104**:129–140.
- Baker MA, Aitken RJ. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;**3**:67.
- Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;**1**:307–310.
- Cambi M, Tamburrino L, Marchiani S, Olivito B, Azzari C, Forti G, Baldi E, Murtatori M. Development of a specific method to evaluate 8-hydroxy, 2-deoxyguanosine in sperm nuclei: relationship with semen quality in a cohort of 94 subjects. *Reproduction* 2013;**145**:227–235.
- Chen H, Zhao H-X, Huang X-F, Chen G-W, Yang Z-X, Sun W-J, Tao M-H, Yuan Y, Wu J-Q, Sun F et al. Does high load of oxidants in human semen contribute to male factor infertility? *Antioxid Redox Signal* 2012;**16**:754–759.
- Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*, 2nd edn. Hillsdale, NJ: Erlbaum, 1998. Hillsdale.
- Crow JF. The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation. *Nat Rev Genet* 2000;**1**:40–47.
- De Iuliis GN, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A, Nixon B, Aitken RJ. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol Reprod* 2009;**81**:517–524.
- Fisher HM, Aitken RJ. Comparative analysis of the ability of precursor germ cells and epididymal spermatozoa to generate reactive oxygen metabolites. *J Exp Zool* 1997;**277**:390–400.
- Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA, Ames BN. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;**88**:11003–11006.
- Gharagozloo P, Aitken RJ. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod* 2011;**26**:1628–1640.
- Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl* 2005;**26**:349–353.
- Grizard G, Ouchchane L, Roddier H, Artonne C, Sion B, Vasson M-P, Janny L. In vitro alachlor effects on reactive oxygen species generation, motility patterns and apoptosis markers in human spermatozoa. *Reprod Toxicol* 2007;**23**:55–62.
- Hoeijmakers JH. DNA repair mechanisms. *Maturitas* 2001;**38**:17–22; discussion 22–23.
- Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 2000;**21**:33–44.
- Kao S-H, Chao H-T, Chen H-W, Hwang TIS, Liao T-L, Wei Y-H. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertil Steril* 2008;**89**:1183–1190.
- Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril* 1997;**68**:519–524.
- Lanzafame FM, La Vignera S, Vicari E, Calogero AE. Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility. *Reprod Biomed Online* 2009;**19**:638–659.
- Lewis SEM, Aitken RJ. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res* 2005;**322**:33–41.
- Lewis SE, Boyle PM, McKinney KA, Young IS, Thompson W. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1995;**64**:868–870.
- Loft S, Kold-Jensen T, Hjøllund NH, Giwercman A, Gyllemborg J, Ernst E, Olsen J, Scheike T, Poulsen HE, Bonde JP. Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy. *Hum Reprod* 2003;**18**:1265–1272.
- Lord T, Aitken RJ. Fertilization stimulates 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine repair and antioxidant activity to prevent mutagenesis in the embryo. *Dev Biol* 2015;**406**:1–13.
- Ménézo YJR, Hazout A, Panteix G, Robert F, Rollet J, Cohen-Bacrie P, Chapuis F, Clément P, Benkhalfia M. Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reprod Biomed Online* 2007;**14**:418–421.
- Meseguer M, Martínez-Conejero JA, O'Connor JE, Pellicer A, Remohí J, Garrido N. The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a male infertility prognostic factor. *Fertil Steril* 2008;**89**:1191–1199.

- Micillo A, Vassallo MRC, Cordeschi G, D'Andrea S, Necozione S, Francavilla F, Francavilla S, Barbonetti A. Semen leukocytes and oxidative-dependent DNA damage of spermatozoa in male partners of subfertile couples with no symptoms of genital tract infection. *Andrology* 2016;**4**:808–815.
- Montjean D, Ménéz Y, Benkhalifa M, Cohen M, Belloc S, Cohen-Bacrie P, de Mouzon J. Malonaldehyde formation and DNA fragmentation: two independent sperm decays linked to reactive oxygen species. *Zygote* 2010;**18**:265–268.
- Morado S, Cetica P, Beconi M, Thompson JG, Dalvit G. Reactive oxygen species production and redox state in parthenogenetic and sperm-mediated bovine oocyte activation. *Reproduction* 2013;**145**:471–478.
- Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S, Cambi M, Olivito B, Azzari C, Forti G, Baldi E. Investigation on the origin of sperm DNA fragmentation: role of apoptosis, immaturity and oxidative stress. *Mol Med* 2015;**21**:109–122.
- Ni ZY, Liu YQ, Shen HM, Chia SE, Ong CN. Does the increase of 8-hydroxydeoxyguanosine lead to poor sperm quality? *Mutat Res* 1997;**381**:77–82.
- Noblanc A, Peltier M, Damon-Soubeyrand C, Kerchkove N, Chabory E, Vernet P, Saez F, Cadet R, Janny L, Pons-Rejraji H et al. Epididymis response partly compensates for spermatozoa oxidative defects in snGPx4 and GPx5 double mutant mice. *PLoS One* 2012;**7**:e38565.
- Park JH, Kim SK, Kim J, Kim JH, Chang JH, Jee BC, Kim SH. Relationship between phospholipase C zeta immunoreactivity and DNA fragmentation and oxidation in human sperm. *Obstet Gynecol Sci* 2015;**58**:232–238.
- Ross C, Morris A, Khairy M, Khalaf Y, Braude P, Coomarasamy A, El-Toukhy T. A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reprod Biomed Online* 2010;**20**:711–723.
- Santiso R, Tamayo M, Gosálvez J, Meseguer M, Garrido N, Fernández JL. Simultaneous determination in situ of DNA fragmentation and 8-oxoguanine in human sperm. *Fertil Steril* 2010;**93**:314–318.
- Shen H-M, Chia S-E, Ni Z-Y, New A-L, Lee B-L, Ong C-N. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and the association with cigarette smoking. *Reprod Toxicol* 1997;**11**:675–680.
- Showell MG, Mackenzie-Proctor R, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;**12**:CD007411.
- Smith TB, Dun MD, Smith ND, Curry BJ, Connaughton HS, Aitken RJ. The presence of a truncated base excision repair pathway in human spermatozoa that is mediated by OGG1. *J Cell Sci* 2013;**126**:1488–1497.
- Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Luliis GN, Zieschang J-A, Clark AM. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Hum Reprod* 2009;**24**:2061–2070.
- Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod* 1998;**13**:1429–1436.
- WHO. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010. WHO [Internet]. Available from: <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/9789241547789/en/>.
- Wood ML, Esteve A, Morningstar ML, Kuziemko GM, Essigmann JM. Genetic effects of oxidative DNA damage: comparative mutagenesis of 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 7,8-dihydro-8-oxoadenine in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 1992;**20**:6023–6032.
- Zribi N, Feki Chakroun N, El Euch H, Gargouri J, Bahloul A, Ammar Keskes L. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril* 2010;**93**:159–166.
- Zribi N, Chakroun NF, Elleuch H, Abdallah FB, Ben Hamida AS, Gargouri J, Fakhfakh F, Keskes LA. Sperm DNA fragmentation and oxidation are independent of malondialdehyde. *Reprod Biol Endocrinol* 2011;**9**:47.

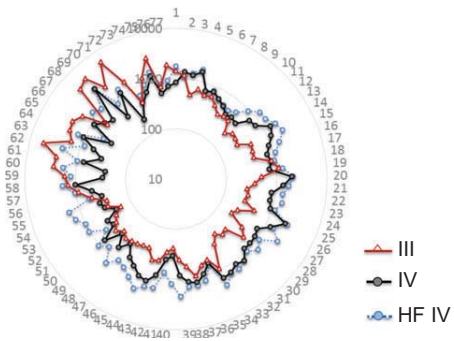
	Protocol I	Protocol II	Protocol III	Protocol IV
Method	8-OHdG Immunodetection protocol			Kit OxyDNA Assay (Biotrin®)
Primary antibody	Primary anti-8-OHdG antibody			Avidin protein affinity –FITC conjugate
Secondary Antibody	anti-mouse IgG – coupled horseradish peroxidase	anti-mouse IgG – coupled Alexa Fluor 488	anti-mouse IgG – coupled Alexa Fluor 488	
Detection	Light Microscopy (LM)	Fluorescence Microscopy (FM)	Flow cytometry (FCM)	FCM
Measured Values	%	%	% and MIF	% and MIF
Negative control				
Positive control				
Subjects				

Supplementary Figure S1 Four detection methods were tested and compared in a pairwise manner. In the first set of experiments, we performed an intra-methods comparison between three methods of detection (pairwise) using the same anti-8-OHdG primary antibody: protocol I using HRP anti-mouse antibody and light microscopy (LM,) versus (vs.) protocol II using Alexa Fluor 488 anti-mouse antibody and fluorescence microscopy (FM) ($n = 10$); protocol II (FM) vs. protocol III using Alexa Fluor secondary antibody and flow cytometry (FCM, protocol III) ($n = 15$). In the second set of experiments, we assessed the reliability of values obtained with protocol III and those obtained with the OxyDNA Test® (protocol IV) in 80 additional patients. Using FCM for both protocols III and IV, the percentage of 8-OHdG-positive spermatozoa and the mean intensity level of fluorescence (MIF) were considered. Each sample was read blind by two observers (two slides, 200 spermatozoa per slide). Spermatozoa were considered as 8-OHdG-positive when a spot of peroxidase (pink–brown color) or green fluorescence was observed. Examples of micrographs and FCM graphs of negative (untreated with anti-8-OHdG primary antibody or the kit's binding conjugate) and positive control (8 M H₂O₂) profiles and a patient sperm profile are presented for each protocol (magnification: $\times 100$). Two populations were observed in relation to their MIF for Protocol IV. We have considered both the total fluorescent sperm population termed 'IV population' and the subpopulation with the highest fluorescence intensity mean termed 'HF IV' (HF for highly fluorescent).

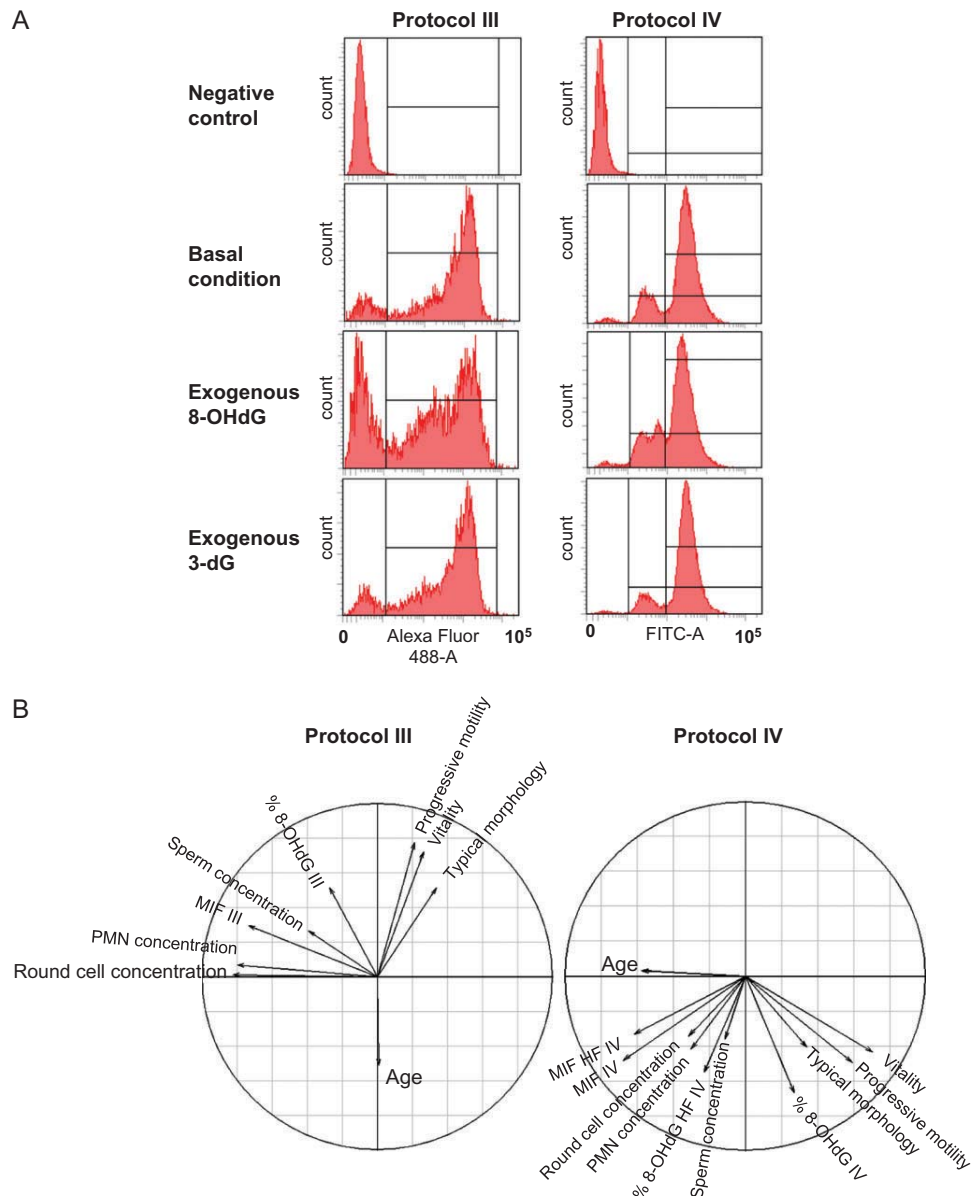
A Protocols III vs IV : % 8-OHdG spz



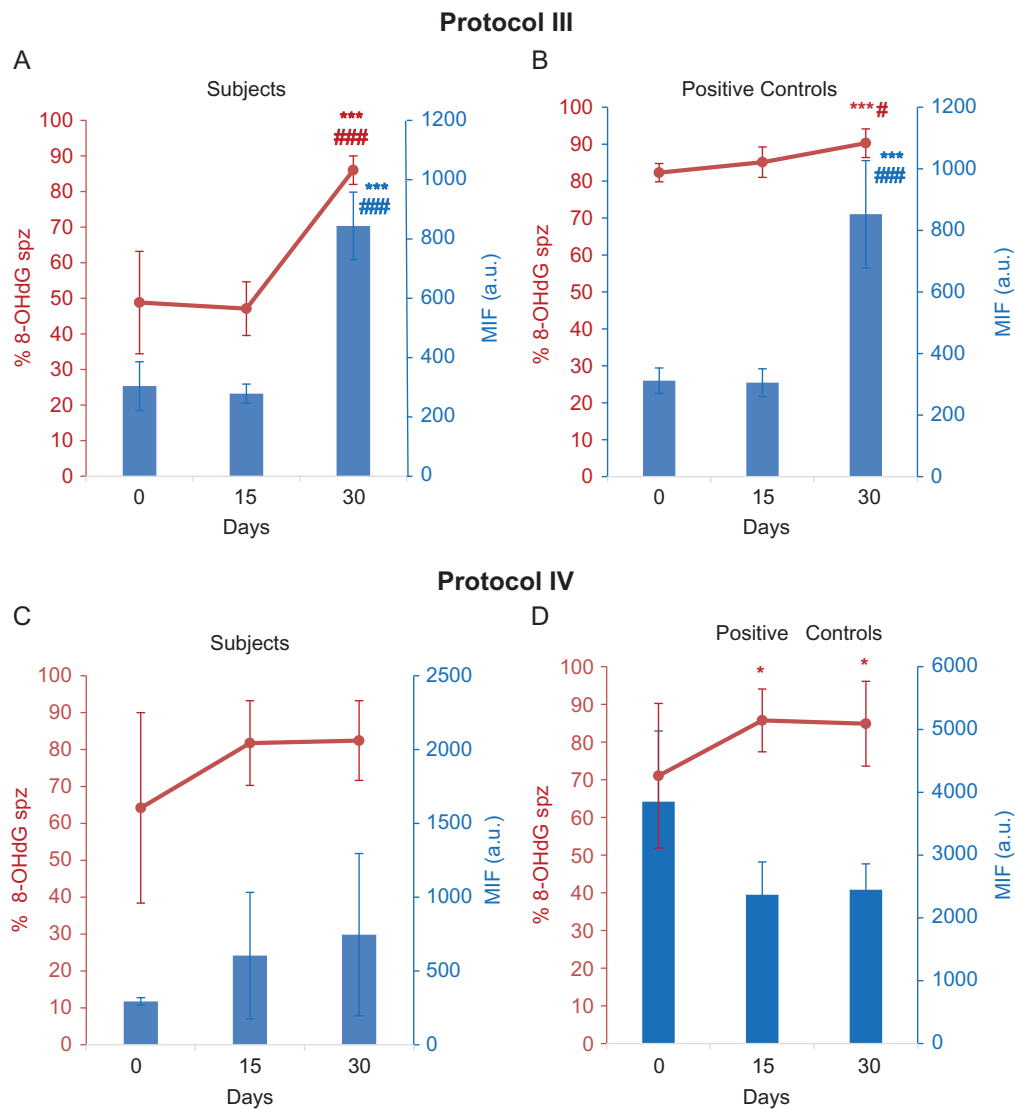
B Protocols III vs IV : MIF



Supplementary Figure S2 Individual distribution profiles of oxidized DNA spermatozoa using protocol III vs. IV. The percentages of 8-OHdG-positive spermatozoa (**A**) and MIF (**B**) of the 80 subjects are represented in the spider graphs after FCM evaluation following protocol III (red triangle) and protocol IV (total population represented by gray circles and the HF subpopulation is represented by blue circles).



Supplementary Figure S3 Specificity, sensitivity and correlation with sperm parameters and clinical data. **A:** Examples of a typical FCM profile of a negative control (untreated with anti-8-OHdG primary antibody or the binding conjugate), basal condition, or competition condition using either exogenous 8-OHdG or exogenous 3-dG pre-incubation for protocols III (left graphs) and IV (right graphs). **B:** Principal components analysis (PCA) graphs display Pearson correlations between percentage of 8-OHdG-positive spermatozoa (% 8-OHdG spz), mean intensity of fluorescence (MIF), clinical data (such as patient age) and conventional sperm parameters (spermatozoa concentrations, PMN and round cells, progressive motility, vitality, typical morphology) related to detection using protocol III (left graph) or IV (right graph). Each parameter is represented by an arrow; the distance between two arrows indicates the correlation between the two variables (the closer the arrows, the more the variables are correlated) and the length of the arrow indicates the power of the correlation. PCA representation of MIF and percentage also clearly highlighted the correlation between PMN concentration and MIF when determined by protocol III (the arrows are the longest and closest to each other).



Supplementary Figure S4 Protocol III vs. protocol IV for stability over time. Detection stability of fixed spermatozoa after storage was evaluated using protocols III (**A** and **B**) and IV (**C** and **D**) for subject samples (**A** and **C**) and positive controls (**B** and **D**). Percentages of 8-OHdG-positive spermatozoa (red points and lines) and MIF (blue bars) obtained on Day 0, Day 15 and Day 30 ($n = 3$) were compared. Data are presented as the mean $\pm$ SEM. * and *** indicate significant difference with $P < 0.05$ and $P < 0.001$ in comparison with Day 0. # and ### indicate significant difference with $P < 0.05$ and $P < 0.001$ in comparison with Day 15 using the non-parametric Wilcoxon test.

Supplementary Table SI Intra-assay and inter-assay repeatability.

		Intra-assay CV	Inter-assay CV
Patient	%	7.5	7.0
	Mean	6.0	6.5
Positive control	%	2.2	6.9
	Mean	7.4	6.1

Intra- and inter-assay repeatability tests were performed to determine coefficient of variation (CV) using five sperm samples assayed in triplicate (intra-assay CV) on 3 different days (inter-assay CV).

Statistical analysis

All analyses were performed using GraphPad PRISM[®] 5 (La Jolla, CA, USA) and STATA[®] (version 13, StataCorp, College Station, TX, USA) software. Statistical significance was tested for a two-sided type I error at 0.05. Continuous data were presented as the mean $\pm$ SEM or median [interquartile range] according to statistical distribution (assumption of normality assessed by using the Shapiro–Wilk test) and as number of patients and associated percentages for categorical parameters. To determine statistical concordance between oxidation detection protocols, 8-OHdG-positive sperm proportion and MIF were compared using Lin's concordance coefficient (kLIN). kLIN values are usually framed in a scheme where <0.20 is negligible, 0.20–0.40 weak, 0.41–0.6 moderate, 0.61–0.8 substantial and >0.8 excellent concordance (Bland and Altman, 1986). Bland–Altman plots were also created to illustrate the difference between the two measurements against their mean. Results were analyzed using bias (the difference in values between the two protocols) and limits of agreement were expressed with 95% CI. Pearson or Spearman correlations were also determined according to the data distribution pattern. For each pairwise comparison, the statistical difference was evaluated using parametric (Student's *t*-test) or non-parametric (Wilcoxon test) paired tests. To study correlated repeated data (for example stability or specificity assays), mixed models were used to measure sperm DNA oxidation based on days in preservative solution or with increasing concentrations of 8-OHdG or 3-dG, taking into account between-subject and within-subject variability (as random effects). Finally, to compare independent groups (sperm characteristics and risk factors for oxidation *per patient*), the Student's *t*-test or Mann–Whitney test

were applied as appropriate (assumption of normality was studied as described previously and homoscedasticity by Fisher–Snedecor test). Results were expressed as effect-size (ES) and 95% CI. ES values were compared to usual ES bounds defined by Cohen (1998). An ES of 0.2 is small, 0.5 is medium and 0.8 is 'grossly perceptible and therefore large'. ROC curve analysis was also applied in order to complete these analyses. Results were expressed as AUC and 95% CI. Then, the optimal threshold to predict a pathological state was determined according to biological and clinical relevance and according to usual indexes recommended in the literature: Ray *et al.* (2010). As described previously, Pearson or Spearman correlation coefficients were calculated to study the relationship between the percentage of 8-OHdG-positive spermatozoa, MIF, clinical data (such as BMI and patient age) and conventional sperm parameters, i.e. concentrations of spermatozoa, PMN and round cells, progressive motility, vitality, typical morphology, related to detection using protocol III or protocol IV. These usual inferential analyses were followed by factorial analysis: principal component analysis (PCA) used to study relationships between quantitative parameters, and factor discriminant analysis (FDA) used to determine which parameters optimally discriminated between sperm characteristics (discrimination rules are based on linear combinations of the observed variables, called discriminant factors). The parameters selected for inclusion in these analyses were chosen according to univariate results and biological relevance. More precisely, FDA is a supervised discrimination and can be seen as a classification technique. The equations involved are designed such that the discriminant factors minimize the Mahalanobis distance within each group and maximize the distance between groups, providing compact groups that are segregated as much as possible in the space.

II. COMET assay et immunodétection du 8-OHdG

Une des altérations nucléaires spermatiques les plus étudiées est la fragmentation de l'ADN (Shen *et al.*, 1997; Pacey, 2018). Il a été démontré que la fragmentation de l'ADN était corrélée à l'âge paternel, aux altérations du spermogramme notamment à la baisse de la numération et de la vitalité spermatique et à une augmentation de la tératozoospermie (Wallach *et al.*, 1992; Aitken, 2006; Franken and Oehninger, 2012). Certains auteurs ont clairement démontré que la fragmentation de l'ADN spermatique était corrélée négativement à la qualité embryonnaire (Sakkas *et al.*, 1998; Morris *et al.*, 2002), à l'obtention de blastocyste (Virant-Klun *et al.*, 2002; Muriel *et al.*, 2006) et à l'incidence des fausses couches spontanées (Zini *et al.*, 2014). Mais l'interprétation de ces résultats, notamment les seuils critiques retenus comme pouvant avoir un impact sur les chances de grossesses sont délicats (Li *et al.*, 2006; Simon *et al.*, 2017).

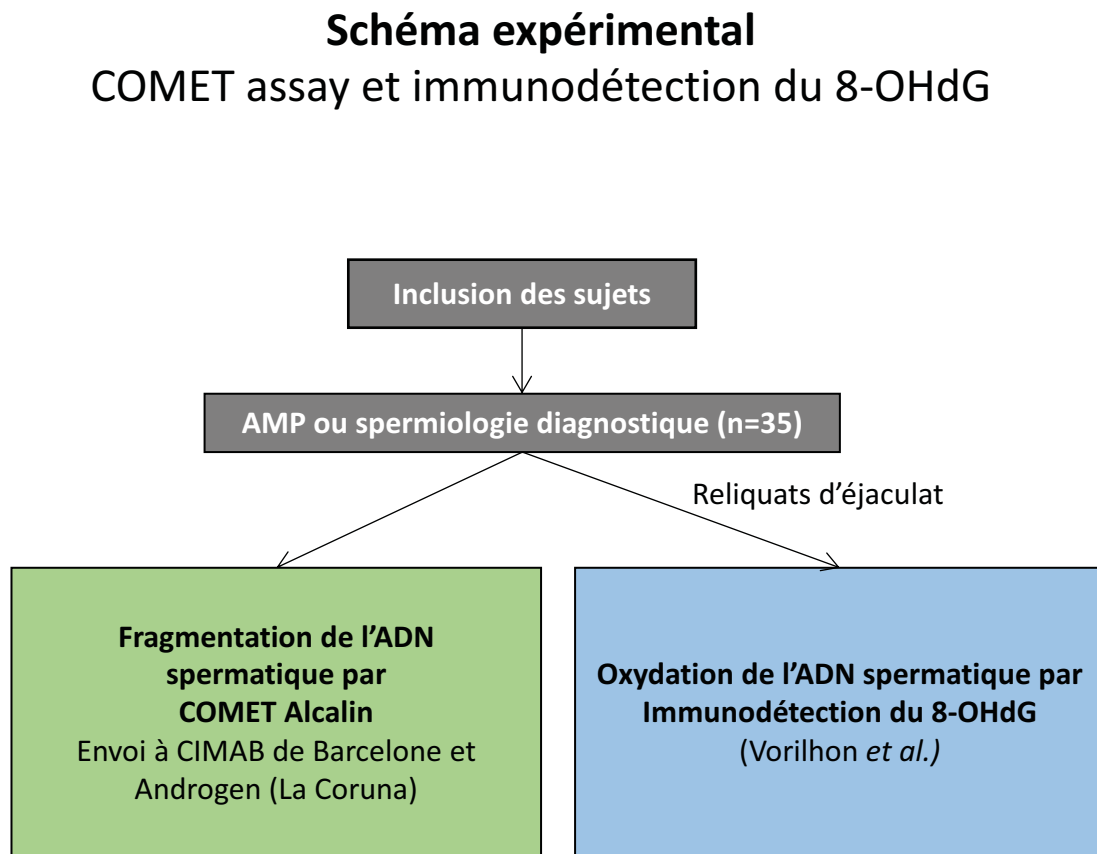
Différentes méthodes de mesure du taux de fragmentation de l'ADN spermatique chez l'homme sont disponibles : le COMET assay, le SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) et le test TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling ; Ribas-Maynou and Benet, 2019). De nombreuses études ont tenté d'établir une valeur critique de référence pour le test TUNEL (Selvam and Agarwal, 2018). Avec une spécificité de 89%, une sensibilité de 96,9% et une valeur prédictive de 92,8%, une équipe a analysé le sperme de 66 patients infertiles et a trouvé une valeur seuil de 20% de spermatozoïdes TUNEL positifs (Sergerie *et al.*, 2005). Sharma *et al.*, en 2016, ont établi une valeur de référence du taux de fragmentation de l'ADN spermatique par TUNEL à l'aide du kit commerciale APO-DIRECT (BD Pharmingen) à 16,8% de spermatozoïdes TUNEL positifs avec une spécificité de 91.6% et une valeur prédictive positive de 91.4% (Sharma *et al.*, 2016). D'autres seuils ont été proposés variants par les techniques utilisées et les populations de patients analysés (Pacey, 2018). En 2013, Ribas-Maynou (Ribas-Maynou *et al.*, 2013) proposait un seuil lié à l'infertilité masculine pour le COMET alcalin à 45,37% (sensibilité à 85% et une spécificité à 92%) et pour le COMET en condition neutre à 34,37% (sensibilité à 97% et une spécificité à 32%). Enfin, Santi *et al.*, en 2018, valide *via* une méta-analyse que la fragmentation de l'ADN spermatique est significativement plus importante chez les patients infertiles vs les patients fertiles,

quelle que soit la méthode de détection utilisée en comparant le TUNEL, le SCSA ou le COMET.

Le test TUNEL est très utilisé, mais il ne permet pas de différencier les cassures simples et doubles brins de l'ADN spermatique. De plus, le test TUNEL ne détecte pas toutes les cassures en particuliers celles qui ne génèrent pas d'extrémité 3'-OH libres, comme c'est le cas lors d'atteintes oxydantes de l'ADN. Malgré le fait que certains auteurs s'accordent sur le fait que les cassures simples brins de l'ADN spermatique seraient plutôt dues aux ERO (Enciso *et al.*, 2009; Simon and Carrell, 2013) alors que les cassures doubles brins seraient produites directement *via* une activité nucléase (Ward, 2010). Il est clair maintenant que le test TUNEL sous estime le réel niveau de fragmentation du noyau spermatique. Ceci est important d'un point de vue diagnostic et de choix d'actions thérapeutiques. L'ovocyte qui aura la charge de réparer le noyau spermatique à des capacités limitées directement liées au degré d'atteinte du génome spermatique (Setti *et al.*, 2013) et à l'âge ovocytaire (Marchetti *et al.*, 2007; Meseguer *et al.*, 2011). Ainsi, l'augmentation des échecs d'implantation, des taux de fausses couches voire de malformations congénitales ont été observées en cas de dommages à l'ADN spermatique trop important (Lewis and Aitken, 2005b). C'est pourquoi, le diagnostic de la fragmentation de l'ADN spermatique est recommandé en pratique clinique en cas d'échecs multiples de fécondation ou de développement embryonnaire lors de tentatives d'AMP.

Le test COMET appliqué aux spermatozoïdes est la seule technique à pouvoir distinguer les cassures simples ou doubles brins de l'ADN, lesquelles semblent avoir des conséquences cliniques distinctes (Ribas-Maynou *et al.*, 2012; Ribas-Maynou and Benet, 2019). Elle a été mise au point par Ostling and Johanson, en 1984, pour détecter les cassures doubles brins de l'ADN induite directement par des agents toxiques et indirectement lors de processus enzymatique de réparation des dommages ou de processus secondaires de fragmentation de l'ADN tel que l'apoptose. Initialement, la lyse et l'électrophorèse de l'ADN spermatique étaient réalisées en conditions neutres avec une coloration à l'acridine orange. Singh *et al* en 1988, ont optimisé cette technique en conditions fortement alcalines afin de détecter les cassures simples brins de l'ADN (Singh *et al.*, 1988).

FIGURE 46



A notre connaissance, aucun consensus n'existe concernant l'oxydation et la fragmentation nucléaire de l'ADN spermatique humain en distinguant des cassures simples et doubles brins. L'objectif de cette étude était d'évaluer le lien entre oxydation de l'ADN spermatique, validé par l'immunodétection du 8-OHdG par CMF (Vorilhon *et al.*, 2018) et le profil de fragmentation de l'ADN spermatique chez l'homme par test COMET assay en condition alcaline.

Schéma expérimental (Figure 46) :

COMET assay et immunodétection du 8-OHdG.

Tableau 6

Paramètres mesurés	Population totale n=35	Caractéristiques spermatiques normales n=19	Caractéristiques spermatiques altérées n=16
Données cliniques			
Âge H (ans)	34,51 ± 6,86	32,95 ± 7,02	36,38 ± 6,39
IMC H	27,74 ± 4,90	27,81 ± 4,71	27,64 ± 5,41
Nbre de fumeur H	12	7	5
Infertilité primaire H	24	14	10
Spermogramme - spermocytogramme			
Volume ml	3,38 ± 1,32	3,3 ± 1,46	3,47 ± 1,17
Concentration (M/ml)	97,02 ± 69,02	115,92 ± 64,20*	74,58 ± 69,72*
Mobilité progressive (%)	51 ± 12	54 ± 9	47 ± 14
Forme Typique (%)	7 ± 7	11 ± 7	2 ± 3
TZI	1,38 ± 0,16	1,33 ± 0,11	1,44 ± 0,19
Concentration cellules rondes (M/ml)	3,86 ± 3,48	3,57 ± 4,25	4,07 ± 3,05
PNN (M/ml ; n=6)	758 450 ± 1 384 828	158 333 ± 230 340	1 358 567 ± 1 384 828
Caractéristiques nucléaires			
Taux de spz fragmentés (%)	60,71 ± 24,79	57,79 ± 27,30	64,19 ± 21,79
Taux de spz oxydés (%)	84,64 ± 13,29	81,14 ± 15,39	88,79 ± 9,06
MIF de spz oxydés (ua)	1961,49 ± 1736,70	1559,21 ± 1723,33	2439,19 ± 1680,57

**Tableau descriptif de la population étudiée : Données cliniques, spermatiques et nucléaires
Comet assay et immunodétection du 8-OHdG**

IMC : Indice de masse corporel ; TZI : Indice de tératozoospermie ; PNN : Polynucléaires neutrophiles ; MIF : Moyenne d'Intensité de Fluorescence ; ua : Unité arbitraire ; Les valeurs sont ici présentées sous formes de moyennes ± écarts types à la moyenne ; * : Résultats significatifs avec p=0,021.

RESULTATS

Descriptif de la population

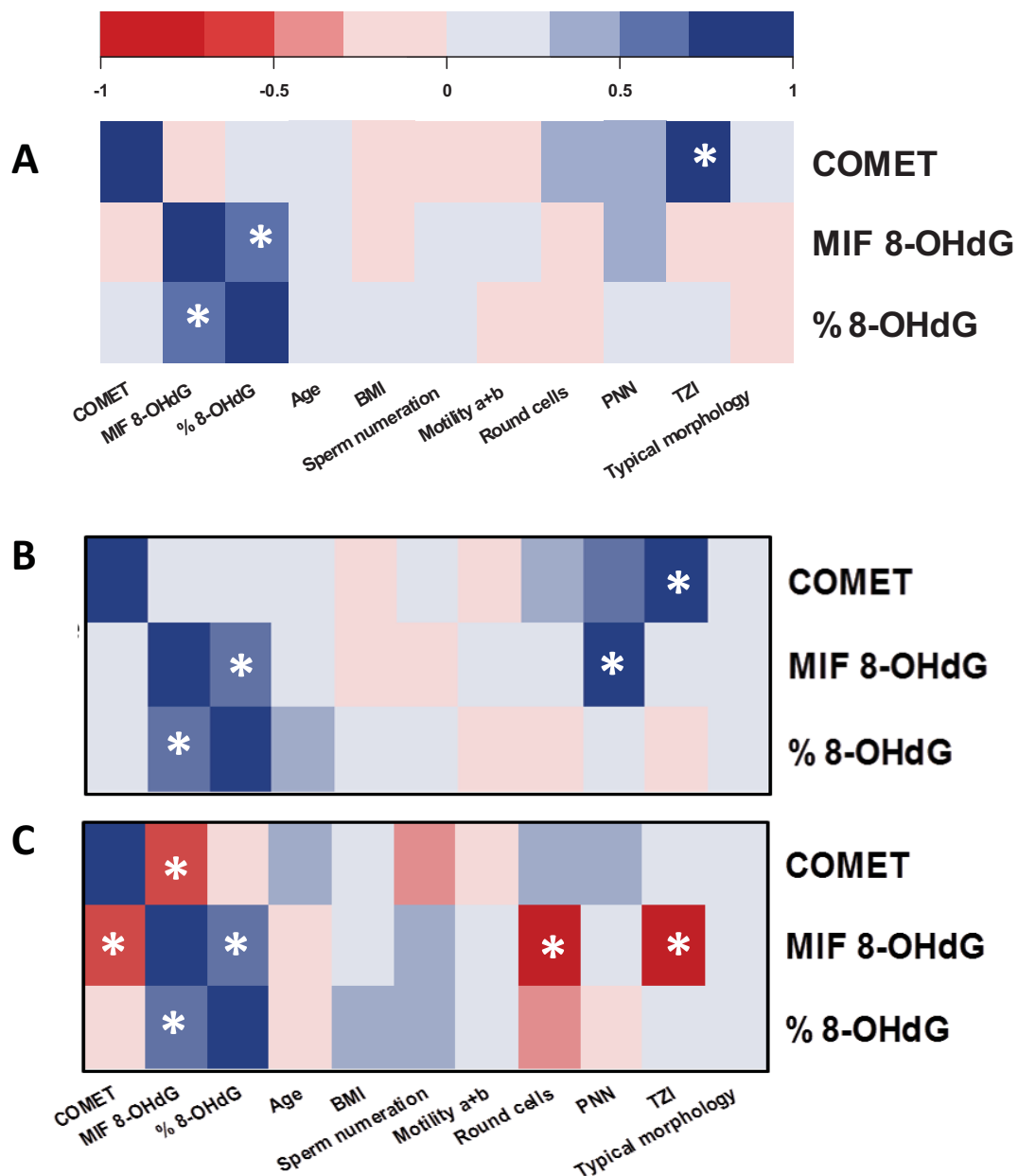
Trente-cinq patients ont été inclus dans cette étude, 11 venaient dans le service de Biologie de la Reproduction du CHU de Clermont-Ferrand pour un examen spermiologique standard et 24 dans le cadre d'une prise en charge en AMP au CHU de Clermont Ferrand. Le tableau 6 représente le descriptif de la population étudiée avec les données cliniques, spermatiques et nucléaires. L'âge moyen était de $34,51 \pm 6,86$ ans, et l'indice de masse corporel (IMC) moyen de $27,74 \pm 4,90$ (Tableau 6). Dix-neuf patients étaient normozoospermiques ; 16 présentaient un examen spermiologique avec au moins une anomalie ; 13 présentaient une tératozoospermie, dont une associée à une leucospermie et une autre à une nécro-oligo-asthénozoospermie. Enfin, un patient présentait une asthénozoospermie isolée et deux autres patients une leucospermie isolée. Sur les 35 patients inclus, 24 patients présentaient une infertilité primaire et 6 une infertilité secondaire.

Lien entre fragmentation, oxydation de l'ADN et les caractéristiques cliniques et spermatiques

L'analyse des données a été réalisée sur la population totale des patients et en distinguant les patients normozoospermiques des patients avec au moins une anomalie du spermogramme-spermocytogramme (tableau 6 et figure 47A, B et C). Les taux de fragmentation et d'oxydation nucléaires chez les patients présentant au moins une anomalie du spermogramme n'étaient pas significativement différents des taux moyens mesurés chez les patients normozoospermiques (tableau 6), même s'ils tendent à être plus élevés.

De même, les patients présentant une infertilité primaire n'avaient pas de valeurs de fragmentation ou d'oxydation de l'ADN spermatique significativement différentes en comparaison avec les patients présentant une infertilité secondaire ($60,29 \pm 5,10\%$ vs $56,17 \pm 10,93\%$; $p=0,73$ pour la fragmentation et $84,38 \pm 2,78\%$ vs $84,57 \pm 5,74\%$; $p=0,977$ pour le pourcentage de spermatozoïdes oxydés et 2135 ± 1903 ua vs 2151 ± 1525 ua ; $p=0,61$ pour la MIF de spermatozoïdes oxydés).

FIGURE 47



Corrélation entre la fragmentation et l'oxydation de l'ADN spermatique en fonction des caractéristiques cliniques et spermatisques sous forme de *Heatmap*

A. Population infertile globale étudiée (n=35)

B. Patients normozoospermie (n=19),

C. Patients avec une anomalie du spermogramme-spermocytogramme (n=16)

MBI : Body masse index ; TZI : Indice de tératozoospermie ; PNN : Polynucléaires neutrophiles ; MIF : Moyenne d'Intensité de Fluorescence ; ua : Unité arbitraire * : Résultats significatifs avec $p < 0,05$

Aucune corrélation n'a été retrouvée entre les taux de fragmentation mesurée par COMET (Figure 47A) et les taux d'oxydation nucléaire, que cela soit pour le pourcentage de spermatozoïdes avec un ADN oxydé ($r=0,13$; $p=0,45$, % 8-OHdG ; Figure 47A) ou pour la MIF ($r=-0,02$; $p=0,90$, MIF 8-OHdG ; Figure 47 A). Une corrélation positive significative a été retrouvée entre l'indice de tératozoospermie (TZI) et le taux de fragmentation de l'ADN spermatique ($r=0,72$; $p=0,01$, Figure 47A).

Lorsque l'on distingue les patients normozoospermiques ($n=19$, tableau 6), la corrélation entre l'indice de tératozoospermie et le taux de fragmentation était augmentée ($r=0,94$; $p=0,01$; Figure 47B). Une forte corrélation positive a été également observée entre la MIF de l'oxydation de l'ADN spermatique et la concentration en polynucléaires neutrophiles (PNN, $r=0,84$; $p=0,04$; Figure 47B). Dans cette sous population, aucune corrélation n'a été trouvée entre les taux de fragmentation et d'oxydation que cela soit pour le pourcentage de spermatozoïdes avec un ADN oxydé ($r=0,27$; $p=0,26$; Figure 47A) ou pour la MIF ($r=0,26$; $p=0,29$; Figure 47A).

Chez les patients présentant un moins une anomalie du spermogramme, nous avons mesuré des corrélations négatives entre la MIF du 8-OHdG et la concentration de cellules rondes ($r=-0,76$; $p=0,01$, Figure 47C) ainsi qu'avec l'indice de la tératozoospermie ou TZI ($r=-0,90$, $p=0,04$, Figure 47C). De plus, une corrélation négative est mesurée entre le taux de fragmentation et la MIF de l'oxydation de l'ADN spermatique ($r=-0,59$; $p=0,02$, Figure 47C) mais pas avec le pourcentage de spermatozoïdes 8-OHdG.

III. HYPOTAURINE

La cryopréservation des spermatozoïdes est actuellement une méthode couramment utilisée pour la préservation de la fertilité masculine. Elle est indiquée principalement à titre préventif pour conserver la possibilité de procréer après un traitement stérilisant (radiothérapie, chimiothérapie, chirurgie ou traitement médicamenteux à risque) et dans le cadre du don. Elle est aussi proposée aux hommes ayant des difficultés à réaliser le prélèvement de sperme, parfois à ceux ayant une qualité spermatique très faible pouvant être insuffisante le jour de la tentative d'AMP. Depuis plus de 30 ans, en France les CECOS représentent l'infrastructure clinico-biologique gérant une partie de l'autoconservation et la totalité du don de spermatozoïdes. L'autoconservation est réalisée dans le but de conserver des spermatozoïdes pour l'individu ou le couple, dans l'espoir de procréation future.

En dépit des progrès dans le domaine de la cryobiologie, les étapes de congélation et de décongélation affectent toujours l'intégrité des spermatozoïdes avec des conséquences pour le succès reproductif. En effet, au cours de la cryopréservation, les spermatozoïdes sont soumis à un stress physique lié aux chocs thermiques et aux variations d'osmolarité dues à l'addition et au retrait du milieu cryoprotecteur. Il s'ensuit alors une diminution forte de la proportion de cellules vivantes et des modifications structurales, notamment au niveau membranaire, et fonctionnelles qui se traduisent par une diminution de la mobilité et du pouvoir fécondant (O'Connell *et al.*, 2002; Agarwal *et al.*, 2008b).

Les cycles de congélation/décongélation induisent également une forte production d'ERO et une diminution de la quantité et de l'activité des systèmes antioxydants (O'Flaherty *et al.*, 1997) aggravés par le retrait du plasma seminal en amont de la congélation. L'induction de ce stress oxydant entraîne des perturbations au niveau des membranes plasmique, acrosomique et mitochondriale, ainsi que de l'ADN des spermatozoïdes, et finalement peut conduire à leur mort par apoptose (Pons-Rejraji *et al.*, 2011). En effet, après décongélation, il existe un accroissement de la fraction de spermatozoïdes présentant des signes caractéristiques de l'activation de l'apoptose, et une fragmentation de l'ADN (Zribi *et al.*, 2010). Il a également été observé qu'après décongélation une fraction des spermatozoïdes possédait des caractéristiques similaires aux spermatozoïdes capacités : cette situation est

évoquée sous le terme de à celle de la capacitation : la cryocapacitation (Medeiros *et al.*, 2002). De plus, il est toujours observé après décongélation une augmentation du taux de spermatozoïdes sans acrosome (Cormier *et al.*, 1997). Les spermatozoïdes capités prématurément ou ayant fait leur réaction acrosomique ont un temps de survie limité et un pouvoir fécondant réduit de manière significative, diminuant d'autant la probabilité de réussite de la fécondation (Medeiros *et al.*, 2002). Il est aussi possible d'observer en microscopie à fort grossissement des vacuoles qui seraient un indicateur de défauts de condensation de la chromatine spermatique (Boitrelle *et al.* 2012). La littérature demeure controversée quand aux effets de la congélation sur la présence de vacuoles. Certains auteurs ont rapporté une augmentation de la décondensation de l'ADN spermatique ainsi que la présence de vacuoles (Boitrelle *et al.* 2012) alors que l'équipe de Gatimel n'a pas mis en évidence de différence significative (Gatimel *et al.* 2013).

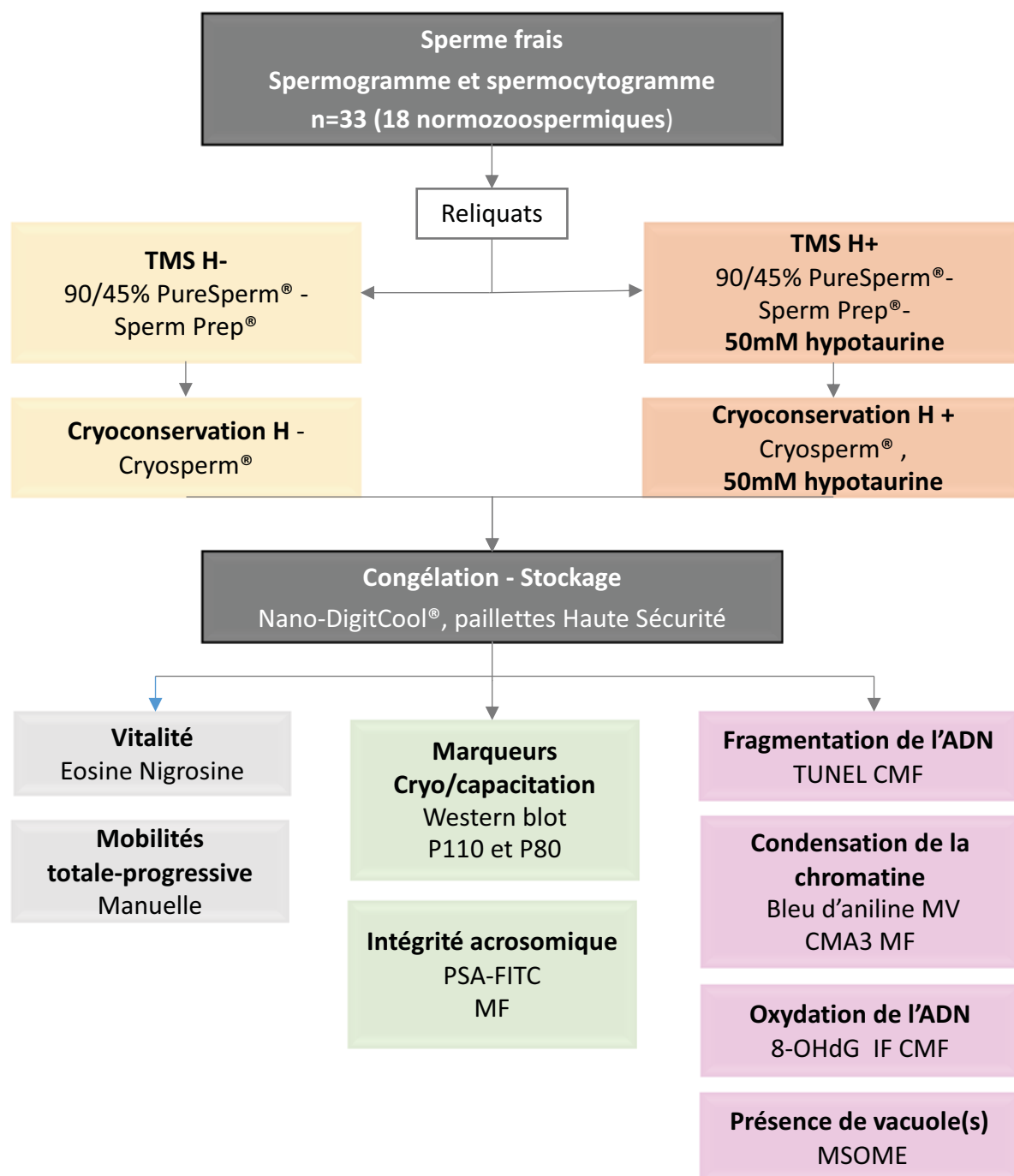
Dans la littérature scientifique, de nombreux auteurs s'accordent à dire que les antioxydants préviennent la réduction de la qualité spermatique comme la mobilité et la vitalité, ou encore des dommages causés à l'ADN (Agarwal *et al.*, 2008b). Une étude antérieure de l'équipe clinique avait évalué simultanément les avantages d'une migration sur gradient de densité avant ou après cryopréservation, et les effets d'une supplémentation en hypotaurine des milieux utilisés lors des traitements et de la cryopréservation des spermatozoïdes (Brugnon *et al.*, 2013). Brièvement, cette étude montrait un effet bénéfique de l'hypotaurine sur la vitalité des spermatozoïdes et sur le nombre de spermatozoïdes ne présentant pas de marqueurs apoptotiques (externalisation de la phosphatidylsérine au niveau de la membrane plasmique, élévation du potentiel mitochondrial et fragmentation de l'ADN spermatique). De plus, la supplémentation en hypotaurine réduisait significativement les altérations de la membrane plasmique suite à une congélation-décongélation, d'autant plus quand une migration sur gradient de densité était réalisée avant la congélation (Brugnon *et al.*, 2013).

Au regard de ces considérations préliminaires, nous avons choisi d'évaluer plus avant et ce, de manière concomitante sur un même prélèvement, les effets d'une supplémentation en hypotaurine après congélation sur :

FIGURE 48

Schéma expérimental

Effets bénéfiques d'une supplémentation en hypotaurine sur la cryopréservation des spermatozoïdes humains



TMS :Test de Migration Survie ; CMF : Cytométrie en flux ; TUNEL: TdT- mediateddUTP-biotinNick End Labelling ; MSOME: Motile Sperm Organelle Morphology Examination ; PSA-FITC: Pisum sativum ; Agglutinine -Fluorescéine IsoThioCyanate ; MV : microscopie visible ; MF microscopie à fluorescence ; IF : Immuno fluorescence

- Les paramètres spermiologiques standards : la vitalité et la mobilité (OMS 2010)
- L'expression de marqueurs de la qualité nucléaire spermatique tels que : l'oxydation et la fragmentation de l'ADN, la compaction et la protamination de la chromatine en utilisant respectivement les techniques d'immunodétection du 8-OHdG, le TUNEL et les marquages au bleu d'aniline et à la Chromomycine A3 (CMA3).
- L'expression de marqueurs du pouvoir fécondant tels que des marqueurs de capacitation (par western blot), et de l'état de l'acrosome (par marquage au PSA-FITC).
- La présence ou non de vacuole(s) dans les têtes spermatiques, par la technique microscopique MSOME (Motile Sperm Organelle Morphology Examination).

Schéma expérimental (Figure 48) : Effets bénéfiques d'une supplémentation en hypotaurine sur la cryopréservation des spermatozoïdes humains.

Hypotaaurine Supplementation in Preparation and Freezing media improves post thaw human sperm nuclear and fertilizing ability

Running title: Hypotaaurine supplementation benefits in Cryopreservation

H. Pons-Rejraji^{1,2}, S. Vorilhon^{1,3}, A. Difrane¹, S. Dollet², C. Bourgne⁴, M. Berger⁴, B. Pereira⁵, C. Bouche¹, JR. Drevet³ and F. Brugnon^{1,2}

¹ CHU Clermont Ferrand, Hôpital Estaing, Laboratoire de Biologie du Développement et de la Reproduction : AMP-CECOS, F-63003 Clermont-Ferrand, France;

² Université Clermont Auvergne, INSERM 1240, ImoST., F-63000 Clermont-Ferrand, France

³ Université Clermont Auvergne, CNRS UMR6293, INSERM U1103, GReD, F-63000 Clermont-Ferrand, France,

⁴ CHU Clermont Ferrand, Hôpital Estaing, Laboratoire d'Hématologie Biologique, F-63003 Clermont-Ferrand, France

⁵ CHU Clermont-Ferrand, DRCl, 'Délégation Recherche Clinique et Innovation', Clermont-Ferrand, France,

*corresponding author: Dr. Hanae Pons-Rejraji
hpons-rejraji@chu-clermontferrand.fr

Abstract

Study question: Does the combined effect of hypotaurine supplementation and spermatozoa selection by density gradient centrifugation (DGC) protect human sperm functions and DNA quality from the deleterious effects of freezing-thawing?

Summary answer: Hypotaurine supplementation in selection and frozen media improves vitality and progressive motility and reduces cryo-capacitation and the percentage of spermatozoa having fragmented DNA, chromatin packaging alterations and nuclear vacuolization.

What is known already: Although it is widely used, slow freezing can induce strong functional and nuclear spermatogenic alterations reducing the chances of pregnancy.

Study design, size, duration: Samples were obtained from 33 men (mean age 33.5 ± 0.8 years) undergoing routine semen analysis at the Center for Reproductive Medicine, between May 2014 and August 2018. Spermatozoa were selected by density gradient centrifugation (DGC), washed and frozen using a programmable device. Each step was performed in parallel with (H+ arm) or without (H- arm) 50mM hypotaurine supplementation. After thawing, the different analyzes were performed for both conditions in parallel.

Participants/materials, setting, methods: This prospective study was performed on surplus semen after a DGC-frozen-thawing cycle. We compared for both conditions, with or without hypotaurine supplementation, the total and progressive motility, vitality, integrity of the acrosome, markers of PKA-dependent capacitation intracellular signaling pathway and nuclear quality by measuring chromatin packaging, DNA fragmentation and oxidation as well as the presence of vacuoles in the spermatozoa head.

Main results and the role of chance: Post thaw spermatozoa selected and frozen in the presence of hypotaurine have a vitality (+ 17%, $p < 0.001$) and a progressive and total motility (+ 40% and + 22% respectively, $p < 0.005$) higher than the control arm. Supplementation reduces DNA fragmentation (-19%, $p < 0.05$), nuclear vacuolization (-21%, $p < 0.05$) and chromatin decondensation as measured by chromomycin A3 (-16%, $p < 0.01$) and aniline blue (-20%, $p < 0.01$). It also reduces the non-specific phosphorylation of the P110 and P80 capacitation protein markers, limiting cryo-capacitation.

Limitations, reasons for caution: Oligozoospermic population was not evaluated because the comparison of the different measurements required a high number of spermatozoa.

Wider implications of the findings: Our study is the first to demonstrate a beneficial effect of hypotaurine supplementation in preparation and freezing procedures on human spermatozoa DNA quality and cryocapacitation markers.

Study funding/competing interest(s): This work was funded by institutional grants from the INSERM and Université Clermont Auvergne and by a hospital grant (Programme Hospitalier Recherche Clinique, CHU Clermont-Ferrand). No competing interests.

Key words: cryopreservation, human spermatozoa, density gradient centrifugation, DNA fragmentation and oxidation, chromatin packaging, acrosome, capacitation and cryocapacitation

Introduction

Spermatozoa freezing is an indispensable tool for the preservation of male fertility. Despite advances in the field of cryobiology, the freezing and thawing steps still affect the integrity of spermatozoa, causing fertilization disorders (Watson, 1995; Di Santo *et al.*, 2012). Indeed, the addition and removal of the cryoprotectant medium induce spermatozoa physical stress related to thermal shocks and osmolarity variations. This results in a sharp decrease in the proportion of viable and motile cells, structural changes particularly at membrane level, and functional changes yielding a decrease sperm fertilizing ability (O'Connell *et al.*, 2002; Hezavehei *et al.*, 2018). The freezing-thawing cycles induce a strong production of reactive oxygen species (ROS) and a decrease in the amount and activity of antioxidant (AO) systems (Aitken and Baker, 2006; Tremellen, 2008; Aitken *et al.*, 2010). The situation of oxidative stress causes disruption of the plasma, acrosomal and mitochondrial membranes, as well as DNA alteration, and can ultimately lead to spermatozoa death notably by apoptosis (Oehninger *et al.*, 2000; Said *et al.*, 2010; Di Santo *et al.*, 2012; Lewis *et al.*, 2013). Indeed, after thawing, there is an increase in the fraction of spermatozoa with signs of apoptotic pathway activation together with nuclear DNA fragmentation (Said *et al.*, 2010). It has also been observed that frozen spermatozoa can present similar characteristics to that of the capacitated fresh spermatozoa; a phenomenon known as cryocapacitation (Medeiros *et al.*, 2002; Naresh and Atreja, 2015). In addition, it is always observed after thawing an increase in the number of spermatozoa without acrosome or with an altered acrosome membrane. Sperm that are prematurely acrosome reacted have limited survival time, and have a significantly reduced fertilizing ability (Medeiros *et al.*, 2002).

To reduce the deleterious effects of freezing-thawing cycle, two main strategies have been reported. The first one (Petyim *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2015) consists in the selection or the enrichment of high-quality sperm cells notably by swim up or density gradient centrifugation (DGC). Therefore, it eliminates immature germ cells, immune or epithelial cells, as well as dead or altered spermatozoa, which contributes to reduce reactive ROS sources. However, seminal liquid removal deprives sperm cells of their natural AO protection (Grizard *et al.*, 1999) having detrimental effect notably for altered semen as recently reported (Palomar Rios *et al.*, 2018). The second strategy is more widespread and consists in providing AO to protect the sperm cells (Amidi *et al.*, 2016; Ghorbani *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016; Hatef *et al.*, 2017; Aghaz *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018). Few studies showed the beneficial effect of combining both strategies (Brugnon *et al.*, 2013; Aliabadi *et al.*, 2018). In the study of Brugnon *et al.* (2013), semen samples of patients with oligo-asthenoteratozoospermia (OAT) have been selected by DGC supplemented with hypotaurine, the latter being also added to the washing and cryopreservation media. They showed beneficial effects notably via the reduction of the proportion of viable spermatozoa with apoptotic markers such as phosphatidylserine externalization, mitochondrial potential elevation and increased DNA fragmentation. Hypotaurine was selected because it is naturally present in the fluids of male and female genital tracts, and known to be an AO and osmolality regulator (Alvarez and Storey, 1983; Chen *et al.*, 1993; Bucak *et al.*, 2013; Partyka *et al.*, 2017). It has protective effects on motility (Boatman *et al.*, 1990; Donnrelly *et al.*, 2000), capacitation and acrosome reaction (Meizel, 1985; Martins-Bessa *et al.*, 2009) of spermatozoa from numerous species suggesting that, beside its AO actions, it could improve the fertilizing ability of cryopreserved human spermatozoa (Chen *et al.*, 1993; Sánchez-Partida *et al.*, 1997).

To better substantiate the beneficial effect of such a strategy the aim of the present study was to analyze more extensively the effects of hypotaurine supplementation on a large array of semen parameters, in men in age to procreate, with a particular focus on sperm DNA quality and fertilizing ability. To this end, we have concomitantly evaluated, the effects of hypotaurine addition to sperm DGC, cryopreservation and washing media on: (i) sperm conventional parameters such as vitality and motility; (ii) sperm nuclear alterations such as DNA fragmentation and oxidation, chromatin decondensation and the presence of vacuole in

spermatic heads (*i.e.* nuclear vacuolization); (iii) fertilizing ability by measuring acrosome integrity, cryocapacitation level after thawing and ability of sperm cells to capacitate *in vitro*.

Materials and Methods

Experimental design, Ethics Statement and Patient characteristics

Experimental design is presented Figure 1. Samples were obtained from 33 men undergoing routine semen analysis at the Center for Reproductive Medicine, between May 2014 and August 2018. Patients were recruited in accordance with the 1975 Declaration of Helsinki principles on human experimentation. Only surplus semen was used in this study. Written informed consent was obtained from each man prior to inclusion of any sperm sample in the “Germethèque” biobank. This study was approved by the Germethèque Scientific Committee and the Ethical Committee under the French IRB reference CPP Sud-Est 6, DC2008-DC58. Semen samples were collected and conventional semen analysis were performed in accordance with the WHO 2010 guidelines (“WHO | WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen,” n.d.) Morphology and teratozoospermia index (TZI) were measured in accordance to stricter criteria (Menkveld *et al.*, 1990). Each sample was subdivided and treated in parallel in two ways: a control arm “H -”: sperm were treated by DGC without hypotaurine supplementation and an arm “H +”: semen were treated with a 50mM hypotaurine supplementation in DGC, washing and freezing media. Spermatozoa were frozen in high-security straws (CBS™, Cryobiosystem™, France) in the presence of Cryosperm® freezing medium (Origio, Malov, Denmark) and stored at -196 ° C in liquid nitrogen until use. After thawing, the different analyzes were performed in parallel for both conditions: (i) sperm vitality and progressive and total motility; (ii) chromatin condensation, DNA fragmentation and oxidation and nuclear vacuolization; (iii) acrosome integrity and capacitation terminal markers. Thirty three patients have been included in the study with a mean age and body mass index (BMI) of 33.5±0.8 years and a 26.2±0.8, respectively (Table I). Semen parameters are presented in Table I: briefly, 20 were normozoospermic and 13 presented teratozoospermia, 1 associated with asthenozoospermia and 1 with high level of leukocytes (Table I). Since a large number of sperm cells was required to perform the panel of measurements, some samples with a limited number of cells did not allow to perform the full set of analyses. We therefore distributed the samples to have a homogeneous number of measurements for all analyzes. We varied the combinations of measurements realized in order to evaluate the correlations between the different analyzes. Vitality and mobility were performed on all samples.

Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France) unless otherwise indicated.

Semen collection and preparation

Semen samples were collected by masturbation into sterile containers after a period of 2–7 days of sexual abstinence. Conventional semen analysis were performed in accordance with the WHO 2010 guidelines (“WHO | WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen,” n.d.). Leukocytes were detected using the LeucoScreen Kit (FertiPro N.V., Belgium). Viable spermatozoa proportion (vitality) was assessed by eosin-nigrosin staining using Vital Screen Kit (FertiPro N.V., Belgium). All the sperm counts resulted from two independent readings. The semen surplus was treated by a two steps (90/45%) discontinuous density gradient centrifugation (DGC), 750 g, 20 min, room temperature (RT) using fresh gradient media consisting of Puresperm® medium (Nidacon International, Molndal, Sweden) and equilibrated Sperm Preparation® medium (Origio Malov, Denmark). The high density fraction was then washed by centrifugation in Sperm Preparation® medium at 750 g, for 8 min at RT and the pellet was resuspended in the

washing medium. Samples were mixed 1:1 ratio (v/v) with cryoprotectant medium (Cryosperm, Origio, France) according to supplier's recommendations, frozen in high security straws (Cryobiosystem®, L'Aigle, France) using a NanoDigitcool® programmable freezer (Cryobiosystem®, L'Aigle, France) and stored in a liquid nitrogen tank (CF250M, Cryodiffusion®, France). For the H + arm, all media were supplemented with a final concentration of 50mM of hypotaurine as previously described (Brugnon *et al.*, 2013).

For thawing, the straws were placed at 37°C for 3 min. After a multi-steps addition of Sperm Preparation® medium, the cryoprotectant was removed by centrifugation (750g, 5 min, RT). Finally, a second wash was performed using Sperm Preparation® medium (750g, 5 min, RT) and samples were aliquoted for measurements.

Nuclear quality markers measurements

DNA fragmentation measurements

Sample were washed with PBS 1X by centrifugation (750g, 5 min, RT). The measurement of sperm DNA fragmentation (n=19) was performed using the TUNEL Detection Kit (Cell Death Kit detection POD®, Roche, France) as described in Brugnon *et al.* 2013. After washing by centrifugation (500g, 5min, TA, PBS 1X), 1.10^6 sperm were fixed in a solution of 4% paraformaldehyde. After washing in PBS 1X –BSA 1%, the spermatozoa were resuspended in a permeabilization solution containing 0.1% Triton-X in 0.1% sodium citrate for 3 min in ice. After washing (500 g, 5 min, RT), the labeling reaction was carried out by incubating for 1 h at 37 ° C with enzyme and labeling solution. Then, the cell suspension is washed in 1% PBS-BSA and counterstained with Propidium Iodide (PI, 2 mg / ml) to control the effectiveness of the permeabilization before flow cytometry (FCM) measurements.

Chromatin packaging measurements

Chromatin decondensation measurements were performed using aniline blue staining and chromomycin A3 labeling. Aniline blue staining was usually used to evaluate the degree of nuclear maturity and chromatin condensation. Nevertheless, it was shown that aniline blue could lack of sensitivity in comparison to CMA3 (Wong *et al.*, 2008, Franken *et al.*, 1999). CMA3 binds to GC-rich sequences, which makes it possible to assess protamine deficiency and fragmented or partially denatured DNA (Sakkas *et al.*, 1998; Franken *et al.*, 1999; Esterhuizen *et al.*, 2000). As the results were systematically similar and because a large number of sperm cells were required for the panel of tests we conducted here we did favor the CMA3 staining (n= 28).

For aniline blue staining, 0.25×10^6 spermatozoa were fixed with a solution of 3% glutaraldehyde – PBS 1X and stained with a 5% aniline blue-4% acetic acid solution for 5 min (CARLO ERBA, Italy). The slides (Super Frost® slides, Thermo Fischer Scientific, Villebon sur Yvette, France) were rinsed with PBS 1X and counter-stained with 0.5% eosin for 1 min. Spermatozoa with blue color on 50% of the head are considered as having decondensed chromatin, while pink spermatozoa are considered as having a normally condensed chromatin.

For Chromomycin A3 labeling, spermatozoa were fixed in methanol / glacial acetic acid (3: 1) at 4 ° C for 5 min, before labeling with a CMA3 solution (0.25 mg / ml of McIlvaine buffer, pH 7.0 and 10 mM of $MgCl_2$) in a humid chamber. Bright yellow sperm heads are indicative of an abnormally condensed chromatin. A total of 200 sperm per slide was counted blind for each condition by two different readers.

DNA Oxidation measurements

To evaluate DNA oxidation 8-OHdG residues were immunodetected and quantified using FCM measurement (n=18) as described previously (Vorilhon *et al.*, 2018). Briefly, PBS-washed samples were incubated for 10 min in the dark in a decondensation buffer comprising 2 mM DTT (dithiothreitol), 0.5% Triton X-100 and 1X PBS, followed by fixation with 4% paraformaldehyde. Spermatozoa were incubated in 1.5% NGS (Normal Goat Serum) saturation solution. Mouse anti-8-OHdG monoclonal antibody (DNA/RNA Damage

Antibody-15A3, NB110-96878, Novus Biological®, France, 1:1000) and Alexa Fluor 488 antibodies monoclonal anti-8OHdG antibody (Molecular Probes®, Eugene, OR, 1:1000) labeling were conducted overnight and for 90 min, respectively. For each assay, control incubations were conducted comprising a negative control untreated with anti-8-OHdG primary antibody or the binding conjugate, and a positive control treated with an 8 M H₂O₂ (Gilbert, Herouville-Saint-Clair, France) solution for 1 h before fixation. Using FCM the percentage of 8-OHdG-positive spermatozoa and mean fluorescence intensity level of fluorescence (MFI) were evaluated.

Flow Cytometry measurements

Flow Cytometry measurements were performed on a minimum of 20,000 spermatozoa using a BD FACS Aria SORP (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) cell sorter using an 85 µm nozzle. The FSC (forward-scattered light) and SSC (side-scattered light) were detected on a linear scale and used to gate sperm cells. Sperm cell gating was confirmed by microscopy after cell sorting. The fluorochromes were excited at a wavelength of 488 nm by an argon laser. The fluorescence green (FITC) and red (PI) were respectively detected in FL1 by a bandwidth filter of 525nm and in FL3 by a bandwidth filter of 620nm. The fluorescence signals detected by FL1 and FL3 were recorded after logarithmic amplification and the percentage of labeled cells was calculated by the flow cytometer software.

Nuclear vacuolization analysis

Nuclear vacuolization was estimated for 19 samples by motile sperm organelle morphology examination (MSOME) using an inverted microscope (Leica AM 6000 micromanipulator, France) equipped with a Hoffman and Nomarski interferential contrast with a dry objective of x6300. The spermatozoa suspension was deposited in a microdrop of 5µl of PVP (Polyvinylpyrrolidone, Clinical Grade®, Origio) in a sterile glass dish covered with mineral oil (Ovoil®, Vitrolife, Sweden). Spermatozoa were classified in 2 groups: spermatozoa with a large head vacuole or 2 small vacuoles or more; normal group consisting of sperm free of vacuole or with one small nuclear vacuole. A total of 200 spermatozoa was counted blind for each condition by two different readers.

Terminal markers of Capacitation and Acrosome integrity measurements

Western blot of terminal markers of Capacitation

Spermatozoa capacitation ability for 15 samples was estimated by monitoring tyrosine phosphorylation (P-Tyr) of P80 and P110 proteins by western-blot procedure, using a monoclonal anti-phosphotyrosine antibody (clone 4G10; Upstate Biotechnology Inc, Lake Placid, NY). The intensity of the phosphorylation was evaluated by densitometry after scanning of the films. After thawing and washes and following 3 h of incubation in capacitating conditions (Sperm Preparation medium, 37°C and 5% CO₂), spermatozoa were washed with PBS 1X and centrifuged (500 g, 5 min, 4°C). Spermatozoa proteins were solubilized and denatured in electrophoresis sample buffer (2% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 31.25 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.2% phosphatase inhibitor cocktail) at 100 °C for 5 min. Proteins derived from 250,000 cells were separated on a 7.5% SDS-polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose membrane. Immunodetections were performed as indicated in previous studies (Pons-Rejraji *et al.*, 2011). To calibrate the signal for the amount of sperm protein subjected to the electrophoresis and western blot procedures, the same membranes were probed again using the same protocol with a mouse monoclonal anti α-tubulin antibody. P-Tyr profiles and tubulin signals were quantified and the P-Tyr signal was normalized to the tubulin one. For each condition, the ratio obtained after different durations of incubation were related to the ratio obtained before incubation.

Acrosome Integrity measurements

For evaluation of acrosome integrity, spermatozoa of 25 samples were fixed and permeabilized in methanol 98 % after a wash in PBS 1X. Sperm cells were incubated with a freshly prepared solution of *Pisum sativum agglutinin* conjugated to fluorescein

isothiocyanate (FITC-PSA, 60 µg/ml final) in PBS 1X for 30 min at 4°C in a moisture chamber as indicated in prior studies (Pons-Rejraji *et al.*, 2014). After washing, sperm cells were observed with an epifluorescence microscope (x 400). Sperm cells with their acrosome membrane showed a marked fluorescence on the acrosome region, while those having lost their acrosome membrane were devoid of fluorescence or presented a fluorescence mark along the equatorial segment. A total of 200 sperm per slide was counted blind for each condition by two different readers.

Statistics

All analyses were performed using STATA® (version 13, StataCorp, College Station, TX) software. Data were presented as the mean $\pm$ standard error of mean (SEM) or median [interquartile range]. For each pairwise comparison, the statistical difference was evaluated using parametric (Student's *t*-test) or non-parametric (Wilcoxon test) paired tests. Correlations between the different parameters were evaluated using or Spearman correlations (rho coefficient) according to statistical distribution and number of subjects. A *heatmap* representation was performed to illustrate the different correlations.

Results

Hypotaaurine supplementation and DGC effects

Vitality as well as total and progressive motility were significantly decreased for the 2 arms after thawing (39.0 ± 2.9 % and 45.5 ± 3.2 %, respectively for the H- and H + arm for vitality, Table II) in comparison with the values measured with fresh spermatozoa (73.6 ± 1.9 %, $p < 0.0001$). However, the three parameters were significantly higher for the H + condition compared with H- one ($p < 0.001$ for vitality, and $p < 0.005$ for both progressive and total motility, Table II).

We observed after thawing significantly higher phosphorylation levels of the P110 and P80 proteins for H- condition, indicating a higher cryocapacitation grade, in comparison with H+ one (1.3 ± 0.4 a.u. vs. 1.0 ± 0.3 a.u. $p < 0.01$ for P110 and 1.3 ± 0.4 a.u. vs. 1.0 ± 0.4 a.u. $p < 0.01$ for P80, Table III). P110 and P80 phosphorylation levels after 3h of incubation in capacitation conditions tended to be higher for H+ condition in comparison the with H- one, even if it was not statistically significant (3.5 ± 1.0 for H- vs. 4.4 ± 1.0 a.u. for H+, $p = 0.23$ for P110 and 3.6 ± 0.9 for H- vs. 4.5 ± 1.0 a.u. for H+, $p = 0.08$ and P80, Table III). The percentage comparison of spermatozoa with an altered or absent acrosome (AR %, Table III) reveals no significant difference between both conditions.

Spermatozoa chromatin packaging was found also significantly improved in the H+ arm in comparison with the H- one using CMA3 ($p < 0.05$, Table IV) and aniline blue labeling ($p < 0.05$, Table IV). Similar effects were observed with the spermatozoa having fragmented DNA (18.7 ± 2.0 % for H+ condition in comparison with H- one 23.0 ± 2.7 %, $p < 0.05$, Table IV) and spermatozoa with nuclear vacuolization (31.7 ± 4.4 vs. 25.1 ± 3.9 %, $p < 0.05$, Table IV). Concerning DNA oxidation measured by 8-OHdG immuno-detection, we observed no statistically significant effect for sperm cells percentage nor for MIF. However, MFI the most discriminant criteria in DNA oxidation assay tended to be lower in the H+ arm (5900.5 ± 802.9 for H- and 5615.1 ± 838.3 a.u. for H+, $p = 0.35$, Table IV).

Correlations between sperm parameters

Correlations between the different parameters measured are represented by a heatmap shown in Figure 2. The percentage of CMA3+ spermatozoa was negatively correlated with the vitality ($r = -0.4$, $p < 0.01$) and the total motility ($r = -0.4$, $p < 0.01$) and the percentage of spermatozoa having nuclear vacuoles ($r = -0.4$, $p < 0.01$). The percentage of spermatozoa

having a fragmented DNA was negatively correlated with the MFI of DNA oxidation ($r = -0.6$, $p < 0.01$), the vitality ($r = -0.5$, $p < 0.01$) and the progressive motility ($r = -0.4$, $p < 0.05$). The percentage of spermatozoa with nuclear vacuolization was also negatively correlated with the MFI of DNA oxidation ($r = -0.6$, $p < 0.01$).

The percentage of acrosome reacted spermatozoa was positively correlated with The MFI of DNA oxidation ($r = 0.5$, $p < 0.05$) and the percentage of spermatozoa with nuclear vacuolization ($r = 0.4$, $p < 0.05$). Capacitation markers P110 and P80 were positively correlated with DNA oxidation regarding both percentage ($r = 0.5$ with P110, $p < 0.01$) and MFI ($r = 0.6$ with P110 and $r = 0.7$ with P80, $p < 0.001$), whereas cryocapacitation markers were not correlated with any of those.

Discussion

Despite the development of new tools and approaches for spermatozoa cryopreservation, the slow and progressive freezing remains the gold standard method to preserve men fertility (Sharma *et al.*, 2015; Hezavehei *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019). However, sperm preparations including washing, DGC selection (Tremellen, 2008), as well as cryopreservation by itself (Zribi *et al.*, 2010) are known to increase oxidative stress resulting in alterations of sperm membrane and DNA. Furthermore, DGC by eliminating the protective AO activities of seminal fluid can aggravate the spermatozoa susceptibility to oxidative damage (Grizard *et al.*, 1999). In such a context, the addition of AO during DGC and cryopreservation processes could have beneficial effect on sperm structure and functions. Hypotaurine was selected because beside its well-known osmoregulatory action it has been described as an antioxidant having i) protective effects on the integrity of the sperm plasma membrane, ii) beneficial effect on sperm DNA integrity notably by reducing DNA fragmentation and, iii) positive impact on spermatozoa functionalities in numerous species (Alvarez and Storey, 1983; Boatman *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1993; Bucak *et al.*, 2013; Partyka *et al.*, 2017; Asano *et al.*, 2018). More precisely, it was reported in animal models that hypotaurine supplementation reduced lipid peroxidation of cryopreserved spermatozoa (Partyka *et al.*, 2017) protecting plasma and acrosomal membranes (Bucak *et al.*, 2013). Semen concentrations of hypotaurine as well as taurine, its immediate downstream metabolite, have long been reported to be related with male fertility (Holmes *et al.*, 1992). Naturally present in the human male and female reproductive tissues (Guérin *et al.*, 1995), hypotaurine was shown to play a role in various processes including sperm capacitation, acrosome reaction and fertilization (Meizel, 1985; Holmes *et al.*, 1992; Buff *et al.*, 2001). Therefore, we hypothesized that because of its combined antioxidant, anti-capacitant and osmoregulatory actions hypotaurine supplementation in DGC, washing and freezing media was a pertinent choice in order to improve the quality of cryopreserved spermatozoa (Hezavehei *et al.*, 2018; Pini *et al.*, 2018). Our earlier study (Brugnon *et al.*, 2013) reported a decrease of the percentage of spermatozoa with apoptotic markers when sperm selection was performed before freezing and with hypotaurine addition. The present study clearly demonstrated the benefit of the combination of DGC and hypotaurine supplementation on vitality, total and progressive motility, cryocapacitation and DNA integrity of post thaw spermatozoa from patients with normal or altered conventional sperm parameters. Notably, we shown that this protocol significantly reduced the proportion of spermatozoa having DNA fragmentation, chromatin decondensation and nuclear vacuolization.

All the nuclear alterations measured were significantly reduced by hypotaurine supplementation with the sole exception of oxidation. However, while there were no statistical differences in terms of the number of cells positive for 8-OHdG between the H+ and H- arms there was a clear tendency towards a decrease when the 8-OHdG MFI was considered. This suggested that overall hypotaurine treatment was associated with a decrease in spermatozoa nucleus susceptibility to oxidative alteration resulting in lower MFI

values, which we have shown earlier to be the most discriminant criteria when monitoring the extent of DNA oxidative alteration using 8-OHdG immunofluorescence and flow cytometry in human sperm (Vorilhon *et al.*, 2018). The absence of clear significant effect could be explained either by semen sample heterogeneity regarding DNA oxidation level associated with the rather limited number of samples analyzed. Because the 8-OHdG assay requires a large number of cells we could not carry it out with every sample of our cohort. In addition, it is also possible that 50mM of hypotaurine was either not a sufficient concentration to protect efficiently sperm DNA from oxidation or, that hypotaurine is not the most efficient AO to counteract H₂O₂-mediated DNA oxidative damage. Indeed, there are reports showing that hypotaurine can scavenge the aggressive hydroxyl radical (Aruoma *et al.*, 1988; Donnelly *et al.*, 2000), but its ability to deal with H₂O₂ (or/and H₂O₂-mediated damage) is not clearly established. The protective effects of hypotaurine on sperm nuclear integrity reported here confirmed our preliminary report (Brugnon *et al.*, 2013) and are in agreement with other reports that have shown that AO supplementation in freezing media protected sperm cells from DNA damages (Sharma *et al.*, 2015; Hezavehei *et al.*, 2018). Dose-response experimentations should be performed to see whether higher hypotaurine concentrations could improve its effect on sperm DNA oxidative damage.

Regarding sperm nuclear vacuolization and cryopreservation there are two conflicting reports (Boitrelle *et al.*, 2012; Gatimel *et al.*, 2013). In the first study, cryopreservation as shown to induce sperm nuclear vacuolization and chromatin decondensation (Boitrelle *et al.*, 2012) while in the second study not effect was recorded (Gatimel *et al.*, 2013). However, these studies are difficult to compare since in the first case 25 infertile males were analyzed while in the second 27 fertile males constituted the cohort. Our study demonstrates that AO addition to selection and freezing media reduces both sperm nuclear vacuolization and chromatin packaging alterations which may support the idea that cryopreservation can aggravates/provokes sperm nuclear vacuolization.

We did not observe any significant effect of hypotaurine on acrosome integrity or capacitation. It nevertheless reduced the non-specific phosphorylation of two capacitation markers induced by cryopreservation in the process known as cryo-capacitation. It was reported (Bucak *et al.*, 2013), using ram model, that hypotaurine supplementation reduced the deleterious effects of cryopreservation on the acrosome. However Partyka *et al.* shown none effect on acrosome integrity of chicken spermatozoa (Partyka *et al.*, 2017). Hypotaurine action seems to be dose-dependent and species-specific as it was true for ram spermatozoa but not for chicken spermatozoa. The 50mM concentration was chosen on the basis of the concentrations measured in seminal and epididymal fluids of fertile men (Holmes *et al.*, 1992). This concentration is however, the highest used in this context in comparison with others studies (Bucak *et al.*, 2013; Partyka *et al.*, 2017). Once again, dose-response experiments should be conducted to determine what concentrations could improve hypotaurine effects on human spermatozoa. In parallel, in combination with hypotaurine other AO could be tested for a synergistic or/and complementary action as it was shown recently that different antioxidants when combined may have additive positive effects on sperm cells (for recent reviews (Sharma *et al.*, 2015; Amidi *et al.*, 2016; Hezavehei *et al.*, 2018)).

In conclusion, we show here that post-thaw spermatozoa selected and frozen in the presence of hypotaurine had significant proportion of live and progressively motile spermatozoa than spermatozoa that were only selected by DGC before freezing. Supplementation reduced the percentage of spermatozoa with DNA fragmentation, chromatin decondensation and nuclear vacuolization. It also reduced the non-specific phosphorylation of capacitation protein markers, limiting cryo-capacitation. Sperm cryopreservation is a precious clinical aid in the management of men infertility in particular to preserve fertility in the context of pathologies or before treatments that may be gonadotoxics.

Hypotaaurine supplementation could be easily and routinely added in ART preparation and freezing media in order to improve the management of men infertility.

In conclusion, we show here that post-thaw spermatozoa selected and frozen in the presence of hypotaaurine had significant proportion of live and progressively motile spermatozoa than spermatozoa that were only selected by DGC before freezing. Supplementation reduced the percentage of spermatozoa with DNA fragmentation, chromatin decondensation and nuclear vacuolization. It also reduced the non-specific phosphorylation of capacitation protein markers, limiting cryo-capacitation. As sperm cryopreservation is a precious clinical aid in the management of men infertility in particular to preserve fertility in the context of pathologies or before treatments that may be gonadotoxics, hypotaaurine supplementation could be easily implemented in ART preparation and freezing media in order to improve the management of men infertility.

Authors' roles

H. Pons-Rejraji : HP; S. Vorilhon : SV ; A. Difrane : AD ; S. Dollet : SD; C. Bourgne : CB; M. Berger : MB; B. Pereira: BP; C. Bouche CB1: JR. Drevet : JRD; F. Brugnon: FB

HP designed the study, performed the research and wrote the article. BP performed the statistical analyses and interpretations and contributed to manuscript revision in collaboration with HP and SV. SV, SD, AD, CB and HP performed the semen analyses. CB1 and MB contributed to realize FCM analysis and interpretations. FB and JRD contributed to study design and manuscript revision.

Funding

This work was funded by institutional grants from the INSERM and Université Clermont Auvergne and by a hospital grant (Programme Hospitalier Recherche Clinique, CHU Clermont-Ferrand).

Conflict of interest

None

References

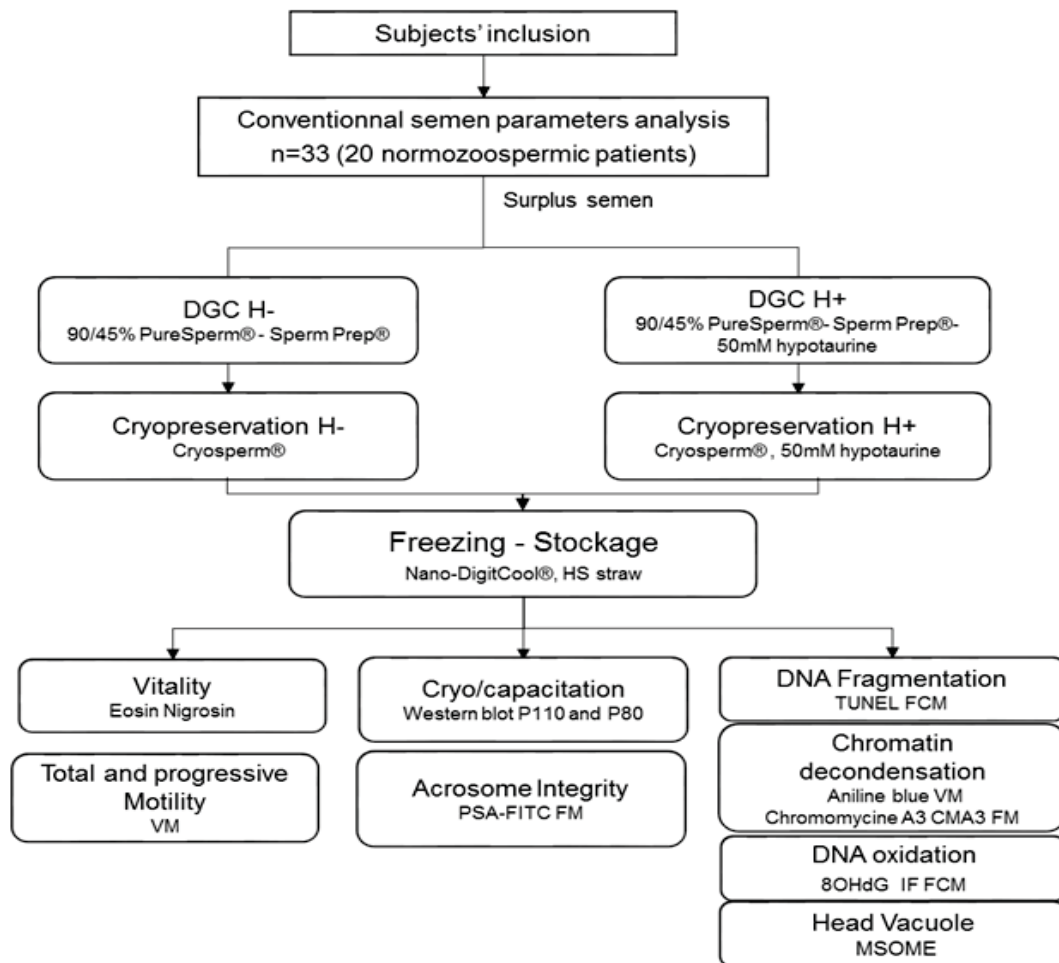
- Aghaz F, Khazaei M, Vaisi-Raygani A, Bakhtiyari M. Cryoprotective effect of sericin supplementation in freezing and thawing media on the outcome of cryopreservation in human sperm. *Aging Male* 2018;1–8.
- Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol* 2006;250:66–69.
- Aitken RJ, De Iuliis GN, Finnie JM, Hedges A, McLachlan RI. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Hum Reprod* 2010;25:2415–2426.
- Aliabadi E, Jahanshahi S, Talaei-Khozani T, Banaei M. Comparison and evaluation of capacitation and acrosomal reaction in freeze-thawed human ejaculated spermatozoa treated with L-carnitine and pentoxifylline. *Andrologia* 2018;50:.
- Alvarez JG, Storey BT. Taurine, hypotaaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol Reprod* 1983;29:548–555.
- Amidi F, Pazhohan A, Shabani Nashtaei M, Khodarahmian M, Nekoonam S. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell Tissue Bank* 2016;17:745–756.

- Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochem J* 1988;**256**:251–255.
- Asano A, Roman HB, Hirschberger LL, Ushiyama A, Nelson JL, Hinchman MM, Stipanuk MH, Travis AJ. Cysteine dioxygenase is essential for mouse sperm osmoadaptation and male fertility. *FEBS J* 2018;**285**:1827–1839.
- Boatman DE, Bavister BD, Cruz E. Addition of hypotaurine can reactivate immotile golden hamster spermatozoa. *J Androl* 1990;**11**:66–72.
- Boitrelle F, Albert M, Theillac C, Ferfour F, Bergere M, Vialard F, Wainer R, Bailly M, Selva J. Cryopreservation of human spermatozoa decreases the number of motile normal spermatozoa, induces nuclear vacuolization and chromatin decondensation. *J Androl* 2012;**33**:1371–1378.
- Brugnon F, Ouchchane L, Pons-Rejraji H, Artonne C, Farigoule M, Janny L. Density gradient centrifugation prior to cryopreservation and hypotaurine supplementation improve post-thaw quality of sperm from infertile men with oligoasthenoteratozoospermia. *Hum Reprod* 2013;**28**:2045–2057.
- Bucak MN, Keskin N, Taşpınar M, Çoyan K, Başpınar N, Cenariu MC, Bilgili A, Öztürk C, Kuşunlu AN. Raffinose and hypotaurine improve the post-thawed Merino ram sperm parameters. *Cryobiology* 2013;**67**:34–39.
- Buff S, Donzé A, Guérin P, Guillaud J, Fontbonne A, Ménézo Y. Taurine and hypotaurine in spermatozoa and epididymal fluid of cats. *J Reprod Fertil Suppl* 2001;**57**:93–95.
- Chen Y, Foote RH, Brockett CC. Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology* 1993;**30**:423–431.
- Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Adv Urol* 2012;**2012**:854837.
- Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. Glutathione and hypotaurine in vitro: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. *Mutagenesis* 2000;**15**:61–68.
- Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JG, Van Zyl C, Müller II, Van Rooyen LH. Chromatin packaging as an indicator of human sperm dysfunction. *J Assist Reprod Genet* 2000;**17**:508–514.
- Franken DR, Franken CJ, Guerre H de la, Villiers A de. Normal sperm morphology and chromatin packaging: comparison between aniline blue and chromomycin A3 staining. *Andrologia* 1999;**31**:361–366.
- Gatimel N, Leandri R, Parinaud J. Sperm vacuoles are not modified by freezing–thawing procedures. *Reprod Biomed Online* 2013;**26**:240–246.
- Ghorbani M, Vatannejad A, Khodadadi I, Amiri I, Tavilani H. PROTECTIVE EFFECTS OF GLUTATHIONE SUPPLEMENTATION AGAINST OXIDATIVE STRESS DURING CRYOPRESERVATION OF HUMAN SPERMATOZOA. *Cryo Letters* 2016;**37**:34–40.
- Grizard G, Chevalier V, Griveau JF, Le Lannou D, Boucher D. Influence of seminal plasma on cryopreservation of human spermatozoa in a biological material-free medium: study of normal and low-quality semen. *Int J Androl* 1999;**22**:190–196.
- Guérin P, Guillaud J, Ménézo Y. Hypotaurine in spermatozoa and genital secretions and its production by oviduct epithelial cells in vitro. *Hum Reprod* 1995;**10**:866–872.
- Hatef B, Taramchi A, Nejatbakhsh R, Farrokhi A, Shokri S. Supplementation of freezing media with stromal cell-derived factor-1 α preserves human sperm from cryodamage. *Cryobiology* 2017;**79**:37–42.
- Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, Henkel R, Agarwal A, Esmaeili V, Shahverdi A. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod Biomed Online* 2018;**37**:327–339.
- Holmes RP, Goodman HO, Shihabi ZK, Jarow JP. The taurine and hypotaurine content of human semen. *J Androl* 1992;**13**:289–292.
- Lewis SEM, John Aitken R, Conner SJ, Iulius GD, Evenson DP, Henkel R, Giwercman A, Gharagozloo P. The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. *Reproductive BioMedicine Online* 2013;**27**:325–337.
- Li Y-X, Zhou L, Lv M-Q, Ge P, Liu Y-C, Zhou D-X. Vitrification and conventional freezing methods in sperm cryopreservation: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2019;**233**:84–92.
- Liu J, Wang W, Liu X, Wang X, Wang J, Wang Y, Li N, Wang X. Supplementation of cryopreservation medium with TAT-Peroxiredoxin 2 fusion protein improves human sperm quality and function. *Fertil Steril* 2018;**110**:1058–1066.
- Martins-Bessa A, Rocha A, Mayenco-Aguirre A. Effects of taurine and hypotaurine supplementation and ionophore concentrations on post-thaw acrosome reaction of dog spermatozoa. *Theriogenology* 2009;**71**:248–253.

- Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 2002;**57**:327–344.
- Meizel S. Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the mammalian sperm surface. *Am J Anat* 1985;**174**:285–302.
- Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, Kruger TF, Zyl JA van. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod* 1990;**5**:586–592.
- Naresh S, Atreja SK. The protein tyrosine phosphorylation during in vitro capacitation and cryopreservation of mammalian spermatozoa. *Cryobiology* 2015;**70**:211–216.
- O'Connell M, McClure N, Lewis SEM. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod* 2002;**17**:704–709.
- Oehninger S, Duru NK, Srisombut C, Morshedi M. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. *Mol Cell Endocrinol* 2000;**169**:3–10.
- Palomar Rios A, Gascón A, Martínez JV, Balasch S, Molina Botella I. Sperm preparation after freezing improves motile sperm count, motility, and viability in frozen-thawed sperm compared with sperm preparation before freezing-thawing process. *J Assist Reprod Genet* 2018;**35**:237–245.
- Partyka A, Rodak O, Bajzert J, Kochan J, Niżański W. The Effect of L-Carnitine, Hypotaurine, and Taurine Supplementation on the Quality of Cryopreserved Chicken Semen. *Biomed Res Int* 2017;**2017**:7279341.
- Petyim S, Neungton C, Thanaboonyawat I, Laokirkkiat P, Choavaratana R. Sperm preparation before freezing improves sperm motility and reduces apoptosis in post-freezing-thawing sperm compared with post-thawing sperm preparation. *J Assist Reprod Genet* 2014;**31**:1673–1680.
- Pini T, Leahy T, Graaf SP de. Sublethal sperm freezing damage: Manifestations and solutions. *Theriogenology* 2018;**118**:172–181.
- Pons-Rejraji H, Artonne C, Sion B, Brugnion F, Canis M, Janny L, Grizard G. Prostatosomes: inhibitors of capacitation and modulators of cellular signalling in human sperm. *Int J Androl* 2011;**34**:568–580.
- Pons-Rejraji H, Brugnion F, Sion B, Maqdasy S, Gouby G, Pereira B, Marceau G, Gremeau A-S, Drevet J, Grizard G, *et al.* Evaluation of atorvastatin efficacy and toxicity on spermatozoa, accessory glands and gonadal hormones of healthy men: a pilot prospective clinical trial. *Reprod Biol Endocrinol* 2014;**12**:65.
- Said TM, Gaglani A, Agarwal A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reprod Biomed Online* 2010;**21**:456–462.
- Sakkas D, Umer F, Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi PG, Shoukir Y, Campana A. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 1998;**13 Suppl 4**:11–19.
- Sánchez-Partida LG, Setchell BP, Maxwell WM. Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 1997;**9**:689–696.
- Sharma R, Kattoor AJ, Ghulmiyyah J, Agarwal A. Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. *Syst Biol Reprod Med* 2015;**61**:1–12.
- Tremellen K. Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 2008;**14**:243–258.
- Vorilhon S, Brugnion F, Kocer A, Dollet S, Bourgne C, Berger M, Janny L, Pereira B, Aitken RJ, Moazamian A, *et al.* Accuracy of human sperm DNA oxidation quantification and threshold determination using an 8-OHdG immuno-detection assay. *Hum Reprod* 2018;**33**:553–562.
- Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 1995;**7**:871–891.
- WHO | WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen WHO [Internet] Available from: <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/9789241547789/en/>.
- Wong A, Chuan SS, Patton WC, Jacobson JD, Corselli J, Chan PJ. Addition of eosin to the aniline blue assay to enhance detection of immature sperm histones. *Fertility and Sterility* 2008;**90**:1999–2002.
- Zhang W, Li F, Cao H, Li C, Du C, Yao L, Mao H, Lin W. Protective effects of l-carnitine on astheno- and normozoospermic human semen samples during cryopreservation. *Zygote* 2016;**24**:293–300.
- Zribi N, Feki Chakroun N, El Euch H, Gargouri J, Bahloul A, Ammar Keskes L. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril* 2010;**93**:159–166.

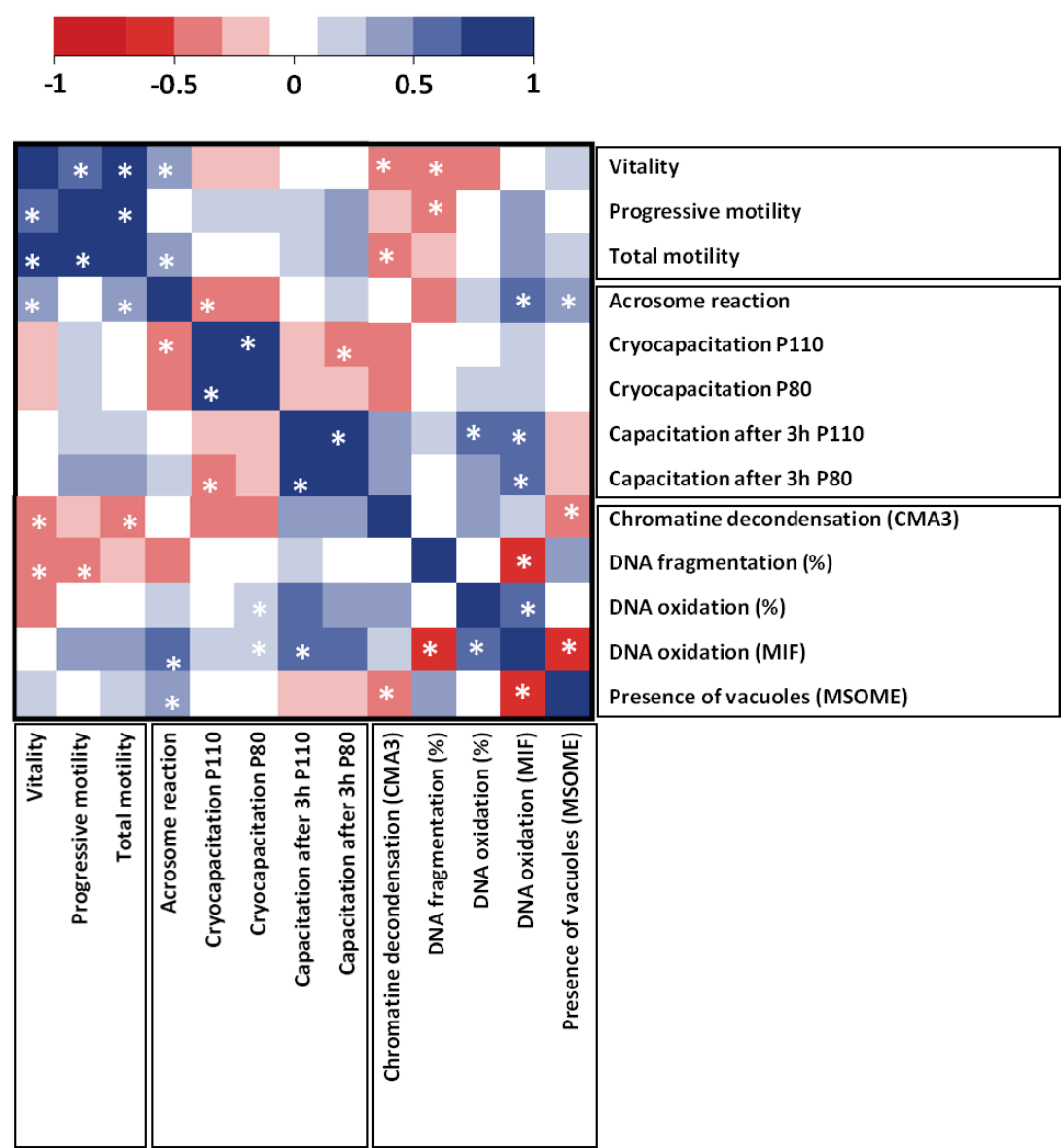
Figure legends

Figure 1 Experimental study design



Samples were obtained from 33 men undergoing routine semen analysis at the Center for Reproductive Medicine. Surplus semen of each sample was subdivided and treated in parallel by two ways: a control arm "H -": sperm cells were treated by density gradient centrifugation (DGC) without hypotaurine supplementation and an arm "H +": semen were treated with a 50mM hypotaurine supplementation in DGC. Spermatozoa were washed and frozen in high-security straws in the presence of media supplemented (H+) or not (H-) with hypotaurine. After thawing, the different analyzes were performed in parallel for both conditions: (i) sperm vitality (n =33, measured by eosin nigrosine staining) and progressive and total motility measured manually using visible microscopy (VM, n =33) ; (ii) chromatin condensation measured by aniline blue and VM (n= 18) and chromomycin A3 and fluorescence microscopy (FM, n=28), DNA fragmentation by TUNEL assay and flow cytometry (FCM, n= 18) and oxidation (percentage of 8-OHdG-positive spermatozoa (8-OHdG spz) and the mean intensity of fluorescence (MFI) using immuno-fluorescence (IF) and FCM (n= 18) and nuclear vacuolization observed by motile sperm organelle morphology examination (MSOME, n=19); (iii) acrosome integrity estimated after FITC- PSA labeling and FM (n=25) and finally capacitation terminal markers by measuring P110 and P80 tyrosine phosphorylation using western Blot (n=15).

Figure 2 Correlations between post thaw spermatozoa parameters



Heatmap representing positive (in blue) and negative (in red) correlations between the different parameters using or Spearman correlations according to statistical distribution and number of subjects. *indicates significant difference with $p < 0.05$.

Table I Clinical characteristic and conventional semen parameters

Clinical characteristics and Conventional semen parameters (Mean±SEM)	
Number of subjects	33
Age (years)	33.5 ± 0.8
BMI	26.2 ± 0.8
Normozoospermic	20
astheno-teratozoospermic	1
leuco-teratozoospermic	1
teratozoospermic	11
Semen volume (ml)	4.7 ± 0.4
pH	7.9 ± 0.05
Sperm concentration (10⁶ spz/ml)	112.8 ± 13.3
Round cells concentration (10⁶ cells/ml)	3.0 ± 0.6
PMN concentration (10⁶ cells/ml)	0.1 ± 0.1
Vitality (%)	73.6 ± 1.9
Total motility (%)	54.3 ± 1.6
Progressive motility (%)	46.1 ± 1.7
Sperm abnormalities (%)	7.6 ± 1.5
TZI	1.4 ± 0.04

Values are represented mean ± SEM. Spermatozoa morphology and TZI index was measuring using stricter criteria classification and conventional semen parameters were realized according to the WHO 2010 guidelines. BMI: body mass index.

Table II Conventional parameters before and after sperm selection by density gradient centrifugation and freezing–thawing with H+ and H- protocols

	fresh	H-	H+	p- value
Vitality (%)	73.6 ± 1.9	39.0 ± 2.9*	45.5 ± 3.2*	0.0007
Total motility (%)	54.3 ± 1.6	36.5 ± 3.5*	44.4 ± 3.6*	0.0047
Progressive motility (%),	46.1 ± 1.7	17.3 ± 2.1*	24.2 ± 2.3*	0.0030

Values (n=33) are represented mean ± SEM for percentage (%). "H -": sperm cells were treated by density gradient centrifugation (DGC), washed and frozen without hypotaurine supplementation. "H +": sperm cells were treated by DGC, washed and frozen semen in presence of 50mM hypotaurine. * indicates significant difference with p < 0.05 in comparison with fresh values. p-value indicates the significant difference between H- and H+ conditions.

Table III Effects Hypotaurine supplementation on acrosome integrity and cryo / capacitation of post-thaw spermatozoa

	H-	H+	p- value
AR (% , n=25)	65.1 ± 3.2	64.4 ± 3.1	0.5951
cryocapacitation (n=15)			
P110 (a.u.)	1.3 ± 0.4	1.1 ± 0.3	0.0039
P80 (a.u.)	1.3 ± 0.5	1.1 ± 0.4	0.0026
capacitation (n=15)			
P110 (a.u.)	3.5 ± 1.0	4.4 ± 1.0	0.2296
P80 (a.u.)	3.6 ± 0.9	4.5 ± 1.0	0.0761

Values are represented mean ± SEM for percentage (%) and P110 and P80 values (arbitrary units: a.u.). "H -": sperm cells were treated by density gradient centrifugation (DGC), washed and frozen without hypotaurine supplementation. "H +": sperm cells were treated by DGC, washed and frozen semen in presence of 50mM hypotaurine.

Table IV Effects Hypotaurine supplementation on nuclear parameters of post-thaw spermatozoa

	H-	H+	p- value
Chromatin packaging (decondensation)			
CMA3 + spermatozoa (% , n=28)	13.7 ± 1.3	11.5 ± 1.4	0.0276
anilin blue + spermatozoa (% , n=18)	39.2 ± 5.2	31.4 ± 5.7	0.0109
DNA fragmentation			
TUNEL + spermatozoa (% , n=19)	23.0 ± 2.7	18.7 ± 2.0	0.0126
DNA Oxidation			
8-OHdG spermatozoa percentage (% , n=13)	87.7 ± 2.3	87.7 ± 2.6	0.9753
8-OHdG MFI (a.u. , n=13)	5900.5 ± 802.9	5615.1 ± 838.3	0.3542
Head vacuoles spermatozoa % (n=19)	31.7 ± 4.4	25.1 ± 3.9	0.0204

Values are represented mean ± SEM for percentage (%) or mean intensity of fluorescence (MFI) using arbitrary units (a.u.). "H -": sperm cells were treated by density gradient centrifugation (DGC), washed and frozen without hypotaurine supplementation. "H +": sperm cells were treated by DGC, washed and frozen semen in presence of 50mM hypotaurine. After thawing were measured: (i) Chromatin packaging : percentage of spermatozoa with a decondensed chromatin assessed by chromomycine A3 CMA3 (+ spermatozoa) and aniline blue (anilin blue + spermatozoa); (ii) DNA fragmentation estimated by TUNEL assay (TUNEL + spermatozoa); (iii) DNA oxidation assessed by immunodetection of 8-OHdG residues and represented by 8-OHdG-positive spermatozoa percentage (8-OHdG spermatozoa percentage) and the mean intensity of fluorescence (8-OHdG MFI) and (iv) nuclear vacuolization estimated by MSOME (Head vacuoles spermatozoa %).

IV. Impact de la qualité nucléaire des spermatozoïdes humains sur le développement embryonnaire : Etude PRIMOSPERMO

Il est démontré que les spermatozoïdes porteurs d'anomalies nucléaires présentent une diminution de leur qualité fonctionnelle et de leur pouvoir fécondant (Morado *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2015). Toutefois, un spermatozoïde mobile et fécondant n'est pas à l'abri d'une atteinte de son intégrité nucléaire pouvant alors induire un défaut lors du développement embryonnaire précoce (Lewis and Aitken, 2005a). De nombreux auteurs ont montré la nécessité d'une oxydation modérée pour la bonne fonctionnalité des spermatozoïdes lors d'une fécondation (Pons-Rejaji *et al.*, 2009; Du Plessis *et al.*, 2015). Toutefois, une oxydation exacerbée qualifiée de « stress oxydant » peut induire un nombre important de bases oxydées que l'ovocyte devra remplacer, une décondensation anormale de la chromatine, voire une activation des mécanismes d'apoptose qui peuvent conduire *in fine* à une fragmentation de l'ADN spermatique que ce soit en pré ou post-fécondation. Cette situation de noyau paternel oxydé est très commune puisque on estime qu'environ 30 à 60% des patients infertiles présenteraient une oxydation délétère de l'ADN spermatique (Aitken *et al.*, 2014). Un point important est à considérer lequel est : si le stress oxydant a clairement été associé à la fragmentation de l'ADN spermatique (Tremellen, 2008; Brugnon *et al.*, 2013; Aitken *et al.*, 2014 ; Fraga *et al.*, 1991; Kodama *et al.*, 1997) il apparaît que ces deux situations peuvent être dissociées et qu'un grand nombre de patients ne montreront pas de fragmentation du noyau spermatique tout en ayant un niveau d'oxydation du noyau spermatique modéré à élevé. En modèle animal, nous avons clairement démontré que l'oxydation seule et modérée du noyau spermatique (non accompagnée de fragmentation) provoquait des échecs reproductifs illustrés par une augmentation des avortements, des développements embryonnaires anormaux et de la mortalité périnatale (Chabory *et al.*, 2009).

En accord avec ces observations, il a été démontré que le taux d'oxydation spermatique était corrélé positivement au degré de fragmentation cellulaire de l'embryon et négativement au taux d'obtention de blastocystes (Meseguer *et al.*, 2008). D'autres auteurs ont affirmé que l'oxydation des spermatozoïdes pouvait également compromettre le développement embryonnaire préimplantatoire et être à l'origine d'une augmentation du risque de fausses

couches (Morado et al. 2013; J. H. Park et al. 2015). L'oxydation de l'ADN spermatique a aussi été identifiée comme pouvant être à l'origine de transmission d'altérations géniques impliquant des risques pour la descendance (Aitken *et al.*, 2014; Drevet, 2016).

Par ailleurs, il a été démontré que la fragmentation de l'ADN spermatique impactait négativement le développement embryonnaire (Sakkas *et al.*, 1998; Morris *et al.*, 2002; Wdowiak *et al.*, 2015) ainsi que le taux d'obtention et la qualité des blastocystes (Nasr-Esfahani *et al.*, 2005; Muriel *et al.*, 2006). Cependant, l'évaluation du niveau de fragmentation du noyau spermatique n'est réalisée en pratique qu'après plusieurs échecs de fécondation, lors de l'absence d'obtention d'embryons ou encore après la répétition de fausses couches.

Enfin, chez les patients pris en charge en ICSI, présentant un défaut de compaction de l'ADN (au-delà de 30% de spermatozoïdes marqués par CMA3), il a été observé de faibles taux de fécondation (Sakkas *et al.*, 1996, 1998) ainsi qu'un défaut du développement embryonnaire (Hammadeh *et al.*, 1996; Sadeghi *et al.*, 2009).

Concernant l'impact potentiel de la qualité nucléaire spermatique sur la cinétique du développement embryonnaire, nous disposons de peu de données actuellement. Il a été démontré que la contribution de l'ADN paternel au développement embryonnaire était effective à partir du 3^{ième} jour post-fécondation et qu'une altération de l'intégrité du génome paternel pouvait entraîner un développement anormal du blastocyste et/ou de l'embryon, voire une fausse couche précoce (Janny and Menezo, 1994; Tesarik, 2005). En effet, de nombreuses études ont démontré une corrélation négative entre le pourcentage de spermatozoïdes présentant une altération de l'ADN et les taux de grossesses après AMP (Evenson *et al.*, 1999; Benchaib *et al.*, 2003; Tarozzi *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 2013).

De plus, Esbert M *et al.* 2018, ont montré que la cinétique embryonnaire était influencée par la fragmentation de l'ADN spermatique (évaluée par la technique TUNEL), mais sans modifier la qualité finale embryonnaire en cas de fécondation *in vitro* avec don d'ovocyte. Ainsi au-delà de 20% de fragmentation de l'ADN spermatique, une cinétique de division plus lente était observée, sans impact sur la blastulation et les issues de tentatives (Esbert *et al.*, 2018). Si ces quelques études démontrent l'impact délétère des altérations du génome paternel sur les issues de grossesses, très peu d'auteurs rapportent l'impact des altérations du noyau

spermatique dans les étapes précoces de la cinétique embryonnaire. Par ailleurs, aucune étude n'a évalué l'impact de l'oxydation du noyau spermatique sur la cinétique du développement embryonnaire pour la simple raison que personne ne mesure en routine le niveau d'oxydation nucléaire spermatique.

Jusqu'à récemment, en AMP, la qualité embryonnaire était évaluée de façon ponctuelle au cours du développement embryonnaire à des temps définis. Ceci afin de limiter l'exposition de l'embryon à des conditions délétères à sa survie. En effet, l'embryon a besoin d'un environnement le plus proche possible de l'état physiologique *in situ*. Ces observations sont ainsi limitées à des étapes dites clés de la cinétique embryonnaire telles que l'obtention d'un zygote, d'un embryon clivé et d'un blastocyste.

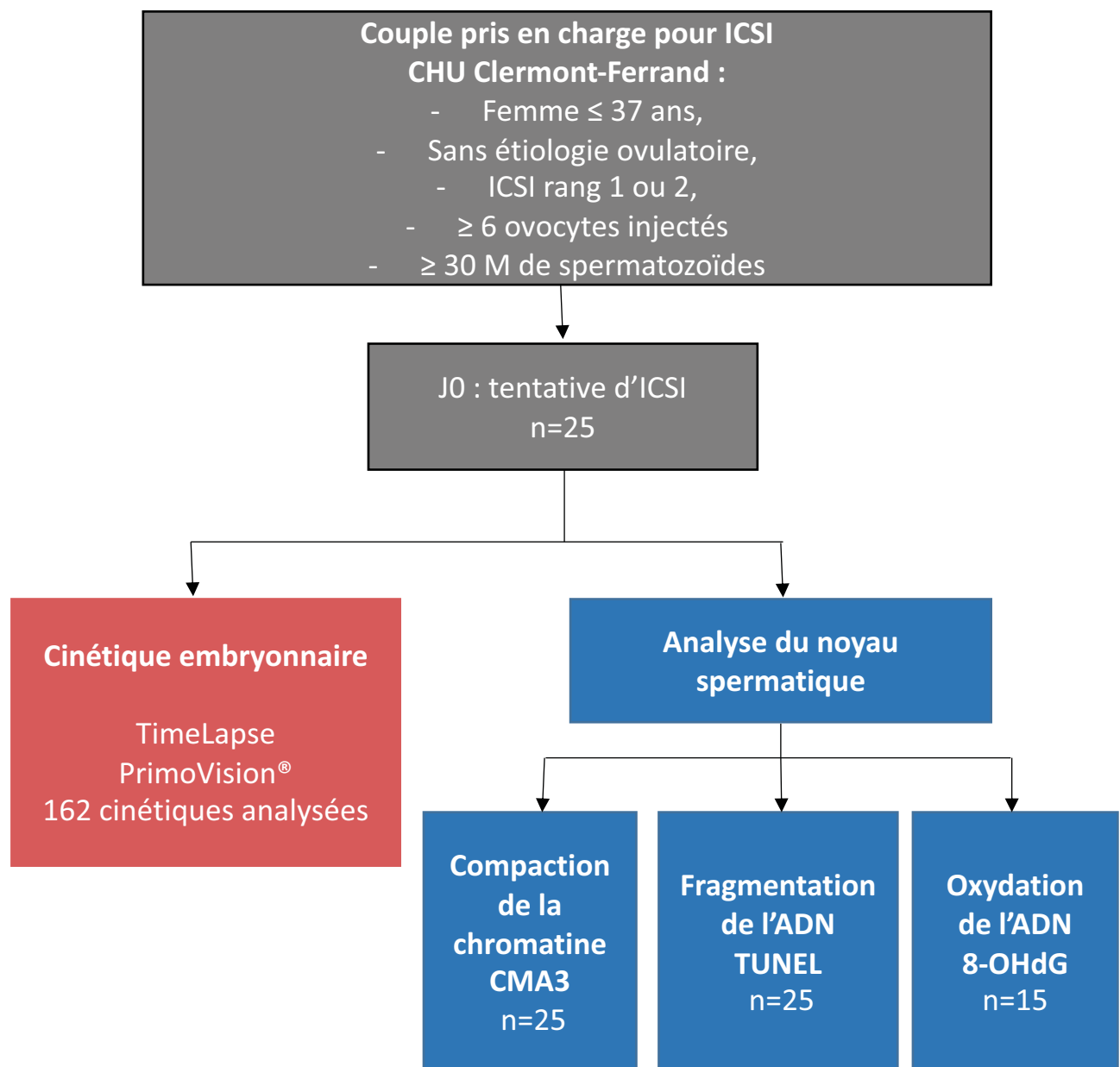
Aujourd'hui, il est possible d'observer en continu la cinétique du développement embryonnaire de façon non invasive grâce à une prise continue d'images de l'embryon en culture par une technologie innovante appelée « Time Lapse » (pour revues : Kaser and Racowsky, 2014; Armstrong *et al.*, 2015). L'intérêt de ce système est double : d'une part, il permet d'observer la cinétique embryonnaire sans les sortir de leur environnement de culture optimal ; d'autre part il devient possible de suivre en continu les cinétiques de développement de manière plus précise et objective (Sundvall *et al.*, 2013). Cela permet au final d'améliorer la précision de l'évaluation de la qualité embryonnaire, et donc d'optimiser les chances de succès de l'AMP. Différents travaux ont démontré le bénéfice de ces dispositifs « Time-Lapse » sur les chances de grossesse du fait de meilleures conditions de sélection de l'embryon à transférer (Meseguer *et al.*, 2012; Conaghan *et al.*, 2013; Motato *et al.*, 2016). En lien avec cette technologie, des algorithmes ont été développés pour le choix de l'embryon à transférer, fondés sur des marqueurs clés de la cinétique de développement de l'embryon. Toutefois, ces algorithmes sont spécifiques de l'outil « Time Lapse » utilisé, des milieux de culture et des protocoles techniques propres à chaque laboratoire. De ce fait, les résultats des algorithmes publiés ne sont pas facilement transposables d'un laboratoire à un autre (Kaser and Racowsky, 2014; Armstrong *et al.*, 2015).

L'objectif de notre étude a été d'analyser les effets de la qualité nucléaire spermatique sur la cinétique de développement embryonnaire et l'obtention de blastocyste de bonne qualité

FIGURE 49

Schéma expérimental

Impact de la qualité nucléaire des spermatozoïdes humain sur
le développement embryonnaire
Etude PRIMOSPERMO



(top blastocyste). Nous avons également souhaité mettre au point une cinétique optimale pour l'obtention d'un blastocyste de bonne qualité dans nos conditions de culture.

Schéma expérimental (Figure 49) : Impact de la qualité nucléaire des spermatozoïdes humain sur le développement embryonnaire, Etude PRIMOSPERMO

Tableau 7

Données cliniques	n= 25
Âge H (Années)	34,24 ± 6,80
IMC H	26,48 ± 5,30
Nombre de fumeurs H	8
Âge F (Années)	31,51 ± 6,30
IMC F	24,40 ± 4,88
Nombre de fumeurs F	8
Nombre moyen de CCO recueillis / tentative	12,92 ± 2,58
Nombre moyen d'ovocytes injectés / tentative	10,00 ± 2,00
Nombre d'ovocytes injectés	194
Nombre de cinétiques analysées	162
Nombre de zygotes	135
Nombre moyen de zygotes / tentative	6,72 ± 1,34
Nombre de « Top blastocystes »	49
Nombre moyen de « Top blastocyste » / tentative	2,12 ± 0,42
Nombre d'embryons transférés	25

PRIMOSPERMO : Descriptif clinique de la population étudiée

H : Homme ; F : Femme ; IMC : Indice de masse corporel ; CCO : Complexes cumulo-ovocytaires ; Les valeurs sont ici présentées sous formes de moyennes ± écarts types à la moyenne.

Tableau 8

Paramètres mesurés	Population Totale PRIMOSPERMO n= 25	Groupe Fragmentation - n=8	Groupe Fragmentation + n= 17	Groupe Oxydation - n=6	Groupe Oxydation + n=9
Volume (ml)	3,24 ± 0.65	2,84 ± 1,01	3,44 ± 0,83*	2,73 ± 1,12	3,33 ± 1,11*
Concentration (M/ml)	44,35 ± 8.87	28,00 ± 9,93	52,05 ± 12,63	53,67 ± 21,99	72,96 ± 24,32
Numération (M/éjaculat)	120,86 ± 24,17	80,50 ± 28,55	139,86 ± 33,95*	134,32 ± 55,05	198,74 ± 66,25*
Mobilité progressive (%)	36 ± 7	45 ± 16	33 ± 8*	42 ± 17	40 ± 13
Forme Typique (%)	1 ± 0,30	2 ± 1	1 ± 0,30	2 ± 1	1 ± 0,41*
Concentration cellules rondes (M/ml)	3,65 ± 0,73	3,08 ± 1,09	3,86 ± 0,94	5,42 ± 2,22	4,11 ± 1,37*

PRIMOSPERMO :

Descriptif des caractéristiques spermatisques en fonction des anomalies nucléaires

« Oxydation + » correspond aux patients dont le pourcentage de spermatozoïde oxydé est supérieur à 65,8% associé à une MIF supérieure à 552 ua (Vorilhon *et al.* 2018) par rapport au groupe « Oxydation - »

« Fragmentation + » correspond aux patients dont le pourcentage de spermatozoïde fragmenté est supérieur à 16,8% ont été notés dans mon travail par rapport au groupe « Fragmentation - » (R. Sharma *et al.* 2016a).

Non représenté ici le seul patient présentant un taux de spermatozoïdes avec une chromatine décondensé supérieur à 30% pouvant composer le groupe « Décondensation + » (Sakkas *et al.*, 1996, 1998).

Les valeurs sont ici présentées sous formes de moyennes ± écarts types à la moyenne. * correspond à une différence significative avec $p < 0,05$ en comparaison du groupe « - » respectif de chaque anomalie nucléaire.

RESULTATS

Schéma expérimental et descriptif de la population

Le schéma expérimental est présenté Figure 49 et les caractéristiques de la population sont présentées dans le tableau 7. L'âge moyen des patientes était de $31,51 \pm 6,30$ ans avec un IMC de $24,40 \pm 4,88$. L'âge des hommes inclus était de $34,24 \pm 6,80$ ans, avec un IMC de $26,48 \pm 5,30$. Huit femmes et 8 hommes ont déclaré une consommation de tabac. Au total, 25 tentatives ont été incluses dans l'étude avec 194 ovocytes micro-injectés et 162 cinétiques analysées. Le taux de fécondation était de 70%. Quarante-neuf « Top Blastocystes » ou « TB » ont été obtenus et 25 embryons ont été transférés à J2 ou J5 post fécondation.

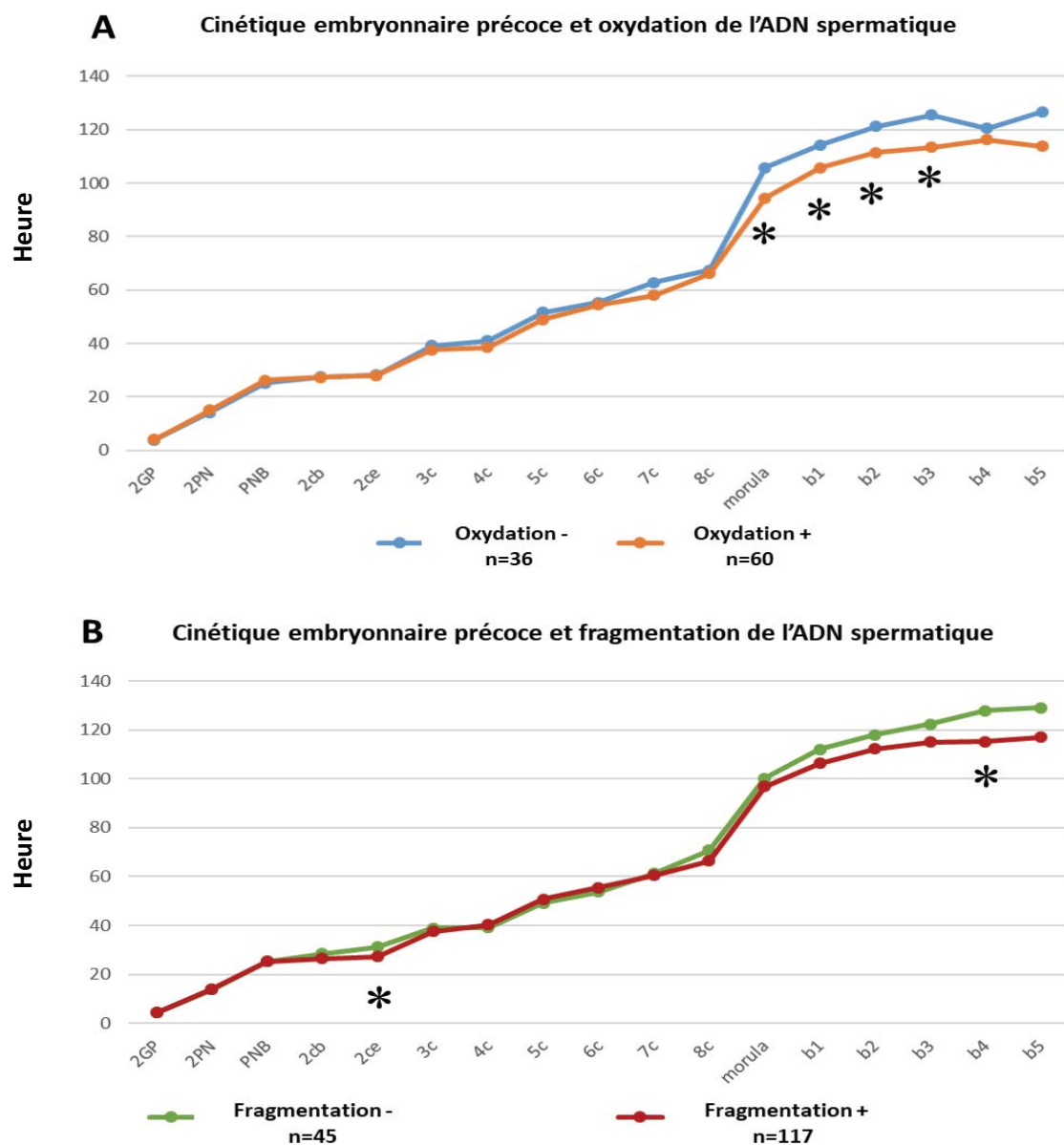
Anomalies nucléaires et caractéristiques spermatiques

Le tableau 8 présente les caractéristiques spermatiques standards des patients en lien avec les anomalies nucléaires. Parmi les 25 patients, 17 patients présentaient un pourcentage de spermatozoïdes avec une fragmentation de l'ADN supérieur ou égal à 16,8% (Sharma *et al.*, 2016) et sont identifiés en tant que groupe « Fragmentation + ». Neuf patients parmi les 25 patients présentaient un pourcentage de spermatozoïde oxydé supérieur ou égal à 65,8% associé à une MIF supérieure à 552 au. (Vorilhon *et al.*, 2018) et sont identifiés en tant que groupe « Oxydation + ». Seul un patient présentait un taux de spermatozoïdes avec une chromatine décondensé supérieur à 30% pouvant composer le groupe « Décondensation + » (Sakkas *et al.*, 1996, 1998). Du fait du nombre faible représentant ce dernier groupe, il n'a pas été reporté dans le tableau 8.

Le volume d'éjaculat ($p = 0,009$, tableau 8) et le nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat ($p = 0,04$, tableau 8) dans le groupe « Fragmentation + » étaient significativement plus élevés par rapport au groupe « Fragmentation - ». La mobilité progressive dans le groupe « Fragmentation + » étaient significativement plus faible ($p < 0,001$) en comparaison avec le groupe « Fragmentation - ».

De même, le volume d'éjaculat ($p=0,03$, tableau 8) et le nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat ($p<0,001$, tableau 8) dans le groupe de patient « Oxydation + » étaient

FIGURE 50



Cinétiques de développement embryonnaire précoce en fonction de l'oxydation et de la fragmentation de l'ADN spermatique

A.Représentation des cinétiques de développement embryonnaire entre le groupe « Oxydation + » (orange) vs le groupe « Oxydation - » (Bleu)

B.Représentation des cinétiques de développement embryonnaire entre le groupe « Fragmentation + » (rouge) vs le groupe « Fragmentation - » (vert)

*correspond à une différence significative avec $p < 0,05$.

Cinétiques de division : 2GP : 2^{ème} globule polaire ; 2PN : Pronoyaux ; PNB: Disparition des PN ; 2cb : Début de la 1^{ère} division cellulaire ; 2Ce : Fin de la 1^{ère} division cellulaire ; 3C à 8C : Apparition du stade 3 cellules à 8 cellules ; tM : Début de la compaction du stade morula ; B1, B2, B3, B4 et B5 : Stades de blastocyste (Garner et Schoolcraft, 1999).

Intervalles de division : PNB-2Cb : Intervalle PNB et fin de la 1^{ère} division cellulaire ; 2Ce-2Cb : Durée de la 1^{ère} division cellulaire ; Cc2 : Intervalle entre 2C et 3C ; La synchronisation de la division des 2 premiers blastomères S2 : Durée entre le stade 3C et 4C ; 4C-2C : Intervalle entre le stade 2C et 4C ; 8C-5C : Intervalle entre le stade 5C et 8C.

significativement plus élevés par rapport au groupe « Oxydation - ». Le pourcentage de formes typiques ($p=0,02$) et la concentration en cellules rondes ($p=0,001$) dans le groupe de patient « Oxydation + » sont significativement plus bas par rapport au groupe « Oxydation - ».

Parmi les 25 patients, seuls 3 étaient normozoospermiques selon les normes de l'OMS 2010 ("WHO | WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen," 2010). Une oligozoospermie a été retrouvée chez 7 patients et une asthénozoospermie chez 7 autres patients. Les patients avec une tératozoospermie ($n=22$; $67 \pm 15\%$, $p<0,001$) ou une oligozoospermie ($n=7$; $79 \pm 30\%$; $p=0,04$) avaient un pourcentage de spermatozoïdes avec un ADN oxydé significativement plus élevé que les patients avec un pourcentage normal de formes typiques ($64 \pm 37\%$ spermatozoïdes 8-OHdG) et une numération normale ($66 \pm 15\%$).

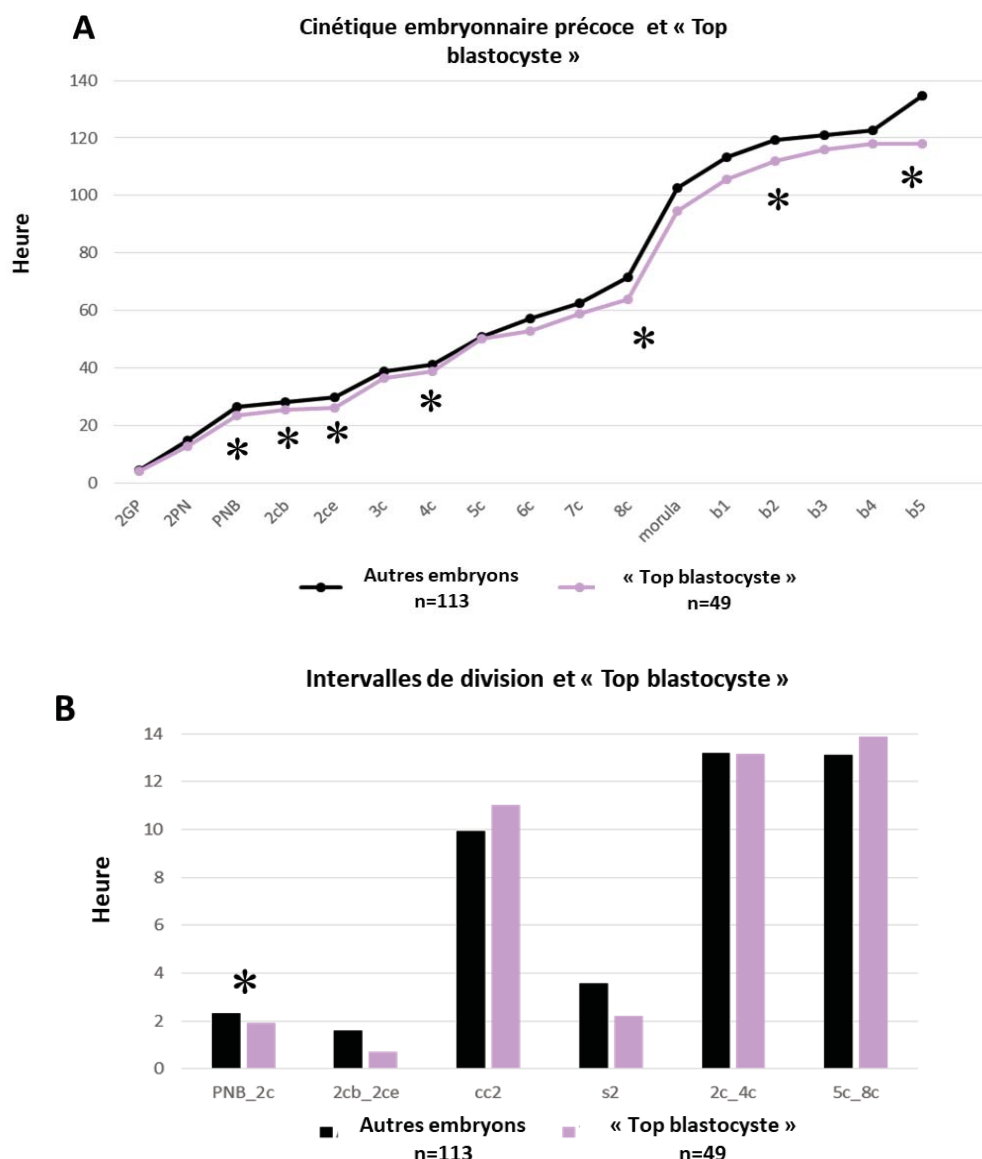
Les différentes altérations nucléaires étaient corrélées entre-elles. La MIF du 8-OHdG était corrélée positivement au pourcentage de spermatozoïdes avec une fragmentation de l'ADN ($r=0,22$; $p=0,03$) et négativement au pourcentage de spermatozoïdes avec une chromatine décondensée ($r=-0,37$; $p<0,001$). En revanche, le pourcentage de spermatozoïdes avec une chromatine décondensée était positivement corrélé avec le pourcentage de spermatozoïdes oxydés ($r=0,20$; $p=0,02$).

Anomalies nucléaires spermatiques et développement embryonnaire (Figure 50)

Les cinétiques embryonnaires moyennes des couples issues du groupe « Oxydation + » ($n=60$ 2GP) et « Fragmentation + » ($n=117$ 2GP) ont été comparés à celles des groupes respectivement « Oxydation - » ($n=36$ 2GP) et « Fragmentation - » ($n=45$ 2GP, Figure 50 A et B). Nous avons observé que des taux élevés d'oxydation et de fragmentation de l'ADN spermatique influençaient significativement la cinétique de développement embryonnaire à des temps clés.

Ainsi, dans le groupe « Oxydation + », la cinétique de division était significativement plus rapide du stade morula (94,44h vs 105,88h ; $p=0,01$, Figure 50 A), à la blastulation B1 (105,76h vs 114,40h ; $p=0,04$, Figure 50 A), B2 (111,46h vs 121,30h ; $p=0,04$, Figure 50 A) et

FIGURE 51



Développement embryonnaire précoce en fonction de la qualité embryonnaire

- A. Représentation des cinétiques de développement embryonnaire précoce entre le groupe «Top Blastocyste» (violet) vs tous les autres embryons (noir)
- B. Représentation des intervalles de division cellulaire du développement embryonnaire entre le groupe «Top Blastocyste» (violet) vs tous les autres embryons (noir)

*correspond à une différence significative avec $p < 0,05$.

Cinétiques de division : 2GP : 2^{ème} globule polaire ; 2PN : Pronoyaux ; PNB: Disparition des PN ; 2cb : Début de la 1^{ère} division cellulaire ; 2Ce : Fin de la 1^{ère} division cellulaire ; 3C à 8C : Apparition du stade 3 cellules à 8 cellules ; tM : Début de la compaction du stade morula ; B1, B2, B3, B4 et B5 : Stades de blastocyste (Garner et Schoolcraft, 1999).

Intervalles de division : PNB-2Cb : Intervalle PNB et fin de la 1^{ère} division cellulaire ; 2Ce-2Cb : Durée de la 1^{ère} division cellulaire ; Cc2 : Intervalle entre 2C et 3C ; La synchronisation de la division des 2 premiers blastomères S2 : Durée entre le stade 3C et 4C ; 4C-2C : Intervalle entre le stade 2C et 4C ; 8C-5C : Intervalle entre le stade 5C et 8C.

au stade B3 (113,47h vs 125,56h ; $p=0,025$, Figure 50 A) comparaient au groupe « Oxydation - ». De même, dans le groupe « Fragmentation + », il a été observé une cinétique plus rapide d'apparition du stade 2 cellules (2Ce 27,30h vs 31,19h ; $p=0,010$, Figure 50 B) et du stade B4 (115,26h vs 127,76h ; $p=0,004$, Figure 50 B). Aucune différence significative entre les différents groupes « Fragmentation + » ou « Oxydation + » vs leurs groupes négatifs respectifs n'a été retrouvée quant à la présence d'anomalies de division (passage de 1-3C ou 2-5C) ou de ploïdie (zygote à 1 ou 3 PN et plus).

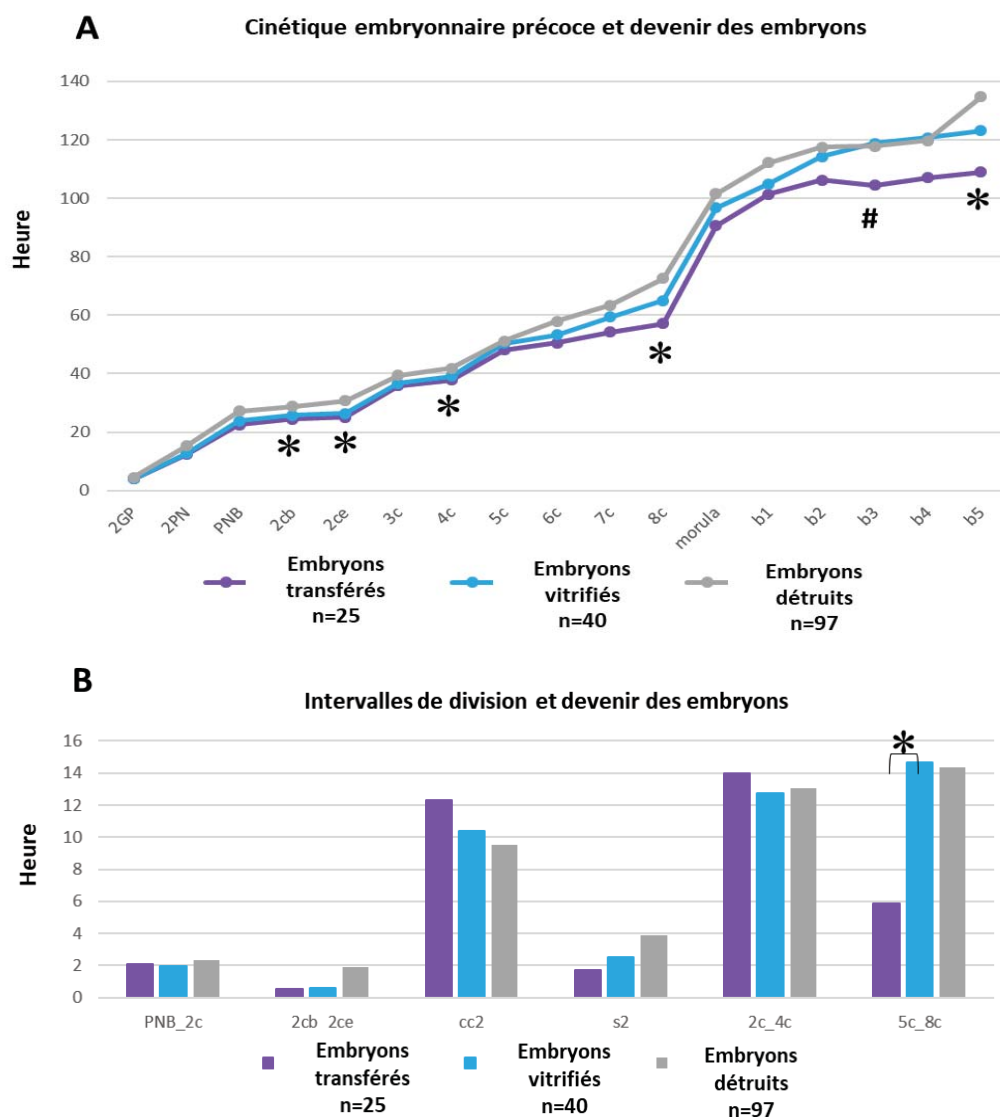
Du fait qu'un seul couple constituait le groupe « Décondensation + » nous n'avons pas réalisé de comparaison des cinétiques. Toutefois, des corrélations négatives entre le pourcentage de spermatozoïdes décondensés et les intervalles de divisions cellulaires PNB-2C ($r=-0,2$ et $p=0,025$) et 5C-8C ($r=-0,17$; $p=0,04$) ont été mesurés.

Blastocystes considérés comme « Top blastocystes » et devenir embryonnaire (Figure 51)

Quarante-neufs blastocystes « TB » ont été obtenus. La cinétique embryonnaire permettant d'aboutir à l'obtention d'un « TB » était significativement plus rapide que pour les autres embryons (Figure 51A et B). Ainsi, en cas d'obtention de « TB », une cinétique de division plus rapide a été observée dès la syngamie (23,42h vs 26,39h ; $p=0,02$, Figure 51A), au stade 2 cellules (2Ccb 25,30h vs 28,06h ; $p=0,002$ et 2Ce 26,00h vs 29,68h ; $p<0,001$ Figure 51A), puis à 4 cellules (38,61h vs 41,06h ; $p=0,04$, Figure 51A) et enfin aux stades B2 (111,93h vs 119,30h ; $p=0,03$, Figure 51A) et B5 (118,05h vs 134,81h ; $p=0,004$, Figure 51A). L'intervalle de division entre le stade 2 cellules et la syngamie est plus rapide pour les futurs « TB » (1,92h vs 2,30h ; $p=0,002$, Figure 51B).

Vingt-cinq embryons ont été transférés, 40 embryons ont été congelés et 97 embryons ont été détruits. La figure 52 représente les cinétiques embryonnaires moyennes des différents devenir embryonnaires: transférés, congelés ou détruits. Nous avons observé une cinétique plus rapide pour les embryons transférés par rapports aux embryons détruits pour les stades : 2 cellules (24,49h vs 28,74h pour 2Cb avec $p=0,002$; 25,02h vs 30,72h pour 2Ce avec $p<0,001$, Figure 52A), 4 cellules (37,74h vs 41,77h ; $p=0,04$, Figure 52A), 8 cellules (57,11h vs 72,53h ; $p=0,045$, Figure 52A) et B5 (109,00h vs 134,81h ; $p=0,03$, Figure 52A). Une différence

FIGURE 52



Cinétiques de développement embryonnaire précoce fonction du devenir embryonnaire : transférés, vitrifiés ou détruits

A. Représentation des cinétiques de développement embryonnaire précoce entre les embryons transférés (violet), vitrifiés (bleu) ou détruits (gris) ; * correspond à $p < 0,05$ par rapport aux embryons transférés vs détruits et # correspond à $p < 0,05$ par rapport aux embryons transférés vs congelés.

B. Représentation des intervalles de division cellulaire du développement embryonnaire précoce entre les embryons transférés (violet), vitrifiés (bleu) ou détruits (gris) ; * correspond à $p < 0,05$ par rapport aux embryons transférés.

Cinétiques de division : 2GP : 2^{ème} globule polaire ; 2PN : Pronoyaux ; PNB: Disparition des PN ; 2cb : Début de la 1^{ère} division cellulaire ; 2Ce : Fin de la 1^{ère} division cellulaire ; 3C à 8C : Apparition du stade 3 cellules à 8 cellules ; tM : Début de la compaction du stade morula ; B1, B2, B3, B4 et B5 : Stades de blastocyste (Garner et Schoolcraft, 1999).
Intervalles de division : PNB-2Cb : Intervalle PNB et fin de la 1^{ère} division cellulaire ; 2Ce-2Cb : Durée de la 1^{ère} division cellulaire ; Cc2 : Intervalle entre 2C et 3C ; La synchronisation de la division des 2 premiers blastomères S2 : Durée entre le stade 3C et 4C ; 4C-2C : Intervalle entre le stade 2C et 4C ; 8C-5C : Intervalle entre le stade 5C et 8C.

significative a été observée entre les embryons transférés (104,04h) et les embryons congelés pour le stade B3 (118,82h ; $p=0,02$, Figure 52A). De plus, l'intervalle de division entre 8C et 5C était significativement plus rapide pour les embryons transférés par rapport aux embryons congelés (5,89h vs 14,69h ; $p=0,04$, Figure 52B). Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les devenir des embryons et les caractéristiques spermatiques ou nucléaires.

Discussion Perspectives

Un des paramètres essentiels du succès reproductif (et par succès reproductif il faut entendre : une fécondation réussie, un développement embryonnaire harmonieux et optimal, l'obtention d'un enfant sain et dont le patrimoine génétique exempt d'altérations lui permettra de vivre en bonne santé le plus longtemps possible et de se reproduire à son tour) est représenté par la qualité des gamètes. Outre la qualité cytologique et métabolique des gamètes masculins et féminins, l'intégrité de leur patrimoine génétique respectif est une des conditions premières du succès reproductif et de la pérennité des espèces.

La spermologie diagnostique telle que pratiquée à ce jour présente des limites pour qualifier la fertilité masculine. En effet, outre les caractéristiques spermatiques standards recommandées par l'OMS (numération, morphologie et mobilité), il apparaît important de mieux qualifier le noyau spermatique humain pour pouvoir : comprendre certaines situations d'infertilité, éventuellement proposer une approche thérapeutique adaptée et conseiller efficacement quant au recours à l'AMP, le but ultime étant la transmission d'un génome paternel le plus intègre possible.

Dans ce contexte, je me suis tout d'abord attachée à optimiser et valider un test diagnostique de l'oxydation de l'ADN spermatique, une altération courante du noyau spermatique chez les patients infertiles comme fertiles (Vorilhon *et al.*, 2018). Etant alors capable de mesurer le niveau d'oxydation nucléaire spermatique d'un échantillon d'éjaculat, je me suis attachée à corrélérer cette caractéristique aux paramètres spermologiques classiques et aux situations cliniques rencontrées dans notre pratique locale (Vorilhon *et al.*, 2018). Ceci a conduit à la mise au point d'un test clinique utilisable en routine, offrant une bonne spécificité, sensibilité et reproductibilité dépassant largement les performances du seul test disponible au moment où j'ai initié ces travaux (aujourd'hui retiré de la commercialisation). En raison de la faible marge de brevetabilité (le test utilisant un anticorps commercial) il n'a pas été décidé de déposer un brevet et la technique a été publiée en 2018 (Vorilhon *et al.*, 2018). Etant donné que le niveau d'oxydation du noyau spermatique n'est pas systématiquement associé au niveau de fragmentation nucléaire, il serait intéressant dans l'optique d'une meilleure caractérisation de l'intégrité du noyau paternel de tester en routine les hommes infertiles à la fois pour la fragmentation et pour l'oxydation. Le protocole développé par nos soins en combinaison avec les techniques de TUNEL, Comet ou SCSA (selon le choix du clinicien) permettrait d'avoir ces deux indicateurs

pour un patient donné. Outre l'information qualitative sur le niveau d'atteintes nucléaires spermatiques, cet indicateur utilisé en routine serait une aide importante pour la conduite d'une approche thérapeutique raisonnée. En effet, il est courant que face à des échecs reproductifs répétés et en présence de paramètres spermatiques « OMS » légèrement altérés, l'équipe clinique suggère la prise de compléments alimentaires vitaminés et antioxydants sans aucune connaissance du niveau d'altérations oxydantes des gamètes du patient et donc de la pertinence d'une telle supplémentation. Sachant qu'un certain niveau d'oxydation est nécessaire pour une condensation optimale du noyau spermatique durant la maturation post-testiculaire des spermatozoïdes, le risque, en l'absence d'une évaluation du niveau d'oxydation nucléaire spermatique, est donc de traiter des patients ne nécessitant pas de correction d'un éventuel stress oxydant. Dans un tel cas de figure, le traitement serait contre-productif puisqu'il conduirait à une décondensation du noyau spermatique et donc à une plus grande susceptibilité du noyau spermatique paternel face à différents agresseurs (stress oxydant inclus). Par ailleurs, dans l'optique où un traitement AO est envisagé après évaluation, la connaissance précise du niveau d'altérations oxydantes des spermatozoïdes du patient permet d'adapter la posologie afin d'éviter là encore les situations de déséquilibre entre « stress oxydant » et « stress réducteur », l'un comme l'autre délétères en terme de succès reproductif.

En parallèle à cet axe majeur de mes travaux de thèse je me suis intéressée à :

- Tenter de corréler le niveau d'oxydation nucléaire spermatique avec les cassures simples brins de l'ADN spermatique révélées par une approche Comet,
- Evaluer l'effet protecteur de l'ajout d'un AO (Hypotaurine) lors des protocoles de sélection et de cryoconservation des spermatozoïdes,
- Evaluer les conséquences des altérations spermatiques nucléaires (fragmentation et oxydation) sur les caractéristiques cinétiques du développement embryonnaire précoce.

I. Diagnostic de l'oxydation de l'ADN spermatique

De nombreuses étiologies peuvent intervenir dans la formation de dommages à l'ADN spermatique. Compte tenu de l'augmentation de l'incidence de l'infertilité, la prise en charge devient une problématique quotidienne. Dans le panel d'examen de biologie

médicale, les principales anomalies identifiées dans la littérature telles que les anomalies de décondensation de la chromatine ou la fragmentation de l'ADN spermatique, sont riches en tests diagnostiques. Leur aide dans le bilan clinique de l'infertilité est cependant limitée car il y a toujours aujourd'hui une absence de consensus quant à leur respective valeur prédictive du succès reproductif. La recherche de nouveaux marqueurs de la qualité nucléaire des spermatozoïdes est ainsi toujours d'actualité.

Comme il est acquis que le stress oxydant est un facteur majeur d'infertilité masculine et que les recherches sur les modèles animaux ont démontré les conséquences de l'oxydation du noyau spermatique en dehors de toute autre altération des paramètres spermatiques et en dehors d'un niveau délétère de fragmentation nucléaire, nous avons entrepris de développer pour la clinique un test optimisé en recherche fondamentale pour la détection de l'oxydation nucléaire spermatique. Mon travail c'est donc inscrit dans une démarche d'application clinique pour répondre au besoin diagnostique de l'ADN spermatique chez l'homme. En partant du modèle murin, j'ai pu valider un test diagnostique de l'oxydation de l'ADN spermatique avec l'établissement d'un seuil en lien avec les caractéristiques spermatiques standards. De par la robustesse, la reproductibilité et la stabilité de l'immunodétection du 8-OHdG, ce test permet une application en routine.

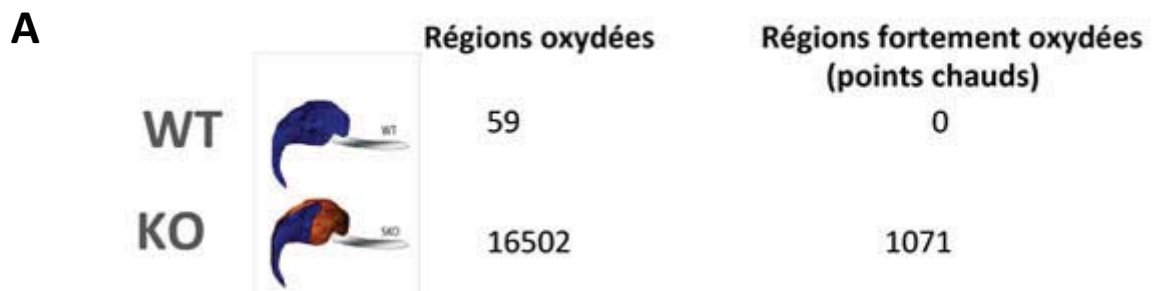
La standardisation de ce test a nécessité de valider un contrôle positif reproductible, qui nous a conduit à essayer plusieurs réactions d'oxydation *in vitro*. Nous avons considéré l'extrême réactivité du radical hydroxyle ($\text{OH}^\bullet$) produit lors de la réduction de H_2O_2 par des ions ferreux (Fe^{2+}) – via la réaction de Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{FeSO}_4 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$) (De Iuliis *et al.*, 2009; Aitken, 2010) et avons testé en parallèle différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), identifié comme le métabolite le plus cytotoxique pour l'ADN. Des résultats antérieurs avaient montré que des concentrations très variées d' H_2O_2 pouvaient être utilisées pour induire une oxydation du noyau spermatique humain allant de 25 μM (Cambi *et al.*, 2013), 5 mM (Santiso *et al.*, 2010), 4 M et jusqu'à 8M (Muratori *et al.*, 2015). Dans nos conditions expérimentales, la concentration de 8M d' H_2O_2 a été choisie en raison de sa stabilité, de sa reproductibilité quel que soit l'échantillon traité et de son fort pouvoir oxydant. La comparaison de méthodes conduite dans notre publication (voir Vorilhon *et al.*, 2018) a mis en évidence une très bonne concordance entre les détections de résidus 8-

OHdG par immunocytochimie (fluorescente ou non), visualisation microscopique et les détections plus automatisées utilisant l'immunofluorescence associée à la CMF. La détermination du niveau de 8-OHdG dans les noyaux spermatiques *via* la CMF présentant un réel avantage ici car autorisant le décompte d'un nombre important de cellules (50 000) gage d'une meilleure précision face à la subjectivité d'un opérateur observant une lame de microscope et décomptant péniblement 150 à 200 spermatozoïdes.

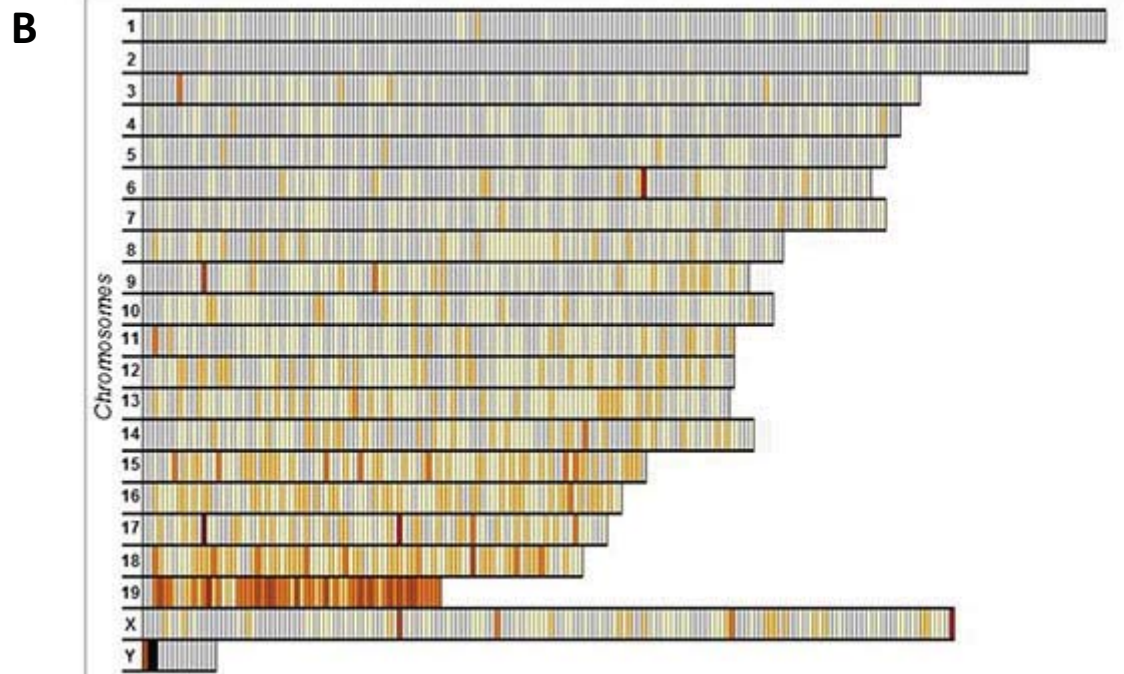
Afin de comparer notre protocole de détection du 8-OHdG (protocole III) avec le seul kit commercial disponible à l'époque (protocole IV) nous avons réalisé une expérience de compétition. Il s'est avéré que l'utilisation de l'anticorps anti-8-OHdG couplé à l'Alexa 488 (Protocole III) montrait une spécificité et une sensibilité bien plus discriminante. La qualité du kit commercial avait déjà été mise en doute précédemment par l'équipe de Cambi (Cambi *et al.*, 2013). En parallèle, nous avons également travaillé à rendre pratique ce protocole de détection notamment en optimisant la stabilité des échantillons que nous pouvons conserver 15 jours sans enregistrer de différences dans le niveau d'oxydation entre les mesures faites sur sperme frais ou sperme conservé pendant 2 semaines. Dans le cas d'une application clinique et/ou d'analyse multicentrique, la stabilité du marquage spermatique constitue un atout pratique déterminant. Ces caractéristiques ont permis de valider le protocole III pour la détection de l'oxydation de l'ADN spermatique chez l'homme. Néanmoins, ce protocole nécessite un nombre important de spermatozoïdes (environ 30 Millions) ce qui constitue un sérieux facteur limitant. De fait, le test n'est réalisable que pour des spermes avec une numération normale ou subnormale mais n'est pas approprié pour les situations d'oligozoospermies modérées à sévères. L'amélioration du protocole apparaît donc être nécessaire pour permettre l'analyse du statut oxydant des patients oligozoospermiques pris en charge en AMP. L'ajustement des temps d'incubations et des concentrations d'anticorps en fonction du nombre de spermatozoïdes analysés est encore à travailler. Par ailleurs, le seuil mis en évidence se rapporte aux caractéristiques spermatiques et à la concentration en PNN, il est maintenant important d'évaluer un nouveau seuil d'oxydation de l'ADN spermatique en lien avec le développement embryonnaire et les taux de grossesses.

En perspective à ce travail et sur un plan plus fondamental, il serait intéressant de connaître quelles sont les régions du noyau spermatique humain susceptibles aux dommages

FIGURE 53



Résultats de séquençage à haut débit des régions oxydées du noyau spermatique (Souris sauvages (WT) versus souris *gpx5*^{-/-} (KO)) après immuno-précipitation avec un Ac anti-8OHdG.



Distribution sur les chromosomes de souris des points chauds d'oxydation du noyau spermatique chez les animaux KO

A. Résultats de séquençage à haut débit des régions oxydées du noyau spermatique (Souris sauvages (WT) versus souris *gpx5*^{-/-} (KO)) après immuno-précipitation avec un Ac anti-8OHdG.

Environ un millier de ces régions d'ADN dans le noyau des spermatozoïdes KO présentent un niveau élevé d'oxydation (points chauds d'oxydation). Le noyau des spermatozoïdes WT ne présente qu'un faible nombre de sites oxydés et aucun de ces sites ne constitue un point chaud d'oxydation. Souris KO = souris déficientes en glutathion peroxidase 5 (Chabory *et al.*, J. Clin. Invest., 2009)

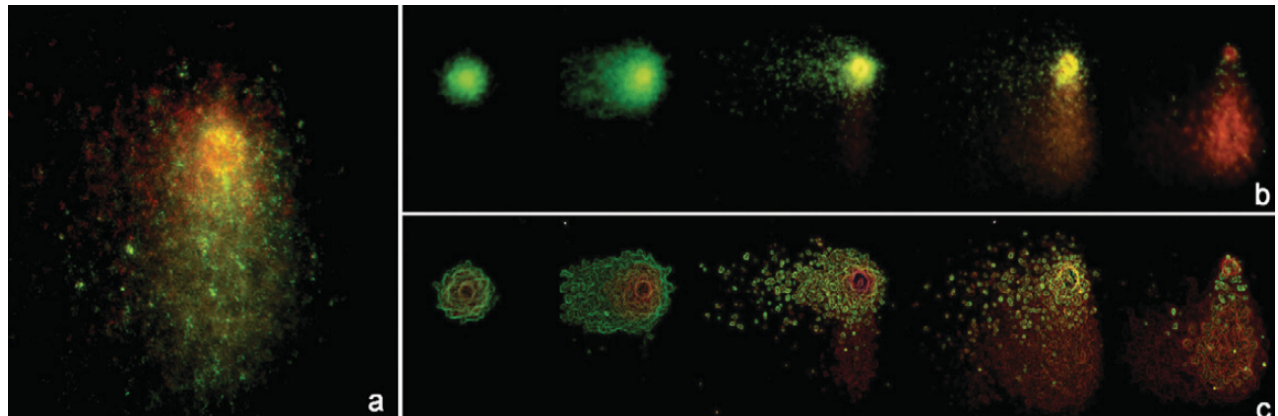
B. Distribution sur les chromosomes de souris (autosomes 1 à 19 et chromosomes sexuels X et Y, classés par taille décroissante) des points chauds d'oxydation du noyau spermatique chez les animaux KO. Le code couleur utilisé (du jaune clair vers le noir) indique l'intensité d'oxydation de chaque région chromosomique. Une barre verticale représente 1 million de paires de bases (Kocer *et al.* 2015)

oxydants. Notre équipe de recherche a démontré chez la souris que des régions discrètes du noyau spermatique murin étaient concernées par les dommages oxydants et que celles-ci correspondent à la chromatine spermatique toujours en assemblage nucléosomal (Nobla *et al.*, 2013). Nous avons aussi démontré chez la souris que certains chromosomes, essentiellement en raison de leur position dans le noyau spermatique, étaient plus susceptibles d'être oxydés. C'est ainsi que chez la souris les petits chromosomes 17 à 19 ainsi que le chromosome Y sont plus susceptibles aux dommages oxydants (Figure 53) que les autres autosomes et le chromosome sexuel X plus grands et en localisation plus interne dans le noyau spermatique murin (Kocer *et al.*, 2015; Champroux *et al.*, 2018). La moindre condensation du noyau spermatique humain comparé au noyau spermatique murin laisse présager que les atteintes oxydantes du noyau spermatique vont probablement concerner plus largement les chromosomes. Ceci est d'ailleurs confirmé par les images de détection du 8-OHdG sur spermatozoïdes humains où l'on voit distinctement que tout le noyau spermatique est marqué et non quelques régions discrètes comme c'est le cas chez la souris (Vorilhon *et al.*, 2018). A l'image de ce que nous avons réalisé chez la souris, *via* une approche d'immunoprécipitation de chromatine spermatique en utilisant l'anticorps anti-8-OHdG couplée à du séquençage nouvelle génération, il serait intéressant d'identifier les régions chromosomiques du noyau spermatique humain qui sont susceptibles aux dommages oxydants. En outre, cette détermination permettrait de voir si ces régions de susceptibilité pourraient expliquer les échecs reproductifs et/ou certaines conséquences dans la descendance notamment en lien avec l'âge paternel et maternel.

II. Les dommages à l'ADN

Nous avons retrouvé des corrélations entre les concentrations en cellules rondes, en polynucléaires neutrophiles et les cassures simple brins de l'ADN spermatique. En effet, comme je l'ai développé dans l'introduction, les étiologies fréquentes des dommages à l'ADN spermatique sont les états inflammatoires aigus ou chroniques voire les infections locales ou systémiques. De plus, dans l'étude « PRIMOSPERMO », nous avons mesuré des corrélations entre asthénozoospermie et fragmentation de l'ADN spermatique ; entre

FIGURE 54



2T Comet assay

Caractérisation de la fragmentation de l'ADN simple brin (ADNss) et double brin (ADNdb) par hybridation in situ par fluorescence (FISH) et coloration à l'acridine orange.

- a. Détection de l'ADNss par FISH avec une sonde du génome humain entière marquée à la digoxigénine et isothiocyanate de fluorescéine détecté (vert) sur des co-échantillons à deux queues (2T) obtenus à partir de spermatozoïdes humains, contre-colorés avec l'iodure de propidium (rouge).
- b. Types 2T-Comet trouvés dans un échantillon de sperme normal soumis pour la première fois à une électrophorèse dans des conditions neutres à gauche; Axe X) puis électrophorèse à 90° en conditions alcalines (du haut vers le bas; axe Y), coloré avec $0,5 \times 10^{-4}$ mol / l acridine orange
- c. Mêmes images après application d'un filtre électronique commun
(Enciso M *et al.* 2009)

oligozoospermie, tératozoospermie et oxydation de l'ADN spermatique concordant avec la littérature (Aitken *et al.*, 2014; Santi *et al.*, 2018).

Mon travail a mis en évidence une corrélation négative entre les cassures de l'ADN simple brin, témoin de la fragmentation de l'ADN spermatique et la moyenne d'intensité de fluorescence (MIF) de l'immunodétection du 8-OHdG, marqueur de l'oxydation de l'ADN spermatique lorsqu'une anomalie spermatique est diagnostiquée. On retrouve cette même corrélation négative significative dans le travail sur l'impact de l'hypotaurine sur les dommages à l'ADN spermatique mesurée par la technique TUNEL. Cette corrélation négative pourrait être expliquée par le fait que l'oxydation de l'ADN spermatique avec la présence de 8-OHdG précède la fragmentation du fait des systèmes de réparation ou d'apoptose non encore actifs ou partiellement actifs dans le spermatozoïde mature (Lewis *et al.*, 2013). On observerait ainsi de la fragmentation seulement une fois la création des sites abasiques, c'est à dire lorsque des systèmes de réparation sont à l'œuvre (en l'occurrence post-fécondation dans l'environnement du cytoplasme ovocytaire).

L'équipe d'Enciso en 2009 a validé le test 2T-Comet assay ou two-tailed Comet permettant de réaliser sur un même prélèvement une détection des cassures de l'ADN spermatique et de les distinguer (Enciso *et al.*, 2009 ; Figure 54). Cette équipe utilisait du peroxyde d'hydrogène en concentration croissante et a mis en évidence une augmentation significative des cassures simples brins de l'ADN spermatique chez les patients normozoospermiques sans impact sur les cassures doubles brins. Sa conclusion était que l'oxydation de l'ADN spermatique (induite par le peroxyde d'hydrogène) provoquait seulement des cassures simples brins de l'ADN spermatique. Dans la même étude, cette équipe présentait un taux de spermatozoïdes fragmentés avec des cassures doubles brins significativement plus important dans une population d'hommes infertiles avec des altérations des caractéristiques spermatiques en comparaison avec celle de patients fertiles, mais aucune différence n'a été mesurée concernant les cassures simples brins. Ce dernier point est concordant avec nos résultats concernant la population totale de notre étude « COMET assay et immunodétection du 8-OHdG ». En effet les patients avec une infertilité primaire ne présentaient pas de taux de spermatozoïdes avec des cassures simples brins

significativement différent des patients avec une infertilité secondaire. A l'heure actuelle, aucun auteur n'a analysé avec des tests robustes la relation entre oxydation de l'ADN spermatique (en associant simultanément le pourcentage et la MIF des spermatozoïdes oxydés comme nous le recommandons), la fragmentation de l'ADN spermatique en distinguant les cassures simples des cassures doubles brins. Un tel travail serait intéressant à conduire dans l'avenir.

Un marqueur complémentaire de la qualité nucléaire spermatique serait la mesure de la longueur des télomères. En effet, le lien entre la taille des télomères et les paramètres spermatiques conventionnels est controversé. Certaines études rapportent une diminution de la taille des télomères des spermatozoïdes positivement corrélée à une diminution du nombre des spermatozoïdes (Yang *et al.*, 2015; Cariati *et al.*, 2016), de la mobilité progressive et de la vitalité (Rocca *et al.*, 2016). A l'inverse, d'autres études ne mesurent aucune relation (Thilagavathi *et al.*, 2013b; Turner and Hartshorne, 2013). Des études démontrent également une diminution de la taille des télomères chez les hommes infertiles en comparaison d'un groupe contrôle d'hommes fertiles (Thilagavathi *et al.*, 2013b; Mishra *et al.*, 2016).

Les télomères assurent la stabilité des chromosomes et le maintien de l'intégrité du génome en empêchant la dégradation ou le raccourcissement des chromosomes (Hallows *et al.*, 2012). Ils permettent l'alignement et l'appariement des chromosomes au cours de la méiose, le crossing-over et les recombinaisons homologues et ont donc un rôle crucial pour la formation des gamètes (Kalmbach *et al.*, 2013). Les télomères des spermatozoïdes sont les premiers sites du génome à répondre aux signaux ovocytaires pour la formation du pronucléus et les mouvements des microtubules. La taille des télomères gamétiques va donc impacter la fécondation, la formation du pronucléus, le développement embryonnaire précoce (de Frutos *et al.*, 2016), l'implantation (Yang *et al.*, 2015) et le taux de fausses-couches précoces (Thilagavathi *et al.*, 2013a; Cariati *et al.*, 2016).

Etant transmis à la descendance, il est important de conserver au mieux la longueur des télomères. Cependant, les télomères, supposés très sensibles à l'oxydation en raison de leur richesse en résidus guanine, ont été montrés dans certaines études comme étant raccourcis par les dommages oxydants, en relation avec la fragmentation de l'ADN. Lorsqu'ils ont

atteint une taille trop critique, cela entraînerait une senescence puis une apoptose de la cellule. Certaines études rapportent une diminution de la taille des télomères avec une augmentation de la fragmentation de l'ADN et une décondensation de la chromatine (Rodríguez *et al.*, 2005; Moskovtsev *et al.*, 2010; Rocca *et al.*, 2016), les ERO (Cariati *et al.*, 2016). En revanche, d'autres études ne montrent pas de corrélation entre le taux de fragmentation de l'ADN ou les ERO et la taille des télomères des spermatozoïdes (Thilagavathi *et al.*, 2013b; Turner and Hartshorne, 2013). La mesure de la longueur des télomères des spermatozoïdes viendrait étoffer notre réflexion sur l'impact de la qualité nucléaire spermatique sur la fertilité masculine. Elle permettrait notamment dans l'étude « PRIMOSPERMO », de compléter notre analyse sur l'impact des altérations nucléaires sur la cinétique du développement embryonnaire. En effet, pour cette étude, nous avons collectionné les échantillons spermatiques afin de mesurer de la taille des télomères en qPCR et en qFISH.

III. Quelle prise en charge en cas de dommages à l'ADN spermatique

L'infertilité masculine touche un couple sur six dans le monde (Rato *et al.*, 2013) avec une étiologie masculine dans 20 à 50 % des cas (Sharlip *et al.*, 2002). Un taux élevé d'ERO élevé est retrouvé chez ces hommes infertiles (Agarwal *et al.*, 2008b). Pour pallier à l'infertilité, l'AMP offre différents types de prise en charge thérapeutique. L'intérêt des AO n'est pas nouveau. L'optimisation des protocoles d'AMP, eux-mêmes sources d'exposition des gamètes aux dommages oxydants, est en perpétuelle remise en cause pour diminuer au maximum la production d'ERO, en réduisant le nombre, la vitesse et le temps des centrifugations, les temps d'incubation et la concentration atmosphérique en oxygène pendant les cultures embryonnaires (Alhelou *et al.*, 2018; Boueilh *et al.*, 2018; DeAngelis *et al.*, 2018).

- **La prise en charge en AMP**

Dans l'étude « PRIMOSPERMO », l'obtention d'embryons considérés comme « TB », transférés ou congelés, n'était pas modifiée par la présence de dommages à l'ADN spermatique ou les altérations du spermogramme. Plusieurs hypothèses sont possibles afin

d'expliquer l'absence d'impact de la qualité spermatique, notamment nucléaire sur l'obtention de « TB » lors de nos tentatives d'ICSI.

Tout d'abord, la phase de sélection des spermatozoïdes par test de migration survie a déjà démontré son efficacité à sélectionner les spermatozoïdes compétents avec une diminution des dommages à l'ADN (Xue *et al.*, 2014; Volpes *et al.*, 2016; Oguz *et al.*, 2018). De plus, la technique ICSI elle-même consiste à sélectionner microscopiquement les spermatozoïdes à morphologie normale et mobile avant fécondation. En effet, Shuai *et al.* ont montré que les légères oligo-asthénozoospermies n'impactaient pas les taux de fécondation, ni le taux de grossesses, ou encore le taux de blastocystes obtenu au cours d'ICSI (Shuai *et al.*, 2015). De plus, une autre équipe rapporte que la morphologie des spermatozoïdes n'aurait pas de conséquences sur les résultats d'ICSI (Høst *et al.*, 2001). Enfin, Sadeghi *et al.*, en 2009, n'ont également pas montré de différences significatives dans l'obtention d'un embryon de bonne « qualité » en cas d'anomalies de la fragmentation ou de la compaction de l'ADN spermatique. Enfin, afin de pouvoir réaliser l'analyse des marqueurs nucléaires sur les reliquats d'éjaculat, notre étude a été réalisée avec des patients d'ICSI mais dont les altérations du spermogramme étaient modérées, notamment en ce concerne la numération des spermatozoïdes. Il serait intéressant d'élargir notre étude à la FIV. Ceci permettrait de tester l'hypothèse de l'impact de l'ICSI sur nos résultats.

Une autre hypothèse pour expliquer l'absence d'effet sur la qualité des blastocystes, concerne la culture embryonnaire. Les études comparant la culture en milieu séquentiel et global mettent en évidence des altérations du développement embryonnaire précoce dans les milieux séquentiels (Hardarson *et al.*, 2015). Une équipe a montré que l'utilisation d'un milieu unique en FIV améliorerait le taux d'obtention de blastocystes et de fécondation (Sfontouris *et al.*, 2016). Dans l'étude PRIMOSPERMO, les conditions de cultures de notre laboratoire en milieu global G-TL® et le suivi en Time Lapse pourraient être des conditions optimales qui compenseraient l'impact d'une mauvaise qualité de l'ADN spermatique.

Enfin, la capacité de réparation des dommages nucléaires spermatiques par l'ovocyte est une hypothèse cruciale. Dans notre étude PRIMOPSEMRO, étaient incluses uniquement des femmes de moins de 37 ans. Les systèmes de réparation ovocytaires sont plus compétents chez les femmes jeunes (Cimadomo *et al.*, 2018). Une réparation efficace des ovocytes de

nos patientes jeunes pourrait expliquer l'absence d'impact sur l'obtention des blastocystes. Tous ces éléments réunis concourent probablement à expliquer l'absence d'impact sur l'obtention de blastocystes de bonne qualité. Comme l'équipe d'Enciso a proposé le postulat que l'ovocyte aurait plus de difficultés à réparer les cassures doubles brins par rapport aux cassures simple brins (Enciso *et al.*, 2009). Une étude similaire à notre étude « PRIMOSPERMO » pourrait être réalisée en distinguant le type de cassures de l'ADN spermatique afin de confirmer ou non cette hypothèse.

L'étude « PRIMOSPERMO » a cependant montré une cinétique de développement précoce plus rapide pour les embryons de couples dont l'homme avait un niveau élevé de fragmentation, d'oxydation de l'ADN ou de décondensation de la chromatine spermatique. Nous avons mis en évidence des cinétiques significativement plus rapides en cas de fragmentation de l'ADN pour les stades 2C et B4, et en cas de décondensation de la chromatine spermatique pour les stades PNB-2C et 5C-8C. Wdowiak and Bojar, (2016) ont retrouvé une corrélation positive entre le pourcentage de spermatozoïdes fragmentés et les temps de développement embryonnaire à partir du stade PN et jusqu'au stade 5C. Récemment, l'équipe de Mangoli a mis en évidence que les stades 4C, 6C et 7C étaient plus lents lorsque le taux de spermatozoïdes positifs en CMA3 était supérieur à 10%. Ce même auteur rapportait une corrélation positive entre la numération spermatique et les stades 4C, 6C et 7C, ainsi qu'entre la mobilité progressive et l'apparition des stades 2C et 4C (Mangoli *et al.*, 2018). Concernant l'oxydation mesurée par la présence de résidus 8-OHdG, mon travail a montré un impact de l'oxydation de l'ADN spermatique élevé sur les stades tardifs du développement embryonnaire. Du stade morula à la blastulation B1, B2 et B3, les cinétiques sont plus rapides dans le groupe « Oxydation + ». A l'inverse, en utilisant d'autres marqueurs de l'oxydation comme les ERO intracellulaires (H_2O_2 et O_2), Ghaleno *et al.* ont mis en évidence que plus le taux de spermatozoïdes oxydés est élevé, plus la formation d'un zygote était ralentie (Ghaleno *et al.*, 2014). Nos résultats sont donc pour l'instant en discordance la littérature. Cependant, du fait du faible effectif de notre population étudiée, les résultats sont à mettre en perspective. En effet, les inclusions pour l'étude PRIMOSPERMO sont encore en cours et nos résultats correspondent à une analyse intermédiaire de l'étude. Par ailleurs, il se peut très bien que nos observations bien que distinctes de celles de Ghaleno *et*

al., (2014) soient correctes car les situations sont différentes puisque dans un cas nous connaissons le niveau d'altérations oxydantes de l'ADN spermatique alors que dans l'autre cas nous avons seulement une information du niveau d'ERO spermatiques ce qui est très différent.

Esbert *et al.* ont démontré qu'un taux de fragmentation de l'ADN spermatique évaluée en cas de don d'ovocyte allongeait la cinétique des clivages embryonnaires mais n'avait pas de conséquences sur les issues de tentatives (blastulation et grossesse) comparé à l'utilisation des ovocytes du couple (Esbert *et al.*, 2018). Cet auteur met en évidence le rôle essentiel de l'ovocyte dans la réparation de l'ADN spermatique, influencé par l'âge maternelle et l'importance de la fragmentation spermatique à réparer. Finalement, nous arrivons aux mêmes conclusions que ces auteurs. En effet, notre étude intermédiaire a montré que même si les dommages à l'ADN spermatique modifiaient la cinétique embryonnaire, la qualité finale embryonnaire et le taux d'obtention de blastocystes de bonne qualité n'étaient pas altérés (Esbert *et al.*, 2018). Il serait intéressant de renouveler notre étude avec des femmes âgées de plus de 37 ans, ou présentant des pathologies ovulatoires pour évaluer l'efficacité des mécanismes de réparations ovocytaires.

Sur un plan, plus fondamental, certains auteurs rapportent chez l'animal des expressions protéiques et géniques déterminantes pour l'activation optimale du zygote et le développement embryonnaire préimplantatoire normal (Gao *et al.*, 2017; Svoboda, 2018). Il pourrait être intéressant de réaliser, sur un modèle murin une analyse génomique et transcriptomique des marqueurs clés de l'activation du zygote par spectrométrie de masse. En effet, cette analyse permettrait de mieux caractériser les mécanismes mis en jeu lors du développement embryonnaire dans le cadre d'un ADN spermatique altéré.

Tous les auteurs s'accordent sur le fait qu'un seul marqueur de cinétique ne peut être pertinent pour évaluer la qualité embryonnaire et prédire le potentiel d'implantation. C'est pourquoi les algorithmes de prise de décision ont fleuri dans la littérature scientifique. Rubio n'a pas retrouvé de résultats en termes de grossesse en utilisant l'algorithme proposé par Meseguer (Meseguer *et al.*, 2012; Rubio *et al.*, 2014). Basile *et al.* mettent en évidence un

algorithme prenant en compte les stades 3C, 5C et CC2 (Basile *et al.*, 2015). Ainsi 10 catégories d'embryons sont obtenues en fonction de leur potentiel implantatoire. Des études rétrospectives (Meseguer *et al.*, 2012) et prospectives (Kirkegaard *et al.*, 2013; Rubio *et al.*, 2014) ont essayé de proposer un algorithme de sélection optimal des embryons basé sur les cinétiques. Les résultats sont contradictoires et propres à chaque centre, aux conditions de culture et surtout à chaque système de Time Lapse utilisé.

Mon travail de thèse a mis en évidence une cinétique embryonnaire permettant d'aboutir à l'obtention d'un « TB » significativement plus rapide que pour les autres embryons. Notamment l'intervalle de division PNB-2C était plus rapide. Déjà, en 2016, notre équipe avait mis en lumière sur une cohorte de 140 « TB » une cinétique significativement plus rapide à partir de la syngamie des PN et jusqu'au stade 8C comparé aux 119 non « TB » étudiés. En 2012, Meseguer proposait les stades 5C (entre 48,8 et 56,6h) et CC2 (<11,9h) comme prédictifs d'implantation (Meseguer *et al.*, 2012). Puis, Basile *et al.*, en 2015, mettaient en évidence trois variables cinétiques en relation significative avec l'obtention d'une grossesse : les stades 3C (entre 34 et 40 h), 5C (entre 45 et 55 h) et l'intervalle CC2 (entre 9 et 12h). Dans ce travail, nous avons mesuré, en moyenne, en cas d'obtention de « TB » les stades 3C à 37,92h, 5C à 50,54h et CC2 à 10,31h. De plus, un auteur (Sakkas *et al.*, 2001) a rapporté que le clivage précoce à 25h présente une valeur pronostique positive sur les compétences de l'embryon, une corrélation avec le taux de grossesse (45 % vs 23,8 % sans clivage précoce) et les taux d'implantation (25,5 % vs 14,8 %). Ainsi, nous retrouvons en cas d'obtention de « TB », que le stade 2Cb est en moyenne à 27,13h, avec une fin du stade 2 cellules (2Ce) à 28,42h et des stades 7C et 8C obtenus respectivement à 60,66h et 61,44h. En conclusion, les cinétiques embryonnaires déterminées lors de mon travail de thèse sont en accord avec la littérature, validant nos conditions de culture.

Nous allons poursuivre les inclusions et en perspective de ce travail nous allons modéliser un algorithme propre à notre milieu de culture global et à notre système Time Lapse Primo Vision® afin d'optimiser la sélection des embryons permettant d'obtenir une grossesse. Enfin, les seuils de décondensation, de fragmentation et d'oxydation que nous avons considérés dans notre étude étaient basés sur la littérature. Le seuil d'oxydation, par exemple, a été établi en relation avec la qualité spermatique et la concentration en PNN.

L'étude PRIMOSPERMO, une fois aboutie, permettrait de déterminer potentiellement de nouveaux seuils critiques des altérations nucléaires en relation avec la cinétique embryonnaire.

- **Les milieux**

La cryopréservation spermatique, seule alternative actuellement pour la préservation de la fertilité masculine, n'est pourtant pas inoffensive pour les spermatozoïdes. Dans ce travail, j'ai démontré que l'ajout d'hypotaurine dans les milieux avait un effet bénéfique sur la cryopréservation spermatique. L'ajout d'AO dans les milieux de préparation des spermatozoïdes et tout particulièrement de congélation, est le sujet de nombreuses études ou revues de la littérature scientifique sans pour autant atteindre de consensus (Martin-Hidalgo *et al.*, 2019). L'hypotaurine, présente naturellement dans l'éjaculat, agit *in vitro* comme piègeur de radicaux libres hydroxyles, protégeant ainsi les membranes lipidiques. Son oxydation résulte en la formation de la taurine. Il a été démontré une relation entre les concentrations d'hypotaurine et de taurine dans l'éjaculat (Holmes *et al.*, 1992). Le manque d'hypotaurine pourrait être une explication à la plus faible protection des spermatozoïdes contre les différents dommages auxquels le noyau spermatique doit faire face, notamment en cas de congélation. Alvarez et Storey ont démontré dès les années 80, les effets bénéfiques d'une supplémentation en hypotaurine et en taurine sur la lipopéroxydation lipidique, la capacitation et la réaction acrosomique des spermatozoïdes (Alvarez and Storey, 1983). Nous pourrions poursuivre nos investigations sur l'hypotaurine en évaluant l'impact d'une supplémentation des milieux de cultures uniques sur les cinétiques de développements embryonnaires grâce à la technologie Time lapse. Cette analyse pourrait être réalisée avec différentes concentrations en hypotaurine seule ou en association avec d'autres molécules antioxydantes dans les milieux de culture et de congélation des gamètes et des embryons.

- **Les AO oraux**

Compte tenu de pléthore de traitements ou de supplémentations antioxydantes sur le marché médical et du risque de mauvaise utilisation, le diagnostic de l'oxydation du noyau

de l'ADN spermatique nous a semblé être une première étape nécessaire dans une démarche diagnostique.

Santiso *et al.*, 2010 ont validé que la fragmentation de l'ADN spermatique était significativement plus importante chez les patients infertiles vs les patients fertiles, quel que soit la méthode de détection utilisée. Cette même équipe a rapporté une amélioration de la fragmentation de l'ADN spermatique de 4% après 3 mois de prise de FSH. Ceci laisse le champ ouvert à une possible prise en charge thérapeutique de la fragmentation de l'ADN spermatique chez l'homme jusqu'à présent limitée à la prise de supplémentation antioxydante parfois déraisonnables et inadaptée.

Showell *et al.* en 2014 suggérait, avec une faible puissance, qu'une supplémentation en antioxydants chez les hommes infertiles pouvait améliorer les taux de naissance vivante et de grossesse clinique (Showell *et al.*, 2014).

La réalisation d'une étude comparative des différentes préparations antioxydantes paraît essentielle. Cette étude devra être randomisée, multicentrique, en double aveugle avec un bras placebo et comparer un panel de molécules antioxydantes actuellement sur le marché en vente libre et non remboursé par la sécurité sociale. Comme développé précédemment dans l'étude intermédiaire PRIMOSPERMO, l'impact d'une supplémentation orale pourrait être évalué sur des tentatives de FIV avec une indication masculine, en fonction de l'âge des femmes (> 37 ans) avec un groupe contrôle plus jeune ou avec des donneuses d'ovocytes. Il serait alors possible d'analyser l'impact des dommages à l'ADN spermatique par rapport aux cinétiques embryonnaires en incluant l'impact de la réparation ovocytaire. Il pourrait ainsi être intéressant de qualifier simultanément les effets d'une telle thérapeutique sur les différents types d'atteintes, cassures simples ou doubles brins, de la fragmentation de l'ADN spermatique chez nos patients.

Mais le plus important est d'avoir un réel diagnostic de la qualité nucléaire spermatique et tout particulièrement de l'oxydation de l'ADN avant la prise d'antioxydants, afin de proposer une thérapeutique optimale et adaptée.

IV. Conclusion

L'intégrité nucléaire des spermatozoïdes est essentielle à la fécondation et au développement embryonnaire. Ce travail de thèse a permis de mieux comprendre la physiopathologie de l'infertilité masculine et de mettre en évidence des nouveaux biomarqueurs spermatiques en lien avec la qualité spermatique et un développement embryonnaire normal.

Ce travail a validé pour la première fois chez l'homme, un test diagnostique mesurant le 8-hydroxy-2'-desoxyguanosine (8-OHdG), adduit majoritaire de l'oxydation nucléaire et l'établissement d'un seuil critique d'oxydation en relation avec les paramètres fonctionnels spermatiques et les caractéristiques cliniques des patients.

En utilisant différentes techniques de mesure, des corrélations ont été mesurées entre les dommages à l'ADN spermatique les plus fréquents tels que la décondensation de la chromatine, la fragmentation et l'oxydation de l'ADN spermatique. L'évaluation de la moyenne d'intensité de fluorescence de l'immuno-marquage du 8-OHdG a été retrouvée comme primordiale pour compléter la qualification de l'état d'oxydation de l'ADN spermatique chez l'homme.

D'un point de vu plus clinique, des effets bénéfiques d'une supplémentation des milieux en hypotaourine ont été mis en évidence lors de la cryopréservation de spermatozoïdes.

Enfin, par l'analyse des cinétiques de développement embryonnaire précoce, des temps clés ont été identifiés comme plus rapides en cas d'anomalie de la fragmentation et de l'oxydation de l'ADN spermatique. Grâce à une prise en charge globale en AMP par ICSI chez des femmes jeunes, l'obtention de blastocystes considérés comme « Top », à fort potentiel implantatoire, n'était pas modifiée chez ces patients.

Ce travail met en évidence certains impacts des dommages à l'ADN spermatique sur la fertilité masculine. De nombreuses questions restent encore en suspend. Dans l'objectif

d'aboutir à une naissance vivante en bonne santé, les investigations fondamentales et cliniques doivent être poursuivies pour optimiser une prise en charge globale et adaptée à chaque patient.

Liste des figures

Liste des figures

Figure 1 : Géométrie de la double hélice d'ADN et condensation de la chromatine dans un noyau de cellule somatique en interphase

Figure 2 : Le nucléosome, unité fondamentale de la chromatine, modélisation et dynamique

Figure 3 : Deux modèles pour décrire cette fibre de 30 nm et compaction de l'ADN au sein de la chromatine

Figure 4 : Développement des cellules germinales en post-natal chez l'humain

Figure 5 : Transformation des spermatogonies en spermatozoïdes

Figure 6 : Les différents stades de la prophase I

Figure 7 : Représentation microscopique et schématique d'une paire de chromosome homologues lors d'un échange d'une portion de leurs chromatides durant la prophase I de méiose, au niveau de deux chiasmas

Figure 8 : La méiose

Figure 9 : Remaniement morphologique du spermatozoïde durant la spermiogenèse et formation de ponts disulfures

Figure 10 : Cycle de l'épithélium séminifère chez l'homme

Figure 11 : Représentation schématique de l'organisation de la chromatine spermatique testiculaires et épидидymaires

Figure 12 : Le code des histones et les profils de méthylation

Figure 13 : Trois éléments structuraux majeurs de la chromatine spermatique

Figure 14 : Remplacement des histones par les protamines et hypercompaction de la chromatine spermatique - Vue d'ensemble de l'épigénétique du sperme

Figure 15 : Morphologie des chromosomes en microscopie optique et le caryotype humain

Figure 16 : Anomalie du nombre de chromosome : Non disjonction en méiose 1 et en méiose 2

Figure 17 : Le syndrome de Klinefelter et les translocations réciproques

Figure 18 : Caryotype d'un individu masculin trisomique par translocation sur le chromosome 14 et les translocations Robertsoniennes

Figure 19 : Infertilité masculine et les microdélétions du chromosome Y

Figure 20 : Régression linéaire de la fréquence des disomies de quatre paires testées (6, 7, 15,16) par rapport à la maturité nucléaire mesurée par la coloration au bleu d'aniline

Figure 21 : Fragmentation et oxydation de l'ADN dans les cellules germinales

Figure 22 : Classification et marquage de la 5-méthylcytosine des spermatozoïdes

Figure 23 : Activation des spermatozoïdes : Rôle des espèces réactives de l'oxygène et des kinases

Figure 24 : Radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène

Figure 25 : Réaction d'oxydation de la guanine

Figure 26 : Attaque radicalaire des protéines

Figure 27 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques

Figure 28 : Réaction catalysée par la glutathion peroxydase

Figure 29: Mammalian DNA glycosylases, their main substrates, modes of action, and mutant phenotypes

Figure 30 : Spermatogenèse défectueuse : Système de réparation par excision de base (BER)

Figure 31 : Résumé de l'équilibre entre la production de DAO et les systèmes antioxydants

Figure 32 : Spermatogenèse défectueuse : Illustration des effets de l'excès de cytoplasme résiduel (ECR)

Figure 33 : Systèmes ovocytaires de réparation de l'ADN spermatiques et les points de contrôles cellulaires

Figure 34 : Représentation schématique des voies apoptotiques hypothétiques présentent dans le sperme éjaculé de patients infertiles

Figure 35 : Voies extrinsèque et intrinsèque d'induction de l'apoptose

Figure 36 : Adiposité abdominale et hypogonadisme associée à l'obésité masculine (MOSH) et IMC et infertilité

Figure 37 : Mécanismes d'action du stress sur l'axe hypothalamo-hypophysaire

Figure 38 : Mécanismes d'action et effets physiopathologiques de l'alcool sur la fertilité masculine

Figure 39 : Mécanismes d'action et effets physiopathologiques du tabac sur la fertilité masculine

Figure 40 : Varicocèle et infertilité

Figure 41 : Voie de la génération de stress oxydant médiée par les radicaux libres et son rôle dans l'exécution de diverses maladies

Figure 42 : Nutrition et fertilité

Figure 43 : Résumé des techniques employées pour le marquage de la qualité nucléaires spermatiques

Figure 44 : Cinétique de développement embryonnaire précoce

Figure 45 : Schéma expérimental : Diagnostic de l'oxydation de l'ADN spermatique chez l'homme et détermination du seuil par immunodétection du résidu 8-OHdG

Figure 46 : Schéma expérimental : COMET assay et immunodétection du 8-OHdG

Figure 47 : Corrélation entre la fragmentation et l'oxydation de l'ADN spermatique en fonction des caractéristiques cliniques et spermatiques sous forme de *Heatmap*

Figure 48 : Schéma expérimental : Effets bénéfiques d'une supplémentation en hypotaaurine sur la cryopréservation des spermatozoïdes humains

Figure : 49 : Schéma expérimental : Impact de la qualité nucléaire des spermatozoïdes humain sur le développement embryonnaire, Etude PRIMOSPERMO

Figure 50 : Cinétiques de développement embryonnaire précoce en fonction de l'oxydation et de la fragmentation de l'ADN spermatique

Figure 51 : Développement embryonnaire précoce en fonction de la qualité embryonnaire

Figure 52 : Cinétiques de développement embryonnaire précoce fonction du devenir embryonnaire : transférés, vitrifiés ou détruits

Figure 53 : Séquençage à haut débit des régions oxydées du noyau spermatique et distribution sur les chromosomes de souris des points chauds d'oxydation du noyau spermatique chez les animaux KO

Figure 54 : 2T Comet assay

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les antioxydants métaboliques

Tableau 2 : Les antioxydants nutritifs

Tableau 3 : Evaluation du risque d'infertilité après traitement des cancers fréquemment retrouvés de l'enfant et de l'adolescent

Tableau 4 : Les différents niveaux de risques d'infertilité chez l'homme liés aux principaux traitements anticancéreux

Tableau 5 : Gonadotoxicité au cours des traitements des pathologies dysimmunitaires et indications de préservation de la fertilité

Tableau 6 : Tableau descriptif de la population étudiée : Données cliniques, spermatiques et nucléaires Comet assay et immunodétection du 8-OHdG

Tableau 7 : PRIMOSPERMO : Descriptif clinique de la population étudiée

Tableau 8 : PRIMOSPERMO : Descriptif des caractéristiques spermatiques en fonction des anomalies nucléaires

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

- Aboulmaouahib S, Madkour A, Kaarouch I, Sefrioui O, Saadani B, Copin H, Benkhalifa M, Louanjli N, Cadi R. Impact of alcohol and cigarette smoking consumption in male fertility potential: Looks at lipid peroxidation, enzymatic antioxidant activities and sperm DNA damage. *Andrologia* 2018;**50**..
- Agarwal A, Allamaneni SSR. The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review. *Minerva Ginecol* 2004;**56**:235–245.
- Agarwal A, Deepinder F, Sharma RK, Ranga G, Li J. Effect of cell phone usage on semen analysis in men attending infertility clinic: an observational study. *Fertil Steril* 2008a;**89**:124–128.
- Agarwal A, Ikemoto I, Loughlin KR. Effect of sperm washing on levels of reactive oxygen species in semen. *Arch Androl* 1994;**33**:157–162.
- Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol* 2008b;**59**:2–11.
- Agarwal A, Roychoudhury S, Sharma R, Gupta S, Majzoub A, Sabanegh E. Diagnostic application of oxidation-reduction potential assay for measurement of oxidative stress: clinical utility in male factor infertility. *Reprod Biomed Online* 2017;**34**:48–57.
- Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003;**9**:331–345.
- Aitken RJ. Sperm function tests and fertility. *Int J Androl* 2006;**29**:69–75; discussion 105–108.
- Aitken RJ. Whither must spermatozoa wander? The future of laboratory seminology. *Asian J Androl* 2010;**12**:99–103.
- Aitken RJ. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol Reprod Dev* 2017;**84**:1039–1052.
- Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress, spermatozoa and leukocytic infiltration: relationships forged by the opposing forces of microbial invasion and the search for perfection. *J Reprod Immunol* 2013;**100**:11–19.
- Aitken RJ, De Iuliis GN, McLachlan RI. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *International Journal of Andrology* 2009;**32**:46–56.
- Aitken RJ, Gibb Z, Baker MA, Drevet J, Gharagozloo P. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 2016;**28**:1–10.
- Aitken RJ, Jones KT, Robertson SA. Reactive Oxygen Species and Sperm Function—In Sickness and In Health. *Journal of Andrology* 2012;**33**:1096–1106.

- Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Iuliis GN. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl* 2014;**16**:31–38.
- Alhelou Y, Mat Adenan NA, Ali J. Embryo culture conditions are significantly improved during uninterrupted incubation: A randomized controlled trial. *Reprod Biol* 2018;**18**:40–45.
- Alvarez JG, Storey BT. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol Reprod* 1983;**29**:548–555.
- Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 1987;**8**:338–348.
- Alvarez S. Do some addictions interfere with fertility? *Fertil Steril* 2015;**103**:22–26.
- Annunziato, DNA Packaging: Nucleosomes and Chromatin. *Nature Education* 1(1):262008.
- Amann RP. Structure and Function of the Normal Testis and Epididymis. *JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF TOXICOLOGY* 1989;
- Amidi F, Pazhohan A, Shabani Nashtaei M, Khodarahmian M, Nekoonam S. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell Tissue Bank* 2016;**17**:745–756.
- Ammar O, Haouas Z, Hamouda B, Hamdi H, Hellara I, Jlali A, Cheikh HB, Mehdi M. Relationship between sperm DNA damage with sperm parameters, oxidative markers in teratozoospermic men. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2019;**233**:70–75.
- Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review. *Cytogenet Genome Res* 2005;**111**:297–304.
- Antonelli A, Gandini L, Petrinelli P, Marcucci L, Elli R, Lombardo F, Dondero F, Lenzi A. Chromosomal alterations and male infertility. *J Endocrinol Invest* 2000;**23**:677–683.
- Armstrong S, Vail A, Mastenbroek S, Jordan V, Farquhar C. Time-lapse in the IVF-lab: how should we assess potential benefit? *Hum Reprod* 2015;**30**:3–8.
- Arya G, Schlick T. Role of histone tails in chromatin folding revealed by a mesoscopic oligonucleosome model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;**103**:16236–16241.
- Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med* 1995;**332**:281–285.
- Auroux M. [Testicular aging and its consequences]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 1983;**12**:11–17.

- Bahat A, Caplan SR, Eisenbach M. Thermotaxis of human sperm cells in extraordinarily shallow temperature gradients over a wide range. *PLoS ONE* 2012;**7**:e41915.
- Balhorn R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol* 2007;**8**:227.
- Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000;**15**:1338–1344.
- Basile N, Vime P, Florensa M, Aparicio Ruiz B, García Velasco JA, Remohí J, Meseguer M. The use of morphokinetics as a predictor of implantation: a multicentric study to define and validate an algorithm for embryo selection. *Hum Reprod* 2015;**30**:276–283.
- Beal MA, Yauk CL, Marchetti F. From sperm to offspring: Assessing the heritable genetic consequences of paternal smoking and potential public health impacts. *Mutat Res* 2017;**773**:26–50.
- Benchaïb M, Ajina M, Braun V, Niveleau A, Guérin J-F. [DNA sperm methylation in assisted reproductive techniques]. *Gynecol Obstet Fertil* 2006;**34**:836–839.
- Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, Guérin JF. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003;**18**:1023–1028.
- Benchaib M, Braun V, Ressnikof D, Lornage J, Durand P, Niveleau A, Guérin JF. Influence of global sperm DNA methylation on IVF results. *Hum Reprod* 2005;**20**:768–773.
- Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, François Guerin J. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 2007;**87**:93–100.
- Bendayan M, Alter L, Swierkowski-Blanchard N, Caceres-Sanchez L, Selva J, Robin G, Boitrelle F. [Environment and lifestyle: Impacts on male fertility?]. *Gynecol Obstet Fertil Senol* 2018;**46**:47–56.
- Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*. 1997;**33**:20313–6.
- Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 1999;**79**:1127–1155.
- Bhat TA, Wani AA. *Chromosome Structure and Aberrations*. 2017; Springer.
- Bisht S, Dada R. Oxidative stress: Major executioner in disease pathology, role in sperm DNA damage and preventive strategies. *Front Biosci (Schol Ed)* 2017;**9**:420–447.

- Blanco-Rodríguez J. gammaH2AX marks the main events of the spermatogenic process. *Microsc Res Tech* 2009;**72**:823–832.
- Blanco-Rodríguez J, Martínez-García C, Porras A. Correlation between DNA synthesis in the second, third and fourth generations of spermatogonia and the occurrence of apoptosis in both spermatogonia and spermatocytes. *Reproduction* 2003;**126**:661–668.
- Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;**1**:307–310.
- Blondel B. Institut Pasteur - Poliovirus et Apoptose. *hal.pasteur.archives*. 2006.
- Boissonnas CC, Abdalaoui HE, Haelewyn V, Fauque P, Dupont JM, Gut I, Vaiman D, Jouannet P, Tost J, Jammes H. Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men. *Eur J Hum Genet* 2010;**18**:73–80.
- Boissonnas CC, Jouannet P, Jammes H. Epigenetic disorders and male subfertility. *Fertil Steril* 2013;**99**:624–631.
- Boitrelle F, Albert M, Theillac C, Ferfour F, Bergere M, Vialard F, Wainer R, Bailly M, Selva J. Cryopreservation of human spermatozoa decreases the number of motile normal spermatozoa, induces nuclear vacuolization and chromatin decondensation. *J Andrology* 2012;**33**:1371-1378.
- Boueilh T, Reignier A, Barriere P, Freour T. Time-lapse imaging systems in IVF laboratories: a French national survey. *J Assist Reprod Genet* 2018;**35**:2181–2186.
- Bourc'his D, Proudhon C. Sexual dimorphism in parental imprint ontogeny and contribution to embryonic development. *Mol Cell Endocrinol* 2008;**282**:87–94.
- Brugnon F, Ouchchane L, Pons-Rejraji H, Artonne C, Farigoule M, Janny L. Density gradient centrifugation prior to cryopreservation and hypotaurine supplementation improve post-thaw quality of sperm from infertile men with oligoasthenoteratozoospermia. *Hum Reprod* 2013;**28**:2045–2057.
- Brugnon F, Van Assche E, Verheyen G, Sion B, Boucher D, Pouly JL, Janny L, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. *Hum Reprod* 2006;**21**:685–693.
- Buard J, Barthès P, Grey C, Massy B de. Distinct histone modifications define initiation and repair of meiotic recombination in the mouse. *EMBO J* 2009;**28**:2616–2624.
- Bucci D, Spinaci M, Morrell J, Vallorani C, Tamanini C, Guidetti R, Galeati G. Effects of single layer centrifugation with Androcoll-P on boar sperm. *Anim Reprod Sci* 2013;**138**:276–281.
- Bujan L, Walschaerts M, Moinard N, Hennebicq S, Saias J, Brugnon F, Auger J, Berthaut I, Szerman E, Daudin M, *et al*. 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* 2013;**100**:673–680.

- Bulleid NJ, Ellgaard L. Multiple ways to make disulfides. *Trends Biochem Sci* 2011;**36**:485–492.
- Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, Giwercman A. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* 2007;**22**:174–179.
- Burgoyne P, Mahadevaiah S and Turner J. The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nature Reviews. Genetics*. 10:**3**:207-216.
- Cabler S, Agarwal A, Flint M, Plessis SS du. Obesity: modern man’s fertility nemesis. *Asian J Androl* 2010;**12**:480–489.
- Cadet J, Douki T, Ravanat J-L. Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: mechanistic aspects and formation in cells. *Acc Chem Res* 2008;**41**:1075–1083.
- Cambi M, Tamburrino L, Marchiani S, Olivito B, Azzari C, Forti G, Baldi E, Muratori M. Development of a specific method to evaluate 8-hydroxy, 2-deoxyguanosine in sperm nuclei: relationship with semen quality in a cohort of 94 subjects. *Reproduction* 2013;**145**:227–235.
- Campbell JM, Lane M, Owens JA, Bakos HW. Paternal obesity negatively affects male fertility and assisted reproduction outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2015;**31**:593–604.
- Cariati F, Jaroudi S, Alfarawati S, Raberi A, Alviggi C, Pivonello R, Wells D. Investigation of sperm telomere length as a potential marker of paternal genome integrity and semen quality. *Reprod Biomed Online* 2016;**33**:404–411.
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 1992;**305**:609–613.
- Cassuto NG, Montjean D, Siffroi J-P, Bouret D, Marzouk F, Copin H, Benkhalifa M. Different Levels of DNA Methylation Detected in Human Sperms after Morphological Selection Using High Magnification Microscopy. *Biomed Res Int* 2016;**2016**:6372171.
- Chabory E, Damon C, Lenoir A, Kauselmann G, Kern H, Zevnik B, Garrel C, Saez F, Cadet R, Henry-Berger J, *et al.* Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *J Clin Invest* 2009;**119**:2074–2085.
- Champetier C, Gross E, Pointreau Y, Zaccariotto A, Dubergé T, Guerder C, Ortholan C, Chauvet B. [Normal tissue tolerance to external beam radiation therapy: testicles]. *Cancer Radiother* 2010;**14**:376–378.
- Champroux A, Damon-Soubeyrand C, Goubely C, Bravard S, Henry-Berger J, Guiton R, Saez F, Drevet J, Kocer A. Nuclear Integrity but Not Topology of Mouse Sperm Chromosome is Affected by Oxidative DNA Damage. *Genes (Basel)* 2018;**9**:

- Champroux A, Torres-Carreira J, Gharagozloo P, Drevet JR, Kocer A. Mammalian sperm nuclear organization: resiliencies and vulnerabilities. *Basic Clin Androl* 2016;**26**:17.
- Chi HJ, Kim JH, Ryu CS, Lee JY, Park JS, Chung DY, Choi SY, Kim MH, Chun EK, Roh SI. Protective effect of antioxidant supplementation in sperm-preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2008;**23**:1023–1028.
- Choux C, Cavalieri M, Barberet J, Samson M, Bonnotte B, Fauque P, Sagot P. [Immunosuppressive therapy and fertility preservation: Indications and methods]. *Rev Med Interne* 2018;**39**:557–565.
- Cimadomo D, Fabozzi G, Vaiarelli A, Ubaldi N, Ubaldi FM, Rienzi L. Impact of Maternal Age on Oocyte and Embryo Competence. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;**9**:327.
- Cissen M, Wely M van, Scholten I, Mansell S, Bruin JP de, Mol BW, Braat D, Repping S, Hamer G. Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 2016;**11**:e0165125.
- Clapier CR, Iwasa J, Cairns BR, Peterson CL. Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017;**18**:407–422.
- Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 1972;**52**:198–236.
- Clermont Y, Lalli M, Bencsath-Makkai Z. Atlas d’histologie en microscopie optique, 2013.
- Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, Agarwal A. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *Int Braz J Urol* 2007;**33**:603–621.
- Collodel G, Moretti E, Micheli L, Menchiari A, Moltoni L, Cerretani D. Semen characteristics and malondialdehyde levels in men with different reproductive problems. *Andrology* 2015;**3**:280–286.
- Comhaire FH, Mahmoud AM, Depuydt CE, Zalata AA, Christophe AB. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist’s viewpoint. *Hum Reprod Update* 1999;**5**:393–398.
- Conaghan J, Chen AA, Willman SP, Ivani K, Chenette PE, Boostanfar R, Baker VL, Adamson GD, Abusief ME, Gvakharia M, *et al.* Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial. *Fertil Steril* 2013;**100**:412–419.e5.
- Condorelli RA, La Vignera S, Mongioi LM, Alamo A, Calogero AE. Diabetes Mellitus and Infertility: Different Pathophysiological Effects in Type 1 and Type 2 on Sperm Function. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;**9**:268.

- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 2003;**17**:1195–1214.
- Cormier N, Sirard MA, Bailey JL. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl* 1997;**18**:461–468.
- Cornwall GA. New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update* 2009;**15**:213–227.
- Dadoune J-P. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc Res Tech* 2003;**61**:56–75.
- Dadoune J-P. New insights into male gametogenesis: what about the spermatogonial stem cell niche? *Folia Histochem Cytobiol* 2007;**45**:141–147.
- Damirayakhian M, Jeyendran RS, Land SA. Significance of semen cultures for men with questionable semen quality. *Arch Androl* 2006;**52**:239–242.
- Dana M, Stoian V. Association of pericentric inversion of chromosome 9 and infertility in romanian population. *Maedica (Buchar)* 2012;**7**:25–29.
- De Berardis D, Mazza M, Marini S, Del Nibletto L, Serroni N, Pino MC, Valchera A, Ortolani C, Ciarrocchi F, Martinotti G, *et al.* Psychopathology, emotional aspects and psychological counselling in infertility: a review. *Clin Ter* 2014;**165**:163–169.
- De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 1991;**6**:245–250.
- De Iuliis GN, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A, Nixon B, Aitken RJ. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol Reprod* 2009;**81**:517–524.
- DeAngelis AM, Martini AE, Owen CM. Assisted Reproductive Technology and Epigenetics. *Semin Reprod Med* 2018;**36**:221–232.
- De Kloet ER, Joels M and Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2005;**6**:463–475.
- Demyttenaere K, Nijs P, Evers-Kiebooms G, Koninckx PR. Personality characteristics, psychoendocrinological stress and outcome of IVF depend upon the etiology of infertility. *Gynecol Endocrinol* 1994;**8**:233–240.
- Department of Biology Memorial Université of Newfoundland. Principles of Cell Biology (BIOL2060). *Pearson Edition* 2012.
- Devouassoux-Shisheboran M, Mauduit C, Bouvier R, Berger F, Bouras M, Droz JP, Benahmed M. Expression of hMLH1 and hMSH2 and assessment of microsatellite instability in testicular and mediastinal germ cell tumours. *Mol Hum Reprod* 2001;**7**:1099–1105.

- Dewan S, Puscheck EE, Coulam CB, Wilcox AJ, Jeyendran RS. Y-chromosome microdeletions and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2006;**85**:441–445.
- Dijk MR van, Koster MPH, Willemsen SP, Huijgen NA, Laven JSE, Steegers-Theunissen RPM. Healthy preconception nutrition and lifestyle using personalized mobile health coaching is associated with enhanced pregnancy chance. *Reprod Biomed Online* 2017;**35**:453–460.
- Doerksen T, Trasler JM. Developmental exposure of male germ cells to 5-azacytidine results in abnormal preimplantation development in rats. *Biology of reproduction* 1996;**55**:1155–1162.
- Drevet JR. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Mol Cell Endocrinol* 2006;**250**:70–79.
- Drevet JR. Sperm DNA damage and assisted reproductive technologies: reasons to be cautious! *Basic Clin Androl* 2016;**26**:11.
- Drevet JR, Lareyre JJ, Schwaab V, Vernet P, Dufaure JP. The PEA3 protein of the Ets oncogene family is a putative transcriptional modulator of the mouse epididymis-specific glutathione peroxidase gene gpx5. *Mol Reprod Dev* 1998;**49**:131–140.
- Du Plessis SS, Agarwal A, Halabi J, Tvrdá E. Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. *J Assist Reprod Genet* 2015;**32**:509–520.
- Duffy JM, Ahmad G, Mohiyiddeen L, Nardo LG, Watson A. Growth hormone for in vitro fertilization. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;CD000099.
- Dupont JM. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, 2008-06.
- Durairajanayagam D, Agarwal A, Ong C. Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. *Reprod Biomed Online* 2015;**30**:14–27.
- Eisenbach M, Giojalas LC. Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;**7**:276–285.
- El Bardisi H, Majzoub A, Arafa M, AlMalki A, Al Said S, Khalafalla K, Jabbour G, Basha M, Al Ansari A, Sabanegh E. Effect of bariatric surgery on semen parameters and sex hormone concentrations: a prospective study. *Reprod Biomed Online* 2016;**33**:606–611.
- El-Helaly M, Awadalla N, Mansour M, El-Biomy Y. Workplace exposures and male infertility - a case-control study. *Int J Occup Med Environ Health* 2010;**23**:331–338.
- Emanuele MA, Emanuele N. Alcohol and the male reproductive system. *Alcohol Res Health* 2001;**25**:282–287.
- Enciso M, Sarasa J, Agarwal A, Fernández JL, Gosálvez J. A two-tailed Comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2009;**18**:609–616.

- Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwercman A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl* 2006;**8**:11–29.
- Esbert M, Pacheco A, Soares SR, Amorós D, Florensa M, Ballesteros A, Meseguer M. High sperm DNA fragmentation delays human embryo kinetics when oocytes from young and healthy donors are microinjected. *Andrology* 2018;**6**:697–706.
- Escobar-Morreale HF, Santacruz E, Luque-Ramírez M, Botella Carretero JI. Prevalence of “obesity-associated gonadal dysfunction” in severely obese men and women and its resolution after bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2017;**23**:390–408.
- Evenson DP. Evaluation of sperm chromatin structure and DNA strand breaks is an important part of clinical male fertility assessment. *Transl Androl Urol* 2017;**6**:S495–S500.
- Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, Angelis P de, Claussen OP. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999;**14**:1039–1049.
- Ewen KA, Koopman P. Mouse germ cell development: from specification to sex determination. *Mol Cell Endocrinol* 2010;**323**:76–93.
- Favier A. Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique - L'Actualité Chimique. 2003; Available from: <https://www.lactualitechimique.org/Le-stress-oxydant-interet-conceptuel-et-experimental-dans-la-comprehension-des-mecanismes-des>.
- Feise RJ. Do multiple outcome measures require p-value adjustment? *BMC Med Res Methodol* 2002;**2**:8.
- Feldschuh J, Brassel J, Durso N, Levine A. Successful sperm storage for 28 years. *Fertil Steril* 2005;**84**:1017.
- Felsenfeld G. Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature* 1992;**355**:219–224.
- Ferfour F, Selva J, Boitrelle F, Gomes DM, Torre A, Albert M, Bailly M, Clement P, Vialard F. The chromosomal risk in sperm from heterozygous Robertsonian translocation carriers is related to the sperm count and the translocation type. *Fertil Steril* 2011;**96**:1337–1343.
- Fernandez MC, O’Flaherty C. Peroxiredoxin 6 is the primary antioxidant enzyme for the maintenance of viability and DNA integrity in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2018;
- Filippini A, Riccioli A, Padula F, Lauretti P, D’Alessio A, De Cesaris P, Gandini L, Lenzi A, Ziparo E. Control and impairment of immune privilege in the testis and in semen. *Hum Reprod Update* 2001;**7**:444–449.

- Finch JT, Klug A. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;**73**:1897–1901.
- Firms S, Cruzat VF, Keane KN, Joesbury KA, Lee AH, Newsholme P, Yovich JL. The effect of cigarette smoking, alcohol consumption and fruit and vegetable consumption on IVF outcomes: a review and presentation of original data. *Reprod Biol Endocrinol* 2015;**13**:134.
- Fleishman SB, Khan H, Homel P, Suhail MF, Strebel-Amrhein R, Mohammad F, Mahajan D, Rosenwald V, Guarino MJ, Mirzoyev T, *et al.* Testosterone levels and quality of life in diverse male patients with cancers unrelated to androgens. *J Clin Oncol* 2010;**28**:5054–5060.
- Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev* 2001a;**22**:226–239.
- Foresta C, Moro E, Ferlin A. Prognostic value of Y deletion analysis. The role of current methods. *Hum Reprod* 2001b;**16**:1543–1547.
- Fouquet JP, Kann ML, Combeau C, Melki R. Gamma-tubulin during the differentiation of spermatozoa in various mammals and man. *Mol Hum Reprod* 1998;**4**:1122–1129.
- Fraczek M, Kurpisz M. Mechanisms of the harmful effects of bacterial semen infection on ejaculated human spermatozoa: potential inflammatory markers in semen. *Folia Histochem Cytobiol* 2015;**53**:201–217.
- Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA, Ames BN. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;**88**:11003–11006.
- Franken DR, Franken CJ, Guerre H de la, Villiers A de. Normal sperm morphology and chromatin packaging: comparison between aniline blue and chromomycin A3 staining. *Andrologia* 1999;**31**:361–366.
- Franken DR, Oehninger S. Semen analysis and sperm function testing. *Asian J Androl* 2012;**14**:6–13.
- Frutos C de, López-Cardona AP, Fonseca Balvís N, Laguna-Barraza R, Rizos D, Gutierrez-Adán A, Bermejo-Álvarez P. Spermatozoa telomeres determine telomere length in early embryos and offspring. *Reproduction* 2016;**151**:1–7.
- Gabrielsen JS, Tanrikut C. Chronic exposures and male fertility: the impacts of environment, diet, and drug use on spermatogenesis. *Andrology* 2016;**4**:648–661.
- Gao Y, Liu X, Tang B, Li C, Kou Z, Li L, Liu W, Wu Y, Kou X, Li J, *et al.* Protein Expression Landscape of Mouse Embryos during Pre-implantation Development. *Cell Reports* 2017;**21**:3957–3969.
- Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1999;**11**:307–311.

- Garlantézec R, Warembourg C, Monfort C, Labat L, Pulkkinen J, Bonvallot N, Multigner L, Chevrier C, Cordier S. Urinary glycol ether metabolites in women and time to pregnancy: the PELAGIE cohort. *Environ Health Perspect* 2013;**121**:1167–1173.
- Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohi J. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J Androl* 2004;**6**:59–65.
- Gaskins AJ, Chavarro JE. Diet and fertility: a review. *Am J Obstet Gynecol* 2018;**218**:379–389.
- Gatewood JM, Schroth GP, Schmid CW, Bradbury EM. Zinc-induced secondary structure transitions in human sperm protamines. *J Biol Chem* 1990;**265**:20667–20672.
- Gatimel N, Leandri R, Parinaud J. Sperm vacuoles are not modified by freezing-thawing procedures. *Reprod Biomed Online* 2013;**26**:240–246.
- Gervasi MG, Visconti PE. Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. *Andrology* 2017;**5**:204–218.
- Ghaleno LR, Valojerdi MR, Hassani F, Chehraz M, Janzamin E. High level of intracellular sperm oxidative stress negatively influences embryo pronuclear formation after intracytoplasmic sperm injection treatment. *Andrologia* 2014;**46**:1118–1127.
- Gharagozloo P, Aitken RJ. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod* 2011;**26**:1628–1640.
- Giwercman A, Lindstedt L, Larsson M, Bungum M, Spano M, Levine RJ, Rylander L. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. *Int J Androl* 2010;**33**:e221–227.
- Gräff J and Mansuy IM. Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behavioural Brain Research* 2008;**192**:70–87.
- Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Franco G, Anniballo N, Mendoza C, Tesarik J. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 2005;**20**:226–230.
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;**281**:1309–1312.
- Grigoryev SA, Arya G, Correll S, Woodcock CL, Schlick T. Evidence for heteromorphic chromatin fibers from analysis of nucleosome interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;**106**:13317–13322.
- Griveau JF, Grizard G, Boucher D, Le Lannou D. Influence of oxygen tension on function of isolated spermatozoa from ejaculates of oligozoospermic patients and normozoospermic fertile donors. *Hum Reprod* 1998;**13**:3108–3113.

- Griveau JF, Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl* 1997a;**20**:61–69.
- Griveau JF, Le Lannou D. Influence of oxygen tension on reactive oxygen species production and human sperm function. *Int J Androl* 1997b;**20**:195–200.
- Grunewald S, Paasch U, Glander H-J, Anderegg U. Mature human spermatozoa do not transcribe novel RNA. *Andrologia* 2005;**37**:69–71.
- Gual-Frau J, Abad C, Amengual MJ, Hannaoui N, Checa MA, Ribas-Maynou J, Lozano I, Nikolaou A, Benet J, García-Peiró A, *et al*. Oral antioxidant treatment partly improves integrity of human sperm DNA in infertile grade I varicocele patients. *Hum Fertil (Camb)* 2015;**18**:225–229.
- Guérin P, Matillon C, Bleau G, Lévy R, Ménéz Y. [Impact of sperm DNA fragmentation on ART outcome]. *Gynecol Obstet Fertil* 2005;**33**:665–668.
- Gundersen TD, Jørgensen N, Andersson A-M, Bang AK, Nordkap L, Skakkebaek NE, Priskorn L, Juul A, Jensen TK. Association Between Use of Marijuana and Male Reproductive Hormones and Semen Quality: A Study Among 1,215 Healthy Young Men. *Am J Epidemiol* 2015;**182**:473–481.
- Guthauser B, Boitrelle F, Plat A, Thiercelin N, Vialard F. Chronic excessive alcohol consumption and male fertility: a case report on reversible azoospermia and a literature review. *Alcohol Alcohol* 2014;**49**:42–44.
- Haidl G, Jung A, Schill WB. Ageing and sperm function. *Hum Reprod* 1996;**11**:558–560.
- Hallows SE, Regnault TRH, Betts DH. The long and short of it: the role of telomeres in fetal origins of adult disease. *J Pregnancy* 2012;**2012**:638476.
- Hammadeh ME, Hasani S al-, Stieber M, Rosenbaum P, Küpker D, Diedrich K, Schmidt W. The effect of chromatin condensation (aniline blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme. *Hum Reprod* 1996;**11**:2468–2471.
- Hammadeh ME, Stieber M, Haidl G, Schmidt W. Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. *Andrologia* 1998;**30**:29–35.
- Hammoud S, Liu L, Carrell DT. Protamine ratio and the level of histone retention in sperm selected from a density gradient preparation. *Andrologia* 2009;**41**:88–94.
- Hammoud SS, Purwar J, Pflueger C, Cairns BR, Carrell DT. Alterations in sperm DNA methylation patterns at imprinted loci in two classes of infertility. *Fertil Steril* 2010;**94**:1728–1733.
- Hardarson T, Bungum M, Conaghan J, Meintjes M, Chantilis SJ, Molnar L, Gunnarsson K, Wikland M. Noninferiority, randomized, controlled trial comparing

embryo development using media developed for sequential or undisturbed culture in a time-lapse setup. *Fertil Steril* 2015;**104**:1452-1459.e1-4.

- Harlev A, Agarwal A, Gunes SO, Shetty A, Plessis SS du. Smoking and Male Infertility: An Evidence-Based Review. *World J Mens Health* 2015;**33**:143–160.
- Heller CH, Clermont Y. KINETICS OF THE GERMINAL EPITHELIUM IN MAN. *Recent Prog Horm Res* 1964;**20**:545–575.
- Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Gips H, Schill W-B, Kruger TF. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril* 2004;**81**:965–972.
- Henkel R, Kierspel E, Stalf T, Mehnert C, Menkveld R, Tinneberg H-R, Schill W-B, Kruger TF. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertil Steril* 2005;**83**:635–642.
- Henkel RR, Schill W-B. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;**1**:108.
- Hens L, Bonduelle M, Liebaers I, Devroey P, Van Steirteghem AC. Chromosome aberrations in 500 couples referred for in-vitro fertilization or related fertility treatment. *Hum Reprod* 1988;**3**:451–457.
- Hermo L, Pelletier R-M, Cyr DG, Smith CE. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. *Microsc Res Tech* 2010;**73**:241–278.
- Hess RA, Renato de Franca L. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Adv Exp Med Biol* 2008;**636**:1–15.
- Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Van De Pette M, John RM, Kagami M, Nakai K, Soejima H, *et al.* Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproduction technologies. *Hum Reprod* 2012;**27**:2541–2548.
- Hoeijmakers JH. DNA repair mechanisms. *Maturitas* 2001;**38**:17–22; discussion 22–23.
- Holmes RP, Goodman HO, Shihabi ZK, Jarow JP. The taurine and hypotaurine content of human semen. *J Androl* 1992;**13**:289–292.
- Høst E, Ernst E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. Morphology of spermatozoa used in IVF and ICSI from oligozoospermic men. *Reprod Biomed Online* 2001;**3**:212–215.
- Huret JL, Ahmad M, Arsaban M, Bernheim A and Cigna J. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. *Nucleic Acids Research*. 2004;**41**:920–924.

- Hutson JM, Li R, Southwell BR, Petersen BL, Thorup J, Cortes D. Germ cell development in the postnatal testis: the key to prevent malignancy in cryptorchidism? *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012;**3**:176.
- Iranpour FG, Nasr-Esfahani MH, Valojerdi MR, Taki Al-Taraihi TM. Chromomycin A3 Staining as a Useful Tool for Evaluation of Male Fertility. *J Assist Reprod Genet* 2000;**17**:60–66.
- Ivell R. Lifestyle impact and the biology of the human scrotum. *Reprod Biol Endocrinol* 2007;**5**:15.
- Jacobs AL, Schär P. DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. *Chromosoma* 2012;**121**:1–20.
- Jacobs PA, Strong JA. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 1959;**183**:302–303.
- Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997;**88**:347–354.
- Janny L, Menezo YJ. Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. *Mol Reprod Dev* 1994;**38**:36–42.
- Jena NR. DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *J Biosci* 2012;**37**:503–517.
- Jeong S-Y, Kim B-Y, Yu JE. De novo pericentric inversion of chromosome 9 in congenital anomaly. *Yonsei Med J* 2010;**51**:775–780.
- Jeulin C, Feneux D, Serres C, Jouannet P, Guillet-Rosso F, Belaisch-Allart J, Frydman R, Testart J. Sperm factors related to failure of human in-vitro fertilization. *J Reprod Fertil* 1986;**76**:735–744.
- Jeulin C, Soufir JC, Weber P, Laval-Martin D, Calvayrac R. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res* 1989;**24**:185–196.
- Johnson L. Spermatogenesis and aging in the human. *J Androl* 1986;**7**:331–354.
- Jouannet P, Wang C, Eustache F, Kold-Jensen T, Auger J. Semen quality and male reproductive health: the controversy about human sperm concentration decline. *APMIS* 2001;**109**:333–344.
- Kaarouch I, Bouamoud N, Madkour A, Louanjli N, Saadani B, Assou S, Aboulmaouahib S, Amzazi S, Copin H, Benkhalifa M, *et al.* Paternal age: Negative impact on sperm genome decays and IVF outcomes after 40 years. *Mol Reprod Dev* 2018;**85**:271–280.
- Kagami M, Nagai T, Fukami M, Yamazawa K, Ogata T. Silver-Russell syndrome in a girl born after in vitro fertilization: partial hypermethylation at the differentially methylated region of PEG1/MEST. *J Assist Reprod Genet* 2007;**24**:131–136.

- Kalmbach KH, Fontes Antunes DM, Dracxler RC, Knier TW, Seth-Smith ML, Wang F, Liu L, Keefe DL. Telomeres and human reproduction. *Fertil Steril* 2013;**99**:23–29.
- Kang H-J, Rosenwaks Z. p53 and reproduction. *Fertility and Sterility* 2018;**109**:39–43.
- Kao S-H, Chao H-T, Chen H-W, Hwang TIS, Liao T-L, Wei Y-H. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertil Steril* 2008;**89**:1183–1190.
- Karaer A, Karaer K, Ozaksit G, Ceylaner S, Percin EF. Y chromosome azoospermia factor region microdeletions and recurrent pregnancy loss. *Am J Obstet Gynecol* 2008;**199**:662.e1-5.
- Kasai H. Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: formation, repair, and mutagenesis. *Free Radic Biol Med* 2002;**33**:450–456.
- Kaser DJ, Racowsky C. Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2014;**20**:617–631.
- Kent-First MG, Kol S, Muallem A, Ofir R, Manor D, Blazer S, First N, Itskovitz-Eldor J. The incidence and possible relevance of Y-linked microdeletions in babies born after intracytoplasmic sperm injection and their infertile fathers. *Mol Hum Reprod* 1996;**2**:943–950.
- Kidd SA, Eskenazi B, Wyrobek AJ. Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil Steril* 2001;**75**:237–248.
- Kim B, Park K, Rhee K. Heat stress response of male germ cells. *Cell Mol Life Sci* 2013;**70**:2623–2636.
- Kirkegaard K, Kesmodel US, Hindkjær JJ, Ingerslev HJ. Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study. *Hum Reprod* 2013;**28**:2643–2651.
- Kloet ER de, Joëls M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 2005;**6**:463–475.
- Klonoff-Cohen H, Lam-Kruglick P, Gonzalez C. Effects of maternal and paternal alcohol consumption on the success rates of in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer. *Fertil Steril* 2003;**79**:330–339.
- Kobayashi H, Hiura H, John RM, Sato A, Otsu E, Kobayashi N, Suzuki R, Suzuki F, Hayashi C, Utsunomiya T, *et al.* DNA methylation errors at imprinted loci after assisted conception originate in the parental sperm. *Eur J Hum Genet* 2009;**17**:1582–1591.
- Kobayashi N, Miyauchi N, Tatsuta N, Kitamura A, Okae H, Hiura H, Sato A, Utsunomiya T, Yaegashi N, Nakai K, *et al.* Factors associated with aberrant imprint methylation and oligozoospermia. *Sci Rep* 2017;**7**:42336.

- Kocer A, Henry-Berger J, Noblanc A, Champroux A, Pogorelcnik R, Guiton R, Janny L, Pons-Rejraji H, Saez F, Johnson GD, *et al.* Oxidative DNA damage in mouse sperm chromosomes: Size matters. *Free Radic Biol Med* 2015;**89**:993–1002.
- Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril* 1997;**68**:519–524.
- Kolodny RC, Masters WH, Kolodner RM, Toro G. Depression of plasma testosterone levels after chronic intensive marihuana use. *N Engl J Med* 1974;**290**:872–874.
- Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, Witt MA, Roudebush WE. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl* 2006;**27**:450–452.
- Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 2001;**495**:12–15.
- La Salle S, Trasler JM. Dynamic expression of DNMT3a and DNMT3b isoforms during male germ cell development in the mouse. *Dev Biol* 2006;**296**:71–82.
- La Vignera S, Condorelli RA, Vicari E, D’Agata R, Salemi M, Calogero AE. High levels of lipid peroxidation in semen of diabetic patients. *Andrologia* 2012;**44 Suppl 1**:565–570.
- Lakshmi SVV, Padmaja G, Kuppusamy P, Kutala VK. Oxidative stress in cardiovascular disease. *Indian J Biochem Biophys* 2009;**46**:421–440.
- Lambertini M, Del Mastro L, Pescio MC, Andersen CY, Azim HA, Peccatori FA, Costa M, Revelli A, Salvagno F, Gennari A, *et al.* Cancer and fertility preservation: international recommendations from an expert meeting. *BMC Med* 2016;**14**:1.
- Lamirande E de, O’Flaherty C. Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochim Biophys Acta* 2008;**1784**:106–115.
- Lavranos G, Balla M, Tzortzopoulou A, Syriou V, Angelopoulou R. Investigating ROS sources in male infertility: a common end for numerous pathways. *Reprod Toxicol* 2012;**34**:298–307.
- Lewis SE, Sterling ES, Young IS, Thompson W. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1997;**67**:142–147.
- Lewis SEM, Aitken RJ. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res* 2005a;**322**:33–41.
- Lewis SEM, Aitken RJ. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res* 2005b;**322**:33–41.
- Lewis SEM, John Aitken R, Conner SJ, Iuliis GD, Evenson DP, Henkel R, Giwercman A, Gharagozloo P. The impact of sperm DNA damage in assisted

conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. *Reprod Biomed Online* 2013;**27**:325–337.

- Li Y, Lin H, Li Y, Cao J. Association between socio-psycho-behavioral factors and male semen quality: systematic review and meta-analyses. *Fertil Steril* 2011;**95**:116–123.
- Li Z, Wang L, Cai J, Huang H. Correlation of sperm DNA damage with IVF and ICSI outcomes: A systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 2006;**23**:367–376.
- Linschooten JO, Verhofstad N, Gutzkow K, Olsen A-K, Yauk C, Oligschläger Y, Brunborg G, Schooten FJ van, Godschalk RWL. Paternal lifestyle as a potential source of germline mutations transmitted to offspring. *FASEB J* 2013;**27**:2873–2879.
- Lisa Akison, Karen Moritz, Natasha Reid. Adverse reproductive outcomes associated with fetal alcohol exposure: A systematic review. *Reproduction* 2019;REP-18-0607.
- Lohmann L, Chelloug N, Rosales B, Guérin C, Lyonnet S, Jonveaux P, Simon-Bouy B. Dicentric marker derived from chromosome 22 associated with mild clinical signs: a case report. *Prenat Diagn* 2000;**20**:156–158.
- Lopez M, Varlet F. Varicocèle chez l'enfant Mise au point. *Médecine thérapeutique / Pédiatrie* 2009;**12**:10–13.
- López-Teijón M, Elbaile M, Alvarez JG. Geographical differences in semen quality in a population of young healthy volunteers from the different regions of Spain. *Andrologia* 2008;**40**:318–328.
- Ludwig M, Katalinic A, Gross S, Sutcliffe A, Varon R, Horsthemke B. Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples. *J Med Genet* 2005;**42**:289–291.
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF and Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 1997;**386**:251–260.
- Mackay DJG, Temple IK. Human imprinting disorders: Principles, practice, problems and progress. *Eur J Med Genet* 2017;**60**:618–626.
- Mangoli E, Khalili MA, Talebi AR, Ghasemi-Esmailabad S, Hosseini A. Is there any correlation between sperm parameters and chromatin quality with embryo morphokinetics in patients with male infertility? *Andrologia* 2018;**50**:e12997.
- Mansour Ghanaie M, Asgari SA, Dadrass N, Allahkhah A, Iran-Pour E, Safarinejad MR. Effects of varicocele repair on spontaneous first trimester miscarriage: a randomized clinical trial. *Urol J* 2012;**9**:505–513.
- Maor-Sagie E, Cinnamon Y, Yaacov B, Shaag A, Goldsmidt H, Zenvirt S, Laufer N, Richler C, Frumkin A. Deleterious mutation in SYCE1 is associated with non-obstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet* 2015;**32**:887–891.

- Marchetti C, Gallego M-A, Defossez A, Formstecher P, Marchetti P. Staining of human sperm with fluorochrome-labeled inhibitor of caspases to detect activated caspases: correlation with apoptosis and sperm parameters. *Hum Reprod* 2004;**19**:1127–1134.
- Marchetti F, Essers J, Kanaar R, Wyrobek AJ. Disruption of maternal DNA repair increases sperm-derived chromosomal aberrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;**104**:17725–17729.
- Marchetti P. [Apoptosis: basic knowledge and applications]. *Gynecol Obstet Fertil* 2005;**33**:632–641.
- Marchetti P, Marchetti C. [Sperm apoptosis: myth or reality?]. *Gynecol Obstet Fertil* 2009;**37**:562–569.
- Marchiani S, Tamburrino L, Maoggi A, Vannelli GB, Forti G, Baldi E, Muratori M. Characterization of M540 bodies in human semen: evidence that they are apoptotic bodies. *Mol Hum Reprod* 2007;**13**:621–631.
- Mark Woodward, Andrew Neilson. Disorders of sex development - ScienceDirectAvailable from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263931913002342>.
- Marques CJ, Carvalho F, Sousa M, Barros A. Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet* 2004;**363**:1700–1702.
- Marques CJ, João Pinho M, Carvalho F, Bièche I, Barros A, Sousa M. DNA methylation imprinting marks and DNA methyltransferase expression in human spermatogenic cell stages. *Epigenetics* 2011;**6**:1354–1361.
- Martin RH, Rademaker AW. The effect of age on the frequency of sperm chromosomal abnormalities in normal men. *Am J Hum Genet* 1987;**41**:484–492.
- Martin-Hidalgo D, Bragado MJ, Batista AR, Oliveira PF, Alves MG. Antioxidants and Male Fertility: from Molecular Studies to Clinical Evidence. *Antioxidants (Basel)* 2019;**8**.
- Massanyi EZ, Dicarlo HN, Migeon CJ, Gearhart JP. Review and management of 46,XY disorders of sex development. *J Pediatr Urol* 2013;**9**:368–379.
- Mateo S de, Castillo J, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R. Proteomic characterization of the human sperm nucleus. *Proteomics* 2011;**11**:2714–2726.
- Mauduit C, Siddeek B, Benahmed M. [Developmental and environnemental origin of male infertility: role of endocrine disruptors]. *Med Sci (Paris)* 2016;**32**:45–50.
- McElreavey K, Krausz C, Patrat C, Fellous M. [Male infertility and microdeletions of the Y chromosome]. *Gynecol Obstet Fertil* 2002;**30**:405–412.

- McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Herskowitz I, Fellous M. A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;**90**:3368–3372.
- Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 2002;**57**:327–344.
- Mellor J. The dynamics of chromatin remodeling at promoters. *Mol Cell* 2005;**19**:147–157.
- Menezo Y. [Oocyte capacity to repair DNA damage induced in sperm]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2006;**35**:2S19-12S23.
- Menezo Y, Clement P, Amar E. Evaluation of sperm DNA structure, fragmentation and decondensation: an essential tool in the assessment of male infertility. *Transl Androl Urol* 2017;**6**:S553–S556.
- Ménéz YJR, Hazout A, Panteix G, Robert F, Rollet J, Cohen-Bacrie P, Chapuis F, Clément P, Benkhalifa M. Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reprod Biomed Online* 2007;**14**:418–421.
- Menkveld R, Rhemrev JP, Franken DR, Vermeiden JP, Kruger TF. Acrosomal morphology as a novel criterion for male fertility diagnosis: relation with acrosin activity, morphology (strict criteria), and fertilization in vitro. *Fertil Steril* 1996;**65**:637–644.
- Meseguer M, Martínez-Conejero JA, O'Connor JE, Pellicer A, Remohí J, Garrido N. The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a male infertility prognostic factor. *Fertil Steril* 2008;**89**:1191–1199.
- Meseguer M, Rubio I, Cruz M, Basile N, Marcos J, Requena A. Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil Steril* 2012;**98**:1481-1489.e10.
- Meseguer M, Santiso R, Garrido N, García-Herrero S, Remohí J, Fernandez JL. Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertility and Sterility* 2011;**95**:124–128.
- Meyer-Ficca ML, Ihara M, Lonchar JD, Meistrich ML, Austin CA, Min W, Wang Z-Q, Meyer RG. Poly(ADP-ribose) metabolism is essential for proper nucleoprotein exchange during mouse spermiogenesis. *Biol Reprod* 2011;**84**:218–228.
- Meyer-Ficca ML, Lonchar J, Credidio C, Ihara M, Li Y, Wang Z-Q, Meyer RG. Disruption of poly(ADP-ribose) homeostasis affects spermiogenesis and sperm chromatin integrity in mice. *Biol Reprod* 2009;**81**:46–55.
- Mieusset R, Bengoudifa B, Bujan L. Effect of posture and clothing on scrotal temperature in fertile men. *J Androl* 2007;**28**:170–175.

- Mieusset R, Bujan L. Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. *Int J Androl* 1995;**18**:169–184.
- Migdal C, Serres M. [Reactive oxygen species and oxidative stress]. *Med Sci (Paris)* 2011;**27**:405–412.
- Millan NM, Lau P, Hann M, Ioannou D, Hoffman D, Barrionuevo M, Maxson W, Ory S, Tempest HG. Hierarchical radial and polar organisation of chromosomes in human sperm. *Chromosome Res* 2012;**20**:875–887.
- Mínguez-Alarcón L, Hauser R, Gaskins AJ. Effects of bisphenol A on male and couple reproductive health: a review. *Fertil Steril* 2016;**106**:864–870.
- Mishra LN, Gupta N, Rao SMR. Mapping of post-translational modifications of spermatid-specific linker histone H1-like protein, HILS1. *J Proteomics* 2015;**128**:218–230.
- Mishra S, Kumar R, Malhotra N, Singh N, Dada R. Mild oxidative stress is beneficial for sperm telomere length maintenance. *World J Methodol* 2016;**6**:163–170.
- Miskovic S, Culic V, Konjevoda P, Pavelic J. Positive reproductive family history for spontaneous abortion: predictor for recurrent miscarriage in young couples. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012;**161**:182–186.
- Misteli T, Gunjan A, Hock R, Bustin M, Brown DT. Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature* 2000;**408**:877–881.
- Mitra A, Chakraborty B, Mukhopadhyay D, Pal M, Mukherjee S, Banerjee S, Chaudhuri K. Effect of smoking on semen quality, FSH, testosterone level, and CAG repeat length in androgen receptor gene of infertile men in an Indian city. *Syst Biol Reprod Med* 2012;**58**:255–262.
- Montjean D, Zini A, Ravel C, Belloc S, Dalleac A, Copin H, Boyer P, McElreavey K, Benkhalifa M. Sperm global DNA methylation level: association with semen parameters and genome integrity. *Andrology* 2015;**3**:235–240.
- Morado S, Cetica P, Beconi M, Thompson JG, Dalvit G. Reactive oxygen species production and redox state in parthenogenetic and sperm-mediated bovine oocyte activation. *Reproduction* 2013;**145**:471–478.
- Morel F, Laudier B, Guérif F, Couet ML, Royère D, Roux C, Bresson JL, Amice V, De Braekeleer M, Douet-Guilbert N. Meiotic segregation analysis in spermatozoa of pericentric inversion carriers using fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 2007;**22**:136–141.
- Morel F, Mercier S, Roux C, Elmrini T, Clavequin MC, Bresson JL. Interindividual variations in the disomy frequencies of human spermatozoa and their correlation with nuclear maturity as evaluated by aniline blue staining. *Fertil Steril* 1998;**69**:1122–1127.

- Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 2002;**17**:990–998.
- Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JBM. Disruption of telomere-telomere interactions associated with DNA damage in human spermatozoa. *Syst Biol Reprod Med* 2010;**56**:407–412.
- Motato Y, Santos MJ de los, Escriba MJ, Ruiz BA, Remohí J, Meseguer M. Morphokinetic analysis and embryonic prediction for blastocyst formation through an integrated time-lapse system. *Fertil Steril* 2016;**105**:376-384.e9.
- Mozdarani H, Meybodi AM, Karimi H. Impact of pericentric inversion of Chromosome 9 [inv (9) (p11q12)] on infertility. *Indian J Hum Genet* 2007;**13**:26–29.
- Mruk DD, Cheng CY. The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation. *Endocr Rev* 2015;**36**:564–591.
- Mudrak OS, Nazarov IB, Jones EL, Zalensky AO. Positioning of chromosomes in human spermatozoa is determined by ordered centromere arrangement. *PLoS ONE* 2012;**7**:e52944.
- Muratori M, Maggi M, Spinelli S, Filimberti E, Forti G, Baldi E. Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. *J Androl* 2003;**24**:253–262.
- Muratori M, Marchiani S, Maggi M, Forti G, Baldi E. Origin and biological significance of DNA fragmentation in human spermatozoa. *Front Biosci* 2006;**11**:1491–1499.
- Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, Gambera L, Baccetti B, Biagiotti R, Forti G, *et al.* Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl* 2000;**21**:903–912.
- Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S, Cambi M, Olivito B, Azzari C, Forti G, Baldi E. Investigation on the Origin of Sperm DNA Fragmentation: Role of Apoptosis, Immaturity and Oxidative Stress. *Mol Med* 2015;**21**:109–122.
- Muriel L, Garrido N, Fernández JL, Remohí J, Pellicer A, Santos MJ de los, Meseguer M. Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2006;**85**:371–383.
- Muthusami KR, Chinnaswamy P. Effect of chronic alcoholism on male fertility hormones and semen quality. *Fertil Steril* 2005;**84**:919–924.
- Nandipati KC, Pasqualotto FF, Thomas AJ, Agarwal A. Relationship of interleukin-6 with semen characteristics and oxidative stress in vasectomy reversal patients. *Andrologia* 2005;**37**:131–134.

- Narayan G, Raman R. Cytological evaluation of global DNA methylation in mouse testicular genome. *Hereditas* 1995;**123**:275–283.
- Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Anjomshoa M, Rozbahani S, Moulavi F, Mardani M. Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reprod Biomed Online* 2005;**11**:198–205.
- Neelanjana M, Sabaratnam A. Malignant conditions in children born after assisted reproductive technology. *Obstet Gynecol Surv* 2008;**63**:669–676.
- Ng S-F, Lin RCY, Maloney CA, Youngson NA, Owens JA, Morris MJ. Paternal high-fat diet consumption induces common changes in the transcriptomes of retroperitoneal adipose and pancreatic islet tissues in female rat offspring. *FASEB J* 2014;**28**:1830–1841.
- Nijs M, Creemers E, Cox A, Franssen K, Janssen M, Vanheusden E, De Jonge C, Ombelet W. Chromomycin A3 staining, sperm chromatin structure assay and hyaluronic acid binding assay as predictors for assisted reproductive outcome. *Reprod Biomed Online* 2009;**19**:671–684.
- Noblanc A, Damon-Soubeyrand C, Karrich B, Henry-Berger J, Cadet R, Saez F, Guiton R, Janny L, Pons-Rejraji H, Alvarez JG, *et al.* DNA oxidative damage in mammalian spermatozoa: where and why is the male nucleus affected? *Free Radical Biology and Medicine* 2013;**65**:719–723.
- Noblanc A, Kocer A, Drevet JR. Recent knowledge concerning mammalian sperm chromatin organization and its potential weaknesses when facing oxidative challenge. *Basic Clin Androl* 2014;**24**:6.
- Noblanc A, Peltier M, Damon-Soubeyrand C, Kerchkove N, Chabory E, Vernet P, Saez F, Cadet R, Janny L, Pons-Rejraji H, *et al.* Epididymis Response Partly Compensates for Spermatozoa Oxidative Defects in snGPx4 and GPx5 Double Mutant Mice. *PLoS ONE* 2012;**7**:e38565.
- Nospikel T. DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci* 2009;**66**:994–1009.
- Ochsendorf FR. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum Reprod Update* 1999;**5**:399–420.
- O’Connell M, McClure N, Lewis SEM. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod* 2002;**17**:704–709.
- O’Flaherty C, Beconi M, Beorlegui N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrologia* 1997;**29**:269–275.
- Ogur G, Van Assche E, Vegetti W, Verheyen G, Tournaye H, Bonduelle M, Van Steirteghem A, Liebaers I. Chromosomal segregation in spermatozoa of 14 Robertsonian translocation carriers. *Mol Hum Reprod* 2006;**12**:209–215.

- Oguz Y, Guler I, Erdem A, Mutlu MF, Gumuslu S, Oktem M, Bozkurt N, Erdem M. The effect of swim-up and gradient sperm preparation techniques on deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation in subfertile patients. *J Assist Reprod Genet* 2018;**35**:1083–1089.
- Oliva R, De Mateo S, Castillo J, Azpiazu R, Oriola J, Ballescà JL. Methodological advances in sperm proteomics. *Hum Fertil (Camb)* 2010;**13**:263–267.
- Oostingh EC, Steegers-Theunissen RPM, Vries JHM de, Laven JSE, Koster MPH. Strong adherence to a healthy dietary pattern is associated with better semen quality, especially in men with poor semen quality. *Fertil Steril* 2017;**107**:916-923.e2.
- Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;**123**:291–298.
- Pacey A. Is sperm DNA fragmentation a useful test that identifies a treatable cause of male infertility? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2018;**53**:11–19.
- Panner Selvam MK, Agarwal A. A systematic review on sperm DNA fragmentation in male factor infertility: Laboratory assessment. *Arab J Urol* 2018;**16**:65–76.
- Pant N, Kumar G, Upadhyay AD, Gupta YK, Chaturvedi PK. Correlation between lead and cadmium concentration and semen quality. *Andrologia* 2015;**47**:887–891.
- Paoli D, Rizzo F, Fiore G, Pallotti F, Pulsoni A, Annechini G, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L. Spermatogenesis in Hodgkin's lymphoma patients: a retrospective study of semen quality before and after different chemotherapy regimens. *Hum Reprod* 2016;**31**:263–272.
- Park B, McPartland JM, Glass M. Cannabis, cannabinoids and reproduction. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004;**70**:189–197.
- Park JH, Kim SK, Kim J, Kim JH, Chang JH, Jee BC, Kim SH. Relationship between phospholipase C zeta immunoreactivity and DNA fragmentation and oxidation in human sperm. *Obstet Gynecol Sci* 2015;**58**:232–238.
- Peer S, Eltes F, Berkovitz A, Yehuda R, Itsykson P, Bartoov B. Is fine morphology of the human sperm nuclei affected by in vitro incubation at 37 degrees C? *Fertil Steril* 2007;**88**:1589–1594.
- Pellestor F. Differential distribution of aneuploidy in human gametes according to their sex. *Hum Reprod* 1991;**6**:1252–1258.
- Perdrix A, Travers A, Chelli MH, Escalier D, Do Rego JL, Milazzo JP, Mousset-Siméon N, Macé B, Rives N. Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles. *Hum Reprod* 2011;**26**:47–58.
- Perrin A, Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris M-J, Amice J, Amice V, De Braekeleer M. A study of meiotic segregation of chromosomes in spermatozoa of translocation carriers using fluorescent in situ hybridisation. *Andrologia* 2010;**42**:27–34.

- Pfeifer H, Conrad M, Roethlein D, Kyriakopoulos A, Brielmeier M, Bornkamm GW, Behne D. Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB J* 2001;**15**:1236–1238.
- Plymate SR, Bremner WJ, Paulsen CA. The association of D-group chromosomal translocations and defective spermatogenesis. *Fertil Steril* 1976;**27**:139–144.
- Pons-Rejraji H, Artonne C, Sion B, Brugnon F, Canis M, Janny L, Grizard G. Prostatomes: inhibitors of capacitation and modulators of cellular signalling in human sperm. *Int J Androl* 2011;**34**:568–580.
- Pons-Rejraji H, Sion B, Saez F, Brugnon F, Janny L, Grizard G. Rôles des dérivés actifs de l'oxygène (DAO) sur les spermatozoïdes humains et infertilité masculine. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 2009;**37**:529–535.
- Potts JM, Sharma R, Pasqualotto F, Nelson D, Hall G, Agarwal A. Association of ureaplasma urealyticum with abnormal reactive oxygen species levels and absence of leukocytospermia. *J Urol* 2000;**163**:1775–1778.
- Pourquier P, Robert J. [General overview on DNA repair]. *Bull Cancer* 2011;**98**:229–237.
- Print CG, Loveland KL. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays* 2000;**22**:423–430.
- Qin D-D, Yuan W, Zhou W-J, Cui Y-Q, Wu J-Q, Gao E-S. Do reproductive hormones explain the association between body mass index and semen quality? *Asian J Androl* 2007;**9**:827–834.
- Rajewsky F and Muller R. DNA Repair and the Cell Cycle as Targets in Cancer Therapy. *The Cancer Handbook*. 2005:**97**.
- Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Jensen MS, Toft G, Bonde JP. Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. *Hum Reprod* 2007;**22**:188–196.
- Rato L, Alves MG, Dias TR, Lopes G, Cavaco JE, Socorro S, Oliveira PF. High-energy diets may induce a pre-diabetic state altering testicular glycolytic metabolic profile and male reproductive parameters. *Andrology* 2013;**1**:495–504.
- Ravnborg TL, Jensen TK, Andersson A-M, Toppari J, Skakkebaek NE, Jørgensen N. Prenatal and adult exposures to smoking are associated with adverse effects on reproductive hormones, semen quality, final height and body mass index. *Hum Reprod* 2011;**26**:1000–1011.
- Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev* 2002;**12**:162–169.
- Rengan AK, Agarwal A, Linde M van der, Plessis SS du. An investigation of excess residual cytoplasm in human spermatozoa and its distinction from the cytoplasmic droplet. *Reprod Biol Endocrinol* 2012;**10**:92.

- Rex AS, Aagaard J, Fedder J. DNA fragmentation in spermatozoa: a historical review. *Andrology* 2017;**5**:622–630.
- Rhee SG, Woo HA. Multiple functions of peroxiredoxins: peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H₂O₂, and protein chaperones. *Antioxid Redox Signal* 2011;**15**:781–794.
- Ribas-Maynou J, Benet J. Single and Double Strand Sperm DNA Damage: Different Reproductive Effects on Male Fertility. *Genes (Basel)* [Internet] 2019;**10**:.
- Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Abad C, Amengual MJ, Navarro J, Benet J. Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. *Hum Reprod* 2012;**27**:652–658.
- Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Fernández-Encinas A, Abad C, Amengual MJ, Prada E, Navarro J, Benet J. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology* 2013;**1**:715–722.
- Rocca MS, Speltra E, Menegazzo M, Garolla A, Foresta C, Ferlin A. Sperm telomere length as a parameter of sperm quality in normozoospermic men. *Hum Reprod* 2016;**31**:1158–1163.
- Rocheleau CM, Romitti PA, Dennis LK. Pesticides and hypospadias: a meta-analysis. *J Pediatr Urol* 2009;**5**:17–24.
- Rodríguez S, Goyanes V, Segrelles E, Blasco M, Gosálvez J, Fernández JL. Critically short telomeres are associated with sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 2005;**84**:843–845.
- Romero Y, Calvel P, Nef S. [Non-coding small RNAs and spermatogenesis]. *Med Sci (Paris)* 2012;**28**:490–496.
- Roque M, Esteves SC. Effect of varicocele repair on sperm DNA fragmentation: a review. *Int Urol Nephrol* 2018;**50**:583–603.
- Rossi T, Mazzilli F, Delfino M, Dondero F. Improved human sperm recovery using superoxide dismutase and catalase supplementation in semen cryopreservation procedure. *Cell Tissue Bank* 2001;**2**:9–13.
- Roux C, Tripogney C, Joanne C, Bresson JL. [Nuclear quality of the spermatozoon: exploration tests of the chromatin of human spermatozoa (nuclear proteins)]. *Gynecol Obstet Fertil* 2004;**32**:792–798.
- Roux C, Tripogney C, Morel F, Joanne C, Fellmann F, Clavequin MC, Bresson JL. Segregation of chromosomes in sperm of Robertsonian translocation carriers. *Cytogenet Genome Res* 2005;**111**:291–296.
- Rubio I, Galán A, Larreategui Z, Ayerdi F, Bellver J, Herrero J, Meseguer M. Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope. *Fertil Steril* 2014;**102**:1287–1294.e5.

- Sadeghi MR, Hodjat M, Lakpour N, Arefi S, Amirjannati N, Modarresi T, Jadda HH, Akhondi MM. Effects of sperm chromatin integrity on fertilization rate and embryo quality following intracytoplasmic sperm injection. *Avicenna J Med Biotechnol* 2009;**1**:173–180.
- Sakkas D, Percival G, D'Arcy Y, Sharif K, Afnan M. Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection. *Fertil Steril* 2001;**76**:1150–1156.
- Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi GC. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 2003;**7**:428–432.
- Sakkas D, Urner F, Bianchi PG, Bizzaro D, Wagner I, Jaquenoud N, Manicardi G, Campana A. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996;**11**:837–843.
- Sakkas D, Urner F, Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi PG, Shoukir Y, Campana A. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 1998;**13 Suppl 4**:11–19.
- Salas-Huetos A, Bulló M, Salas-Salvadó J. Dietary patterns, foods and nutrients in male fertility parameters and fecundability: a systematic review of observational studies. *Hum Reprod Update* 2017;**23**:371–389.
- Samavat J, Cantini G, Lotti F, Di Franco A, Tamburrino L, Degl'Innocenti S, Maseroli E, Filimberti E, Facchiano E, Lucchese M, *et al.* Massive Weight Loss Obtained by Bariatric Surgery Affects Semen Quality in Morbid Male Obesity: a Preliminary Prospective Double-Armed Study. *Obes Surg* 2018;**28**:69–76.
- Damien Sanlaville D and Turleau C. Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale ; 2010-2011.
- Santi D, Spaggiari G, Simoni M. Sperm DNA fragmentation index as a promising predictive tool for male infertility diagnosis and treatment management - meta-analyses. *Reprod Biomed Online* 2018;**37**:315–326.
- Santiso R, Tamayo M, Gosálvez J, Meseguer M, Garrido N, Fernández JL. Simultaneous determination in situ of DNA fragmentation and 8-oxoguanine in human sperm. *Fertility and Sterility* 2010;**93**:314–318.
- Sasaki H, Matsui Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet* 2008;**9**:129–140.
- Sawyer DE, Mercer BG, Wiklendt AM, Aitken RJ. Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa. *Mutat Res* 2003;**529**:21–34.
- Schaefer CB, Ooi SKT, Bestor TH, Bourc'his D. Epigenetic decisions in mammalian germ cells. *Science* 2007;**316**:398–399.

- Schagdarsurengin U, Paradowska A, Steger K. Analysing the sperm epigenome: roles in early embryogenesis and assisted reproduction. *Nat Rev Urol* 2012;**9**:609–619.
- Schärer OD. Chemistry and biology of DNA repair. *Angew Chem Int Ed Engl* 2003;**42**:2946–2974.
- Sendler E, Johnson GD, Mao S, Goodrich RJ, Diamond MP, Hauser R, Krawetz SA. Stability, delivery and functions of human sperm RNAs at fertilization. *Nucleic Acids Res* 2013;**41**:4104–4117.
- Sepaniak S, Forges T, Gerard H, Foliguet B, Bene M-C, Monnier-Barbarino P. The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation. *Toxicology* 2006;**223**:54–60.
- Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 2005;**20**:3446–3451.
- Sermondade N, Elloumi H, Berthaut I, Mathieu E, Delarouzière V, Ravel C, Mandelbaum J. Progressive alcohol-induced sperm alterations leading to spermatogenic arrest, which was reversed after alcohol withdrawal. *Reprod Biomed Online* 2010;**20**:324–327.
- Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Shayeb AG, Bonde JP, Jensen TK, Van Wely M, Cao J, Martini AC, Eskandar M, *et al.* BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2013;**19**:221–231.
- Setti AS, Figueira RCS, Braga DP a. F, Aoki T, Iaconelli A, Borges E. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection is beneficial in cases of advanced maternal age: a prospective randomized study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013;**171**:286–290.
- Sfontouris IA, Martins WP, Nastri CO, Viana IGR, Navarro PA, Raine-Fenning N, Poel S van der, Rienzi L, Racowsky C. Blastocyst culture using single versus sequential media in clinical IVF: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Assist Reprod Genet* 2016;**33**:1261–1272.
- Shahbazi MN, Scialdone A, Skorupska N, Weberling A, Recher G, Zhu M, Jedrusik A, Devito LG, Noli L, Macaulay IC, *et al.* Pluripotent state transitions coordinate morphogenesis in mouse and human embryos. *Nature* 2017;**552**:239–243.
- Shalgi R, Seligman J, Kosower NS. Dynamics of the thiol status of rat spermatozoa during maturation: analysis with the fluorescent labeling agent monobromobimane. *Biol Reprod* 1989;**40**:1037–1045.
- Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, Schlegel PN, Howards SS, Nehra A, Damewood MD, *et al.* Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril* 2002;**77**:873–882.
- Sharma R, Ahmad G, Esteves SC, Agarwal A. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay using bench top flow cytometer for

evaluation of sperm DNA fragmentation in fertility laboratories: protocol, reference values, and quality control. *J Assist Reprod Genet* 2016;**33**:291–300.

- Sharma RK, Sabanegh E, Mahfouz R, Gupta S, Thiyagarajan A, Agarwal A. TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility. *Urology* 2010;**76**:1380–1386.
- Sheiner EK, Sheiner E, Carel R, Potashnik G, Shoham-Vardi I. Potential association between male infertility and occupational psychological stress. *J Occup Environ Med* 2002;**44**:1093–1099.
- Shen H-M, Chia S-E, Ni Z-Y, New A-L, Lee B-L, Ong C-N. Detection of oxidative dna damage in human sperm and the association with cigarette smoking. *Reproductive Toxicology* 1997;**11**:675–680.
- Shiraishi K, Oka S, Ito H, Matsuyama H. Comparison of the results and complications of retroperitoneal, microsurgical subinguinal, and high inguinal approaches in the treatment of varicoceles. *J Androl* 2012;**33**:1387–1393.
- Showell MG, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;CD007411.
- Showell MG, Mackenzie-Proctor R, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;CD007411.
- Shuai H-L, Ye Q, Huang Y-H, Xie B-G. Comparison of conventional in vitro fertilisation and intracytoplasmic sperm injection outcomes in patients with moderate oligoasthenozoospermia. *Andrologia* 2015;**47**:499–504.
- Simon L, Carrell DT. Sperm DNA damage measured by comet assay. *Methods Mol Biol* 2013;**927**:137–146.
- Simon L, Emery BR, Carrell DT. Review: Diagnosis and impact of sperm DNA alterations in assisted reproduction. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2017;**44**:38–56.
- Sinauer Associates, Inc. and W.H. Freeman & Co. The Science of Biology. *Life Eighth Edition*.2007.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;**175**:184–191.
- Singleton S, Mudrak O, Morshedi M, Oehninger S, Zalenskaya I, Zalensky A. Characterisation of a human sperm cell subpopulation marked by the presence of the TSH2B histone. *Reprod Fertil Dev* 2007;**19**:392–397.
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 2001;**16**:972–978.

- Skulachev VP. Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Lett* 1996;**397**:7–10.
- Smith TB, Dun MD, Smith ND, Curry BJ, Connaughton HS, Aitken RJ. The presence of a truncated base excision repair pathway in human spermatozoa that is mediated by OGG1. *J Cell Sci* 2013;**126**:1488–1497.
- Song GJ, Norkus EP, Lewis V. Relationship between seminal ascorbic acid and sperm DNA integrity in infertile men. *Int J Androl* 2006;**29**:569–575.
- Steger K, Aleithe I, Behre H, Bergmann M. The proliferation of spermatogonia in normal and pathological human seminiferous epithelium: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen. *Mol Hum Reprod* 1998;**4**:227–233.
- Stringer JM, Winship A, Liew SH, Hutt K. The capacity of oocytes for DNA repair. *Cell Mol Life Sci* 2018;**75**:2777–2792.
- Suhag V, Sunita BS, Sarin A, Singh AK, Dashottar S. Fertility preservation in young patients with cancer. *South Asian J Cancer* 2015;**4**:134–139.
- Sullivan R, Mieuisset R. The human epididymis: its function in sperm maturation. *Hum Reprod Update* 2016;**22**:574–587.
- Sun F, Ko E, Martin RH. Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology? *Reprod Biol Endocrinol* 2006;**4**:1.
- Sundvall L, Ingerslev HJ, Breth Knudsen U, Kirkegaard K. Inter- and intra-observer variability of time-lapse annotations. *Hum Reprod* 2013;**28**:3215–3221.
- Svoboda P. Mammalian zygotic genome activation. *Semin Cell Dev Biol* 2018;**84**:118–126.
- Swan SH. Semen quality in fertile US men in relation to geographical area and pesticide exposure. *Int J Androl* 2006;**29**:62–68; discussion 105–108.
- Swan SH, Kruse RL, Liu F, Barr DB, Drobnis EZ, Redmon JB, Wang C, Brazil C, Overstreet JW, Study for Future Families Research Group. Semen quality in relation to biomarkers of pesticide exposure. *Environ Health Perspect* 2003;**111**:1478–1484.
- Szabo S, Tache Y, Somogyi A. The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: a retrospective 75 years after his landmark brief “letter” to the editor# of nature. *Stress* 2012;**15**:472–478.
- Takizawa T, Hatakeyama S. Age-associated changes in microvasculature of human adult testis. *Acta Pathol Jpn* 1978;**28**:541–554.
- Talbert PB, Henikoff S. Histone variants on the move: substrates for chromatin dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017;**18**:115–126.

- Talebi AR, Moein MR, Tabibnejad N, Ghasemzadeh J. Effect of varicocele on chromatin condensation and DNA integrity of ejaculated spermatozoa using cytochemical tests. *Andrologia* 2008a;**40**:245–251.
- Tarozzi N, Bizzaro D, Flamigni C, Borini A. Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2007;**14**:746–757.
- Terquem A., Dadoune JP. Aniline Blue Staining of Human Spermatozoon Chromatin. Evaluation of Nuclear Maturation. *The Sperm Cell* 1983;, p. 696–701. The Sperm Cell. Springer.
- Tesarik J. Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. *Reprod Biomed Online* 2005;**10**:370–375.
- Tesarik J, Hazout A, Mendoza C. Improvement of delivery and live birth rates after ICSI in women aged >40 years by ovarian co-stimulation with growth hormone. *Hum Reprod* 2005;**20**:2536–2541.
- Tesarik J, Martinez F, Rienzi L, Iacobelli M, Ubaldi F, Mendoza C, Greco E. In-vitro effects of FSH and testosterone withdrawal on caspase activation and DNA fragmentation in different cell types of human seminiferous epithelium. *Hum Reprod* 2002;**17**:1811–1819.
- Thilagavathi J, Mishra SS, Kumar M, Vemprala K, Deka D, Dhadwal V, Dada R. Analysis of telomere length in couples experiencing idiopathic recurrent pregnancy loss. *J Assist Reprod Genet* 2013a;**30**:793–798.
- Thilagavathi J, Venkatesh S, Dada R. Telomere length in reproduction. *Andrologia* 2013b;**45**:289–304.
- Thompson BJ, Shang CA, Waters MJ. Identification of genes induced by growth hormone in rat liver using cDNA arrays. *Endocrinology* 2000;**141**:4321–4324.
- Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976;**34**:119–124.
- Torregrosa N, Domínguez-Fandos D, Camejo MI, Shirley CR, Meistrich ML, Ballescà JL, Oliva R. Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. *Hum Reprod* 2006;**21**:2084–2089.
- Tremellen K. Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 2008;**14**:243–258.
- Turner JMA, Aprelikova O, Xu X, Wang R, Kim S, Chandramouli GVR, Barrett JC, Burgoyne PS, Deng C-X. BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation. *Curr Biol* 2004;**14**:2135–2142.
- Turner S, Hartshorne GM. Telomere lengths in human pronuclei, oocytes and spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 2013;**19**:510–518.

- Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I. Cytogenetics of infertile men. *Hum Reprod* 1996;**11 Suppl 4**:1–24; discussion 25–26.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, *et al.* The sequence of the human genome. *Science* 2001;**291**:1304–1351.
- Vercesi AE, Kowaltowski AJ, Grijalba MT, Meinicke AR, Castilho RF. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosci Rep* 1997;**17**:43–52.
- Vermeiden JPW, Bernardus RE. Are imprinting disorders more prevalent after human in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection? *Fertil Steril* 2013;**99**:642–651.
- Virant-Klun I, Tomazevic T, Meden-Vrtovec H. Sperm single-stranded DNA, detected by acridine orange staining, reduces fertilization and quality of ICSI-derived embryos. *J Assist Reprod Genet* 2002;**19**:319–328.
- Viville S, Mollard R, Bach ML, Falquet C, Gerlinger P, Warter S. Do morphological anomalies reflect chromosomal aneuploidies?: case report. *Hum Reprod* 2000;**15**:2563–2566.
- Volpes A, Sammartano F, Rizzari S, Gullo S, Marino A, Allegra A. The pellet swim-up is the best technique for sperm preparation during in vitro fertilization procedures. *J Assist Reprod Genet* 2016;**33**:765–770.
- Vorilhon S, Brugnion F, Kocer A, Dollet S, Bourgne C, Berger M, Janny L, Pereira B, Aitken RJ, Moazamian A, *et al.* Accuracy of human sperm DNA oxidation quantification and threshold determination using an 8-OHdG immuno-detection assay. *Hum Reprod* 2018a;**33**:553–562.
- Vujkovic M, Vries JH de, Dohle GR, Bonsel GJ, Lindemans J, Macklon NS, Spek PJ van der, Steegers E a. P, Steegers-Theunissen RPM. Associations between dietary patterns and semen quality in men undergoing IVF/ICSI treatment. *Hum Reprod* 2009;**24**:1304–1312.
- Wagner L. [Fertility of the aging male]. *Prog Urol* 2004;**14**:577–582.
- Wallace WHB, Anderson RA, Irvine DS. Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? *Lancet Oncol* 2005;**6**:209–218.
- Wallach EE, Liu DY, Baker HWG. Tests of human sperm function and fertilization in vitro. *Fertility and Sterility* 1992;**58**:465–483.
- Walsh TJ, Grady RW, Porter MP, Lin DW, Weiss NS. Incidence of testicular germ cell cancers in U.S. children: SEER program experience 1973 to 2000. *Urology* 2006;**68**:402–405; discussion 405.

- Wang JC. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;**3**:430–440.
- Ward WS. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod* 2010;**16**:30–36.
- Warembourg C, Cordier S, Garlantézec R. An update systematic review of fetal death, congenital anomalies, and fertility disorders among health care workers. *Am J Ind Med* 2017;**60**:578–590.
- Waterland RA, Lin J-R, Smith CA, Jirtle RL. Post-weaning diet affects genomic imprinting at the insulin-like growth factor 2 (Igf2) locus. *Hum Mol Genet* 2006;**15**:705–716.
- Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000;**60–61**:481–492.
- Wdowiak A, Bakalczuk S, Bakalczuk G. The effect of sperm DNA fragmentation on the dynamics of the embryonic development in intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Biol* 2015;**15**:94–100.
- Wdowiak A, Bojar I. Relationship between pregnancy, embryo development, and sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics. *Saudi J Biol Sci* 2016;**23**:598–606.
- Weaver ICG, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* 2004;**7**:847–854.
- Weng S-L, Taylor SL, Morshedi M, Schuffner A, Duran EH, Beebe S, Oehninger S. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod* 2002;**8**:984–991.
- Wheeler BS, Ruderman BT, Willard HF, Scott KC. Uncoupling of genomic and epigenetic signals in the maintenance and inheritance of heterochromatin domains in fission yeast. *Genetics* 2012;**190**:549–557.
- Whitaker RC, Wright JA, Pepe MS, Seidel KD, Dietz WH. Predicting obesity in young adulthood from childhood and parental obesity. *N Engl J Med* 1997;**337**:869–873.
- WHO | WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen 5th ed Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press 2010;
- Wilkins JF, Úbeda F, Van Cleve J. The evolving landscape of imprinted genes in humans and mice: Conflict among alleles, genes, tissues, and kin. *Bioessays* 2016;**38**:482–489.
- Winsor EJ, Palmer CG, Ellis PM, Hunter JL, Ferguson-Smith MA. Meiotic analysis of a pericentric inversion, inv(7) (p22q32), in the father of a child with a duplication-deletion of chromosome 7. *Cytogenet Cell Genet* 1978;**20**:169–184.

- Wolffe AP, Kurumizaka H. The nucleosome: a powerful regulator of transcription. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1998;**61**:379–422.
- Wood MJ, Whittingham DG, Lee SH. Fertilization failure of frozen mouse oocytes is not due to premature cortical granule release. *Biol Reprod* 1992;**46**:1187–1195.
- Woodward M, Neilson A. Disorders of sex development. *Surgery (Oxford)* 2013;**31**:646–651.
- Xella S, Marsella T, Tagliasacchi D, Giulini S, La Marca A, Tirelli A, Volpe A. Embryo quality and implantation rate in two different culture media: ISM1 versus Universal IVF Medium. *Fertil Steril* 2010;**93**:1859–1863.
- Xue X, Wang W-S, Shi J-Z, Zhang S-L, Zhao W-Q, Shi W-H, Guo B-Z, Qin Z. Efficacy of swim-up versus density gradient centrifugation in improving sperm deformity rate and DNA fragmentation index in semen samples from teratozoospermic patients. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2014;**31**:1161.
- Yang Q, Zhang N, Zhao F, Zhao W, Dai S, Liu J, Bukhari I, Xin H, Niu W, Sun Y. Processing of semen by density gradient centrifugation selects spermatozoa with longer telomeres for assisted reproduction techniques. *Reprod Biomed Online* 2015;**31**:44–50.
- Yu B, Huang Z. Variations in Antioxidant Genes and Male Infertility. *Biomed Res Int* 2015;**2015**:513196.
- Yu B, Lin H, Yang L, Chen K, Luo H, Liu J, Gao X, Xia X, Huang Z. Genetic variation in the Nrf2 promoter associates with defective spermatogenesis in humans. *J Mol Med* 2012;**90**:1333–1342.
- Zalata A, El-Samanoudy AZ, Shaalan D, El-Baiomy Y, Mostafa T. In vitro effect of cell phone radiation on motility, DNA fragmentation and clusterin gene expression in human sperm. *Int J Fertil Steril* 2015;**9**:129–136.
- Zamudio N, Chong S and O'Bryan M. Epigenetic regulation in male germ cells. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2008;**2**:131-146.
- Zeyad A, Hamad M, Amor H, Hammadeh ME. Relationships between bacteriospermia, DNA integrity, nuclear protamine alteration, sperm quality and ICSI outcome. *Reprod Biol* 2018;**18**:115–121.
- Zini A, Albert O, Robaire B. Assessing sperm chromatin and DNA damage: clinical importance and development of standards. *Andrology* 2014;**2**:322–325.
- Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *J Androl* 2009;**30**:219–229.
- Zribi N, Feki Chakroun N, El Euch H, Gargouri J, Bahloul A, Ammar Keskes L. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril* 2010;**93**:159–166.