



# L'altération de l'ADN mitochondrial dans l'infertilité masculine

Magalie Boguenet

## ► To cite this version:

Magalie Boguenet. L'altération de l'ADN mitochondrial dans l'infertilité masculine. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2021. Français. NNT : 2021ANGE0060 . tel-03680222

**HAL Id: tel-03680222**

**<https://theses.hal.science/tel-03680222>**

Submitted on 27 May 2022

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

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

# THESE DE DOCTORAT

L'UNIVERSITE D'ANGERS

ECOLE DOCTORALE N° 605

*Biologie Santé*

Spécialité : « *Biologie cellulaire et Biologie de développement* »

Par

**Magalie BOGUENET**

## **L'altération de l'ADN mitochondrial dans l'infertilité masculine**

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 10 Décembre 2021

Unité de recherche : Laboratoire MitoVasc – Equipe MitoLab – UMR CNRS 6015, INSERM U1083

### **Rapporteurs avant soutenance :**

Nelly ACHOUR-FRYDMAN  
Jeanne PERRIN

Professeur d'Université-Praticien Hospitalier, Université Paris Saclay  
Professeur d'Université-Praticien Hospitalier, Université Aix-Marseille

### **Composition du Jury :**

|                       |                                         |                                                                                                                                     |
|-----------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Président :           | Pascal REYNIER                          | Professeur d'Université-Praticien Hospitalier, Université Angers                                                                    |
| Examineurs :          | Fabrice GUERIF<br>Pierre-Emmanuel BOUET | Professeur d'Université-Praticien Hospitalier, Université Tours<br>Professeur d'Université-Praticien Hospitalier, Université Angers |
| Directrice de thèse : | Pascale MAY-PANLOUP                     | Professeur d'Université-Praticien Hospitalier, Université Angers                                                                    |



**L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :**



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

**Consulter la licence creative commons complète en français :**  
**<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>**

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.







# Remerciements

Je remercie l'ensemble des membres de ce jury de thèse : **Nelly Achour-Frydman, Jeanne Perrin, Fabrice Guérif, Pierre-Emmanuel Bouet** et **Pascal Reynier**. Merci énormément pour vos encouragements et votre enthousiasme à l'égard de ma thèse, ainsi qu'au temps accordé à la lecture du manuscrit et à son évaluation.

Je tiens à remercier particulièrement **Pascal Reynier**. Merci d'avoir été présent sur ces 3 années de thèse. Nos réunions et vos conseils m'ont toujours beaucoup apporté. Merci pour votre bienveillance et gentillesse. Vous avez initié ces travaux et je suis fière d'y avoir contribué.

Je remercie **Pierre-Emmanuel Bouet** pour la confiance que vous m'accordez pour la suite. J'ai hâte de commencer cette nouvelle aventure.

Je remercie **Fabrice Guérif** et **Patrice Rodien** pour avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse. Vos remarques ont été très constructrices et bienveillantes sur mes résultats.

Je tiens à remercier très sincèrement ma directrice de thèse, **Pascale May-Panloup**, sans qui ce projet n'existerait pas. Je suis fière du travail que nous avons accompli et très heureuse de pouvoir continuer ces projets de recherche avec vous. Merci pour tout ce que vous m'avez appris, votre présence sans faille, vous êtes une source d'inspiration.

Je tiens à remercier **Daniel Henrion**, directeur de l'unité Mitovasc, et **Guy Lenaers**, directeur de l'équipe Mitolab, pour m'avoir accueillie et donné la possibilité de réaliser cette thèse.

Je remercie toute **l'équipe Mitolab** :

Merci à la FC Dédé (Dédééééé), **Jade, Jérémy, Florian** et **Alexia**. Merci de m'embarquer dans vos conneries à chaque fois (puisque je ne suis jamais auteur de rien), on a gagné ou on n'a pas gagné ?! **Jade**, c'était un plaisir d'être ta voisine de bureau, tu me manques beaucoup. **Florian** et **Jérémy**, dire que l'on est arrivé en thèse en même temps et que vous m'avez abandonné dans cette dernière ligne droite... Mais promis je serai toujours là pour vous dire de ne rien lâcher ! **Charlène, Charlotte** et **Alexia**, merci pour tous les moments partagés autour d'un goûter, courage pour la suite, vous êtes l'avenir ! Merci à toi **Aurélie**, qui a tant donné pour ce labo, tu es devenue une amie. A **Nancy**, merci d'être une vraie tornade, on s'ennuie un peu je dois te l'avouer depuis que tu es partie, merci pour ce câlin de PCR qui était si réconfortant. Merci à toi **Anaïs** de te battre tous les jours pour que tout se passe bien, tu es formidable ! A **Steph**, merci pour tes conseils au labo et ces bons moments sportifs en dehors (ou autour d'un mojito). A **Yannick**, merci pour tous les conseils que tu peux donner, tu es toujours prêt à donner un coup de main. Merci à **Sophie**, ça été un vrai plaisir de partager le NGS et ces galères avec toi. **Morgane**, merci pour cette liste si longue à prendre en compte avant d'être Maman et à tous ces bons moments en salle de pause. Merci à **Majida** pour tous tes conseils en biologie moléculaire. Merci à toi **Caroline** pour ta joie de vivre et ce sourire éclatant, soo cuute. Merci **Cinzia** pour toutes ces heures passées à analyser les données de métabo. C'est un vrai plaisir de travailler avec toi. Ta bonne humeur et ton sourire font qu'on ne peut pas te refuser de « Coucou café ? » avec le TMV. Merci à **Salim**, ça été un réel plaisir de partager ce TP avec toi lors des Summer School. **Arnaud**, merci pour ta patience à regarder des spermatozoïdes en Storm. Merci à **Olivier**, pour ce souvenir de cette journée Meetochondrie, ta bonne



humeur et les pauses musicales. Merci également à **Naïg** même si je n'ai pas eu l'occasion de faire de la biochimie. Merci à nos secrétaires, **Catherine, Catherine** et **Carole** sans qui nous ne pourrions pas travailler.

**Valérie, David** et **Céline**, je vous remercie infiniment. Que dire sur toute l'aide que vous m'avez apportée. J'ai pu compter sur vous à chaque moment, et mes pauvres il y en a eu. Ces petits spermatozoïdes nous auront mené la vie dure ! **Val**, merci d'être aussi présente, patiente et formidable, tu m'apportes toujours les réponses dont j'ai besoin. **David**, ta bonne humeur et tes blagues nous manquent au 2<sup>ème</sup>. Merci pour toute ton aide précieuse et ces super nouveaux eklipses ! **Céline**, merci pour toutes ces connaissances apportées sur le séquençage, c'est toujours un plaisir de discuter avec toi.

Merci à tous les stagiaires qui sont passés au labo et pour tous les bons moments passés, **Paul, Rodrigo, Sarah, Apolline, Sara, Ghita, Aymane, Théophile. Cécile**, merci d'avoir égayé le bureau avec toutes tes histoires, c'était un vrai plaisir de t'avoir avec nous. **Margaux**, merci pour ta gentillesse au quotidien et ton écoute. Sans oublier **Pauline** et **Jeanne**, mes deux premières stagiaires, j'espère vous avoir apporté autant que vous m'avez apporté sur l'encadrement.

Merci aux pièces rapportées de Mitolab, **Julien, Tristan, Pauline, Léa, Matthieu, Maxime** et **Guillaume**, c'est toujours un plaisir de boire un verre avec vous et même de passer des supers week-ends ;)

Un grand merci au service d'AMP, **Véronique, Lisa, Léa, Orianne, Damien, Cynthia, Myriam, Barbara, Stéphanie, Erika, Marie** et **Marie-Odile**. Merci pour votre accueil et votre aide pour cette belle collecte de spermatozoïdes, c'est toujours un plaisir de venir vous voir !

Aux techniciens de biochimie et génétique, **Sandrine, Aurélie, Alexandra, Maryse, Philippe** et **Christelle**, merci de toute l'aide que vous m'avez apportée pour séquencer mes petits spermatozoïdes.

Je remercie **Jérôme Cayon** pour l'apprentissage de la PCR digitale.

Un grand merci à **Charles** et **Guillaume** pour l'apprentissage de la recherche lors de mon M2. **Guillaume**, merci de m'avoir initié au reviewing, ton côté pédagogue est toujours incroyable. Ce n'est pas tous les jours que l'on vous propose du sperme de primate ! Ce métier est fantastique !

**Peggy**, je ne te remercierai jamais assez de toute ton aide, tes conseils, ta gentillesse. Tu m'as toujours encouragé à continuer pour obtenir ce qui me tenait à cœur. Tu fais partie des personnes indispensables et que l'on veut dans son équipe !

Un grand merci aux imprévus, aux galères, aux échecs, aux erreurs, au covid, à Repli-g, aux délais de livraison, à ces phrases cultes « je n'ai jamais vu ça ! » ou « tiens c'est marrant », et j'en passe la liste est longue. Ces 3 années de thèse ne seraient pas pareil sans vous mais toutes ces choses font que la réussite est plus savoureuse.



A toute ma **Famille**,

**Maman et Papa**, merci de tout cœur de m'avoir soutenue toutes ces années, même si ça vous a fait peur parfois. Promis après 9 ans je m'arrête, on est loin du CAP coiffure d'Aucaleuc. Tu sais Papa, le plus important est de participer ;). **Coline**, je regrette les années où nous n'avons pas réussi à s'entendre quand je vois comment on y arrive maintenant, merci d'être comme tu es. Même si ce sont des mots que l'on ne prononce jamais, ça ne veut pas dire qu'on ne les pense pas, je vous aime.

A mes grands-parents. **Papy**, je n'ai pas pris ton côté littéraire mais j'aurai tout de même écrit un roman scientifique. **Mamie Thé**, j'aurais aimé que tu sois là pour continuer de nous voir grandir. J'espère que tu es toujours fière de nous de là où tu es. **Mamie Lou**, merci énormément pour toutes les valeurs que tu m'as transmises, à toutes ces parties de belotte et aux après-midi à regarder le Tour de France ! **Ma Marraine**, merci d'avoir pris soin de moi toutes ces années, c'est à mon tour !

A ma belle-famille, **Catherine, Pascal, Françoise, Antoine, Julien et Margaux**. Merci de m'avoir si bien accueillie, à tous ces bons moments passés et à venir.

A mes **Amis**, merci d'être toujours présents, de faire partie de ma vie, quoi qu'il arrive, de toujours envoyer du rêve, vous êtes si importants.

**Marie**, mon âme sœur, je suis si fière de l'amitié que nous avons créée, tu me comprends sans avoir besoin de parler. **Rodolphe**, mon ami de toujours et pour toute la vie désormais. **Romi**, ma jumelle, venir faire de la gym a été une des meilleures décisions de ta vie. **Manon**, à toutes ces années passées à tes côtés, rien n'aurait été pareil sans toi. **Les Biopotes, Alexia, Lisa, Audrey, Damien, Damien, Nathan** et **Marion** (ma pièce rapportée préférée). L'apprentissage de la biologie a commencé avec vous, petit clin d'œil aux rattrapages et à la SNER. Bientôt 10 ans, j'ai vécu mes plus belles années à vos côtés et j'espère que ça va continuer même si maintenant nous sommes des adultes « responsables ». Est-ce qu'on ne retournerait pas à l'Espace avec des moustaches ? **Le groupe des gens fiables, Caro, Alexis, Hono, Ju, Flo** et **Alban** il s'en est passé des choses en 2 ans, ma team échec, regardez ce que l'on est devenu, qui l'eut cru (lustucru) ? Notre expérience avec les béliers nous lie à jamais. **Caro**, mon petit binôme, je me souviendrai toujours de cette rencontre dans l'amphi où tu m'avais choisie pour être ta copine. **Alexis**, tu fais ressortir le côté fou des gens, c'est ce que j'aime dans les moments passés ensemble. Cette thèse est aussi à toi.

Merci aux nouveaux copains, apportés par Bastien, à tous ces bons moments et à tous les prochains. **Js**, une mention spéciale pour cette superbe diapo pour MT180s, j'adore remettre tes schémas de spermatozoïde et d'ovocyte dans mes présentations !

**Bastien**, ton soutien et ton amour est ce qui m'est de plus important. Merci d'être présent dans tous les moments de la vie, des plus drôles aux plus difficiles. Merci de m'avoir supportée ces derniers temps, de m'avoir aidée et épaulée comme jamais. Je suis fière que tu sois mon amoureux et de faire ma vie à tes côtés. Je t'aime.



## SOMMAIRE

### REMERCIEMENTS

### AVANT-PROPOS

### PUBLICATIONS

### COMMUNICATIONS

### ABREVIATIONS

## INTRODUCTION ..... 2

|           |                                                                        |           |
|-----------|------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.</b> | <b>L'infertilité masculine .....</b>                                   | <b>2</b>  |
| 1.1.      | Infertilité et enjeux de la recherche .....                            | 2         |
| 1.2.      | Reproduction masculine : physiologie .....                             | 2         |
| 1.2.1.    | Généralités sur l'appareil reproducteur masculin .....                 | 2         |
|           | a) Spermatogenèse.....                                                 | 4         |
|           | b) Structure d'un spermatozoïde .....                                  | 6         |
|           | c) Transit épидидymaire.....                                           | 8         |
|           | d) Liquide séminal.....                                                | 8         |
| 1.3.      | Reproduction masculine : pathologie .....                              | 8         |
| 1.3.1.    | Analyse du sperme .....                                                | 8         |
|           | a) Spermogramme.....                                                   | 10        |
|           | b) Spermocytogramme.....                                               | 10        |
| 1.3.2.    | Analyse du liquide séminal.....                                        | 10        |
| 1.3.3.    | Baisse de la fertilité humaine ?.....                                  | 10        |
| 1.3.4.    | Etiologies de l'infertilité masculine .....                            | 12        |
| <b>2.</b> | <b>Les OMICs dans l'infertilité masculine .....</b>                    | <b>12</b> |
| 2.1.      | Définition des OMICs.....                                              | 12        |
| 2.2.      | Les OMICs dans l'infertilité masculine .....                           | 12        |
| 2.2.1.    | Le séquençage haut débit .....                                         | 14        |
| 2.2.2.    | La métabolomique .....                                                 | 14        |
| <b>3.</b> | <b>Mitochondrie et infertilité masculine.....</b>                      | <b>16</b> |
| 3.1.      | Généralités sur la mitochondrie .....                                  | 16        |
| 3.1.1.    | Définition – Origine.....                                              | 16        |
| 3.1.2.    | Morphologie – Structure .....                                          | 18        |
| 3.1.3.    | Rôle énergétique .....                                                 | 18        |
| 3.1.4.    | Dynamique mitochondriale .....                                         | 20        |
| 3.1.5.    | Génome mitochondrial .....                                             | 20        |
|           | a) Généralités.....                                                    | 20        |
|           | b) Réplication de l'ADNmt .....                                        | 22        |
|           | c) Transcription et traduction .....                                   | 24        |
|           | d) Transmission .....                                                  | 26        |
|           | e) Haplogroupes mitochondriaux .....                                   | 26        |
|           | f) Pseudogènes .....                                                   | 28        |
|           | g) Les pathologies mitochondriales .....                               | 28        |
|           | h) Altérations de l'ADNmt .....                                        | 30        |
| 3.2.      | Rôle des mitochondries dans l'infertilité masculine .....              | 34        |
| 3.2.1.    | Mitochondrie et spermatogenèse .....                                   | 34        |
|           | a) Morphologie mitochondriale lors de la spermatogenèse.....           | 34        |
|           | b) Rôle énergétique des mitochondries lors de la spermatogenèse .....  | 36        |
|           | c) Rôle de la dynamique mitochondriale lors de la spermatogenèse ..... | 36        |
| 3.2.2.    | Mitochondrie spermatique et infertilité .....                          | 36        |

## OBJECTIFS DE LA THESE..... 64

## MATERIELS ET METHODES..... 66

|           |                                        |           |
|-----------|----------------------------------------|-----------|
| <b>1.</b> | <b>Cohorte de patients .....</b>       | <b>66</b> |
| 1.1.      | Inclusion des patients à l'étude ..... | 66        |
| 1.2.      | Préparation des échantillons .....     | 66        |





|                                        |                                                                                                                                                                                                            |            |
|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>2.</b>                              | <b>Etude de l'ADNmt .....</b>                                                                                                                                                                              | <b>68</b>  |
| 2.1.                                   | Extraction de l'ADN total des spermatozoïdes .....                                                                                                                                                         | 68         |
| 2.2.                                   | PCR digitale .....                                                                                                                                                                                         | 68         |
| 2.3.                                   | Séquençage haut débit (NGS) .....                                                                                                                                                                          | 70         |
| 2.3.1.                                 | Amplification de l'ADNmt .....                                                                                                                                                                             | 70         |
| 2.3.2.                                 | Construction d'une librairie .....                                                                                                                                                                         | 70         |
| 2.3.3.                                 | PCR en émulsion et séquençage .....                                                                                                                                                                        | 72         |
| 2.3.4.                                 | Traitement bio-informatique .....                                                                                                                                                                          | 72         |
| 2.3.5.                                 | Isolement de l'ADNmt circulaire .....                                                                                                                                                                      | 74         |
| <b>3.</b>                              | <b>Etude métabolomique du liquide séminal.....</b>                                                                                                                                                         | <b>76</b>  |
| 3.1.                                   | Stratégie de l'étude .....                                                                                                                                                                                 | 76         |
| 3.2.                                   | Kit biocrates.....                                                                                                                                                                                         | 76         |
| 3.3.                                   | Analyses des données de métabolomique.....                                                                                                                                                                 | 78         |
| <b>RESULTATS .....</b>                 |                                                                                                                                                                                                            | <b>80</b>  |
| <b>1.</b>                              | <b>Etude du génome mitochondrial d'hommes oligoasthénospermiques sévères .....</b>                                                                                                                         | <b>80</b>  |
| 1.1.                                   | Le séquençage haut débit couplé à la PCR digitale montre que la réduction du contenu en ADNmt dans les spermatozoïdes les plus fertiles s'accompagne d'une augmentation de la dégradation de l'ADNmt. .... | 80         |
| 1.2.                                   | Le défi de l'amplification de l'ADNmt des spermatozoïdes.....                                                                                                                                              | 134        |
| <b>2.</b>                              | <b>Signature métabolomique dans le liquide séminal d'hommes oligoasthénospermiques sévères</b>                                                                                                             | <b>134</b> |
| <b>DISCUSSION .....</b>                |                                                                                                                                                                                                            | <b>146</b> |
| <b>1.</b>                              | <b>Le génome mitochondrial des spermatozoïdes .....</b>                                                                                                                                                    | <b>146</b> |
| <b>2.</b>                              | <b>La métabolomique dans le cadre d'une infertilité masculine .....</b>                                                                                                                                    | <b>148</b> |
| <b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b> |                                                                                                                                                                                                            | <b>152</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>             |                                                                                                                                                                                                            | <b>154</b> |
| <b>TABLES DES ILLUSTRATIONS .....</b>  |                                                                                                                                                                                                            | <b>162</b> |
| <b>TABLE DES TABLEAUX.....</b>         |                                                                                                                                                                                                            | <b>164</b> |



# Avant-propos

Ce travail de thèse a été réalisé dans l'unité MitoVasc, équipe de recherche MitoLab (Inserm U1083, CNRS 6015) en collaboration avec le service de Biologie de la Reproduction du CHU d'Angers dirigé par le Professeur Pascale May-Panloup, directrice de ces travaux de thèse. La collaboration entre ce service et la recherche existe depuis plusieurs années sur le thème « reproduction et mitochondrie », autant sur le plan féminin que masculin. Mon projet se situe dans la continuité des travaux de l'équipe et porte sur l'infertilité masculine, en étudiant d'une part l'ADNmt des spermatozoïdes et d'autre part le liquide séminal d'hommes infertiles.

L'infertilité est un véritable enjeu de santé publique puisqu'elle concerne au moins 50 millions de couples dans le monde. Les différentes techniques d'Aide Médicale à la Procréation (AMP) tentent de palier aux problèmes d'infertilité des couples, cependant le taux de réussite reste relativement faible. La compréhension de tous les mécanismes en lien avec l'infertilité est nécessaire afin de mieux accompagner les couples dans leur désir d'enfant. L'infertilité est d'origine masculine dans la moitié des cas et les causes sont multifactorielles. Les dysfonctions mitochondriales pourraient en être l'une de ces causes. En effet, les mitochondries sont au cœur du métabolisme des spermatozoïdes et sont impliquées dans la production d'énergie, l'équilibre redox et la régulation du calcium, ainsi que dans les voies apoptotiques, tous ces éléments étant nécessaires à la motilité flagellaire, à la capacitation, à la réaction acrosomique et à la fusion gamétique. L'altération des fonctions mitochondriales pourraient être liées à la baisse de la qualité du sperme et à l'infertilité.

Ce travail de recherche avait pour objectif principal d'approfondir nos connaissances sur le lien entre le génome mitochondrial des spermatozoïdes et l'infertilité masculine, mais aussi d'évaluer l'environnement métabolique des spermatozoïdes en cas d'altération des paramètres spermatiques. Dans ce but, nous avons développé les technologies omiques de séquençage haut débit et de métabolomique, respectivement sur l'ADNmt des spermatozoïdes et le liquide séminal sur une cohorte de patients.

La rédaction de cette thèse se présente sous un format article. Elle débute avec une introduction bibliographique suivie d'une revue publiée en 2021 dans *Human Reproduction Update* sur le rôle de la mitochondrie dans les spermatozoïdes et l'infertilité masculine. La section « matériels et méthodes » permet de détailler les différentes techniques utilisées et les différentes analyses effectuées à partir d'une seule cohorte de patients (20 hommes Oligo-Asthénospermiques et 24 hommes fertiles). Les résultats sont présentés en 2 parties. La première porte sur l'évaluation de l'ADNmt des spermatozoïdes et présente un article soumis sur la quantification et le séquençage haut débit de l'ADNmt des spermatozoïdes. La seconde partie concerne la métabolomique du liquide séminal avec un article publié dans *Andrology* paru en 2020. Enfin sont discutés les résultats obtenus et l'importance de la mitochondrie et de son génome dans la qualité gamétique, ainsi que les perspectives ouvertes par ces études.



## Publications

**Boguenet M**, Desquiret-Dumas V, Goudenège D, Bris C, Boucret L, Blanchet O, Procaccio V, Bouet P-E, Reynier P and May-Panloup P. Deep sequencing coupled with digital PCR shows that mitochondrial DNA content reduction in the most fertile spermatozoa is accompanied by increased mtDNA degradation. *Human Reproduction* (soumis)

**Boguenet M**, Bouet P-E, Spiers A, Reynier P, May-Panloup P. Mitochondria: their role in spermatozoa and in male infertility. *Human Reproduction Update* 2021:dmab001.

May-Panloup P, **Boguenet M**, El Hachem H, Bouet P-E, Reynier P. Embryo and Its Mitochondria. *Antioxidants* 2021;**10**:139.

Aurrière J, Goudenège D, Baris OR, **Boguenet M**, May-Panloup P, Lenaers G, Khiati S. Cancer/Testis Antigens into mitochondria: a hub between spermatogenesis, tumorigenesis and mitochondrial physiology adaptation. *Mitochondrion* 2021;**56**:73–81.

**Boguenet M**, Bocca C, Bouet P, Serri O, Chupin S, Tessier L, Blanchet O, El Hachem H, Chao de la Barca JM, Reynier P, *et al.* Metabolomic signature of the seminal plasma in men with severe oligoasthenospermia. *Andrology* 2020:andr.12882.



## Communications

| <b>Titre</b>                                                                                                                                                                       | <b>Désignation et lieu du congrès</b>                                       | <b>Type de Communication</b> | <b>Date</b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-------------|
| Les mutations homozygotes du gène <i>ARMC2</i> sont responsables d'infertilité masculine primaire due à des anomalies morphologiques multiples du flagelle du spermatozoïde (MMAF) | SALF – Paris<br><br>Prix Junior Master                                      | Communication orale          | 01.2019     |
| L'altération de l'ADN mitochondrial dans l'infertilité masculine                                                                                                                   | GDR Reprosciences – Visioconférence<br><br>Prix doctorant                   | Communication orale          | 04.2021     |
| L'altération de l'ADN mitochondrial dans l'infertilité masculine                                                                                                                   | Journée SFR ICAT Angers – Visioconférence<br><br>Prix doctorant             | Communication orale          | 06.2021     |
| Rôle des mitochondries dans le spermatozoïde et l'infertilité masculine                                                                                                            | Assemblée générale des BLEFCO – Visioconférence<br><br>Prix Jeune chercheur | Communication orale          | 06.2021     |
| Rôle des mitochondries dans le spermatozoïde et l'infertilité masculine                                                                                                            | FFER - Rennes                                                               | Communication affichée       | 09.2021     |





## Abréviations

|          |                                                                                 |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------|
| ABM      | Agence de la biomédecine                                                        |
| ACP      | Analyse en Composantes Principales                                              |
| ADN      | Acide Désoxyribo-Nucléique                                                      |
| ADNmt    | Acide Désoxyribo-Nucléique mitochondrial                                        |
| AMP      | Assistance Médicale à la Procréation                                            |
| ANO      | Azoospermie Non-Obstructive                                                     |
| AO       | Azoospermie Obstructive                                                         |
| ARNm     | Acide Ribo-Nucléique messenger                                                  |
| ARNr     | Acide Ribo-Nucléique ribosomal                                                  |
| ARNt     | Acide Ribo-Nucléique de transfert                                               |
| ATP      | Adénosine-5-TriPhosphate                                                        |
| BAX      | Gène nucléaire BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator                           |
| BHT      | Barrière Hémato-Testiculaire                                                    |
| BLAT     | BLAST-like Alignment Tool                                                       |
| dPCR     | PCR digitale                                                                    |
| DRP1     | Dynamin-Related Protein 1                                                       |
| FAD      | Flavine Adénine Dinucléotide                                                    |
| FADH2    | Forme réduite de la Flavine Adénine Dinucléotide                                |
| FIA      | Flow Injection Analysis                                                         |
| FIS1     | Fission protein 1                                                               |
| FIV      | Fécondation In Vitro                                                            |
| HSP      | Promoteur du brin lourd                                                         |
| ICSI     | Intra-Cytoplasmic Sperm Injection                                               |
| IGV      | Integrative Genome Viewer                                                       |
| IIU      | Insémination Intra-Uterine                                                      |
| LC-MS/MS | Chromatographie en phase liquide avec spectrométrie de masse en tandem          |
| LS       | Liquide séminal                                                                 |
| LSP      | Promoteur du brin léger                                                         |
| MFF      | Mitochondrial Fission Factor                                                    |
| MFN      | MitoFusin protein                                                               |
| MS       | Mass Spectrometry                                                               |
| MT-ATP6  | Gène mitochondrial codant pour la sous-unité 6 de l'ATP synthase F1             |
| MT-ATP8  | Gène mitochondrial codant pour la sous-unité 8 de l'ATP synthase F0             |
| MT-COI   | Gène mitochondrial codant pour la sous-unité 1 du complexe Cytochrome c oxidase |
| MT-COII  | Gène mitochondrial codant pour la sous-unité 2 du complexe Cytochrome c oxidase |
| MT-COIII | Gène mitochondrial codant pour la sous-unité 3 du complexe Cytochrome c oxidase |
| MT-CYB   | Gène mitochondrial codant pour le Cytochrome B                                  |
| MT-ND1   | Gène mitochondrial codant pour la sous-unité 1 du complexe NADH Dehydrogenase   |



|           |                                                                                |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------|
| MT-ND2    | Gène mitochondrial codant pour la sous-unité 2 du complexe NADH Dehydrogenase  |
| MT-ND3    | Gène mitochondrial codant pour la sous-unité 3 du complexe NADH Dehydrogenase  |
| MT-ND4    | Gène mitochondrial codant pour la sous-unité 4 du complexe NADH Dehydrogenase  |
| MT-ND4L   | Gène mitochondrial codant pour la sous-unité 4L du complexe NADH Dehydrogenase |
| MT-ND5    | Gène mitochondrial codant pour la sous-unité 5 du complexe NADH Dehydrogenase  |
| MT-ND6    | Gène mitochondrial codant pour la sous-unité 6 du complexe NADH Dehydrogenase  |
| mtSSB     | Mitochondrial Single-stranded DNA-binding protein                              |
| NADH      | Forme réduite du Nicotinamide adénine dinucléotide                             |
| NGS       | Next Generation Sequencing                                                     |
| NUMTs     | Nuclear-encoded mitochondrial sequences                                        |
| OA ou SOA | oligo-asthénospermie ou sévère oligo-asthénospermie                            |
| OATs      | Oligo-asthéo-tératospermie                                                     |
| OH        | Origine de répllication du brin lourd                                          |
| OL        | Origine de répllication du brin léger                                          |
| OMS       | Organisation Mondiale de la Santé                                              |
| OPA1      | Optic Atrophy 1                                                                |
| OPLS-DA   | Orthogonal Projection to Latent Structure – Discriminant Analysis              |
| OXPHOS    | Chaîne de phosphorylation oxydative                                            |
| PCR       | Polymerase Chain Reaction                                                      |
| POLy      | Sous-unité catalytique de la Polymérase gamma                                  |
| POLRMT    | ARN Polymérase mitochondriale                                                  |
| qPCR      | PCR quantitative                                                               |
| ROS       | Reactive Oxygen Species                                                        |
| SNP       | Single Nucleotide Polimorphism                                                 |
| TEFM      | Transcription Elongation Factor                                                |
| TESE      | Testicular Sperm Extraction                                                    |
| TFAM      | Transcription Factor A Mitochondrial                                           |
| TFB2M     | Transcription Factor B2, Mitochondrial                                         |
| TMSC      | Total Motile Sperm Count                                                       |

# Infertilité

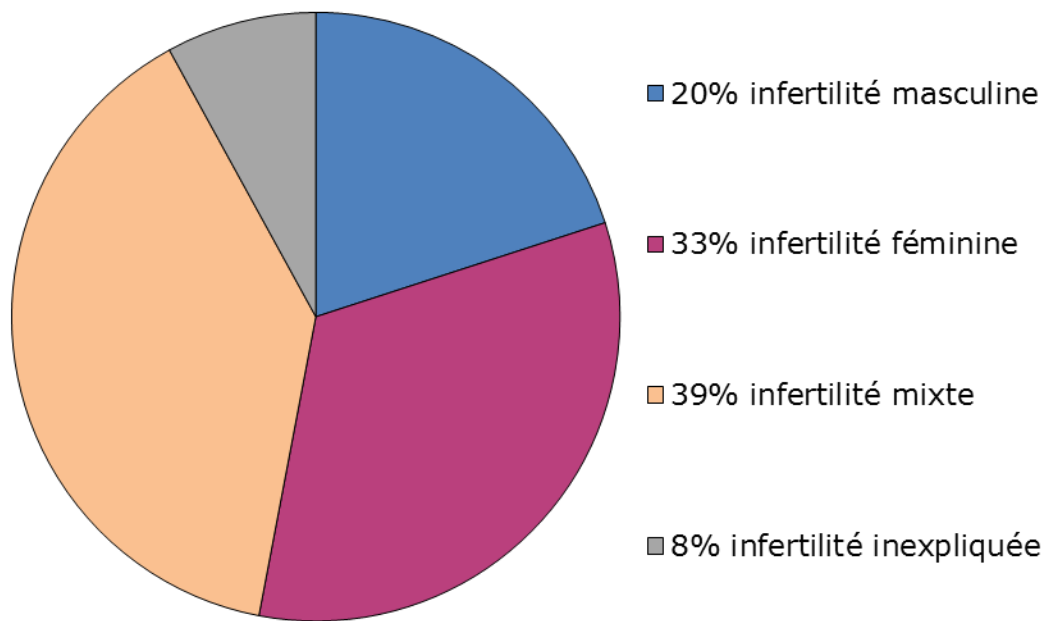


Figure 1 : Représentation de la prévalence de l'infertilité.

Ces données sont issues d'une étude sur 1686 couples (D'après (Thonneau *et al.*, 1991).

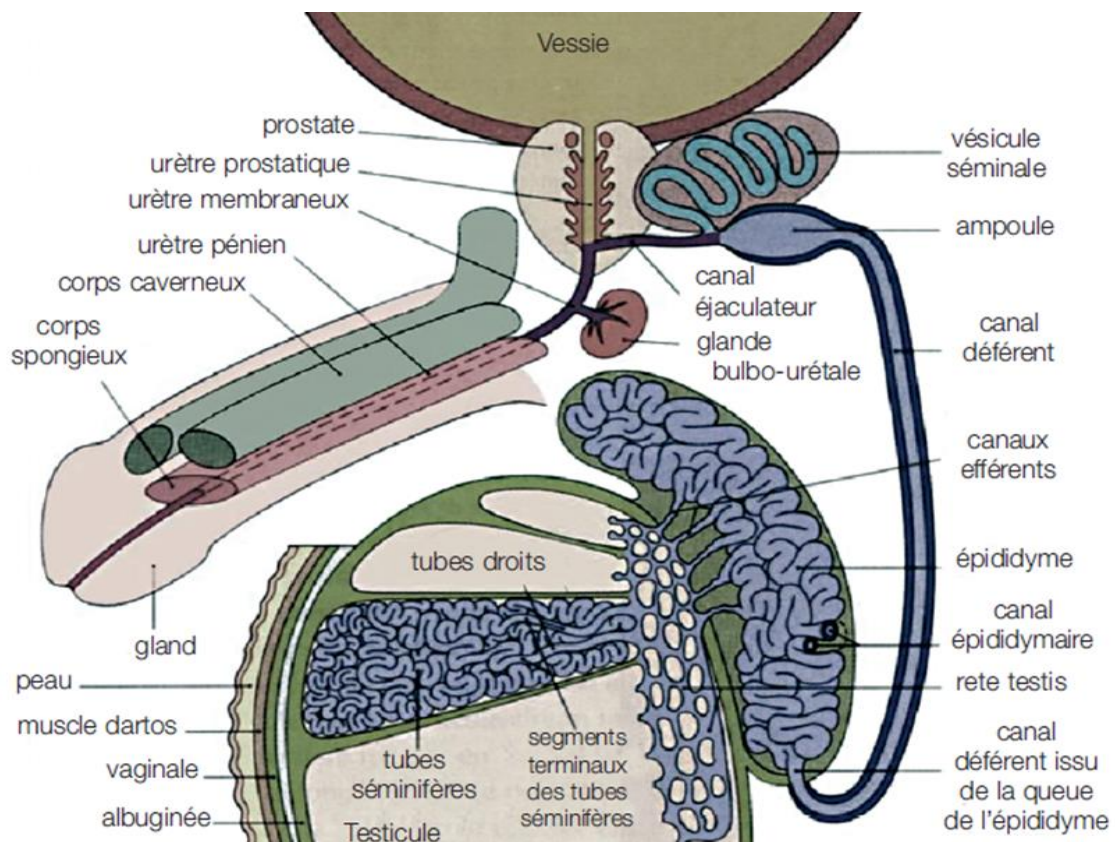


Figure 2 : Anatomie de l'appareil génital chez l'homme.

(D'après (*Exploration de la fonction de reproduction : versant masculin*, 2009))

# Introduction

## 1. L'infertilité masculine

### 1.1. Infertilité et enjeux de la recherche

L'infertilité est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme étant l'incapacité pour un couple de concevoir un enfant après 12 mois d'essai sans contraception. Au moins 50 millions de couples (Mascarenhas *et al.*, 2012), et plus de 30 millions d'hommes (Agarwal *et al.*, 2015) sont exposés à l'infertilité dans le monde, faisant de celle-ci un véritable enjeu de santé publique. Les différentes techniques d'Aide Médicale à la Procréation (AMP) tentent de palier aux problèmes d'infertilité des couples, cependant le taux de réussite reste relativement faible (17% de naissances vivantes, toutes tentatives d'AMP confondues, en 2018, selon le rapport de l'Agence de la Biomédecine (ABM)).

La première étape de prise en charge des couples en AMP consiste en la réalisation d'un bilan d'infertilité permettant de déterminer les causes de l'infertilité et de définir la technique d'AMP adéquate à utiliser pour y remédier. Plusieurs techniques sont réalisables, l'Insémination Intra-Utérine (IIU), la Fécondation In-Vitro classique (FIV) et la FIV avec ICSI (Intra cytoplasmic Sperm Injection), le Transfert d'Embryon Congelé (TEC), le Diagnostic Pré-Implantatoire (DPI), le don de gamètes... (Barberet *et al.*, 2018). La part des enfants issus de l'AMP croît régulièrement, et en 2018 3.3% des enfants nés étaient issus d'AMP, soit 25120 enfants (ABM, 2019).

L'infertilité est une pathologie hétérogène pouvant résulter de différents facteurs individuels mais aussi de facteurs liés au mode de vie et à l'environnement (perturbateurs endocriniens, pesticides, exposition à la chaleur...). La compréhension des mécanismes sous tendant l'infertilité est nécessaire afin de mieux accompagner les couples dans leur désir d'enfant et d'améliorer l'efficacité de leur prise en charge.

L'infertilité est d'origine masculine dans 20% des cas, dans 33% d'origine féminine, dans 39% d'origine mixte et les 8% restant résultent d'une infertilité inexpliquée (Figure 1) (Thonneau *et al.*, 1991). L'infertilité masculine est la résultante d'une altération dans les processus de spermatogenèse et/ou de transit des spermatozoïdes dans les voies séminales. Elle est généralement caractérisée par des anomalies des paramètres spermatiques mises en évidence au cours de l'examen de sperme réalisé dans le cadre du bilan d'infertilité du couple.

### 1.2. Reproduction masculine : physiologie

#### 1.2.1. Généralités sur l'appareil reproducteur masculin

L'appareil reproducteur masculin est composé des testicules, de l'épididyme, des canaux déférents, des canaux éjaculateurs et de l'urètre (Figure 2).

## Spermatogenesis

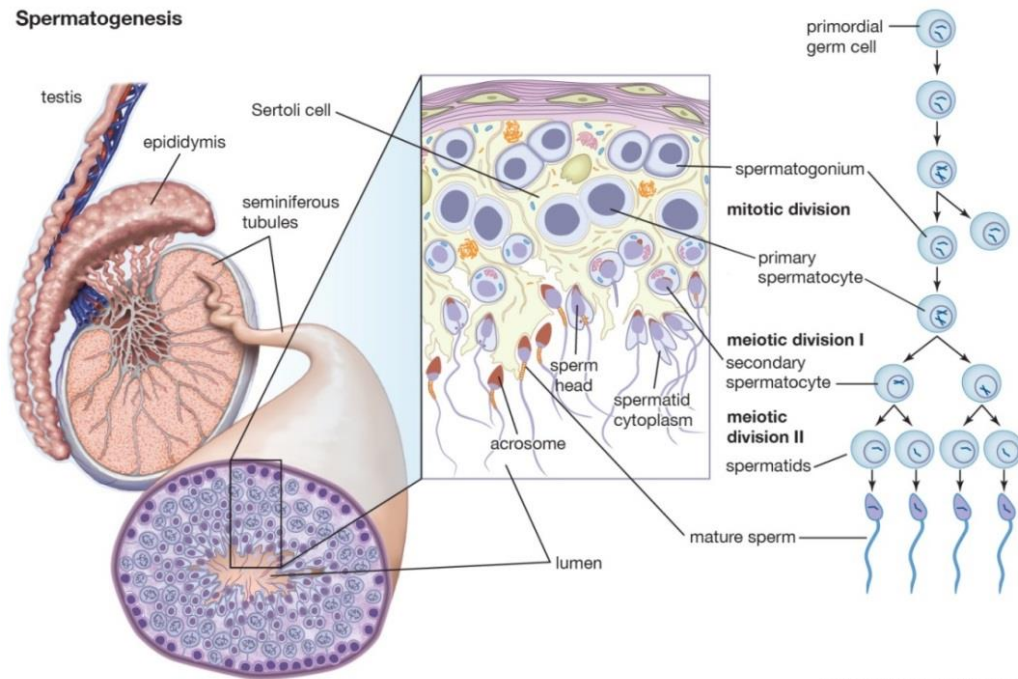


Figure 3 : La spermatogénèse.

(D'après l'encyclopédie Britannica (<https://www.britannica.com/science/spermatogenesis>)).

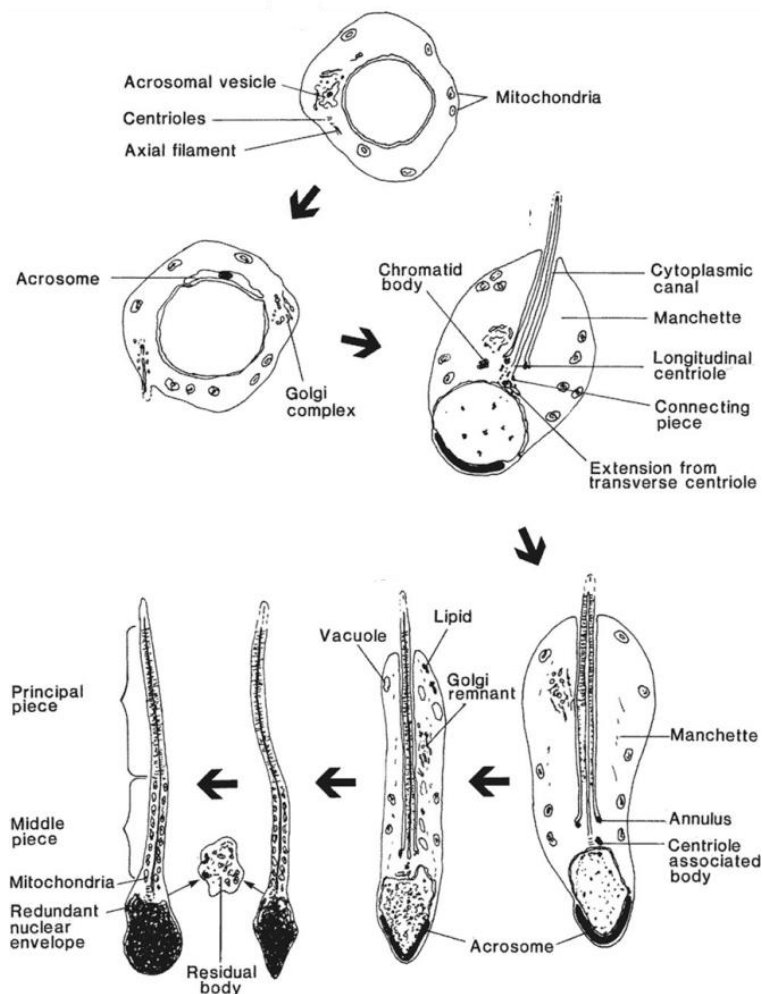


Figure 4 : Les étapes de la spermiogénèse.

(D'après (Mortimer, 2018)).

Le testicule présente deux grandes fonctions, la première exocrine permettant la production de spermatozoïdes (spermatogenèse) et la deuxième fonction, endocrine, avec la synthèse des hormones stéroïdes. Les testicules sont localisés dans le scrotum, en dehors de la cavité abdominale. Cette localisation permet une température inférieure de 3 à 5°C afin d'avoir une spermatogenèse optimale. Le testicule est enveloppé d'une capsule, appelée l'albuginée, et comporte deux compartiments, les tubes séminifères et le tissu interstitiel situé entre les tubes. Ce tissu contient les cellules de Leydig, les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Ce sont les cellules de Leydig qui interviennent dans la production d'hormones androgènes comme la testostérone.

### a) Spermatogenèse

La spermatogenèse se déroule dans les tubes séminifères. C'est un processus physiologique qui comprend l'ensemble des transformations des cellules germinales en une cellule hautement différenciée : le spermatozoïde. La production de spermatozoïdes débute à la puberté et se poursuit toute la vie d'un homme grâce à la multiplication permanente des spermatogonies. Les tubes séminifères comportent deux types cellulaires, les cellules de Sertoli (cellules somatiques) et les cellules germinales (Figure 3). Les cellules de Sertoli sont le support de la spermatogenèse avec un rôle de soutien, de protection (barrière hémato-testiculaire (BHT) notamment), de nutrition, et de phagocytose vis-à-vis des cellules germinales (Griswold, 1998).

La spermatogenèse conduit de la spermatogonie (cellule diploïde) au spermatozoïde (gamète haploïde). Elle comporte 3 phases :

- Phase de multiplication : les spermatogonies vont se diviser par mitose jusqu'au stade de spermatocyte primaire. Une spermatogonie Ad se divise en 2 cellules : une spermatogonie Ap et une spermatogonie Ad. L'Ap se divisera pour donner deux spermatogonies B tandis que la 2<sup>ème</sup> Ad est présente afin de renouveler sans cesse le stock de cellules souches. Chaque spermatogonie B se divisera en deux spermatocytes primaires.
- Méiose : cette deuxième étape permet de passer d'une cellule diploïde (2n) à une cellule haploïde (n). Elle comprend deux divisions. La première est dite réductionnelle et permet d'aboutir à partir d'un spermatocyte primaire à la formation de deux spermatocytes secondaires encore diploïde. La seconde est dite équationnelle et permet la formation de deux spermatides ronds haploïdes à partir d'un spermatocyte secondaire.
- Spermiogenèse : cette dernière phase comporte l'ensemble des modifications permettant de passer de la spermatide au spermatozoïde (Figure 4).

-Compaction de l'ADN nucléaire : elle est liée au remplacement des histones par des protéines transitoires (TP1 et TP2) puis par des protamines (PRM1 et PRM2). Elle se poursuivra au cours du transit épидидymaire. Cette compaction permet de protéger le génome spermatique et est responsable de l'arrêt de la transcription dans le spermatozoïde (Hao *et al.*, 2019).



Table 1 : Cinétique de la spermatogenèse.  
 Chez l'homme la spermatogenèse dure 74 jours.

| Etape de la spermatogenèse                                | Durée           |
|-----------------------------------------------------------|-----------------|
| Spermatogonies Ap se différencient en spermatogonies B    | 18 jours        |
| Spermatogonies B en spermatocytes I                       | 9 jours         |
| Spermatocytes I 1 <sup>ère</sup> division méiose prophase | 23 jours        |
| Spermatocytes II 2 <sup>ème</sup> division méiose         | 1 jour          |
| Spermiogenèse                                             | 23 jours        |
| <b>Durée spermatogenèse</b>                               | <b>74 jours</b> |

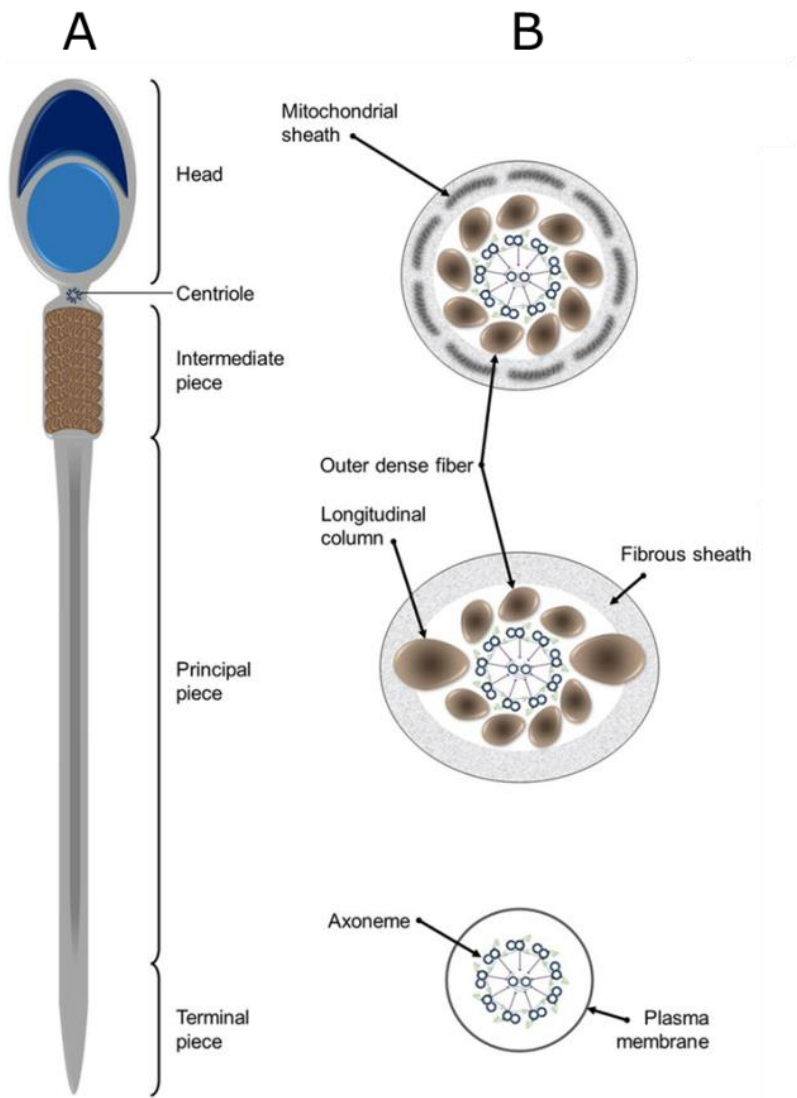


Figure 5: Structure d'un spermatozoïde.  
 A. Vu d'un spermatozoïde. B. Coupe transversale des trois parties du flagelle (Adaptée de (Touré *et al.*, 2020)).

-Formation de l'acrosome : il se développe à partir des vésicules pro-acrosomales produites par l'appareil de Golgi. Ces vésicules vont fusionner pour former l'acrosome, qui va progressivement coiffer les 2/3 du noyau (Ramalho-Santos *et al.*, 2002).

-Formation du flagelle : le flagelle responsable de la mobilité spermatique, est constitué d'une structure microtubulaire centrale, l'axonème, dérivant du centriole distal de la spermatide ronde.

-Modifications cytoplasmiques : une grande partie du cytoplasme de la spermatide va être éliminée sous forme d'une gouttelette cytoplasmique. Ce corps résiduel sera phagocyté par les cellules de Sertoli. Parallèlement les mitochondries résiduelles vont constituer un manchon hélicoïdal au niveau de la pièce intermédiaire (cf paragraphe 3.2.1 a)).

Enfin, l'ultime étape, appelée spermiation, libère les spermatozoïdes dans la lumière des tubules séminifères pour qu'ils poursuivent leur chemin vers les canaux efférents avant de rejoindre l'épididyme.

## **b) Structure d'un spermatozoïde**

Le spermatozoïde est une cellule hautement différenciée, mobile et d'une taille d'environ 60µm chez l'homme. Il possède 3 parties dont une tête, un cou et un flagelle, lui-même composé de 3 parties, une pièce intermédiaire, principale et terminale. Le spermatozoïde est délimité par une membrane plasmique continue (Figure 5).

- La tête : elle mesure environ 4-5 µm de longueur et 2-3 µm de largeur et 1.5 µm d'épaisseur. Elle comprend le noyau et l'acrosome qui le coiffe.
- Le cou : cette partie est également appelée pièce connective. Elle est ancrée sur le noyau et possède un centriole proximal.
- Le flagelle : l'axonème est la structure commune à l'ensemble du flagelle, situé au centre de celui-ci. Cet axonème possède une conformation de type « 9+2 », c'est-à-dire avec 9 doublets de microtubules périphériques et un doublet central. Les 9 doublets possèdent des dynéines, des protéines motrices. Elles vont participer au mouvement flagellaire. L'axonème est entouré de différentes structures suivant les différentes parties du flagelle. Le flagelle des spermatozoïdes est structuré en trois parties, la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale.

-la pièce intermédiaire : elle mesure 5-7 µm avec 1 µm d'épaisseur. Cette pièce comprend un manchon mitochondrial qui entoure un faisceau de 9 fibres denses et l'axonème. Les rôles de la mitochondrie dans le spermatozoïde sont développés ultérieurement avec une revue de la littérature. La pièce intermédiaire prend fin avec l'annulus.

-la pièce principale : la gaine fibreuse remplace la gaine mitochondriale et enveloppe 7 fibres denses et la continuité de l'axonème. Cette gaine présente 2 colonnes longitudinales et comprend toutes les enzymes nécessaires pour la glycolyse.

-la pièce terminale : cette pièce termine le flagelle et ne possède que la fin de l'axonème et la membrane plasmique.



### c) Transit épидидymaire

Le canal épидидymaire est un très long tube, fortement contourné, qui une fois déroulé mesure environ 6 mètres chez l'homme. Le transit des spermatozoïdes dans l'épididyme va durer entre 2 et 15 jours chez l'homme.

A la sortie du testicule, le spermatozoïde est immobile et non fécondant. C'est lors de son transit dans l'épididyme qu'il va acquérir son pouvoir fécondant, c'est-à-dire sa mobilité et la capacité de liaison à la zone pellucide et de fusion avec la membrane ovocytaire.

Le canal épидидymaire est bordé d'un épithélium glandulaire qui régule la composition du fluide épидидymaire (par phénomènes de résorption, de concentration de certains composés et de synthèse et excrétion protéiques) qui varie en fonction de la zone du canal épидидymaire considérée (tête, corps et queue). Sous l'influence de la composition du fluide épидидymaire, les spermatozoïdes vont subir des modifications structurales, biochimiques et métaboliques (Cornwall, 2009; Dacheux and Dacheux, 2014) qui concourent à la maturation fonctionnelle progressive du spermatozoïde.

### d) Liquide séminal

Le sperme se constitue au moment de l'éjaculation. Il est constitué pour 10% par les spermatozoïdes et pour 90% par le liquide séminal. Ce dernier comprend les sécrétions des testicules (0.5%), de l'épididyme (12%), des vésicules séminales (68%), de la prostate (15%) et des glandes annexes (4.5%). Le liquide séminal est le reflet du fonctionnement du testicule et des voies séminales mais aussi des interactions entre les spermatozoïdes et leur environnement. Les spermatozoïdes une fois éjaculés devront traverser les voies génitales féminines afin d'être capables puis d'interagir avec l'ovocyte.

## 1.3. Reproduction masculine : pathologie

L'élément central du bilan d'infertilité masculine repose sur l'examen des paramètres spermatiques.

### 1.3.1. Analyse du sperme

Le sperme est récupéré après 3 à 5 jours d'abstinence par masturbation et évalué selon les recommandations du manuel de l'OMS (World Health Organization, 2021).

Ce manuel, révisé pour la 6<sup>ème</sup> fois en 2021, a pour objectif de standardiser les procédures et l'analyse du sperme dans le monde entier (World Health Organization, 2021).

Une cohorte d'hommes fertiles (3589 hommes de 12 pays) a été utilisée comme population de référence. L'analyse du sperme de cette population a permis de définir une limite de référence pour chaque paramètre spermatique correspondant au 5<sup>ème</sup> percentile inférieur des données (avec un intervalle de confiance de 95%).

Table 2 : Normes de l'OMS.

Les valeurs de référence correspondent au 5<sup>ème</sup> percentile inférieur avec un intervalle de confiance de 95%.

\* : normes définies selon l'OMS (édition de 2010) (World Health Organization, 2010). (D'après (World Health Organization, 2021))

| Paramètres                                                                    | Limites de référence (WHO 2021) | Anomalies                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------|
| Volume (mL)                                                                   | 1,4 (1.3-1.5)                   | <1,5 ml : Hypospermie<br>>6 ml : Hyperspermie |
| pH*                                                                           | 7,2-8                           |                                               |
| Nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat (10 <sup>6</sup> par éjaculat) | 39 (35-40)                      | 0 : Azoospermie<br>< : Oligospermie           |
| Concentration de spermatozoïdes (10 <sup>6</sup> /mL)                         | 16 (15-18)                      |                                               |
| Mobilité totale (progressive et non progressive, %)                           | 42 (40-43)                      | < : Asthénospermie                            |
| Mobilité progressive (%)                                                      | 30 (29-31)                      |                                               |
| Morphologie, formes normales selon Kruger (%)<br>selon David (%)*             | 4 (3.9-4)<br>23                 | < : Tératospermie                             |
| Vitalité, spermatozoïdes vivants (%)                                          | 54 (50-56)                      | < : Nécrospermie                              |
| Leucocytes*                                                                   | 1 million/mL                    | > : Leucospermie                              |

## Infertilité masculine

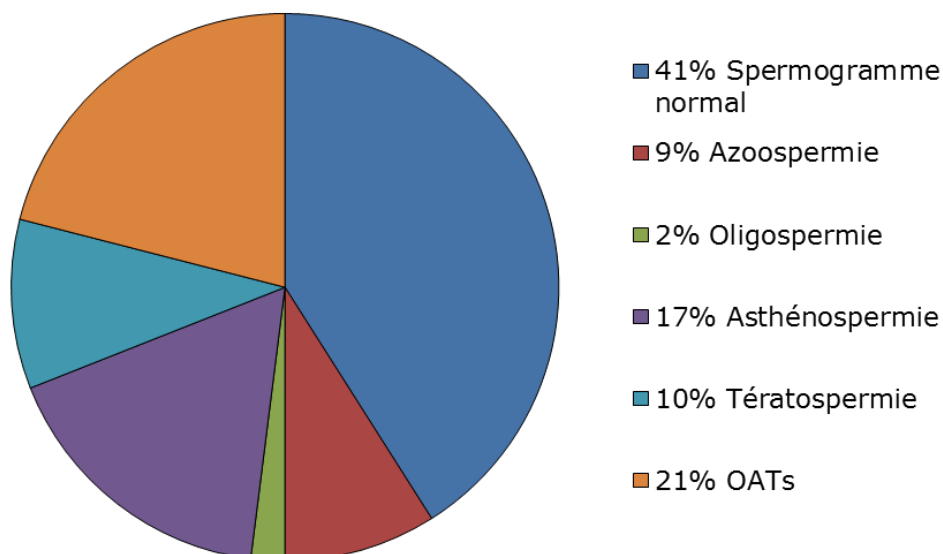


Figure 6 : Représentation des anomalies spermatiques de l'infertilité masculine.

Ces données sont issues d'une étude sur 1467 hommes. OATs : Oligo-Asthéno-TératoSpermie (D'après (Thonneau *et al.*, 1991)).

L'évaluation des paramètres du sperme se fait par la réalisation du spermogramme et du spermocytogramme.

### **a) Spermogramme**

Le spermogramme correspond à l'analyse des caractéristiques spermatiques sur du sperme frais. Après liquéfaction du sperme, plusieurs paramètres sont étudiés : le volume (en mL), le pH, la numération (en millions/mL), la mobilité (en %), la vitalité (en %) et la numération des cellules rondes (cellules germinales immatures, des leucocytes ou des cellules épithéliales, en million/mL). Les normes, définies par l'OMS, pour chaque paramètre sont répertoriées dans la table 2 avec les anomalies associées (Figure 6).

### **b) Spermocytogramme**

Le spermocytogramme permet d'évaluer la qualité morphologique des spermatozoïdes en microscopie optique après frottis et coloration. Plusieurs classifications sont utilisées, celles de Kruger (Kruger *et al.*, 1987) et David modifiée (Auger, 2010). Une centaine de spermatozoïdes sont évalués et analysés selon les critères morphologiques de la tête, de la pièce intermédiaire et principale du flagelle. Un sperme avec seulement 4% (Kruger) ou 23% (David) de spermatozoïdes sans anomalies morphologiques est considéré comme normal.

## **1.3.2. Analyse du liquide séminal**

La biochimie du liquide séminal, examen de deuxième intention, consiste à doser 6 marqueurs spécifiques du tractus génital (Figure 7). Ces dosages permettent de localiser une potentielle dysfonction du tractus génital à l'origine d'anomalies spermatiques. Ils peuvent permettre de préciser l'origine de certaines de ces anomalies comme un faible volume de l'éjaculat, une nécrozoospermie, une infection génitale ou une azoospermie. Dans cette dernière indication, la biochimie du liquide séminal est utilisée pour distinguer une azoospermie d'origine obstructive ou non obstructive. Le liquide séminal est une matrice qui peut être utilisée, par le biais de techniques de type OMICs, afin de déterminer de nouveaux biomarqueurs d'infertilité.

## **1.3.3. Baisse de la fertilité humaine ?**

Plusieurs études mettent en évidence un déclin des paramètres spermatiques dans le monde (Agarwal *et al.*, 2015; Levine *et al.*, 2017; Virtanen *et al.*, 2017) et en France (Geoffroy-Siraudin *et al.*, 2012; Rolland *et al.*, 2013). Cependant cette baisse globale de la qualité du sperme est toujours débattue. En France, l'étude de Rolland *et al.*, effectuée sur une période de 17 ans, fait part d'une baisse de la concentration des spermatozoïdes d'1.9% par an associée à une baisse de leur qualité morphologique mais sans altération de leur

**Tableau 2 : Marqueurs biochimiques usuels du plasma séminal : Origine, méthodes de dosages, valeurs de référence**

|                                          | Fructose               | Citrate                | Zinc                  | Phosphatase acide            | $\alpha$ 1,4 Glucosidase neutre | L-Carnitine                                      |
|------------------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------------------|
| <b>Origine</b>                           | vésicules séminales    | prostate               | prostate              | prostate                     | épididyme                       | épididyme (principalement)                       |
| <b>Méthode de dosage usuelle</b>         | enzymatique 340 nm     |                        | colorimétrique 560 nm | cinétique enzymatique 405 nm |                                 | enzymatique 340 nm ou colorimétrique 405 nm      |
| <b>Valeurs de référence par éjaculat</b> | $\geq 20\mu\text{mol}$ | $\geq 60\mu\text{mol}$ | $\geq 3\mu\text{mol}$ | $\geq 1234\text{UI}$         | $\leq 59\text{mU}$              | $\geq 654\text{ nmol}$ ou $\geq 390\text{ nmol}$ |

Figure 7 : Marqueurs biochimiques du liquide séminal.

(D'après (*Exploration de la fonction de reproduction : versant masculin*, 2009)).

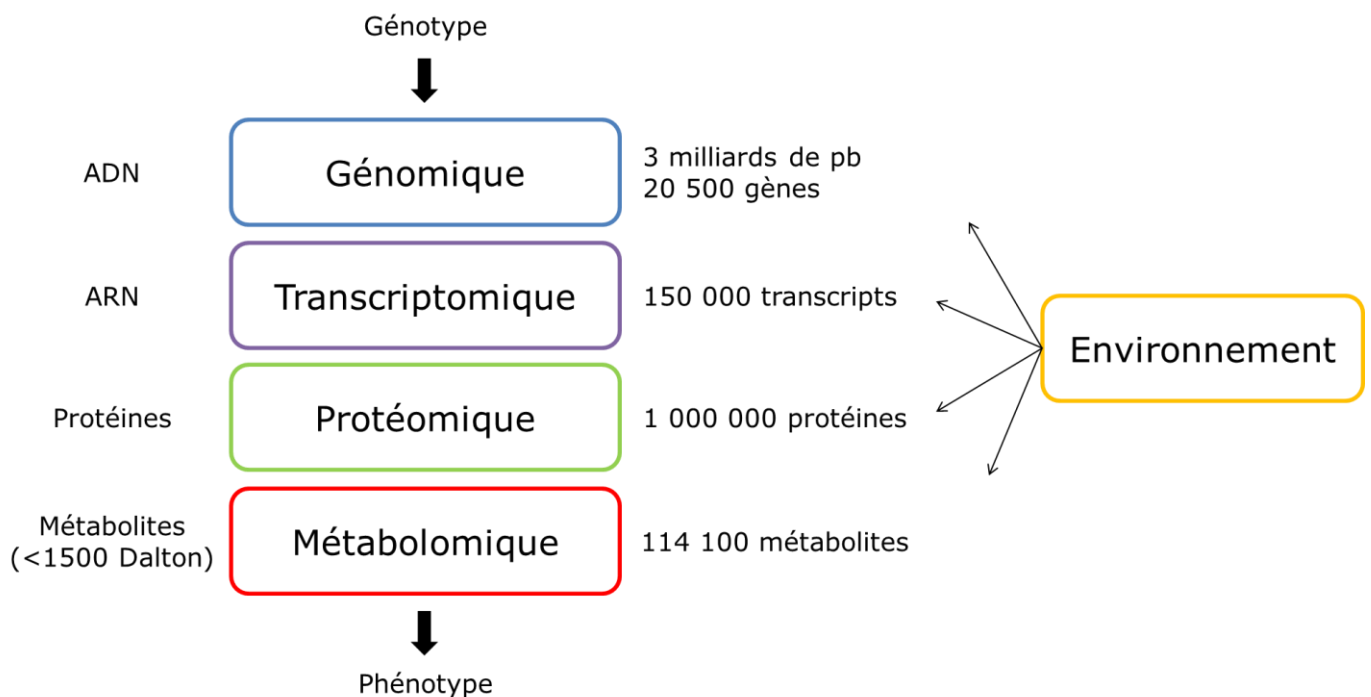


Figure 8 : La cascade des OMICS.

mobilité (Rolland *et al.*, 2013). Inversement, l'étude de Geoffroy-Siraudin *et al.*, objective une baisse de la mobilité spermatique totale et progressive, de respectivement 0.4% et 5.5% par an (Geoffroy-Siraudin *et al.*, 2012).

#### 1.3.4. Etiologies de l'infertilité masculine

Certaines infertilités masculines ont une étiologie définie. Ainsi, la cryptorchidie, la varicocèle, les anomalies génétiques (microdélétion du chromosome Y, anomalies chromosomiques, mutation dans le gène *CFTR*, syndrome de cellules de Sertoli seules ...) (Levy *et al.*, 2010), certaines dysfonctions hormonales et certains facteurs environnementaux sont reconnus pour entrainer une altération des paramètres spermatiques et être responsables d'infertilité.

Néanmoins, de nombreuses altérations spermatiques restent sans cause avérée. En outre, certaines infécondités sont constatées en l'absence de facteur masculin (ou féminin) décelable par les examens habituellement réalisés dans le bilan d'infertilité (spermogramme normal).

## 2. Les OMICs dans l'infertilité masculine

### 2.1. Définition des OMICs

Les « omiques » désignent l'ensemble des technologies générant des données génomiques, transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques (Figure 8), qui permettent la caractérisation et la quantification de l'ensemble des molécules d'un système biologique. Les données ainsi obtenues servent à mieux comprendre le fonctionnement biologique d'un organisme, l'importance des connexions biologiques et les interactions avec les stimuli environnementaux.

### 2.2. Les OMICs dans l'infertilité masculine

Les techniques omics ont été utilisées afin d'améliorer la compréhension des mécanismes sous-tendant l'infertilité masculine (Krzastek *et al.*, 2020; Sinha *et al.*, 2017).

Ainsi, les données du transcriptome des spermatozoïdes ont permis d'identifier des profils d'expression différents selon le type d'infertilité : normospermique, asthénospermique ou oligospermique. (Bansal *et al.*, 2015; Caballero-Campo *et al.*, 2020; Montjean *et al.*, 2012), mais aussi de découvrir des ARNs non codants (de type micro-ARN et long-ARN) qui ont enrichi les connaissances sur la physiologie de la spermatogenèse et l'infertilité masculine (Joshi and Rajender, 2020; Vashisht and Gahlay, 2020).





De la même manière, 30 études ont permis de définir le protéome du spermatozoïde humain qui contiendrait 6238 protéines différentes. L'analyse de ces protéines a en outre déterminé les voies métaboliques essentielles du gamète masculin. Enfin, les niveaux de représentation de certaines protéines (cytosquelette, enzymes impliquées dans le métabolisme et la production d'énergie) seraient modifiés chez les patients asthénospermiques (Amaral *et al.*, 2014; Jodar *et al.*, 2017).

### 2.2.1. Le séquençage haut débit

L'arrivée du séquençage haut débit a permis de grandes avancées dans le domaine de l'infertilité masculine avec l'identification de gènes candidats. Ces larges études de génome ou d'exome entier sont prometteuses pour la découverte d'autres étiologies génétiques de l'infertilité masculine (Krausz and Riera-Escamilla, 2018). Par exemple, le séquençage exomique de plusieurs cohortes de patients infertiles, lié à un phénotype d'anomalies morphologiques du flagelle, a permis d'identifier 18 nouveaux gènes dont les mutations sont à l'origine de 30 à 60% de ces cas d'infertilité (Touré *et al.*, 2020).

En revanche le séquençage haut débit de l'ADNmt n'a jamais été réalisé sur les spermatozoïdes.

### 2.2.2. La métabolomique

La plus récente des technologies omics, la métabolomique, complète les autres approches. Elle correspond à l'analyse de façon globale du métabolome d'un système biologique (Fiehn, 2001). Cette approche permet d'identifier, dans un échantillon donné, des métabolites endogènes et exogènes, correspondant à des molécules de moins de 1500 Daltons. Ces métabolites sont le reflet de l'état phénotypique puisqu'ils sont le reflet des changements génomique, transcriptomique et protéomique en amont. Il existe plusieurs catégories de métabolites (acides nucléiques, acides aminés, peptides, lipides, sucres, vitamines...) (Wishart *et al.*, 2018). D'après la base de données Human Metabolome Database, 114 100 métabolites sont connus et répertoriés à ce jour (HMDB4.0 <https://hmdb.ca/>).

Plusieurs études s'intéressent à la métabolomique du sperme, sur deux matrices: les spermatozoïdes et le liquide séminal. Les études du métabolome des spermatozoïdes sont les moins nombreuses en raison probablement de leur complexité puisque la présence du liquide séminal et les réactifs de lavage gênent l'analyse métabolomique (Panner Selvam *et al.*, 2020). Néanmoins, 4 études ont été réalisées qui soulignent l'importance de certains métabolites en lien avec différentes voies notamment énergétiques (Engel *et al.*, 2019; Fu *et al.*, 2019; Paiva *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2018).

Les études métabolomique du liquide séminal sont plus nombreuses (pour revue (Panner Selvam *et al.*, 2020)). Ces études ont été menées dans plusieurs types d'infertilité masculine: azoospermie, asthénospermie, Oligo-Asthéno-Teratospermie (OATs) et infertilité inexpliquée. Dans le cas des altérations spermatiques, trois grandes voies métaboliques seraient impactées : celles du métabolisme énergétique (cycle de Krebs, glycolyse,  $\beta$ -oxydation des acides gras), des lipides et des acides aminés.



La métabolomique permet d'obtenir des données nouvelles reflétant le fonctionnement spermatique et les interactions avec son environnement. Elle permet d'espérer déterminer les voies spécifiquement dérégulées dans des anomalies spermatiques caractérisées. Cependant, à ce jour les études réalisées restent disparates et peu consensuelles quant aux résultats obtenus, notamment en raison des différentes approches méthodologiques utilisées et de la taille et de l'hétérogénéité des cohortes considérées.

D'autres études sont donc nécessaires pour étayer et préciser les premiers résultats afin de mieux cerner la physiopathologie de l'infertilité masculine et d'ouvrir la voie vers la découverte de biomarqueur.

## 3. Mitochondrie et infertilité masculine

### 3.1. Généralités sur la mitochondrie

#### 3.1.1. Définition – Origine

Les mitochondries sont des organites semi-autonomes localisées dans le cytoplasme de toutes les cellules eucaryotes (à l'exception des érythrocytes). Elles sont considérées comme la centrale énergétique de la cellule par leur rôle clé dans la production d'énergie, via la phosphorylation oxydative, le cycle de Krebs ou encore la  $\beta$ -oxydation des acides gras. Leur nombre varie, de quelques centaines à quelques milliers, selon le type cellulaire et les besoins énergétiques de la cellule. Les mitochondries jouent également d'autres fonctions importantes, notamment dans l'apoptose, l'homéostasie du calcium, la thermogénèse, la production de ROS (espèces réactives de l'oxygène), la synthèse des hormones stéroïdes, les voies de signalisation et bien d'autres.

Le nom « mitochondrie » est né du grec mitos (filamenteux) et chondros (granulaire), donné pour la première fois par Carl Benda en 1898 (Benda, 1898). En 1967, Lynn Margulis propose une théorie sur l'origine endosymbiotique des mitochondries à partir des bactéries (Margulis, 1970). Cette théorie a été acceptée depuis, cela remontrait à environ 2 milliards d'années, ou une endo-symbiose entre une cellule eucaryote primitive et une  $\alpha$ -protéobactérie se serait produite (Gray, 2012; Gray *et al.*, 1999). L' $\alpha$ -protéobactérie transformée en organite mitochondrial, dans une cellule eucaryote, a entraîné de nombreux changements évolutifs, notamment le transfert de la majorité des gènes mitochondriaux vers le noyau (Roger *et al.*, 2017). Certains gènes mitochondriaux sont restés au sein de la mitochondrie puisqu'elle possède son propre génome de 16 kb. Diverses hypothèses ont été émises pour expliquer la conservation d'un génome au sein des mitochondries. Il a également été montré que plusieurs protéines codées par l'ADNmt sont hydrophobes, ce qui poserait des problèmes d'import à la mitochondrie si elles étaient traduites dans le cytoplasme (Roger *et al.*, 2017).

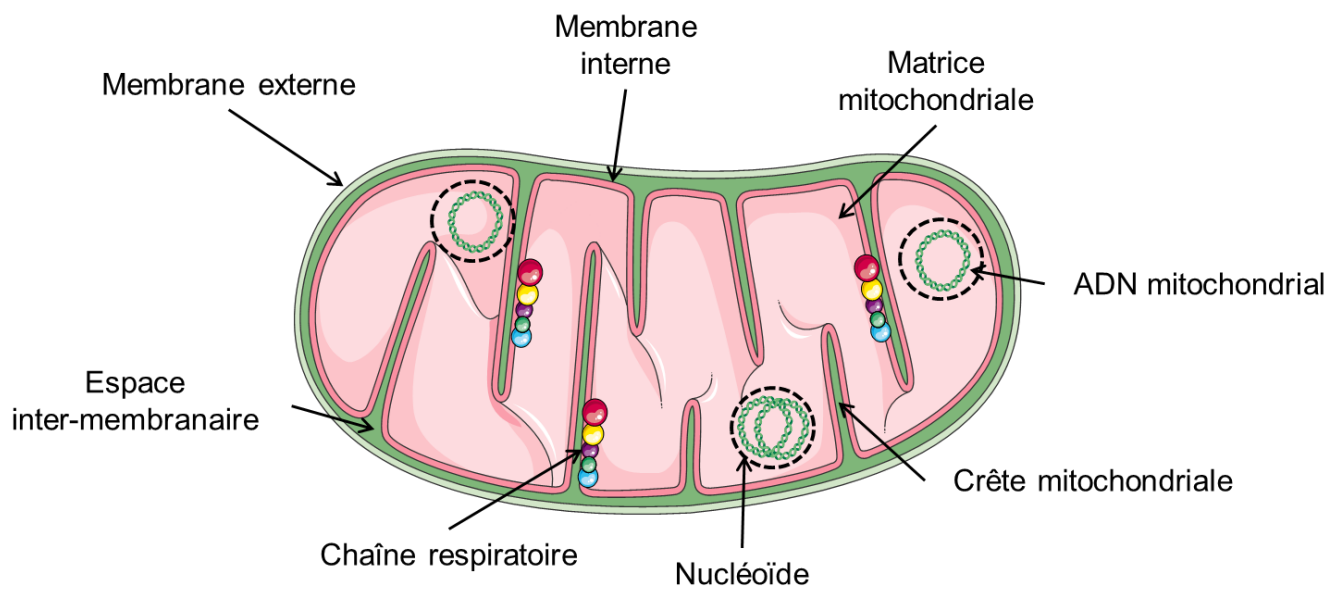


Figure 9 : Schéma de la structure mitochondriale.

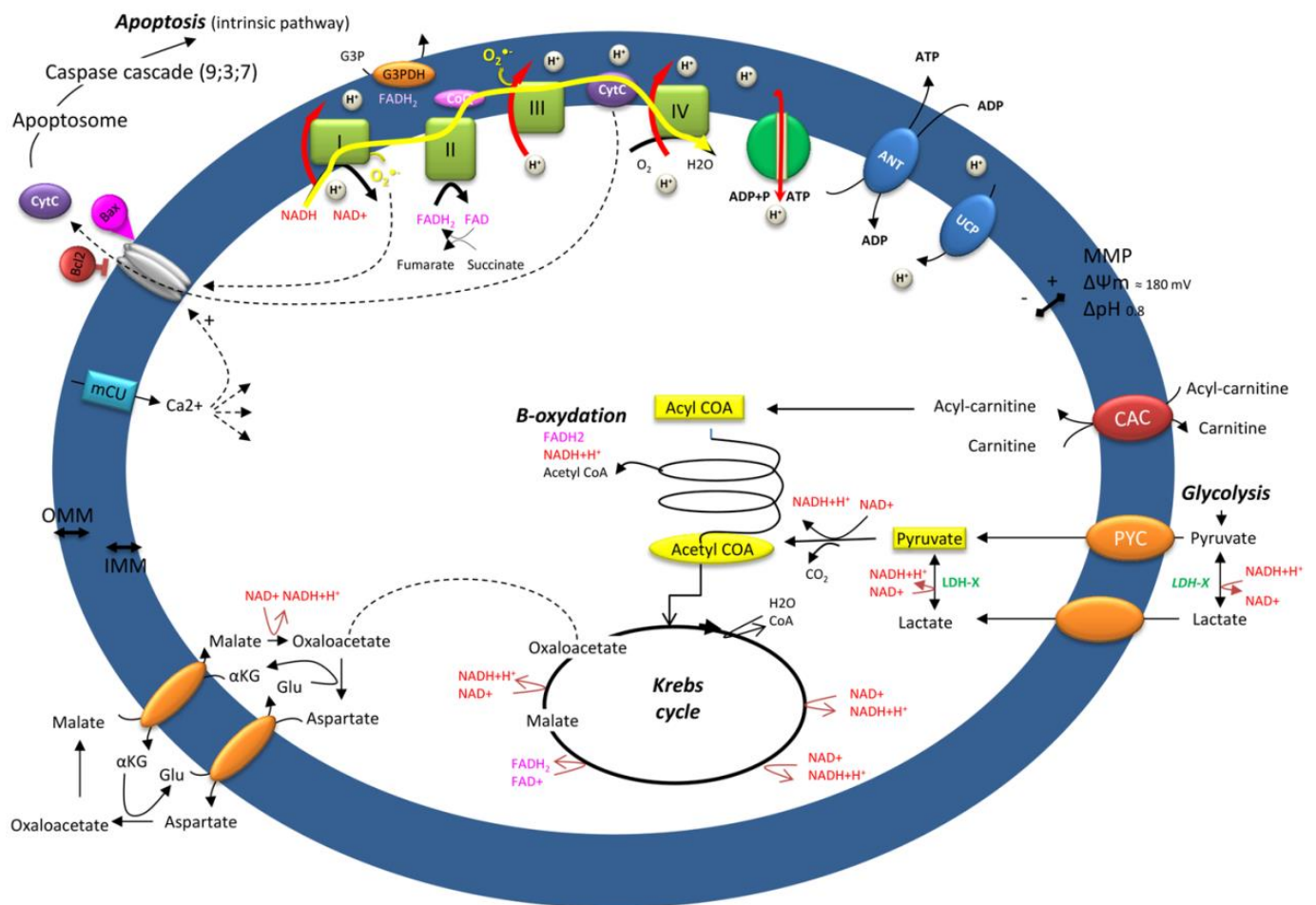


Figure 10 : Métabolisme énergétique mitochondrial.

(D'après (Boguenet *et al.*, 2021))

### 3.1.2. Morphologie – Structure

Les mitochondries se caractérisent par deux membranes, une externe et interne. Ces membranes délimitent deux compartiments, l'espace inter-membranaire et la matrice mitochondriale. La membrane externe est constituée d'une bicouche lipidique, de composition proche de celle de la membrane plasmique (50-60% de protéines, 40-50% de lipides). Elle est perméable aux molécules d'une taille inférieure à 5 kDa grâce aux porines VDAC (voltage-dependent anion-selective channel). Les molécules d'un poids supérieur à 5 kDa nécessitent des transporteurs de type translocase TOM (Translocase of Outer Membrane). L'espace intermembranaire contient les molécules importées du cytoplasme ainsi que des protons  $H^+$  libérés par la chaîne d'électrons de la chaîne respiratoire. La membrane interne est composée de 80% de protéines et 20% de lipides. Contrairement à la membrane externe elle est peu perméable et nécessite des transporteurs de type translocase TIM (Translocase of Inner Membrane). La membrane interne s'invagine créant les crêtes mitochondriales où sont situées les complexes protéiques de la chaîne respiratoire. La matrice mitochondriale est le siège de nombreuses voies métaboliques ( $\beta$ -oxydation, Cycle de Krebs, OXPHOS) et contient toutes les enzymes nécessaires. La matrice contient également le génome mitochondrial et les mitoribosomes (Figure 9).

### 3.1.3. Rôle énergétique

Les mitochondries ont un rôle crucial dans la production d'énergie. Elles sont le siège de la phosphorylation oxydative (OXPHOS), réalisée par la chaîne respiratoire qui prend en charge les coenzymes réduits issus de la dégradation des molécules énergétiques pour la synthèse d'ATP. Les acides gras, par le biais de la  $\beta$ -oxydation, les glucides et les acides aminés sont dégradés pour former l'acétyl-coA. Ce composé va être oxydé par le cycle de Krebs et conduire à la production des co-enzymes réduits : NADH (nicotinamide adénine dinucléotide réduit) et le  $FADH_2$  (flavine adénine dinucléotide réduite) qui vont entrer dans la chaîne respiratoire. (Figure 10).

La chaîne respiratoire est localisée dans la membrane interne mitochondriale. Elle possède 4 complexes enzymatiques et l'ATP synthase. Chaque complexe est composé de sous-unités protéiques codées par le génome nucléaire et mitochondrial, à l'exception du complexe II uniquement codé par le génome nucléaire (Table 3). Le complexe I contient un site de liaison du NADH. Il catalyse le transfert de 2 électrons du NADH à l'ubiquinone et permet le transport de 4 protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Le complexe II comprend la succinate deshydrogénase, une enzyme du cycle de Krebs. Ce complexe assure le transfert des électrons grâce au coenzyme, le FAD jusqu'à l'ubiquinone. L'ubiquinone, transporteur d'électrons, reçoit des électrons par les complexes I et II et se déplace vers le complexe III qui les transfère au cytochrome c. Cela permet de libérer 4 protons vers l'espace intermembranaire. Le relai des électrons se fait par le cytochrome c constituant une navette d'électrons vers le complexe IV. Le complexe IV permet d'oxyder le cytochrome c et réduit le dioxygène en eau libérant 2 protons vers l'espace intermembranaire. Les complexes I, III et IV fonctionnent donc comme des pompes à protons, à l'exception du complexe II. Les protons sont transférés de la matrice à l'espace intermembranaire et génèrent une force protonmotrice se traduisant par un gradient de pH (6.5 à 7 dans l'espace intermembranaire et 8 dans la matrice) et d'un potentiel membranaire

Table 3 : Les complexes de la chaîne respiratoire et leurs sous-unités codées par le génome mitochondrial ou nucléaire.

| <b>Complexes</b>                                          | <b>Sous-unités codées par le génome mitochondrial</b>                                                                | <b>Sous-unités codées par le génome mitochondrial</b> | <b>Sous-unités codées par le génome nucléaire</b> |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| <b>Complexe I :</b><br>NADH ubiquinone oxydoreductase     | <i>MT-ND1</i><br><i>MT-ND2</i><br><i>MT-ND3</i><br><i>MT-ND4L</i><br><i>MT-ND4</i><br><i>MT-ND5</i><br><i>MT-ND6</i> | 7                                                     | 38                                                |
| <b>Complexe II :</b><br>Succinate-déshydrogénase          |                                                                                                                      | 0                                                     | 4                                                 |
| <b>Complexe III :</b><br>Ubiquinol cytochrome c réductase | <i>MT-CYB</i>                                                                                                        | 1                                                     | 10                                                |
| <b>Complexe IV :</b><br>Cytochrome c oxydase              | <i>MT-COI</i><br><i>MT-COII</i><br><i>MT-COIII</i>                                                                   | 3                                                     | 10                                                |
| <b>ATP Synthase</b>                                       | <i>MT-ATP6</i><br><i>MT-ATP8</i>                                                                                     | 2                                                     | 9                                                 |

(environ -150 mV). L'ATP synthase comporte deux sous-unités, F<sub>0</sub> dans la membrane interne et F<sub>1</sub> dans la matrice. L'ATP synthase utilise le gradient électrochimique et phosphoryle l'ADP en ATP. Cet ATP formé dans la matrice mitochondriale est exporté dans le cytoplasme par la translocase ANT (Adénine nucléotide translocase).

#### 3.1.4. Dynamique mitochondriale

Les mitochondries s'organisent en un réseau dynamique. La morphologie mitochondriale évolue selon les besoins énergétiques des cellules grâce à un équilibre dynamique établi entre fusion et fission mitochondriale. La fission entraîne une fragmentation mitochondriale aboutissant à des mitochondries plus petites capables de générer plus de ROS et facilite la mitophagie (Archer, 2013). La fission est médiée par la GTPase DRP1 (dynamin-related protein 1), FIS1 (fission protein 1) et MFF (mitochondrial fission factor). Brièvement, le réticulum endoplasmique et l'actine s'associent à la mitochondrie et l'entourent formant un site de constriction. Plusieurs protéines DRP1 sont recrutées, par les facteurs FIS1 et MFF, à ce site et forme une structure en anneau qui resserre et divise l'organite (Archer, 2013).

En opposition, la fusion entraîne un réseau filamenteux, hyper connecté. Cette conformation protège de la mitophagie, de l'apoptose et stimulerait l'activité OXPHOS (Tilokani *et al.*, 2018). Cette fusion est régulée par 3 GTPases : deux mitofusines, MFN1 et MFN2, et la protéine OPA1 (Optic Atrophy 1). MFN1 et MFN2 assurent la fusion des membranes externes puis OPA1 assure la fusion des membranes internes (Archer, 2013).

#### 3.1.5. Génome mitochondrial

##### a) Généralités

Les mitochondries ont la particularité de posséder leur propre génome, l'ADN mitochondrial (ADNmt). Cet ADNmt code pour 37 gènes : 13 gènes des sous-unités de la chaîne respiratoire (ces 13 protéines sont impliquées dans les complexes I, III, IV et V), 22 ARNt et 2 ARN ribosomiques. L'ADNmt humain a été découvert en 1963 par Schatz-Nass (Nass and Nass, 1963) puis séquencé pour la première fois en 1981 par l'équipe d'Anderson (Anderson *et al.*, 1981), et enfin sa séquence a été révisée en 1999 (Andrews *et al.*, 1999), the « *Revised Cambridge Reference Sequence* » (NC\_012920). Cette séquence révisée sert désormais de référence lors des analyses de génétique mitochondriale.

L'ADNmt possède plusieurs particularités et différences en comparaison au génome nucléaire. Il est circulaire double brin avec 16 569 paires de bases. Il est dépourvu d'histone, d'intron et présente moins de 3% de séquences non codantes situées dans 2 régions. La première, comporte 1121 paires de bases (position 16024-576) avec la D-loop, l'origine de réplication du brin lourd (OH) et les promoteurs transcriptionnels LSP et HSP. Cette région régule la réplication et la transcription de l'ADNmt. La D-loop possède une région triple brin appelé ADN 7S. La 2<sup>ème</sup> région non codante comporte une trentaine de paires de bases et porte l'origine de réplication



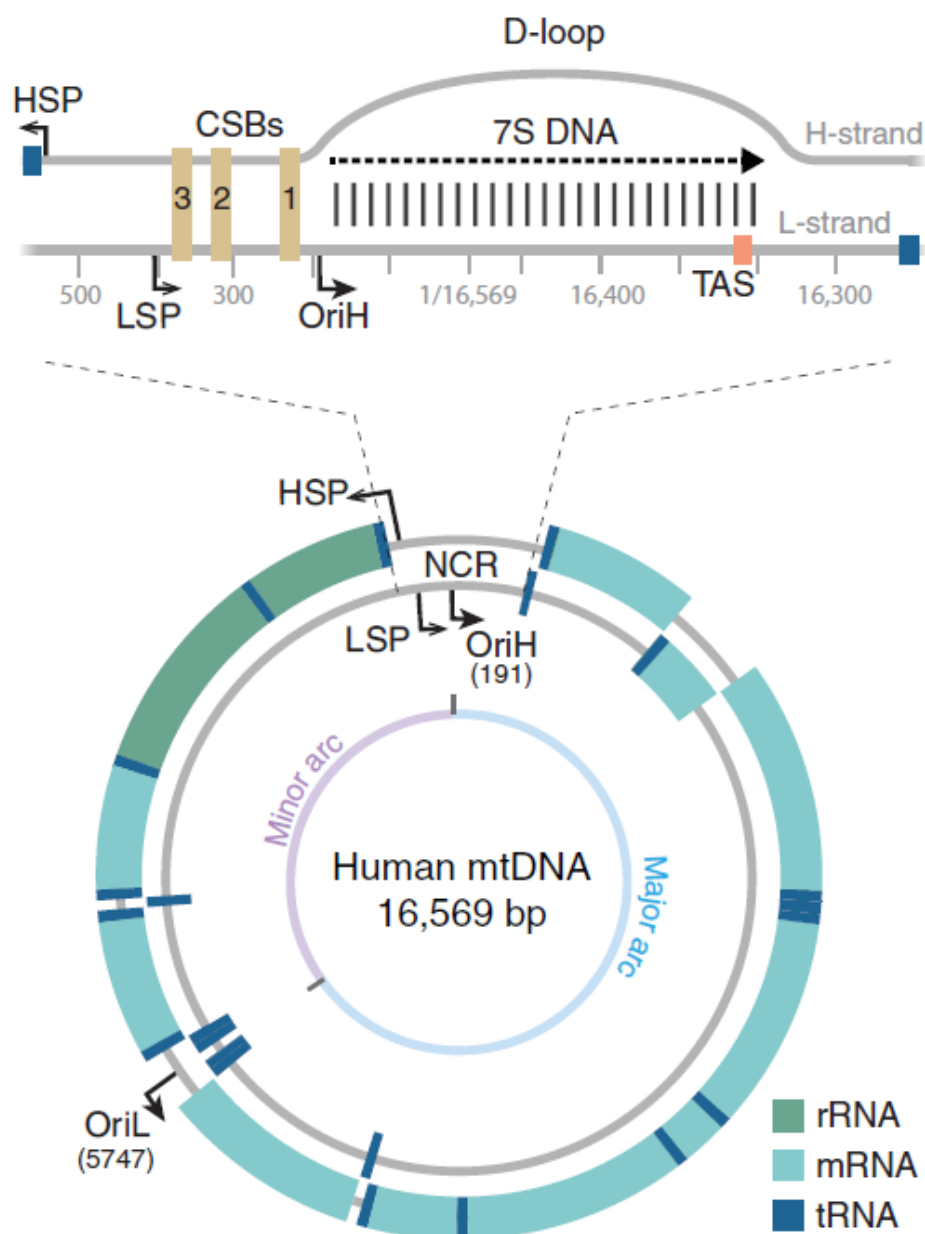


Figure 11 : Représentation de l'ADNmt et sa région non codante.

OriH : Origine de replication du brin H; OriL : Origine de replication du brin L; NCR : région non codante ; TAS : termination-associated sequence; CSBs : conserved sequence block; LSP : light-strand promoter ; HSP: heavy-strand promoter (D'après (Falkenberg and Gustafsson, 2020))

Table 4: Différences du code génétique universel et mitochondrial.

| Codons     | Code génétique universel | Code génétique mitochondrial |
|------------|--------------------------|------------------------------|
| AGA et AGG | Arginine                 | Codon stop                   |
| UGA        | Codon stop               | Tryptophane                  |
| AUA        | Isoleucine               | Méthionine                   |

du brin léger (OL). Les 2 origines de réplifications sont séparées d'environ 11 000 paires de base et forment l'arc majeur (entre OH et OL) (Figure 11). Les deux brins de l'ADNmt diffèrent dans leur composition. Le brin lourd (Heavy : H) est riche en guanine contrairement au brin léger (Light : L). Tous les gènes de l'ADNmt sont transcrits par le brin lourd, à l'exception du gène *MT-ND6* et 8 ARNt qui sont transcrits par le brin léger. Certains gènes sont superposés, c'est le cas des gènes *MT-ND4* et *MT-ND4L* et des gènes *MT-ATP6* et *MT-ATP8*. Enfin, le code génétique mitochondrial est quelque peu différent de celui du génome nucléaire, ils diffèrent de 4 codons sur les 64 (Table 4). L'ADNmt n'est pas sous forme libre dans la matrice mitochondriale mais sous une organisation protéine-ADN appelée nucléoïde. Les nouvelles techniques de microscopies super-résolution permettent aujourd'hui d'obtenir des précisions sur les caractéristiques complexes de cette structure. Notamment sa taille, qui serait uniforme d'environ 100 nm mais également le nombre de copies d'ADNmt contenu dans un nucléoïde. En effet un nucléoïde renfermerait une unique copie d'ADNmt (moyenne d'1.4 copies par nucléoïde) (Kukat *et al.*, 2011). Une augmentation du nombre de copies d'ADNmt dans une cellule ferait augmenter le nombre de nucléoïdes sans altérer sa taille (Kukat *et al.*, 2015). La protéine majoritaire des nucléoïdes est le facteur de transcription TFAM jouant un rôle majeur dans la compaction de ces structures. En effet pour une copie d'ADNmt il y aurait 1000 protéines TFAM associées (Bonekamp and Larsson, 2018). TFAM est une protéine avec des domaines HMG (High Mobility Group-box). Ces domaines permettent à TFAM de se lier à l'ADNmt et de changer sa conformation sans spécificité de séquence (Falkenberg *et al.*, 2007). TFAM est aussi impliqué dans la répllication et la transcription de l'ADNmt. Le nucléoïde comporte également toutes les protéines nécessaires à la répllication (POLG, mtSSB et Twinkle) et la transcription (POLRMT, TFB2M, TEFM) de l'ADNmt.

## **b) Réplication de l'ADNmt**

Contrairement à l'ADN nucléaire, la répllication de l'ADNmt est indépendante du cycle cellulaire et se déroule dans la matrice mitochondriale. Le réplisome forme le complexe enzymatique de répllication, composé de plusieurs protéines nécessaires à la bonne répllication de l'ADNmt. Ces protéines sont codées par le génome nucléaire, traduites dans le cytoplasme et importées ensuite à la mitochondrie. Ce complexe est composé d'une ADN-polymérase  $\gamma$  (POL $\gamma$ ), d'un facteur de transcription TFAM, d'un facteur de stabilisation de l'ADN simple brin mtSSB et d'une hélicase Twinkle. POL $\gamma$  est la seule ADN polymérase mitochondriale. Elle forme un hétérotrimère contenant 3 sous-unités : 1 sous-unité POL $\gamma$ A et 2 sous-unités POL $\gamma$ B. POL $\gamma$ A, le noyau catalytique, contient un domaine exonucléase 3'-5' pour la relecture du brin d'ADN synthétisé. Les sous-unités accessoires, POL $\gamma$ B, améliorent l'interaction avec l'ADN et augmentent l'activité catalytique et la qualité de POL $\gamma$ A. La POL $\gamma$  est fidèle et précise dans la polymérisation des nucléotides (taux d'erreur *in vitro* de 1 nucléotide mal incorporé pour 500 000 bases polymérisées) (Kaguni, 2004). La POL $\gamma$  n'est pas capable d'utiliser l'ADN double brin comme matrice. Elle nécessite l'action de l'hélicase Twinkle qui se déplace devant la POL $\gamma$  et déroule l'ADN double brin dans le sens 5'-3'. La protéine de liaison à l'ADN simple brin, mtSSB, a un rôle de protection contre les nucléases, et empêche la formation de structure secondaire. Elle va également stimuler l'activité de POL $\gamma$  et Twinkle. La répllication et la transcription de l'ADNmt sont liées. En effet pour initier la

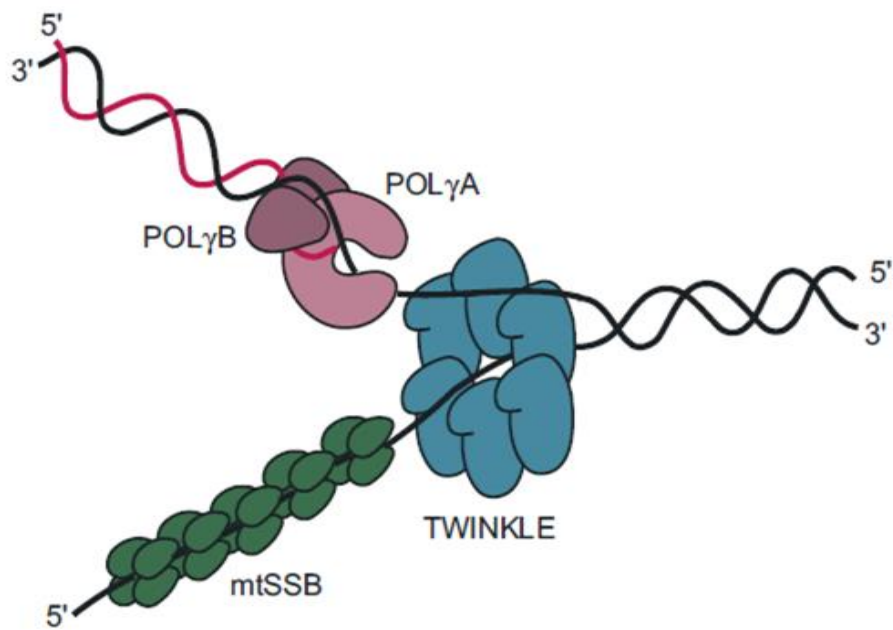


Figure 12 : Schéma du réplisome.  
(D'après (Falkenberg *et al.*, 2007)).

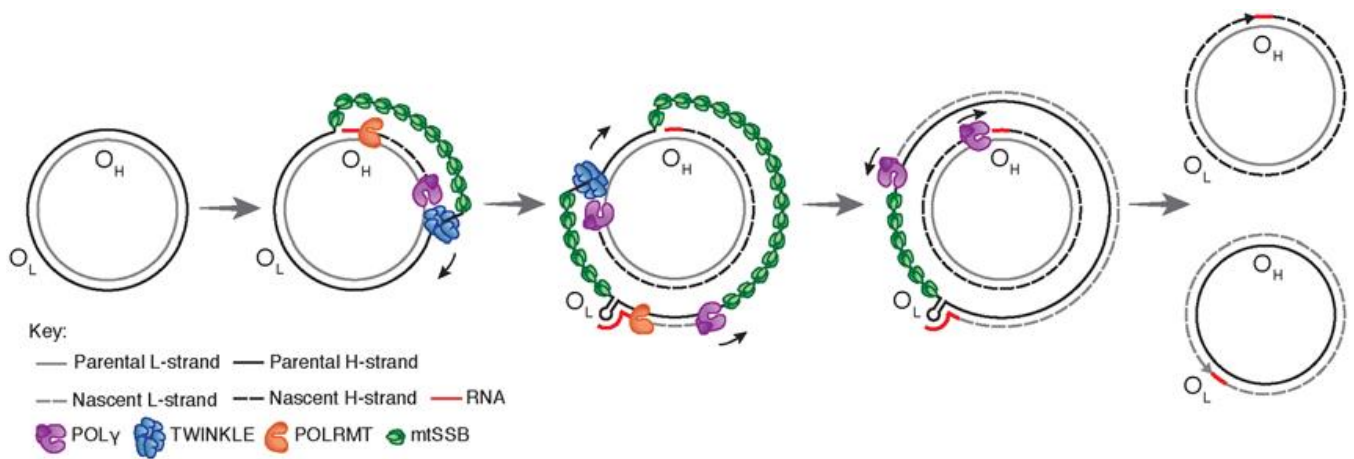


Figure 13 : Réplication de l'ADNmt d'après le modèle de déplacement de brin.  
(D'après (Falkenberg, 2018)).

réplication, une amorce ARN doit être initialement être produite par une polymérase mitochondriale à ARN (POLRMT) (Figure 12) (Falkenberg 2018).

Trois modèles de réplication ont été proposés et restent encore en discussion à ce jour. Cependant le premier modèle de déplacement de brin est le plus communément accepté (Robberson *et al.*, 1972). Dans ce modèle, la réplication est initiée par l'origine de réplication OH avec une synthèse du brin H en simple brin. Lorsque le brin synthétisé arrive au niveau de l'origine de réplication OL, la réplication démarre dans l'autre sens. Tout d'abord le brin H forme une structure tige-boucle, bloquant la liaison de la protéine mtSSB et permettant à la polymérase POLRMT d'initier l'amorce ARN puis POLy prend le relai. La réplication des 2 brins se fait en continu mais de façon asymétrique et asynchrone. Lorsque les 2 brins sont synthétisés, une ligase permet de circulariser les brins néo-synthétisés. Deux molécules d'ADNmt circulaires sont obtenues à la fin d'un cycle de réplication avec pour chaque molécule, un brin néosynthétisé et un brin parental (Falkenberg and Gustafsson, 2020) (Figure 13).

### c) Transcription et traduction

La transcription commence à partir des promoteurs HSP, pour le brin H, et LSP, pour le brin L. Ils produisent des ARN précurseurs polycistroniques. Tout le génome mitochondrial est transcrit en trois transcrits primaires, 2 transcrits pour le brin H et un transcrit unique pour le brin L. La transcription à partir de HSP est initiée à partir de 2 sites spécifiques : H1 et H2. H1 est situé en amont du gène ARNtPhe et son produit de transcription se termine en 3' du gène ARNr 16S. H2 se situe proche de l'extrémité 5' du gène ARNr 12S et produit un transcrit polycistronique correspondant à la quasi-totalité du brin H. La fin de la transcription à partir du H1 dépend de la protéine mTERF (mitochondrial transcription terminaison factor). Cette protéine se lie à la région 3' du gène ARNtLeu. La terminaison de la transcription à partir de H2 se situe après la région contrôle, en amont du gène tRNAPhe. En revanche le site de terminaison de la transcription du brin L n'a pas été étudié (Falkenberg *et al.*, 2007).

La POLRMT n'a pas la capacité d'interagir seule avec les promoteurs de l'ADN pour initier la transcription mais nécessite l'intervention des facteurs TFAM et TFB2M (mitochondrial transcription factor B2). TFAM se lie à l'ADNmt entraînant un changement de conformation de l'ADNmt permettant à la POLRMT de se fixer à l'ADNmt et d'initier la transcription (Falkenberg *et al.*, 2007). L'étape d'élongation nécessite une coopération entre la POLMRT et le facteur TEFM (transcription elongation factor) ((D'Souza and Minczuk, 2018).

Les transcrits primaires subissent un clivage pour obtenir : les ARNm, ARNt et ARNr. Les transcrits subissent ensuite une étape de maturation (D'Souza and Minczuk, 2018). Les ARNm vont être polyadénylés en 3' (à l'exception de *MT-ND6*).

La traduction des 13 protéines du génome mitochondrial est réalisée directement dans la mitochondrie grâce à des mitoribosomes. Ils sont constitués d'une grande sous-unité 39S (mt-LSU) et d'une petite sous-unité 28S (mt-SSU). Les ARNr (16S et 12S) et un ARNt sont codés par le génome mitochondrial alors que les autres

## mtDNA inheritance

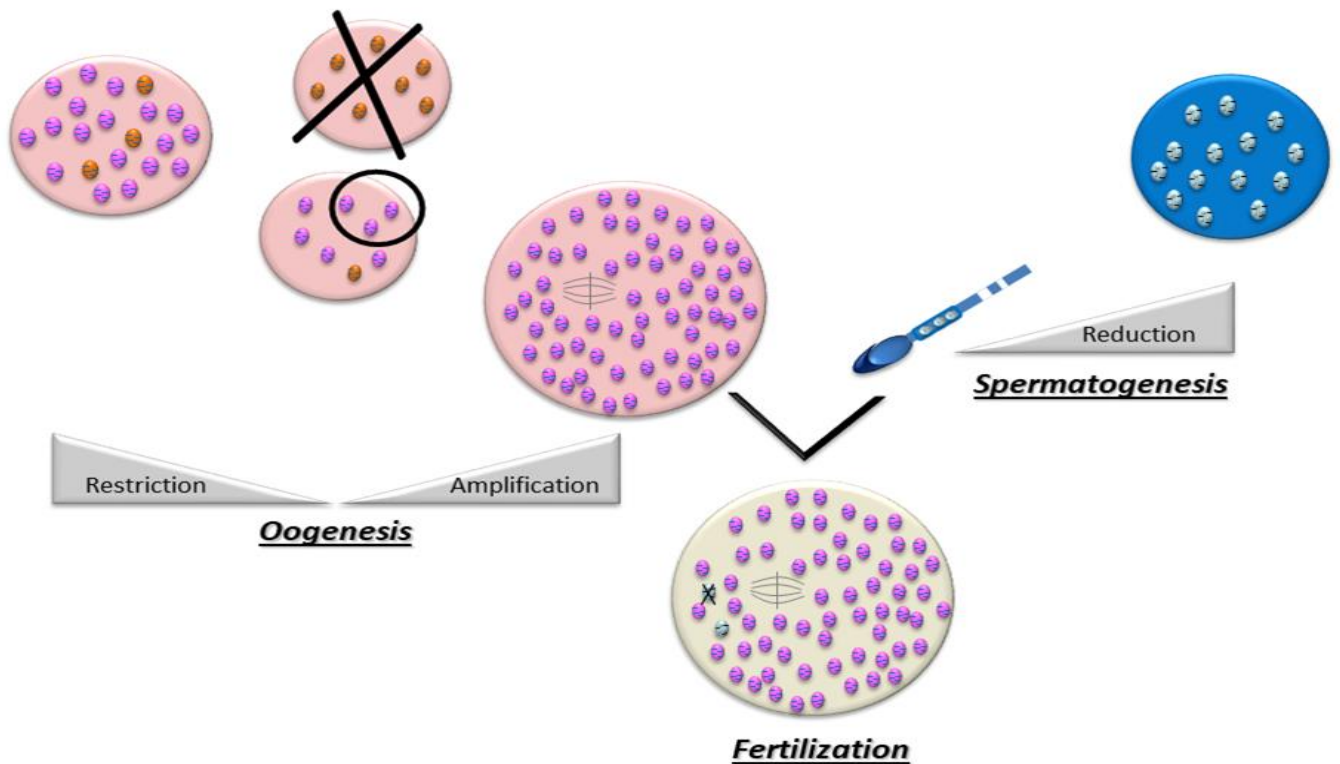


Figure 14 : Transmission mitochondriale maternelle.  
(D'après (May-Panloup et al., 2021))

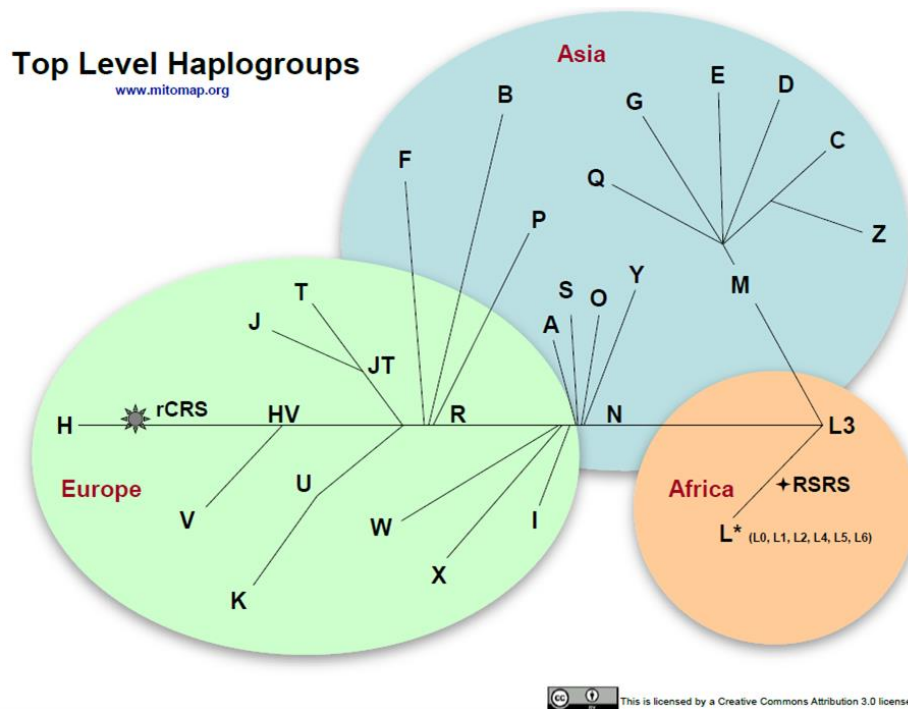


Figure 15 : Représentation des haplogroupes mitochondriaux.  
(D'après Mitomap)

composants des mitoribosomes sont codés par le génome nucléaire et importés dans la mitochondrie (Sissler and Hashem, 2021). La traduction mitochondriale se déroule en 3 étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison (Ott *et al.*, 2016).

#### d) Transmission

La transmission uniparentale maternelle du génome mitochondrial est établie pour tous les mammifères. Seules les mitochondries de l'ovocyte persisteront dans l'embryon. Plusieurs mécanismes sont à l'origine du mode de transmission.

- Tout d'abord, du côté des spermatozoïdes, une réduction drastique du nombre de copies d'ADNmt au cours de la spermatogenèse est observée. D'une part par l'élimination d'une grande partie du cytoplasme, incluant les mitochondries, sous forme de corps résiduels lors de la spermiogenèse et d'une sous-régulation des niveaux de protéines TFAM associés à une réduction du nombre de copies d'ADNmt (Rantanen *et al.*, 2001). Chez les invertébrés, l'ADNmt paternel est quasiment éliminé dans les spermatozoïdes matures par l'action d'une endonucléase mitochondriale endoG (DeLuca and O'Farrell, 2012).
- Ensuite la transmission uniparentale maternelle pourrait résulter d'une dilution passive lors de la fécondation, causée par la disproportion numérique de l'ADNmt des gamètes. En effet, au cours de l'ovogenèse, un phénomène de restriction puis d'amplification du contingent mitochondrial ovocytaire s'effectuerait, appelé bottleneck ou goulot d'étranglement (Hauswirth and Laipis, 1985) qui conduit à faire de l'ovocyte la cellule la plus riche de l'organisme en ADNmt (environ 200 000 copies/ovocyte) (Otten and Smeets, 2015). Ce mécanisme conduit en outre à l'obtention d'une population mitochondriale homogène et homoplasmique, qui sera transmise à la descendance (Figure 14).
- Enfin, un mécanisme d'élimination actif des mitochondries paternelles après la fécondation a été proposé. Les mitochondries spermatiques seraient ubiquitinylées lors de la spermatogenèse et reconnues par l'ovocyte pour une dégradation spécifique suivant différentes voies (mitophagie et un système ubiquitine-protéasome) lors des premières étapes embryonnaires (Song *et al.*, 2016; Sutovsky *et al.*, 1999) (cf paragraphe 3.2.2).

#### e) Haplogroupes mitochondriaux

Le génome mitochondrial présente un taux de mutations très élevé par rapport au génome nucléaire, de l'ordre de 10 à 20%. Au cours de l'évolution, certaines mutations se sont fixées définissant différents groupes de populations. Ces groupes, ainsi définis par la séquence nucléotidique de leur ADNmt sont appelés haplogroupes mitochondriaux (Wallace, 2018) (Figure 15).

Ces mutations d'haplogroupes sont considérées comme neutres mais elles pourraient constituer des facteurs de susceptibilité ou de protection vis-à-vis de diverses pathologies (Wallace, 2018). L'influence des haplogroupes a notamment été mise en évidence dans le contexte de l'infertilité, chez la femme (May-Panloup *et al.*, 2014) et chez l'homme (Feng *et al.*, 2013).



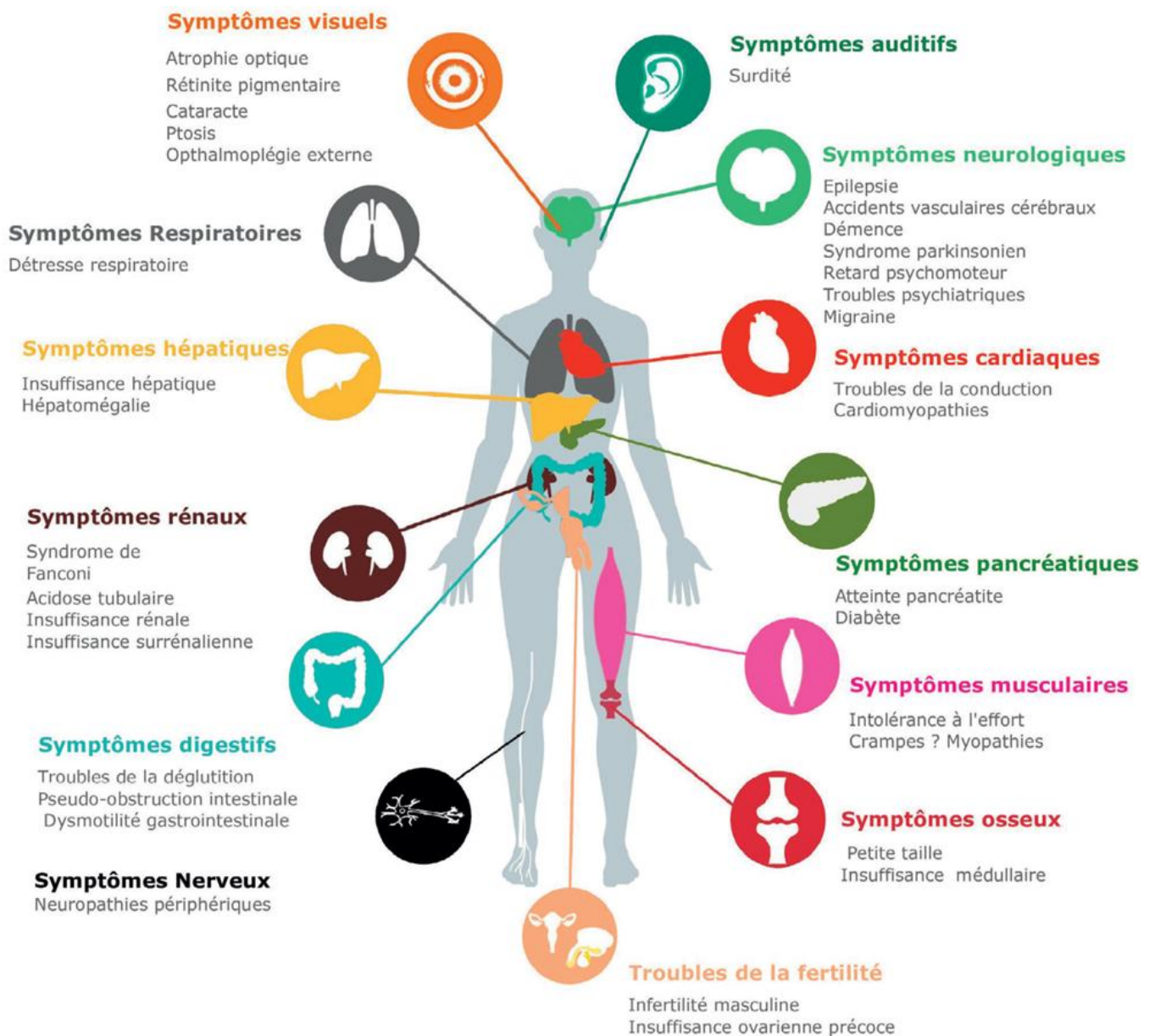


Figure 16 : Symptômes cliniques retrouvés dans les pathologies mitochondriales.

(D'après (Bris et al., 2018))

## f) Pseudogènes

Tout au long de l'évolution, se sont opérés des transferts de segments d'ADNmt vers le noyau des cellules avec une intégration au génome nucléaire. Ces portions d'ADN, appelées pseudogènes ou NUMTs (nuclear-encoded mitochondrial sequences), seraient non fonctionnelles (Puertas and González-Sánchez, 2020). Les mécanismes d'insertion de l'ADNmt dans le génome nucléaire ne sont pas encore complètement compris. Cependant une hypothèse est proposée selon laquelle les fragments d'ADNmt seraient insérés dans le noyau lors de la réparation des cassures double-brin de l'ADN nucléaire par le mécanisme de jonction des extrémités non homologues (NHEJ : Non-Homologous End-Joining) (Marshall and Parson, 2021; Puertas and González-Sánchez, 2020).

Grâce aux avancées du séquençage génomique à haut débit, 1090 NUMTs ont pu être répertoriés allant d'une taille de 13 à 18 649 pb. Certains pseudogènes ont une taille supérieure à celle de l'ADNmt (Marshall and Parson, 2021). Récemment, des Mega-NUMTs ont été identifiés qui correspondent à plusieurs copies du génome mitochondrial complet inséré dans l'ADN nucléaire (Balciuniene and Balciunas, 2019; Lutz-Bonengel *et al.*, 2021).

Ces pseudogènes rendent l'étude de l'ADNmt complexe. Lors du séquençage de ce dernier il est essentiel de s'assurer que les séquences d'ADN analysées ne soient pas des pseudogènes. Il est donc nécessaire de vérifier que les couples d'amorces destinés à amplifier l'ADNmt n'amplifient pas parallèlement des pseudogènes. Outre l'attention particulière au design des amorces une vérification est possible grâce à des tests d'amplification préalables réalisés sur cellules Rho0 (Chandel and Schumacker, 1999) qui sont des cellules déplétées en ADNmt.

## g) Les pathologies mitochondriales

Les pathologies mitochondriales constituent un groupe de troubles métaboliques complexes et hétérogènes se définissant par une anomalie génétique affectant majoritairement le fonctionnement de la chaîne respiratoire (Gorman *et al.*, 2016). Elles peuvent découler de mutations portées par l'ADNmt (prévalence chez l'adulte estimée à 9.6 cas pour 100 000 individus) mais également l'ADN nucléaire (prévalence chez l'adulte estimée à 2.9 cas pour 100 000 individus), codant pour des protéines mitochondriales (Gorman *et al.*, 2015). Pour l'ADNmt, la mutation peut porter sur un gène codant pour une sous-unité de la chaîne respiratoire, pour un ARNt et un ARNr. Les mutations de l'ADN nucléaire ciblent des gènes codant pour des protéines importées vers les mitochondries et nécessaires à leur bon fonctionnement (protéines des complexes de la chaîne respiratoire, protéines liées à la fusion-fission, protéines liées à la réplication, transcription de l'ADNmt...). Les dysfonctions mitochondriales peuvent avoir comme conséquence de nombreux symptômes cliniques et atteindre tous les organes et tissus (Russell *et al.*, 2020). En effet, la production énergétique des organes et tissus dépend du fonctionnement de la chaîne respiratoire (Figure 16). Contrairement au génome nucléaire, le génome mitochondrial présente plusieurs copies par cellule. Une mutation sur un gène nucléaire est retrouvée soit à l'état homozygote (100%), soit à l'état hétérozygote (50%). Cette notion est différente pour l'ADNmt, on parle





d'homoplasmie et d'hétéroplasmie. L'hétéroplasmie est la coexistence de molécules d'ADN sauvages et mutées alors que l'homoplasmie correspond à la présence de la même molécule d'ADNmt dans toutes les cellules (aussi bien native que présentant une même mutation). La fréquence d'hétéroplasmie peut donc varier dans une cellule de 0.1 à 99.9%. Le phénotype pathologique d'une maladie mitochondriale dépend du seuil d'hétéroplasmie, c'est-à-dire du pourcentage d'ADNmt muté. Ce seuil d'hétéroplasmie est généralement établi autour de 70% avant que le phénotype clinique ne se manifeste mais ce seuil varie et dépend de la mutation, du type cellulaire et même de chaque patient (Russell *et al.*, 2020) (Figure 17). A l'heure actuelle seuls les symptômes des maladies mitochondriales sont traités. Le développement de traitements spécifiques est un véritable challenge médical (Rahman and Rahman, 2018; Russell *et al.*, 2020).

## **h) Altérations de l'ADNmt**

Les altérations du génome mitochondrial sont répertoriées selon trois grandes catégories, les déplétions, les grands réarrangements et les mutations ponctuelles.

- **Déplétions de l'ADNmt**

Les déplétions de l'ADNmt sont des anomalies quantitatives caractérisées par une diminution sévère du nombre de copies du génome mitochondrial des cellules (Suomalainen and Isohanni, 2010). Ces déplétions sont causées par des mutations dans des gènes nucléaires, impliqués dans la maintenance du génome mitochondrial ou sa réplication.

- **Grands réarrangements**

Les grands réarrangements de l'ADNmt comportent essentiellement les délétions mais également des duplications. Chez l'homme, plus de 1300 délétions et 44 duplications sont décrites selon la base de données Mitobreak (<http://mitobreak.portugene.com>).

Il existe deux types de délétions, les simples et les multiples. Les délétions simples sont d'origine sporadique et présentent une grande variabilité de taille et de localisation. La plus commune des délétions est celle de 4977 pb, localisée entre les gènes *MT-ATP8* et *MT-ND5* (Figure 18). Les délétions multiples correspondent à la présence de plusieurs délétions de taille différente chez le même individu. Ces délétions multiples résultent d'anomalies des gènes nucléaires et ont une transmission mendélienne. Elles sont issues, soit d'un défaut de maintenance, soit d'un défaut du processus de réplication du génome mitochondrial. Elles peuvent également être associées au vieillissement.

Une molécule d'ADNmt possédant une duplication est plus grande que l'ADNmt normal puisqu'elle possède une région dupliquée en tandem (Damas, Carneiro, *et al.*, 2014). La pathogénicité des duplications n'a pas été démontrée mais pourrait être à l'origine de protéines aberrantes dues à la fusion de gènes, ou perturber la transcription des ARNt (Damas, Samuels, *et al.*, 2014).

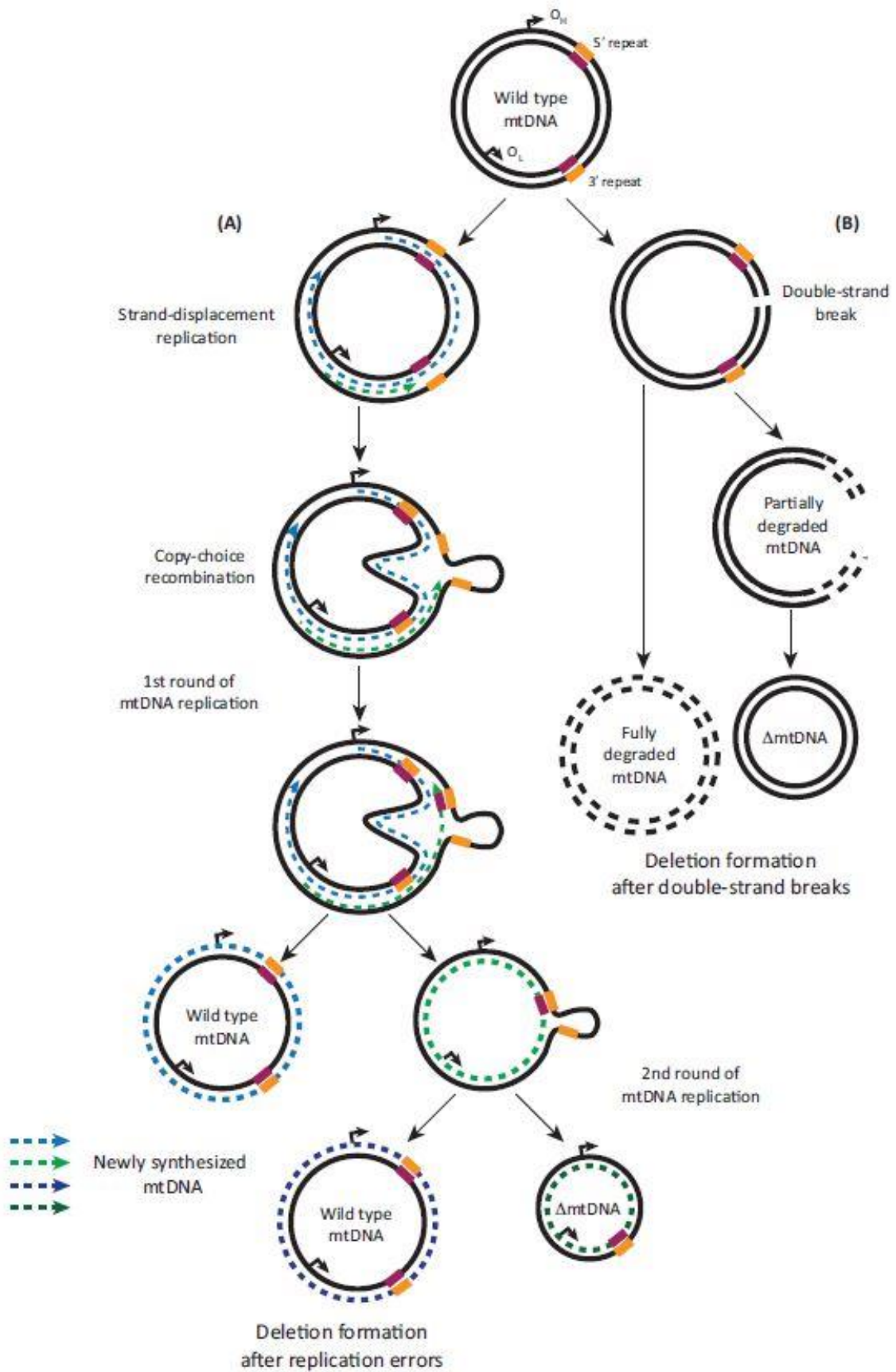


Figure 19 : Formation des délétions.  
(D'après (Nissanka *et al.*, 2019)).

Récemment, un nouveau type de délétion a été proposé dans un outil bioinformatique MitoSAlt (Mitochondrial Structural Alterations) pour l'identification, la quantification et la visualisation des délétions de l'ADNmt. Ils ont reclassé les délétions emportant une ou les deux origines de réplication sous le terme « duplications ». Ces molécules d'ADNmt ont été considérées comme étant incapables de se répliquer et ont été différenciées des autres délétions (Basu *et al.*, 2020).

Les mécanismes de formation des délétions de l'ADNmt sont complexes et ne sont pas encore complètement connus (Falkenberg and Gustafsson, 2020). Plusieurs hypothèses ont été proposées, la formation des délétions serait liée à des erreurs de réplication de l'ADNmt ou aux cassures double-brin (Krishnan *et al.*, 2008; Nissanka *et al.*, 2019). Plus récemment, l'équipe de Persson propose l'implication d'une recombinaison par choix de copie pendant la réplication du brin L de l'ADNmt (Persson *et al.*, 2019) (Figure 19).

Environ 68% des délétions se produisent dans une partie du génome flanquée de courtes séquences directes répétées parfaites (classe I). Ces régions répétées joueraient un rôle dans la formation des délétions (Damas, Carneiro, *et al.*, 2014). La délétion commune en fait partie avec une séquence directe répétée de 13 nucléotides. Douze pourcent des délétions sont flanquées par des répétitions imparfaites (classe II) et 20% des délétions ne possèdent pas de répétitions (classe III). Les erreurs de réplication aboutiraient à des délétions de classe I et II et les erreurs de réparation de l'ADNmt causeraient les délétions de classe II et III (Chen *et al.*, 2011).

- Mutations ponctuelles

Les mutations ponctuelles peuvent être présentes dans tous les gènes de l'ADNmt : gènes codant pour les protéines de la chaîne respiratoire, les ARNt et ARNr.

Toutes les mutations de l'ADNmt ne sont pas pathogènes mais peuvent résulter de variations nucléotidiques entre individus ou populations.

Aujourd'hui, plusieurs mutations ponctuelles pathogènes ont été confirmées et répertoriées dans Mitomap (<https://www.mitomap.org>), 43 dans les gènes codant pour des sous-unités protéiques de la chaîne respiratoire ; 50 dans les ARNt et 2 dans les ARNr. Les mutations ponctuelles ont une transmission maternelle. Dans ces mutations pathogènes nous retrouvons des pathologies comme MELAS (Mitochondrial Encephalopathy Lactic Acidosis Stroke-like episodes), LHON (Leber Hereditary Optic Neuropathy), NARP (neurogenic muscle weakness, ataxia, and retinitis pigmentosa), MERRF (Myoclonic Epilepsy with Ragged-Red Fibers) et DEAF (deafness, sensorineural hearing loss) (Figure 18) (Wallace, 2018).

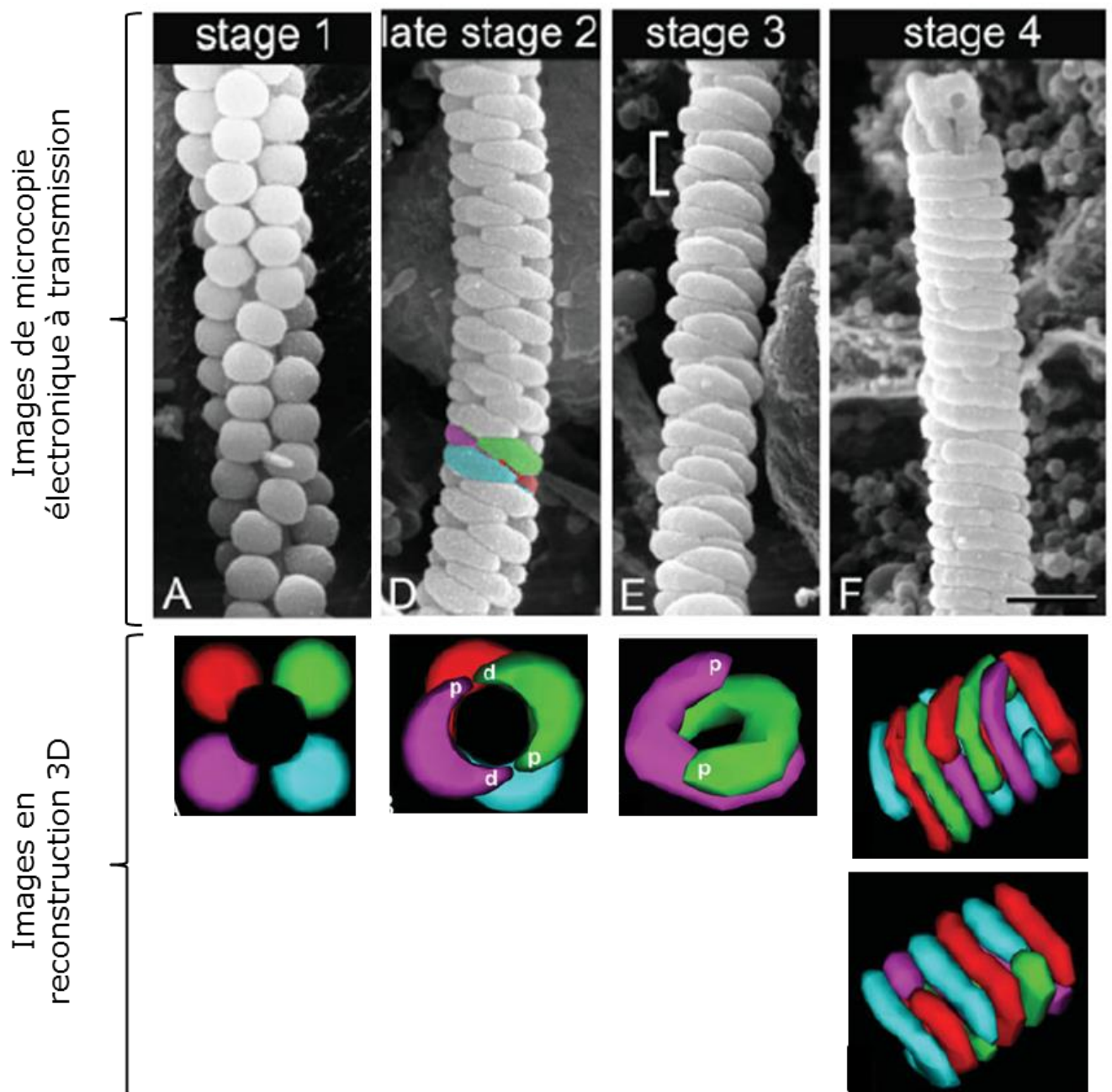


Figure 20 : Formation de l'hélice mitochondriale au cours de la spermiogenèse chez la souris.

Les quatre couleurs représentent chacune une mitochondrie. Echelle : 1  $\mu$ m. p : proximal ; d: distal. (Adaptée de (Ho and Wey, 2007))



## 3.2. Rôle des mitochondries dans l'infertilité masculine

### 3.2.1. Mitochondrie et spermatogenèse

#### a) Morphologie mitochondriale lors de la spermatogenèse

Au cours de la spermatogenèse, la morphologie des mitochondries des cellules germinales évolue. Dans les spermatogonies et les spermatocytes jusqu'au stade leptotène les mitochondries sont de type classique ou « orthodoxe » c'est-à-dire qu'elles ont une morphologie équivalente à celle de la plupart des cellules somatiques. Elles évoluent ensuite vers un type « intermédiaire » dans les spermatocytes primaires, puis « condensé » dans les spermatocytes secondaires. Pendant cette phase les crêtes disparaissent progressivement par l'élongation et dilatation de l'espace inter-membranaire et condensation de la matrice mitochondriale. Enfin, les mitochondries se décondensent pour revenir à un stade intermédiaire dans les spermatides et spermatozoïdes (De Martino *et al.*, 1979; Meinhardt *et al.*, 1999; Ramalho-Santos *et al.*, 2009). Lors de la spermiogenèse, se déroulent les processus de différenciation incluant la formation du flagelle. Les mitochondries présentes dans le cytoplasme vont soit former la gaine mitochondriale située dans la pièce intermédiaire du flagelle, soit être éliminées avec la majeure partie du cytoplasme dans la gouttelette cytoplasmique. Le mécanisme de cette ségrégation mitochondriale est inconnu, et en particulier son caractère sélectif ou aléatoire reste débattu (Varuzhanyan and Chan, 2020).

L'organisation des mitochondries en hélice mitochondriale est décrite en quatre stades par Otani (Otani *et al.*, 1988) qui ont été précisés par Ho and Wey (Ho and Wey, 2007) chez la souris. Les 4 étapes sont décrites comme suit (Figure 20) :

- 1<sup>ère</sup> étape : les mitochondries sphériques s'agencent autour des fibres denses pour former 4 rangées longitudinales.
- 2<sup>ème</sup> étape : les mitochondries changent de morphologie et prennent une forme de croissant. Elles se disposent en cercle par paire, et les cercles successifs s'intercalent constituant ainsi 4 rangées imbriquées.
- 3<sup>ème</sup> étape : Les mitochondries continuent de s'allonger. Les rangées opposées de mitochondries entrent en contact pour former une double hélice.
- 4<sup>ème</sup> étape : Les mitochondries en contact au niveau de leurs extrémités s'allongent pour prendre leur conformation finale.

Les mécanismes moléculaires associés à ces transformations sont encore mal identifiés.

Au final, dans le spermatozoïde humain mature, les mitochondries forment une hélice (spirale) de 10 à 12 spires (Fawcett, 1970) avec deux mitochondries par spire.

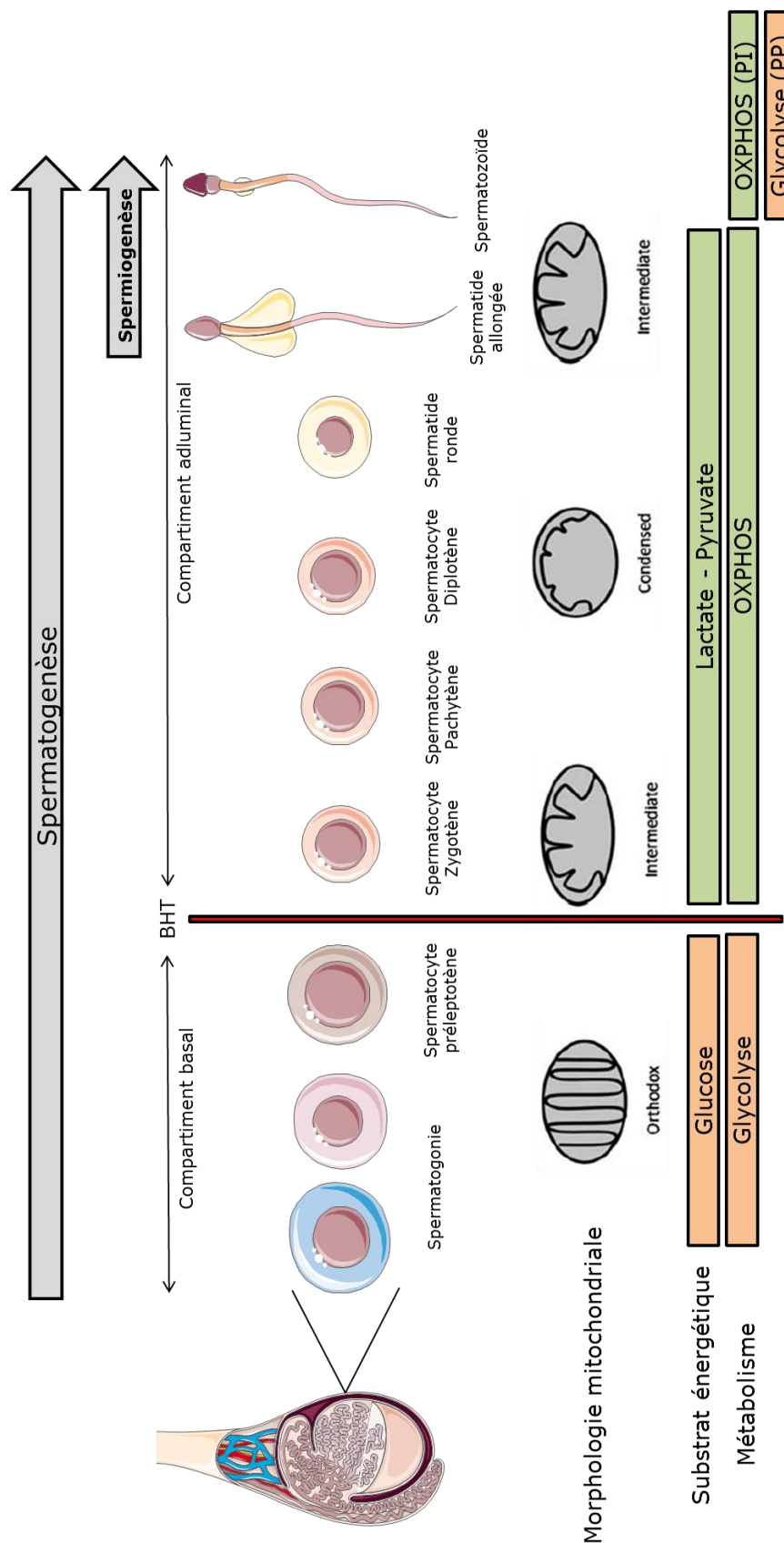


Figure 21 : Morphologie mitochondriale et besoins énergétiques lors de la spermatogenèse.

BHT : Barrière Hémato Testiculaire ; PI : Pièce Intermédiaire ; PP : Pièce Principale (D'après (De Martino *et al.*, 1979; Meinhardt *et al.*, 1999; Ramalho-Santos *et al.*, 2009; Varuzhanyan and Chan, 2020).

## **b) Rôle énergétique des mitochondries lors de la spermatogenèse**

Les mitochondries connaissent de nombreux changements morphologiques au cours de la spermatogenèse. Ces changements seraient liés aux besoins énergétiques des cellules germinales. Les cellules germinales n'ont pas accès aux mêmes substrats énergétiques en fonction de leur stade évolutif, notamment en raison des jonctions serrées que forment les cellules de Sertoli qui délimitent la BHT. Cette BHT détermine deux compartiments. Le compartiment basal est en lien avec le tissu interstitiel et donc le système vasculaire, contrairement au compartiment adluminal, situé après la BHT (Stanton, 2016). Les spermatogonies et les spermatocytes jusqu'au stade leptotène sont situés dans le compartiment basal avec un accès au glucose sanguin qu'ils utilisent pour la glycolyse. Les spermatocytes et spermatides dépendent en revanche des cellules de Sertoli pour leur production énergétique. Les cellules de Sertoli absorbent le glucose et le transforment en pyruvate par la glycolyse. Ce pyruvate peut être transformé en lactate par la pyruvate déshydrogénase (PDH). Le lactate et le pyruvate peuvent ensuite être transportés aux cellules germinales par un transporteur monocarboxylate. Cependant le transport du lactate et son utilisation par les cellules germinales est privilégiée au pyruvate (Rato *et al.*, 2012). Puis le lactate est de nouveau transformé en pyruvate par la lactate déshydrogénase (LDH). Ce pyruvate alimente le cycle de Krebs puis les cofacteurs réduits produits serviront pour l'O<sub>2</sub>PHOS (Varuzhanyan and Chan, 2020) (Figure 21).

## **c) Rôle de la dynamique mitochondriale lors de la spermatogenèse**

Le rôle de la dynamique mitochondriale au cours de la spermatogenèse chez l'homme reste en fait mal évalué. Mais, la structure mitochondriale contrainte en hélice semble en contradiction avec la dynamique du réseau mitochondrial essentielle au fonctionnement des autres cellules de l'organisme.

Pourtant chez la souris, le mutant *Mfn1* et les doubles mutants *Mfn1* et *Mfn2* conduisent à un phénotype d'infertilité sans production de spermatozoïdes. Ces résultats suggèrent l'importance des mécanismes de fusion mitochondriale lors de la spermatogenèse et plus précisément au cours de la méiose (Varuzhanyan *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2016). Par ailleurs, au sein des cellules germinales post méiotiques (spermatides), une fragmentation mitochondriale médiée par les protéines de fission *Fis1* et *Mff* permettrait de générer de petites mitochondries autorisant la formation de la gaine mitochondriale du spermatozoïde murin (Varuzhanyan, Chen, *et al.*, 2021; Varuzhanyan, Ladinsky, *et al.*, 2021).

### **3.2.2. Mitochondrie spermatique et infertilité**

Le rôle des mitochondries dans les spermatozoïdes et l'infertilité masculine a fait l'objet d'une étude bibliographique sous forme de revue publiée dans le journal *Human Reproduction Update* en 2021, présentée ci-dessous.





**Introduction :** La fonction la plus connue du spermatozoïde est de féconder un ovocyte et de transmettre son génome paternel à la descendance. Cette cellule extrêmement spécialisée présente une organisation singulière comprenant les éléments strictement nécessaires à la réalisation des différentes étapes de la fécondation et au développement embryonnaire. Un spermatozoïde mature est composé d'une tête, d'un col et d'un flagelle qui permet la mobilité et contient une pièce intermédiaire incluant un manchon mitochondrial. La mitochondrie est l'élément central de la production d'énergie cellulaire mais elle intervient dans de nombreuses autres fonctions. Si l'importance des mitochondries pour le fonctionnement du spermatozoïde est avérée, leur rôle exact et leur fonctionnement semblent complexes et font l'objet d'une littérature dense et parfois contradictoire. Cette organelle, n'est en outre qu'indirectement impliquée dans l'hérédité cytoplasmique puisque leur ADN, l'ADN mitochondrial paternel, n'est pas transmis à la descendance.

**Objectif :** Notre travail avait pour objectif de faire la synthèse de la littérature disponible sur les mitochondries dans les spermatozoïdes, en particulier chez l'Homme, avec la perspective de mieux comprendre les anomalies mitochondriales pouvant être impliquées dans l'infertilité masculine.

**Matériels et méthodes :** PubMed a été utilisé pour rechercher dans la base de données MEDLINE des articles originaux et des revues évaluées par des pairs concernant les spermatozoïdes et les mitochondries, dans l'espèce humaine. Les recherches ont été effectuées à l'aide de mots-clés appartenant à trois groupes : "mitochondrie" ou "ADN mitochondrial" ; "spermatozoïde" ou "sperme" ; et "espèces réactives de l'oxygène" ou "calcium" ou "apoptose" ou "voies de signalisation". Ces mots-clés ont été combinés à d'autres expressions de recherche pertinentes pour le sujet. Les références de ces articles ont été utilisées pour obtenir des articles supplémentaires.

**Résultats :** Les mitochondries sont au centre du métabolisme du spermatozoïde et sont impliquées dans la production énergétique, l'équilibre redox, la régulation calcique, ainsi que dans les voies apoptotiques, toutes ces fonctions étant nécessaires au mouvement flagellaire, à la capacitation, à la réaction acrosomique et à la fusion gamétique. Dans de nombreux cas, l'altération de ces différentes fonctions a pu être reliée à une atteinte des paramètres spermatiques et/ou de la fertilité. Le lien entre génome mitochondrial et qualité spermatique semble plus complexe. Si la quantité d'ADNmt dans les spermatozoïdes est inversement corrélée à la qualité spermatique, tout comme la présence de larges délétions dans cet ADN, l'effet des mutations semble plus hétérogène, notamment en fonction de leur pathogénicité.

**Discussion :** L'importance du rôle de la mitochondrie dans la reproduction, et particulièrement la qualité gamétique, a émergé ces dernières années avec nombre de publications sur le sujet. La compréhension de l'infertilité masculine revêt un intérêt particulier dans le contexte actuel où est décrite une détérioration significative de la qualité spermatique.

**Mots-clés :** Infertilité masculine, Mitochondrie, ADN mitochondrial, Fonction mitochondriale, Oligoasthénotéatozoospermie, Spermatozoïde



# Mitochondria: their role in spermatozoa and in male infertility

Magalie Boguenet<sup>1</sup>, Pierre-Emmanuel Bouet<sup>2</sup>, Andrew Spiers<sup>2</sup>,  
Pascal Reynier<sup>1,3</sup>, and Pascale May-Panloup<sup>1,4,\*</sup> 

<sup>1</sup>MITOVASC Institute, CNRS 6015, INSERM U1083, Angers University, Angers 49000, France <sup>2</sup>Department of Reproductive Medicine, Angers University Hospital, Angers 49000, France <sup>3</sup>Department of Biochemistry and Genetics, Angers University Hospital, Angers 49000, France <sup>4</sup>Reproductive Biology Unit, Angers University Hospital, Angers 49000, France

\*Correspondence address. Reproductive Biology Unit, Angers University Hospital, Angers 49933, France.  
E-mail: pamaypanloup@chu-angers.fr  <https://orcid.org/0000-0001-7609-7265>

Submitted on July 30, 2020; resubmitted on December 22, 2020; editorial decision on January 7, 2021

## TABLE OF CONTENTS

- Introduction
- Mitochondria
- Mitochondria in spermatozoa
  - Structure of mitochondria in spermatozoa
  - Energy requirements of mitochondria in spermatozoa
  - Signalling pathways of mitochondria in spermatozoa
- Mitochondrial DNA
- Mitochondrial DNA in spermatozoa
  - Spermatozoa mtDNA transmission
  - Spermatozoa mtDNA copy number
  - Spermatozoa mtDNA integrity
- Conclusion

**BACKGROUND:** The best-known role of spermatozoa is to fertilize the oocyte and to transmit the paternal genome to offspring. These highly specialized cells have a unique structure consisting of all the elements absolutely necessary to each stage of fertilization and to embryonic development. Mature spermatozoa are made up of a head with the nucleus, a neck, and a flagellum that allows motility and that contains a midpiece with a mitochondrial helix. Mitochondria are central to cellular energy production but they also have various other functions. Although mitochondria are recognized as essential to spermatozoa, their exact pathophysiological role and their functioning are complex. Available literature relative to mitochondria in spermatozoa is dense and contradictory in some cases. Furthermore, mitochondria are only indirectly involved in cytoplasmic heredity as their DNA, the paternal mitochondrial DNA, is not transmitted to descendants.

**OBJECTIVE AND RATIONAL:** This review aims to summarize available literature on mitochondria in spermatozoa, and, in particular, that with respect to humans, with the perspective of better understanding the anomalies that could be implicated in male infertility.

**SEARCH METHODS:** PubMed was used to search the MEDLINE database for peer-reviewed original articles and reviews pertaining to human spermatozoa and mitochondria. Searches were performed using keywords belonging to three groups: 'mitochondria' or 'mitochondrial DNA', 'spermatozoa' or 'sperm' and 'reactive oxygen species' or 'calcium' or 'apoptosis' or 'signaling pathways'. These keywords were combined with other relevant search phrases. References from these articles were used to obtain additional articles.

**OUTCOMES:** Mitochondria are central to the metabolism of spermatozoa and they are implicated in energy production, redox equilibrium and calcium regulation, as well as apoptotic pathways, all of which are necessary for flagellar motility, capacitation, acrosome reaction



and gametic fusion. In numerous cases, alterations in one of the aforementioned functions could be linked to a decline in sperm quality and/or infertility. The link between the mitochondrial genome and the quality of spermatozoa appears to be more complex. Although the quantity of mtDNA, and the existence of large-scale deletions therein, are inversely correlated to sperm quality, the effects of mutations seem to be heterogeneous and particularly related to their pathogenicity.

**WIDER IMPLICATIONS:** The importance of the role of mitochondria in reproduction, and particularly in gamete quality, has recently emerged following numerous publications. Better understanding of male infertility is of great interest in the current context where a significant decline in sperm quality has been observed.

**Key words:** male infertility / mitochondria / mitochondrial DNA / mitochondrial function / oligoasthenoteratozoospermia / spermatozoa

## Introduction

Infertility, which is defined as the inability of a couple to conceive after 12 months of unprotected intercourse, is a public health issue which affects around 10% of couples worldwide (Mascarenhas et al., 2012). In ~50% of cases, a male factor is implicated, whether isolated (30%) or combined with a female factor (20%) (Agarwal et al., 2015). These figures are on the rise as studies show a significant decrease in sperm quality over the last 10 years (Rolland et al., 2013; Levine et al., 2017). Furthermore, the diagnosis of male infertility is based on the evaluation of sperm parameters according to criteria defined by the World Health Organization (WHO) (World Health Organization, 2010). Although the WHO classification has clear clinical relevance, it does have some limitations, in particular a low-predictive value for spontaneous pregnancies (Esteves et al., 2012). Hence, other sperm factors, which are beyond the scope of conventional observations, could allow for a better understanding of certain male fertility problems, and could even explain certain the so-called unexplained cases of infertility. Due to the prevalence of male infertility and its imperfect categorization by current classical diagnostic methods, it seems essential to better understand sperm pathophysiology in order to apprehend the mechanisms underlying male infertility, and to improve its diagnosis and management.

Spermatozoa are highly specialized cells with a unique structure consisting of all the elements necessary for the different stages of fertilization and for contributing to early embryonic development. A mature spermatozoon is made up of a head, a neck and a tail or flagellum. The head comprises an acrosome containing enzymes necessary for gametic interaction and a nucleus carrying the haploid genome which is passed on to progeny. The neck contains the proximal centriole which when brought to the oocyte, plays a role in orchestrating the embryo's cell division. In addition, spermatozoa provide the components necessary for oocyte activation, phospholipase C-zeta (Saunders et al., 2002), as well as various proteins (Castillo et al., 2018) and RNAs (Jodar et al., 2013) that are thought to have an epigenetic impact on early embryo development and on the health of descendants (Rando, 2012). The final constituent part of spermatozoa, the flagellum, confers motility and is made up of three parts, including the mid-piece with a mitochondrial helix.

Mitochondria are central to cellular energy production, but they also have numerous other functions such as redox, signalling pathways and apoptosis. Although mitochondria are recognized as essential to spermatozoa, their exact roles and functioning appear to be complex. The available literature relative to mitochondria in spermatozoa is dense and contradictory in some cases. Furthermore, mitochondria are only indirectly involved in cytoplasmic heredity as their DNA, the paternal

mitochondrial DNA, is not transmitted to descendants. This review aims to summarize the available literature on mitochondria in spermatozoa, and, in particular, that with respect to humans, with the perspective of better understanding the anomalies that could be implicated in male infertility.

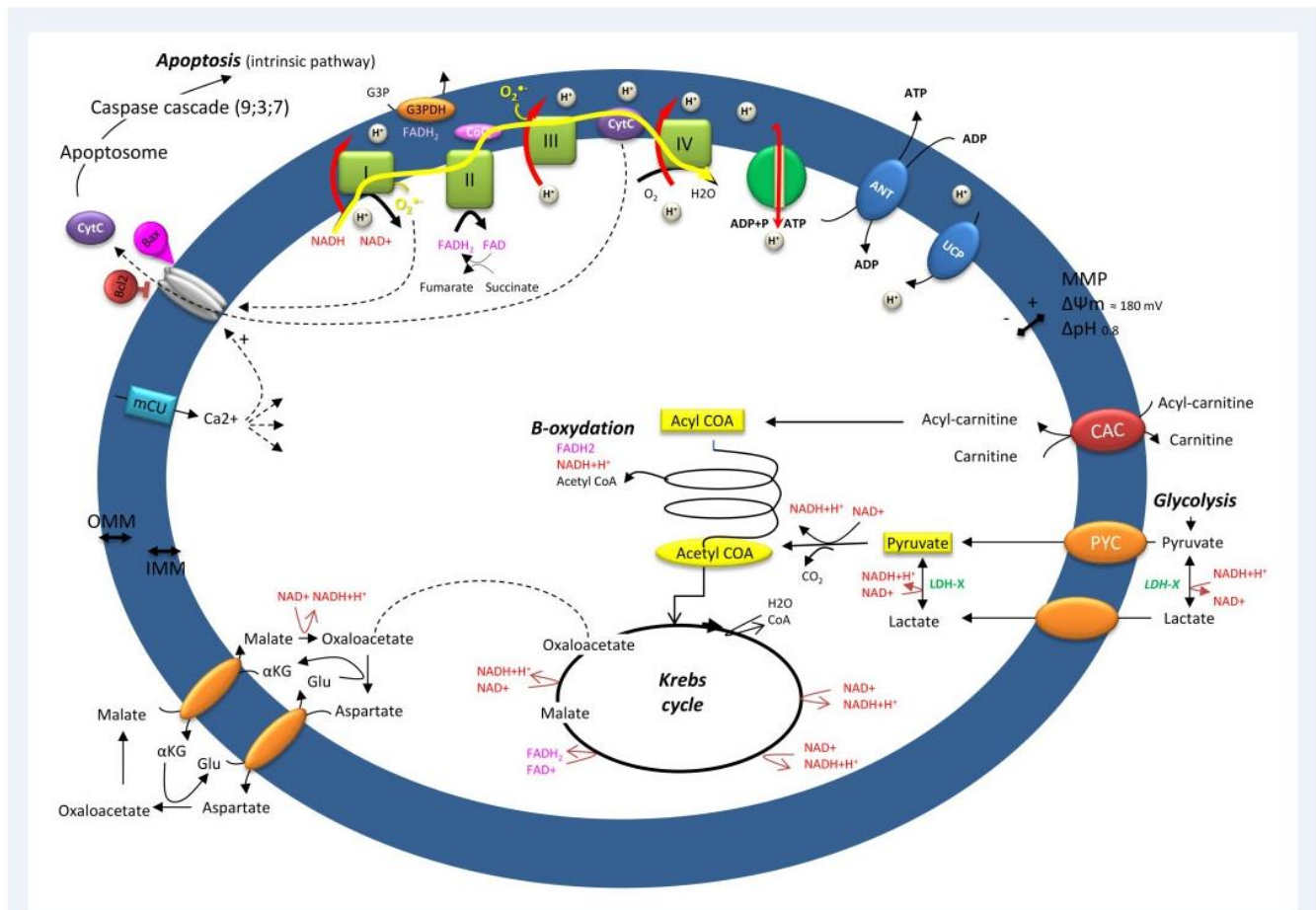
## Mitochondria

Mitochondria are the result of an endosymbiosis, that occurred about 2 billion years ago, between an  $\alpha$ -prokaryote and a primitive eukaryotic cell (Gray, 1999). With the exception of erythrocytes, mitochondria are found in all human cell types and their number varies from a few hundred to several thousand per cell depending on cell type and activity. Mitochondria are characterized by two membranes, the outer and inner membranes (OMM and IMM), delimiting the intermembrane space and the mitochondrial matrix. The invaginations of the inner membrane incorporate highly specialized structures, i.e. the cristae, directly related to energy production. The structure of mitochondria varies considerably from one cell to another and according to energy needs (Vafai and Mootha, 2012). They adopt either the form of filamentous structures (mitos in Greek) organized in interconnected networks, or the form of isolated grains (chondros in Greek). The space occupied by mitochondria can be up to 20% to 30% of the total cell volume, as is the case in energy-consuming cardiomyocytes for example. The structure of mitochondria is highly dynamic, with continuous processes of fusion and fission, allowing for a finely tuned response to cellular energy needs (Archer, 2013).

Mitochondria are the powerhouse of cells, producing the energy required for all cellular functions from the terminal catabolism of energetic substrates through the Krebs cycle, to the oxidative decarboxylation of  $\alpha$ -ketoacids, the  $\beta$ -oxidation of fatty acids and amino acid catabolism, etc. All these metabolic pathways provide the reducing equivalents (NADH<sub>2</sub> and FADH<sub>2</sub>) required for oxidative phosphorylation (OXPHOS). OXPHOS depends on the activity of five multi-enzymatic complexes embedded in the inner mitochondrial membrane; complexes I–IV make up the electron transport chain (ETC) from the reduced equivalents, while complex V, the ATP synthase, produces the ATP required for cellular energy needs (Fig. 1; Spinelli and Haigs, 2018).

The electron transfer along the respiratory chain is coupled with proton translocations from the matrix to the intermembranous space. This leads to a proton gradient across the inner membrane and results in mitochondrial membrane potential (MMP). Decreased MMP is indicative of mitochondrial damage and dysfunction (inability to produce ATP) whereas hyperpolarization can generate excess endogenous





**Figure 1. Mitochondrial structure and function.** Mitochondria are enclosed by a semi-permeable OMM and an IMM that is virtually impermeable to ions and water-soluble metabolites. These substances can only penetrate the IMM by means of specific transport membrane proteins, such as ANT, which exchanges mitochondrial ATP and cytosolic ADP, or by more sophisticated shuttle-like mechanisms, such as the glycerol-3-phosphate shuttle, the lactate/pyruvate shuttle or the malate/aspartate shuttle found in spermatozoa (Shuttles are depicted in orange). Embedded in the IMM are the respiratory chain complexes (I–IV in light green) that transfer electrons from  $\text{NADH}_2$  and  $\text{FADH}_2$  (produced in particular in the Krebs cycle and from  $\beta$ -oxidation) to molecular oxygen. This flow of electrons is linked to the translocation of protons from the matrix to the intramembranous space, generating a gradient at the origin of the membrane potential  $\Delta\Psi_m$ . This proton-motive force is exploited by the ATP synthase (V in dark green) which causes the return of protons to the matrix for the synthesis of ATP that is necessary for various spermatogenic functions. Under certain conditions, this proton return takes place due to decoupling proteins (UCP). The functioning of the respiratory chain produces ROS which is involved in sperm functioning but may be detrimental if in excess. The IMM also contains other specific carriers such as mCU which has a role in the calcium homeostasis necessary for spermatozoa functioning. It also contains mtPTP, the opening of which is responsible for cytochrome-c leakage and the activation of the intrinsic apoptosis pathway. mtPTP activation is modulated by ROS, calcium and specific regulators such as Bax and Bcl-2. ANT, adenine nucleotide translocator; IMM, inner membrane; OMM, outer membrane; UCP, uncoupling protein.

reactive oxygen species (ROS) which is harmful beyond a certain threshold (Zorova et al., 2018). Mitochondria also contain mitochondrial permeability transition pores (mtPTPs) that initiate cell death by opening up when the mitochondrial energy function declines (Hirsch et al., 1997). Thus, mitochondrial dysfunctions that either impair OXPHOS or produce excess ROS increase susceptibility to apoptosis (Fig. 1).

Mitochondria undergo perpetual renewal by means of a continuous process of biogenesis, from pre-existing mitochondria, and degradation, by mitophagy, within lysosomes of altered and depolarized mitochondria (Youle and van der Bliek, 2012).

In addition to their importance in energy production and cell death, mitochondria also play a central role in many other essential functions of cells including the biosynthesis of organic compounds, calcium homeostasis, iron metabolism, thermogenesis and, more generally, gene expression and signalling pathways (Gut and Verdin, 2013; Chandel, 2014; Rossi et al., 2019).

Mitochondria have the unique characteristic of carrying their own genetic information allowing them to code for 13 (unique) proteins (Anderson et al., 1981). The uniparental transmission of mitochondrial DNA is a central issue in reproduction (Otten and Smeets, 2015).



## Mitochondria in spermatozoa

Spermatozoa are extremely specialized cells with the unique function of fertilization. They possess a highly differentiated structure with an extremely particular mitochondrial organization suggesting that mitochondria are essential to spermatozoa functionality (Amaral et al., 2013; Lehti and Sironen, 2017).

### Structure of mitochondria in spermatozoa

During spermatogenesis, from the late spermatocyte stage to the mature spermatozoa, the mitochondria of the germ line cells change from a classic structure to a more condensed and a more active structure (Ramalho-Santos et al., 2009). During spermiogenesis, a large part of the cell cytoplasm (including mitochondria) is eliminated in the form of residual bodies and only a few mitochondria persist in the mature gamete. During this period, the supply of energy substrates is modified due to the transport of male germ cells across the germinal epithelium from the basal compartment (where access to blood nutrients is direct) to the central compartment where lactate and pyruvate are supplied by Sertoli cells (Grootegoed et al., 1984).

Spermatozoa are made up of a head (including the nucleus and the acrosome), a neck (containing the proximal centriole) and a flagellum. The spermatozoa flagellum can be divided into three distinct parts: the midpiece, the principal piece and the end piece. These different flagellar segments have in common a central cytoskeletal structure called the axoneme consisting of nine peripheral doublet microtubules around a central microtubule doublet. Mitochondria are only found in the midpiece; they are strongly linked to each other and helically wrapped around the axoneme, forming the mitochondrial sheath. In humans, ~72–80 elongated mitochondria form 10–12 mitochondrial gyres (Fawcett, 1970; Gu et al., 2019).

The mitochondrial sheath is attached to neighbouring structures (dense fibres and the axoneme) by a reticulum of filaments (Olson and Winfrey, 1990). In addition, the surface of the outer membrane is covered with a keratinous structure formed by disulphide bonds between the cysteine residues of the selenoproteins and in particular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) (Ursini et al., 1999). The mitochondrial sheath produces the ATP necessary for sperm functions (Schmidt and Carter, 2016). Furthermore, the scientific literature theorizes that this structure also has a protective role for the mitochondrial genome as it accentuates flagellar rigidity and protects against osmotic stress (Ramalho-Santos et al., 2009; Lindemann and Lesich, 2016).

#### The link between mitochondrial structure and male infertility

Comparative studies between species have shown that the structure of the flagellar midpiece influences sperm motility and metabolism. In particular, mitochondrial volumes are correlated with ATP production and sperm velocity (Gu et al., 2019). In humans, abnormalities in spermatozoa, including shorter midpieces with fewer mitochondrial gyres (Mundy et al., 1995), abnormal assembly of mitochondria (Wilton et al., 1992; Gopalkrishnan et al., 1995) or structural defects in mitochondrial membranes (Pelliccione et al., 2011), have been associated with asthenospermia. Moreover, fertilization rates could be linked to the proportion of normal mitochondrial structure and helix assembly (Baccetti et al., 2002).

### Energy requirements of mitochondria in spermatozoa

The principal role of mitochondria is to provide energy. Mammalian spermatozoa use ATP not only for motility but also for capacitation, hyperactivation, acrosome reaction and oocyte penetration (Rajender et al., 2010; Mannowetz et al., 2012; Mukai and Travis, 2012; Du Plessis et al., 2015). The metabolic pathways involved in spermatozoa energy production are still under discussion (Ford, 2006; Turner, 2006; Storey, 2008; Ramalho-Santos et al., 2009; Du Plessis et al., 2015; Rodríguez-Gil and Bonet, 2016).

Flagellar movement results from the sliding, with respect of each other, of the axonemal microtubules under the action of dynein arms. The ATPase activity of the dynein protein confirms that ATP is essential for flagellar movement. With the energy production being done by the mitochondria of the intermediate piece (4.5 micrometres in humans), the question remains as to whether or not ATP diffuses to support the energy requirements of the principal piece which represents about 90% of the flagellum (45 micrometres in humans). The available literature supports the idea that the ATP production of the mitochondrial sheath could be insufficient to diffuse to the entire flagellum (Mukai and Travis, 2012). It has been proposed that ATP is produced by mitochondria through OXPHOS in the midpiece and that anaerobic glycolysis provides ATP in the principal piece. Indeed, the principal piece is devoid of mitochondria but contains a fibrous sheath (FS) enriched with glycolytic enzymes, some of which are specific isoenzymes that contain modifications at their N-terminus capable of anchoring the proteins of the FS (Piomboni et al., 2012; Gu et al., 2019). Across different species, these can include hexokinase, phosphoglucokinase isomerase, phosphofructokinase, lactic dehydrogenase (LDH) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Bunch, 1998; Travis et al., 1998, 1999; Du Plessis et al., 2015). OXPHOS and anaerobic glycolysis are not mutually exclusive, and spermatozoa seem able to utilize both pathways.

Mitochondria in spermatozoa use different means to provide reducing equivalents to the respiratory chain. Three shuttles (lactate/pyruvate, malate/aspartate and the glycerol-3P shuttle) (Piomboni et al., 2012), in addition to  $\beta$ -oxidation and Krebs cycle, provide  $\text{FADH}_2$  and  $\text{NADH}_2$  to produce ATP. The balance between the metabolism of pyruvate and lactate is a major energy source for the male gamete. Within the cytoplasm, either pyruvate is transformed into lactate under the action of LDH, thereby reoxidizing the  $\text{NADH}_2$  into  $\text{NAD}^+$  necessary for the achievement of anaerobic glycolysis, or lactate is transformed into pyruvate which is then transported into the mitochondrial matrix by specific transporters (PYC = pyruvate carriers) (Hildyard and Halestrap, 2003) and decarboxylated into acetyl-CoA for aerobic oxidation by OXPHOS (Ferramosca et al., 2008; Ferramosca and Zara, 2014). Mitochondria in spermatozoa could therefore be able to benefit from an alternative energy source through the internalization of lactate, which is further oxidized to pyruvate in the mitochondrial matrix, as shown in rodents (Passarella et al., 2008). In humans, this transformation is carried out thanks to specific lactate dehydrogenase isoforms i.e. LDH-X (or LDH-C4) (Storey, 2008). Indeed, mitochondria in spermatozoa have the peculiarity of containing unique protein isoforms such as LDH-X as well as cytochrome-c, subunit VIb of COX and EI-pyruvate decarboxylase (Piomboni et al., 2012; Du Plessis et al., 2015; Fig. 1).



Fatty acids could also supply energy via  $\beta$ -oxidation within mitochondria and provide energy for spermatogenesis, sperm maturation and flagellar movement, as shown in humans (Ferramosca *et al.*, 2008). Their combination with carnitine provides acylcarnitines, which are transported through the mitochondrial inner membrane. The link between sperm quality and carnitine has already been shown by numerous studies in humans, indicating that carnitine concentration in seminal plasma is directly related to sperm parameters (Matalliotakis *et al.*, 2000; Gürbüz *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007; Sheikh *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2011, 2017) and to the fertility of patients (Zopfgen, 2000; Sheikh *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2011).

The ability of spermatozoa to use different energy sources and metabolic pathways enables them to use the available substrates in their surrounding environment, which varies during their journey within the female genital tract (Ruiz-Pesini *et al.*, 2007; Storey, 2008). Interestingly, the presence of an AMP-activated protein kinase (AMPK) has been demonstrated in mature spermatozoa from different species including humans (Calle-Guisado *et al.*, 2017; Shabani Nashtaei *et al.*, 2017). This essential cellular energy sensor is a strong regulator of mitochondrial activity and allows for the adaptation of spermatogenic functions to environmental conditions (Martin-Hidalgo *et al.*, 2018). Moreover, the preferred metabolic pathway used by spermatozoa with regard to energy production is highly species specific (Storey, 2008). In humans, pigs and rodents, glycolysis seems to be an important energy source (Miki *et al.*, 2004) whereas in horses, OXPHOS appears to be the principal metabolic pathway (Moraes and Meyers, 2018). These two pathways are balanced in bulls (Losano *et al.*, 2017). Thus, in addition to this interspecific variability, the interweaving of the different metabolic energy pathways and the differences in experimental design of relevant studies do not allow for an unanimous conclusion as to the principal metabolic pathways in spermatozoa (Ramalho-Santos *et al.*, 2009; Piomboni *et al.*, 2012; Amaral *et al.*, 2013; Du Plessis *et al.*, 2015; Moraes and Meyers, 2018).

#### *The link between mitochondrial functioning abnormality and male infertility*

Through different methodological approaches, several authors have highlighted the relationship between mitochondria functioning and sperm parameters. In particular, defects in sperm ETC functioning have been associated with sperm quality impairment.

First, MMP which reflects mitochondrial functioning and energy status is correlated with sperm motility and viability, in humans (Evenson *et al.*, 1982; Troiano *et al.*, 1998; Marchetti *et al.*, 2002, 2004; Gallon *et al.*, 2006; Paoli *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Bonanno *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016a; Moscatelli *et al.*, 2017; Barbagallo *et al.*, 2020). Moreover, the MMP increases during the acrosome reaction *in vitro* in boar (Ramíó-Lluch *et al.*, 2011), and is correlated to acrosome reaction capability in humans (Gallon *et al.*, 2006) as well as to sperm fertilizing capability in natural conception and in *in vitro* fertilization (IVF) (Kasai *et al.*, 2002; Gallon *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2011; Marchetti *et al.*, 2012; Malić Vončina *et al.*, 2016). Second, by measuring the enzymatic activity of the respiratory chain complexes and by using specific inhibitors on each of them, a correlation between the functioning of the respiratory chain complexes and sperm parameters, in particular motility and vitality, has been shown (Ruiz-Pesini *et al.*, 1998; Ruiz-Pesini, Lapeña, Dr'ez, *et al.*, 2000). Third, oxygen consumption and mitochondrial respiration efficiency are also correlated with

sperm motility (Ferramosca *et al.*, 2008, 2012), hyperactivated motility and capacitation (Stendardi *et al.*, 2011).

Recently OMIC technology, which allows for the global exploration of biological phenomena, has been used to try and better understand male infertility (Sinha *et al.*, 2017). Modifications in the expression of mitochondrial genes encoded by mitochondrial and nuclear genomes have been found in the spermatozoa of asthenospermic patients (Jodar *et al.*, 2012). Similarly, proteomic analysis revealed a modified expression of several mitochondrial proteins in patients with decreased sperm motility (Zhao *et al.*, 2007; Martínez-Heredia *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2009; Siva *et al.*, 2010; Parte *et al.*, 2012). More recently, other authors have found modifications in the expression of mitochondrial proteins and of proteins involved in the metabolism and energy production in spermatozoa from asthenospermic patients (Amaral *et al.*, 2014; Nowicka-Bauer *et al.*, 2018; Moscatelli *et al.*, 2019). These studies confirm the key role played by mitochondria in sperm physiology and motility. Low sperm motility may very well be caused by dysfunctional mitochondria and insufficient production of energy.

Furthermore, an important element of mitochondrial function is that mitochondria are highly dynamic organelles that interact with each other to respond to variations in cellular energy demands. Mitochondrial dynamics are mediated by large dynamin GTPases (DRP1, OPA1, MFN1 and MFN2) embedded in the mitochondrial membranes (Archer, 2013). Dynamin related protein 1 (DRP1) is involved in mitochondrial fission phenomena. This protein is expressed in human spermatozoa and located in the different parts of the flagellum, in particular the intermediate part (Marchiani *et al.*, 2014). Interestingly, this protein could be the target of sumoylation phenomena, which are post-translational modification processes occurring in mature spermatozoa (Marchiani *et al.*, 2011; Vigodner *et al.*, 2013). Sumoylation is involved in various cellular processes including the control and regulation of mitochondrial dynamics (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007). Thus, a link was demonstrated between the sumoylation of DRP1 and the alteration of sperm motility, possibly via the alteration of mitochondrial functions and metabolic energy processes (Marchiani *et al.*, 2014). Similarly, mitofusin-2 (MFN2) is involved in mitochondrial fusion phenomena and the preservation of mitochondrial morphology and function. This protein had already been detected in sperm from different animal species and has recently been found in the intermediate piece of human spermatozoa with significantly higher expression in normospermic patients compared to asthenospermic patients (Fang *et al.*, 2018). Thus, proteins regulating mitochondrial dynamics are believed to play a crucial role in the functioning of mitochondria in spermatozoa, highlighting their importance in male infertility.

### **Signalling pathways of mitochondria in spermatozoa**

Mitochondria also fulfil a wide range of functions beyond ATP synthesis, including the production of intracellular ROS, calcium regulation and the regulation of cell signalling.

#### *Reactive oxygen species*

Although mitochondria are the major source (Aitken, 2020), ROS in mammalian spermatozoa can have multiple origins, including the NADPH oxidase of the plasma membrane, such as NADPH



oxidase 5 (NOX5) present in human sperm (Musset et al., 2012), aromatic amino acid oxidases and lipoxygenases.

The respiratory chain transfers electrons to molecular oxygen, which is reduced to water. However, in 1–3% of cases, the oxygen is incompletely reduced and forms ROS. In this context, the ROS are essentially the result of the leakage of respiratory chain electrons at the complex I and III levels (Bui et al., 2018).

In physiological conditions, ROS are essential to the activation of intracellular pathways responsible for sperm function. They participate in hyperactive motility, capacitation, acrosomal reaction, chemotactic processes and fusion with the oocyte (Aitken et al., 1991; de Lamirande et al., 1997; Baumber et al., 2003; Ford, 2004; Tremellen, 2008; Sánchez et al., 2010; Amaral et al., 2013; Gibb et al., 2014).

Keeping the rate of ROS at physiological levels is important for sperm function. During their epididymal transit, the spermatozoa are protected from excessive ROS by the antioxidant enzymes of the epididymal epithelium, notably glutathione peroxidase (GPX) and peroxiredoxin (PRDX) (O'Flaherty, 2019). After ejaculation, seminal plasma is believed to play a protective role, as sperm possess a limited supply of antioxidant enzymes due to the minimal availability of cytoplasmic space. The secretions from the prostate and seminal vesicles contain non-enzymatic antioxidants (i.e. vitamin C and E, glutathione, amino acids such as taurine and hypotaurine, albumin, carnitine, carotenoids and flavonoids) (Rhemrev et al., 2000; Dutta et al., 2019). Interestingly, some mitochondrial proteins in sperm appear to be linked with the regulation of ROS production and with sperm quality. The expression of prohibitin, which is a chaperone protein of the inner mitochondrial membrane, has been shown to be inversely correlated with the production of ROS and with a drop in sperm motility in humans (Wang et al., 2012; Chai et al., 2017). Similarly, the mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2), also of the inner mitochondrial membrane, has been known to regulate the level of mitochondrial ROS (Toda and Diano, 2014). In 2018, it was shown that UCP2 is expressed in the intermediate piece of human spermatozoa. Thus, by eliminating ROS, UCP2 could play a role in sperm motility (Wang et al., 2018). Finally, the spermatogenic protein DJ-1, a product of the Parkinson disease related protein 7 (PARK7) gene, has been shown to be under-expressed in asthenospermic patients in association with oxidative stress (Wang et al., 2009; An et al., 2011; Shen et al., 2013; Sun et al., 2014; Nowicka-Bauer et al., 2018). Mitochondrial targeting of this protein could play a role in the regulation of ROS production at the level of complex I of the respiratory chain (Sun et al., 2014).

ROS overproduction can originate from a variety of cells including leucocytes, immature germ cells and defective human spermatozoa (Koppers et al., 2008; Cassina et al., 2015). When the ROS level exceeds a certain threshold, oxidative stress occurs. Oxidative stress can induce a series of harmful processes in spermatozoa. The plasma membrane of sperm contains a large quantity of polyunsaturated fatty acids (PUFA), making it more sensitive to ROS by lipid peroxidation (Aitken et al., 2016). Oxidative stress reduces sperm motility, mitochondrial activity and the ability to fertilize the oocyte (O'Flaherty, 2019; Nowicka-Bauer and Nixon, 2020). ROS also induces DNA damage (Tremellen, 2008) and DNA base oxidation (O'Flaherty and Matsushita-Fournier, 2017).

In 25–40% of infertile men, elevated levels of ROS have been detected in sperm and spermatozoa (O'Flaherty and Matsushita-Fournier, 2017; Adeoye et al., 2018). High concentrations of ROS as

well as low concentrations of antioxidants have been found in the semen of infertile men (Bui et al., 2018). Moreover, the improvement of sperm parameters by antioxidant treatments, although controversial, is also an argument in favour of the negative effects of excess ROS on male fertility (Majzoub and Agarwal, 2018).

The production of ROS by the mitochondria in spermatozoa is also linked to sperm apoptosis. Although mitochondria are the principle site of intracellular ROS formation, they are also particularly susceptible to oxidative stress. Mitochondrial ROS from complex III lead to a release of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> into the extracellular space. On the contrary, mitochondrial ROS from complex I are released into the mitochondrial matrix and can induce peroxidative damage to the IMM (Koppers et al., 2008). This can result in the opening of the transient mtPTP and a collapse of the MMP (Zorov et al., 2014) which triggers the mitochondrial intrinsic apoptotic pathway (Amaral, Lourenço, et al., 2013; Treulen et al., 2015; Aitken et al., 2016; Aitken, 2017). Interestingly, it has also been shown in human spermatozoa that lipid peroxidation induced by oxidative stress produces electrophilic aldehydes, such as 4-hydroxynonenal and acrolein. These compounds react with the mitochondria by targeting succinate dehydrogenase, resulting in an alteration in the functioning of the respiratory chain and leading to the activation of the intrinsic apoptotic pathway as well as an overproduction of ROS in a self-perpetuating cycle (Aitken et al., 2012).

### Apoptosis

Numerous studies show that the sperm apoptotic markers are similar to those in somatic cells, such as the externalization of phosphatidylserine at the plasma membrane (Schuffner et al., 2002; Barroso et al., 2006), loss of mitochondrial integrity (Espinoza et al., 2009), caspase activation (Grunewald et al., 2009) and DNA damage (Aitken and Koppers, 2011). All of these elements are in favour of an apoptotic mechanism present in spermatozoa, although the unique architecture of spermatozoa (i.e. different compartments between the nucleus and mitochondria, reduced cytoplasm and strong chromatin condensation) makes the apoptotic process difficult to understand and, indeed, its existence is controversial.

Interestingly, apoptotic markers have been found in sperm from infertile men and immature sperm, but not in mature sperm from fertile men (Wang et al., 2003; Grunewald et al., 2017). The mitochondria, at the heart of the intrinsic pathway, may be involved in the induction of apoptosis in spermatozoa. A positive correlation has been shown between ROS levels, cytochrome-c release and activation of caspases 9 and 3 in infertile patients (Wang et al., 2003) or in patients with spermatogenic alterations (Zhang et al., 2014). These studies also show a decrease in the expression of Bcl-2 protein (anti-apoptotic) with an increase in Bax (pro-apoptotic). However, studies on the artificial induction of ROS (via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in particular) are inconsistent. Some show a decrease in sperm motility without signs of apoptosis among spermatozoa (Grunewald et al., 2005; Engel et al., 2018), while others find an externalization of phosphatidylserine to the plasma membrane, activation of caspase-3 and DNA fragmentation (Lozano et al., 2009). Similarly, induction of the intrinsic apoptosis pathway (via betulinic acid), induces a significant decrease in MMP, motility and spermatozoa integrity with activation of caspases 9 and 3 (Paasch et al., 2004; Grunewald et al., 2005; Engel et al., 2018). Normally, DNA fragmentation is a secondary event to the release of mitochondrial apoptotic molecules: endonuclease-G and apoptosis inducing factor (AIF). In



humans, these molecules have been detected in spermatozoa (Taylor *et al.*, 2004; Koppers *et al.*, 2011). Once released in cells, these molecules are translocated into the nucleus and cause DNA fragmentation. This mechanism is, however, unlikely given the architecture of spermatozoa. As such, activation of the intrinsic pathway does not appear to lead to fragmentation of the sperm nuclear DNA (Engel *et al.*, 2018), and the DNA lesions observed are more likely to be of oxidative origin (Aitken and Koppers, 2011).

Activation of the apoptotic cascade is believed to have an adverse effect on the fertilization potential of spermatozoa (i.e. capacitation, acrosomal response, fertilization) (Grunewald *et al.*, 2006; Said *et al.*, 2006). A negative correlation has been shown between certain apoptotic characteristics (caspase-3 activation, phosphatidylserine externalization and disruption of MMP) and the ability of sperm to fertilize an oocyte (Grunewald *et al.*, 2008; Talarczyk-Desole *et al.*, 2016) and to support early embryonic development (Hidhri *et al.*, 2018).

#### Calcium homeostasis

$\text{Ca}^{2+}$  is a second messenger that regulates various cellular processes. In particular, it plays an important role in sperm function (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2006). It is involved in flagellar movement, capacitation, acrosomal reaction and chemotaxis, as shown in animals (Publicover *et al.*, 2007) and humans (Espino *et al.*, 2009). A study done on bovids showed that the mechanisms that regulate the calcium concentration of spermatozoa involve the plasma membrane, the acrosome and the mitochondria (Rodriguez *et al.*, 2012). Indeed, mitochondria are at the crossroads of metabolic pathways and cellular signalling pathways and are involved in the regulation of calcium fluxes (Rossi *et al.*, 2019). Calcium is able to penetrate the mitochondrial matrix where it regulates the proteins, enzymes and transporters necessary for the synthesis of ATP (Contreras *et al.*, 2010). In excess, it is likely to stimulate the opening of mPTP, release of cytochrome-c and activation of the apoptotic pathway. The absorption of  $\text{Ca}^{2+}$  through the IMM is mediated by different channels including, in particular, the mitochondrial calcium uniporter (mCU) (Patergnani *et al.*, 2011). Blocking the mCU has been shown to reduce human sperm motility and ATP levels, highlighting the role of mitochondria in calcium regulation and spermatozoa function (Bravo *et al.*, 2015).

## Mitochondrial DNA

One of the peculiarities of mitochondria is that these organelles possess their own genome in the form of mitochondrial DNA (mtDNA). The mtDNA molecule in humans is circular, double-stranded and made up of 16 569 basepairs (Anderson *et al.*, 1981). mtDNA is organized into nucleoprotein complexes (i.e. nucleoids), devoid of protective histones (Satoh and Kuroiwa, 1991; Legros *et al.*, 2004). The mtDNA content of a human cell is highly variable depending on the cell type considered. Both strands of the DNA principally form coding sequences. These sequences code for 13 subunits of the I, III, IV and V respiratory chain complexes as well as for 22 tRNAs and 2 rRNAs which play a role in mitochondrial translation (Fig. 2). All other mitochondrial proteins (estimated to number about 1500) are nuclear encoded in the cell and imported into mitochondria by specialized import machinery (Chacinska *et al.*, 2009).

The regulation of mitochondrial biogenesis enables mitochondrial function to be adapted to cellular needs. This regulation is carried out, in coordination with the general cell metabolism, by peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1  $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) and the sirtuin family. PGC-1 $\alpha$  activates nuclear genes involved in fatty acid oxidation, antioxidant defense and the Krebs cycle. In parallel, PGC-1 $\alpha$  promotes the expression of nuclear respiratory factor 1 and 2 (NRF1 and NRF2), transcription factors of nuclear genes coding for mitochondrial import proteins, assembly proteins and respiratory subunits, as well as for factors responsible for mtDNA translation (tRNA and rRNA), transcription and replication mitochondrial transcription factor A (TFAM) and DNA polymerase gamma (POLG), thus ensuring the necessary coordination between the mitochondrial and nuclear genomes.

## Mitochondrial DNA in spermatozoa

### Spermatozoa mtDNA transmission

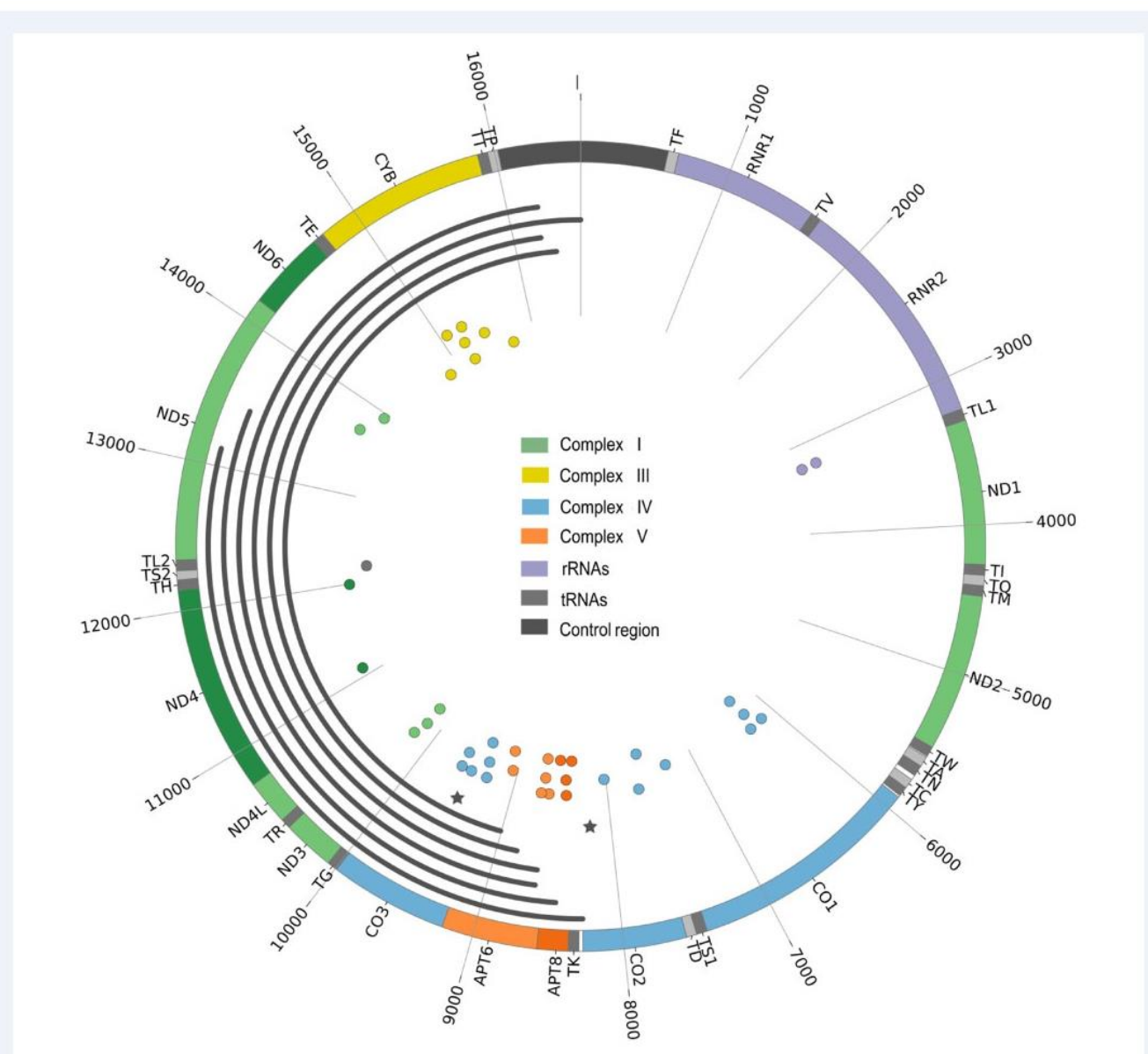
Although efficient mitochondria are essential to spermatozoa fertilizing ability, after fertilization they seem to no longer have any function. It is accepted that in most organisms, the mitochondrial genome is transmitted exclusively through uniparental maternal transmission via the oocytes (Hutchison *et al.*, 1974; Giles *et al.*, 1980).

Why is heteroplasmy detrimental? The mtDNA in spermatozoa could be damaged by oxidative stress and could be unsuitable for transmission to the embryo. Moreover, even with nonpathogenic variants, mitochondrial heteroplasmy (the coexistence of two mtDNA genomes) has been reported to alter physiological and cognitive functions in mice (Acton *et al.*, 2007; Sharpley *et al.*, 2012). Beyond a certain threshold of heteroplasmy (Yabuuchi *et al.*, 2012), the coordination between nuclear and mitochondrial genes may break down, particularly with regard to energy production (Reinhardt *et al.*, 2013).

Different mechanisms have coevolved to avoid paternal mtDNA transmission. However, as yet we do not know the exact mechanisms involved in humans (Sato and Sato, 2013; Carelli, 2015).

First, there is a drastic reduction in the mtDNA copy number (mtDNA-CN) during mammalian spermatogenesis. On the one hand, during spermiogenesis, a large part of the cellular cytoplasm, including the mitochondria, is eliminated in the form of residual bodies (DeLuca and O'Farrell, 2012). On the other hand, during spermatogenesis a downregulation of mitochondrial TFAM protein levels associated with a downregulation of the mtDNA copy number (Rantanen *et al.*, 2001) has been shown in both mice and humans (Larsson *et al.*, 1996, 1997). Among invertebrates, it has been shown that paternal DNA is almost completely eliminated in mature sperm, potentially under the action of endonuclease-G that could intervene during sperm elongation (DeLuca and O'Farrell, 2012; Zhou *et al.*, 2016).

Second, maternal uniparental transmission could result from passive dilution at fertilization, caused by the numerical disproportion of mtDNA molecules between the male and female gametes (Gyllenstein *et al.*, 1991). Although solid evidence of passive dilution is lacking, there is a significant numerical disproportion between the number of



**Figure 2. Representation of human mitochondrial DNA, specifically in the case of spermatozoa.** MtDNA is double-stranded, circular structure of 16569 basepairs. mtDNA is shown with a non-coding region (D-loop), 13 genes coding for subunits of the respiratory chain, 22 tRNAs and 2 rRNAs. The large rearrangements are represented by the black semicircles, starting from the outside: deletions of 4856bp, 4977bp, 7345bp, 7436bp, 7491bp and 7599bp. The two stars represent two deletions of 15bp and 2bp in the CO3 and CO2 genes, respectively. The mutations are represented by circles, with each colour corresponding to the gene in which the variant is found. The deletions are listed in Table II and the mutations are listed in Table III.

mitochondria contained in an oocyte (around 250 000 copies in humans; [Otten and Smeets, 2015](#)) and in a spermatozoa (between 1 and 1000; [Faja et al., 2019](#)). Deep mtDNA sequencing ([Pyle et al., 2015](#)) in buccal samples, has found no evidence that paternal mtDNA haplotypes are transmitted to human offspring. This makes a simple dilution mechanism unlikely for uniparental mtDNA transmission among healthy individuals. However, because of the uneven distribution of mitochondria from sperm during early embryo development, only some cells and tissues could inherit paternal mtDNA

([Luo et al., 2013](#)). Thus, one cannot overlook the fact that paternal DNA could possibly be detectable only in some tissues of offspring ([Carelli, 2015](#)).

Another mechanism is the destruction of mitochondria and/or paternal mtDNA in early embryos. Although mitochondria from the sperm are found in the oocyte just after fertilization ([Ankel-Simons and Cummins, 1996; Cummins, 1998](#)), they are explicitly destroyed before the four-cell stage of embryogenesis. Thus after fertilization in murine, bovine and rhesus monkey populations, the sperm sheath is



deformed, clumped and finally disassembled before the 2–4 cell stage (Song *et al.*, 2016).

Mitochondria are ubiquitinated during spermatogenesis (Sutovsky *et al.*, 1999, 2000). The mitochondrial membrane and matrix proteins, like prohibitin and TFAM, are likely targets of this ubiquitination (Thompson *et al.*, 2003; Antelman *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2016). Ubiquitinated substrates could facilitate the recognition of defective spermatozoa in the epididymis for degradation and also make mitochondria in spermatozoa recognizable to the oocyte's destructive machinery after fertilization. The destruction of targeted mitochondria in the ooplasm could involve different pathways including both mitophagy and the ubiquitin-proteasome system (UPS). This process could rely on the combined action of sequestosome 1 (SQSTM1) dependent autophagy and the valosin-containing protein (VCP), mediated by the presentation of ubiquitinated spermatozoa in mitochondria proteins to the 26S proteasome (Song *et al.*, 2016). It is also possible that specific endonucleases may be involved in the elimination of damaged mitochondria (Nishimura *et al.*, 2006; Sutovsky and Song, 2018).

Exceptions do exist and it is important to note that paternal mtDNA transmission has been shown. Destruction of paternal mitochondria within the oocyte cytoplasm takes place according to species and tissue specific mechanisms. The persistence of paternal mitochondria has been found in inter-species crosses (Kaneda *et al.*, 1995; Sutovsky *et al.*, 1999) and upon injection into the oocyte of mitochondria originating from tissue other than the male germ line cells, such as hepatic mitochondria (Shitara *et al.*, 2000). Furthermore, occurrence of paternal mtDNA transmission has been occasionally documented in mice (Gyllenstein *et al.*, 1991), in sheep (Zhao *et al.*, 2004) and in humans (Schwartz and Vissing, 2002). However, the presence of paternal mtDNA has not been confirmed in subsequent studies in patients with mtDNA mutations (Filosto *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2003). The transmission of paternal mtDNA still remains debated today (Luo *et al.*, 2018, 2019; Eker *et al.*, 2019; Lutz-Bonengel and Parson, 2019; van den Amele *et al.*, 2020). Finally, because these processes depend on the ability of the oocyte to eliminate paternal mtDNA, oocyte quality impairment has been linked to the persistence of paternal mtDNA in polyploid human embryos (St John *et al.*, 2000).

### Spermatozoa mtDNA copy number

Spermatozoa are the cells in the body with the smallest quantity of mtDNA. In humans, early studies with southern blot techniques showed an mtDNA copy number (mtDNA-CN) per spermatozoa of a few hundred (Manfredi *et al.*, 1997; Díez-Sánchez *et al.*, 2003). This technique can be influenced by cross-hybridization with the large number of mitochondrial pseudogenes present in the nuclear genome (Toumen *et al.*, 2002) and therefore lead to an overestimation of the number of mitochondrial genomes. More recent studies using the more accurate real-time quantitative PCR technology show an even lower figure of about ten copies per spermatozoa (May-Panloup *et al.*, 2003; Kao *et al.*, 2004; Song and Lewis, 2008; Gabriel *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2014; Bonanno *et al.*, 2016; Faja *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2019a).

There is a paradox between the fact that spermatozoa need functional mitochondria but contain a very low number of mtDNA. Interestingly, mtDNA transcripts remain constant during spermatogenesis (Alcivar *et al.*, 1989). This could be the result of an increased

stability of those transcripts with a continued translation in spermatozoa (Hecht *et al.*, 1984). Indeed, it is a known fact that mature human spermatozoa produce proteins necessary for the final stages of maturation before fertilization, independently of any transcription, through the translation of pre-existing transcripts (Ostermeier *et al.*, 2002) and that many of these transcripts code for proteins involved in mitochondrial function (Zhao *et al.*, 2006). Surprisingly, these translational phenomena in mature spermatozoa are believed to involve the mitochondrial translational machinery, i.e. mito-ribosomes, and occur either in the cytoplasm or in the mitochondrial matrix (Gur and Breitbart, 2008).

Moreover, Guo *et al.* (2017) showed in pig sperm, that less mtDNA content in motile spermatozoa was accompanied with higher levels of the transcription factor TFAM and cofactor PGC-1 $\alpha$ , increased levels of mtDNA encoded proteins and greater mitochondrial activity. This could suggest a phenomenon of preferential transcription of mtDNA during spermatogenesis, to the detriment of its replication, as already considered by other authors (Agaronyan *et al.*, 2015).

Although a causal relationship cannot be established, many studies have shown that a high number of sperm mtDNA copies is related with poor sperm quality. Increased mtDNA-CN has been related to sperm quality impairment in various species (stallion: Orszynowicz *et al.*, 2016; Darr *et al.*, 2017; Dog: Bugaj *et al.*, 2013; Hesser *et al.*, 2017; pig: Guo *et al.*, 2017). Luo *et al.* 2013 showed that in mice, most motile sperm that had reached the oviduct for fertilization had eliminated their mtDNA, leaving only vacuolar mitochondria (Luo *et al.*, 2013). It has also been shown in mice that males can tolerate at least a threefold reduction in the mtDNA copy number in their sperm without impaired fertility and that the mutated allele of TFAM responsible for a reduction in the number of copies of sperm mtDNA is preferentially transmitted (Wai *et al.*, 2010). In humans, all studies except for one, show an increase in the number of copies of mtDNA in the sperm of infertile patients with sperm abnormalities notably asthenospermia and oligospermia (Table I). Moreover, higher sperm mtDNA-CN has been associated with an impairment in fertilization rates and embryo quality (Wu *et al.*, 2019b) as well as with decreased probability of obtaining a spontaneous pregnancy (Rosati *et al.*, 2020).

The pathophysiology of this phenomenon has not been elucidated but several hypotheses have been proposed.

The increase of mtDNA-CN in abnormal spermatozoa could reflect an abnormality during the maturation phase of spermatogenesis and potentially an aberrant gene expression of mtDNA regulators such as TFAM or POLG (Amaral *et al.*, 2007). Thus, a high mtDNA-CN in abnormal spermatozoa could be linked to an anomaly in the physiological downregulation of TFAM expression which occurs during spermiogenesis (Rantanen *et al.*, 2001).

Alternatively, this could result from compensatory phenomena. Sperm motility impairment, linked to insufficient energy, could promote mitochondrial biogenesis and an increase in mtDNA-CN through increased expression of TFAM or POLG. In addition, elevated mtDNA-CN can result from a compensatory rise due to defective, fragmented or deleted mtDNA. It has been shown in mice that male infertility caused by heteroplasmic mtDNA mutations can be restored by increasing the mtDNA copy number through overexpression of TFAM (Jiang *et al.*, 2017).

Finally, it is important to note that some authors, have proposed that the variability in spermatozoa mtDNA-CN between different



**Table 1 Mitochondrial DNA copy number in spermatozoa and male fertility.**

| Study                      | Population/question                                                                                                                                                             | mtDNA-CN in spermatozoa                                                                                                                      |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Díez-Sánchez et al. (2003) | 440 donors: normal/abnormal spermatozoa separated using Percoll gradient                                                                                                        | Normal: $717 \pm 394$ /abnormal: $1278 \pm 447$ . Negatively correlated with sperm motility                                                  |
| May-Panloup et al. (2003)  | 67 men undergoing IVF including 35 with abnormal semen parameters. Comparison between the two groups and for each patient after separation of spermatozoa with Percoll gradient | Normal sperm parameters: 1.4 (range 0.3–4.2)/abnormal: 6.1 (range 0.5–28). Fraction 40%: 17.1 (range 0.8–70.4/fraction 100%: 2.4. (0.3–12.4) |
| Kao et al., (2004)         | 29 patients with normal semen parameters and 23 patients with asthenospermia                                                                                                    | Normal group: $74.1 \pm 2$ /asthenospermia: $7.2 \pm 1.3$                                                                                    |
| Amaral et al. (2007)       | 42 patients including 14 controls                                                                                                                                               | Normal group: $11.3 \pm 4.5$ /OAT group $46.7 \pm 15.0$                                                                                      |
| Song and Lewis (2008)      | 57 men undergoing IVF including 24 with normal semen parameters                                                                                                                 | Generale population: 34 (range 2–226). Normal semen parameters: 15.7/oligoasthenoteratospermia (OATS): 73.7                                  |
| Gabriel et al. (2012)      | 14 patients before and after varicocele surgery                                                                                                                                 | Decrease after surgery ( $27 \pm 30$ – $9 \pm 6$ ). Negative correlation with sperm motility.                                                |
| Tian et al. (2014)         | 118 men undergoing IVF                                                                                                                                                          | Whole population: 29.6 (range: 0.2–344.9). Negatively correlated with sperm motility, concentration and morphology                           |
| Bonanno et al., (2016)     | 22 normospermic patients and 37 asthenospermic patients                                                                                                                         | Normal group: 5.75 (range 1.1–10)/asthenospermia: 14.8 (range 1–1)                                                                           |
| Zhanget al. (2016a)        | Cohort of 386 young men                                                                                                                                                         | Whole population: $3.68 \pm 3.22$ . Negatively correlated with sperm concentration, count and motility                                       |
| Wu et al. (2019b)          | 119 couples undergoing IVF                                                                                                                                                      | Higher sperm mtDNA associated with lower odds of fertilization and embryo quality                                                            |
| Wu et al. (2019a)          | 125 men undergoing IVF                                                                                                                                                          | Associated with lower sperm concentration, count, motility and morphology. High predictive value for clinical infertility.                   |
| Faja et al. (2019)         | 126 patients: 63 with normal motility and 63 with asthenospermia                                                                                                                | Normal motility: $29.6 \pm 23.3$ /OATS: $73.0 \pm 576$ . Negatively correlated with sperm concentration                                      |

studies could result from a significant fragmentation of the paternal mitochondrial genome (Darr et al., 2017) potentially in relation to its non-transmission to offspring (DeLuca and O'Farrell, 2012). Accordingly, the most viable spermatozoa, resulting from an efficient process, would therefore most likely be devoid of mtDNA transmissible to offspring.

Another way of approaching the link between mtDNA-CN in spermatozoa and male infertility is to consider selected gamma DNA polymerase studies. The analysis of POLG genotypes among different human populations has allowed for the identification of a critical CAG microsatellite repeat that codes for a polyglutamine tract. The absence of this ten-repeat allele has been associated with different types of male infertility (Rovio et al., 2001; Jensen et al., 2004). Other authors have shown that heterozygosity in POLG was found with a significantly higher incidence in oligoasthenospermic patients and associated with a higher number of mtDNA copies in spermatozoa (Amaral et al., 2007). However, these results have not been confirmed by other studies (Krausz et al., 2004; Akin-Seifer et al., 2005; Harris et al., 2006) and a recent meta-analysis concluded no apparent association between POLG-CAG-repeat and male infertility (Zhang et al., 2016a,b).

### Spermatozoa mtDNA integrity

Mitochondrial diseases result from an abnormality in nuclear genes or in mtDNA. Alterations in mtDNA are typically grouped into two

categories: point mutations and major rearrangements (consisting mainly of deletions). In most cases, molecular abnormalities of the mtDNA are found in a heteroplasmic state where the mutated mtDNA coexists with wild molecules. As the proportion of mutated mtDNA increases, there is a decrease in energy production which, beyond a certain threshold, is responsible for cellular dysfunctions and the manifestation of symptoms. The proportion of mutants from which a phenotype is observed in the patient depends both on the type of mutation, but also on the tissue.

The phenotype of patients with mitochondrial disease is generally severe, and fertility is not at the centre of the concerns for these patients. The few studies that focus on sperm in patients with mitochondrial disease (Folgero et al., 1993; Huang et al., 1994), in particular those carrying the pathogenic mutation m.3243A>G (Spiropoulos et al., 2002), have shown a decrease in sperm motility. Similarly, analysis of spermatozoa from an infertile patient with evidence of mitochondrial disease identified multiple deletions in sperm mtDNA (Reynier et al., 1997). More recently, an investigation of the fertility of a cohort of English patients with mitochondrial disease showed a 35% decrease in their fertility compared to the general population (Martikainen et al., 2017). This decrease is not found in studies of women with mitochondrial disease, which seems to support the hypothesis that male reproductive function is particularly vulnerable to mitochondrial dysfunction associated with mtDNA abnormalities (Vaught and Dowling, 2018). Studies on transgenic mice also provide information on the link between mtDNA alteration and male infertility. In 2006,



Nakada *et al.* (2006) by engineering mice that harbour mutant DNA (pathogenic deletion of 4696 bp) showed a decrease in sperm count and sperm motility associated with a decrease in fertility from a heteroplasma rate threshold of 70%, and infertility above a rate of 80% associated with akinetospemia. Similarly, in 2004 created a mutant mouse for the POLG catalytic site was created. This mutation leads to an alteration in the proofreading activity of the enzyme and the accumulation of deletions and mutations in the mtDNA. In this study, male mice had smaller testes and were most often infertile (Trifunovic *et al.*, 2004).

Numerous studies have, focused on the alteration of mtDNA in infertile male populations or in abnormal sperm. They suggest that there is a link between the presence of deletions in sperm mtDNA and sperm quality. The common deletion of 4977 bp has been frequently associated with altered sperm motility and sperm count (Kao *et al.*, 1995, 1998; Ieremiadou and Rodakis, 2009; Hosseinzadeh Colagar and Karimi, 2014; Ambulkar *et al.*, 2016; Bahrehmand Namaghi and Vaziri, 2017; Talebi *et al.*, 2018; Gholinezhad *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2019b; Al Zoubi *et al.*, 2020; Table II) although this has not been confirmed by all studies (Cummins *et al.*, 1998; St John *et al.*, 2001). The presence of other deletions and in particular multiple deletions has also been shown to be more frequent in sperm from infertile patients compared to control patients with normal sperm parameters (Table II). Some authors have compared the presence of deletions in sperm fractions obtained after density gradient. These gradients are capable of separating, in a given patient, the most normal spermatozoa from the abnormal spermatozoa. Interestingly, the high-density fractions containing normal spermatozoa contained more wild-type

mtDNA than the low-density fractions (Kao *et al.*, 1995; O'connell *et al.*, 2003).

Nevertheless, the rate of heteroplasma found for the 4977 bp deletion is generally low and it is impossible to assert a causal link between the presence of this deletion and the alteration of spermatogenic parameters (Moraes and Meyers, 2018). Furthermore, the origin of these deletions remains debated. Some link their occurrence to a redox imbalance during spermatogenesis due to an increase in oxidative stress (Abasalt *et al.*, 2013; Bonanno *et al.*, 2016) and altered sperm parameters (Agarwal *et al.*, 2014; Aitken *et al.*, 2014). Indeed, the proximity of mtDNA to the respiratory chain and the lack of protective histones and efficient repair mechanisms results in an mtDNA mutation rate almost 25 times higher than that of nuclear DNA (Lynch *et al.*, 2006). Nevertheless, caution should be exercised with respect to spermatozoa; although the sperm mtDNA has been shown to be more sensitive to oxidative stress than sperm nuclear DNA, it is much less sensitive to oxidative stress compared to mtDNA in other cell types (Sawyer *et al.*, 2003).

The study of point mutations in the sperm of infertile men has been carried out in several works. An increased incidence of certain variants in mitochondrial genes has been found in oligo and/or asthenospermic patients (Holyoake *et al.*, 2001; Thangaraj *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2009; Baklouti-Gargouri *et al.*, 2013; Baklouti-Gargouri *et al.*, 2014a,b; Ni *et al.*, 2017; Table III) or patients with low fertility rates (Mao *et al.*, 2015). However, the link between the presence of these variants in sperm and infertility remains difficult to establish, not only because of low numbers of patients and inconsistent results across populations (Selvi Rani *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2008), but also because many of

**Table II Mitochondrial DNA deletions and male fertility.**

| Deletion | Genomic position              | Junction site                               | Impacted gene                            | Reference                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|----------|-------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2 bp     | m.8195-m.8196                 | Created a stop codon (AGA) at position 8216 | CO2                                      | Thangaraj <i>et al.</i> (2003)                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 15 bp    | m.9480-m.9495                 |                                             | CO3                                      | St John <i>et al.</i> (2001)                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 4856 bp  | m.8270-m.8277/m.13127-m.13134 | 7 nt direct repeat: 5'ACCCCT3'              | ATP8, ATP6, CO3, ND3, ND4L, ND4, ND5     | Abasalt <i>et al.</i> (2013); Gholinezhad <i>et al.</i> (2019)                                                                                                                                                                                                                                         |
| 4977 bp  | m.8470-m.8483/m.13447-m.13460 | 13 nt direct repeats: 5'-ACCTCCCTCACCA-3'   | ATP8, ATP6, CO3, ND3, ND4L, ND4, ND5     | Kao <i>et al.</i> (1995, 1998); Ieremiadou and Rodakis (2009); Hosseinzadeh Colagar and Karimi (2014); Ambulkar <i>et al.</i> , (2016); Bahrehmand Namaghi and Vaziri (2017); Talebi <i>et al.</i> (2018); Gholinezhad <i>et al.</i> (2019); Wu <i>et al.</i> , (2019b); Al Zoubi <i>et al.</i> (2020) |
| 7345 bp  | m.9009-m.9008/m.16354-m.16353 | 2 nt:5'-GG-3'                               |                                          | Kao <i>et al.</i> (1998); Talebi <i>et al.</i> , (2018)                                                                                                                                                                                                                                                |
| 7436 bp  | m.8637-m.8649/m.16073-m.16085 | 13 nt:5'-CATCAACAACCG-3'                    | ATP6, CO3, ND3, ND4L, ND4, ND5, ND6, CYB | Gholinezhad <i>et al.</i> (2019)                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 7491 bp  | m.8829-m.8830/m.16230-m.16231 | 2 nt:5'-CC-3'                               | ATP6, CO3, ND3, ND4L, ND4, ND5, ND6, CYB | Hosseinzadeh Colagar and Karimi (2014)                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 7599 bp  | m.8643-m.8637/m.16242-m.16236 | 7 nt direct repeat: 5'-CATCAAC-3'           | ATP6, CO3, ND3, ND4L, ND4, ND5, ND6, CYB | Kao <i>et al.</i> (1998); Hosseinzadeh Colagar and Karimi (2014); Talebi <i>et al.</i> (2018)                                                                                                                                                                                                          |

**Table III Mitochondrial DNA mutations/variants and male fertility.**

| Gene                                        | Mutation      | Protein | PolyPhen-2               | MITOMAP                  |                           | Reference                                                 |
|---------------------------------------------|---------------|---------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------|
|                                             |               |         |                          | GenBank<br>frequency (%) | GenBank<br>sequence count |                                                           |
| CO2                                         | m.7598 G > A  | p.A5T   | Benign                   | 1.2                      | 612                       | Baklouti-Gargouri et al. (2014a)                          |
| Cytochrome c oxidase<br>subunit 2           | m.7664 G > A  | p.A27T  | Benign                   | 0.15                     | 77                        | Baklouti-Gargouri et al. (2014a);                         |
|                                             | m.8021 A > G  | p.I146V | Benign                   | 0.01                     | 4                         | Thangaraj et al. (2003)                                   |
|                                             | m.7649 C > T  | p.T22I  | Benign                   | /                        | /                         | Thangaraj et al. (2003)                                   |
|                                             | m.7809 C > T  | p.L75F  | <b>Probably damaging</b> | /                        | /                         |                                                           |
| CO3                                         | m.9588G>A     | p.E128K | <b>Probably damaging</b> | 0                        | 1                         | Holyoake et al. (2001); Baklouti-Gargouri et al. (2014a)  |
| Cytochrome c oxidase<br>subunit 3           | m.9477 G > A  | p.V91I  | Benign                   | 3.94                     | 2017                      | Baklouti-Gargouri et al. (2014a)                          |
|                                             | m.9301 C > T  | p.A32V  | Benign                   | 0.04                     | 20                        |                                                           |
|                                             | m.9336 A > G  | p.M44V  | Benign                   | 0.15                     | 78                        |                                                           |
|                                             | m.9390 A > G  | p.T62A  | Benign                   | 0                        | 0                         |                                                           |
| ATP6                                        | m.9055 G > A  | p.A177T | <b>Probably damaging</b> | 4.25                     | 2178                      | Holyoake et al. (2001)                                    |
| ATP synthase subunit a                      | m.9098 T > C  | p.I191T | <b>Probably damaging</b> | 0.1                      | 52                        | Kumar et al. (2009)                                       |
|                                             | m.8684 C > T  | p.T53I  | Benign                   | 1.05                     | 539                       | Baklouti-Gargouri et al. (2014a)                          |
|                                             | m.8618 T > C  | p.I31T  | Benign                   | 0.96                     | 494                       | Baklouti-Gargouri et al. (2014a);                         |
|                                             | m.8531 A > G  | p.N2S   | <b>Probably damaging</b> | /                        | /                         | Mao et al. (2015)                                         |
|                                             | m.8701 A > G  | p.T59A  | Benign                   | 33.31                    | 17050                     | Thangaraj et al. (2003)                                   |
|                                             | m.8677 A > C  | p.K51Q  | Benign                   | 0                        | 1                         | Thangaraj et al. (2003); Baklouti-Gargouri et al. (2014a) |
|                                             | m.8859 A > G  | p.T112A | Benign                   | /                        | /                         |                                                           |
|                                             | m.11994 C > T | p.T412I | Benign                   | 0                        | 0                         | Selvi Rani et al. (2006)                                  |
| ND4                                         | m.11084 A > G | p.T109A | <b>Probably damaging</b> | 0.4                      | 204                       | Ni et al. (2017)                                          |
| NADH-ubiquinone oxido-<br>reductase chain 4 |               |         |                          |                          |                           |                                                           |
| ND5                                         | m.13708 G > A | p.A458T | Benign                   | 7.16                     | 3666                      | Kumar et al. (2009)                                       |
| NADH-ubiquinone oxido-<br>reductase chain 5 | m.13946 T > A | p.I537N | <b>Probably damaging</b> | 0                        | 0                         |                                                           |
| COI                                         | m.6150 G > A  | p.V83I  | Benign                   | 0.46                     | 234                       | Baklouti-Gargouri et al. (2013, 2014a)                    |
| Cytochrome c oxidase<br>subunit I           | m.6253 T > C  | p.M117T | Benign                   | 1.04                     | 531                       |                                                           |
|                                             | m.6267 G > A  | p.A122T | Benign                   | 0.16                     | 83                        | Thangaraj et al. (2003)                                   |
|                                             | m.7146 T > A  | p.T415A | Benign                   | /                        | /                         | Baklouti-Gargouri et al. (2013)                           |
|                                             | m.6344 T > C  | p.F148L | <b>Probably damaging</b> | /                        | /                         |                                                           |
|                                             | m.6771 A > C  | p.H290P | <b>Probably damaging</b> | /                        | /                         |                                                           |
|                                             | m.7309 T > A  | p.I469N | Benign                   | 0                        | 0                         |                                                           |
|                                             | m.6307 A > G  | p.N135S | <b>Probably damaging</b> | 0                        | 2                         |                                                           |
|                                             | m.8394 C > T  | p.P10L  | <b>Probably damaging</b> | 0.01                     | 3                         | Kumar et al. (2009)                                       |
| ATP8                                        | m.8435 A > G  | p.T24A  | Benign                   | 0.03                     | 13                        | Baklouti-Gargouri et al. (2014a)                          |
| ATP synthase protein 8                      | m.8531 A > G  | p.T56A  | <b>Probably damaging</b> | 0.06                     | 33                        |                                                           |
|                                             | m.8448 T > C  | p.M28T  | Benign                   | 0.45                     | 228                       |                                                           |
|                                             | m.10165 C > T | p.P36L  | <b>Probably damaging</b> | 0                        | 0                         | Kumar et al. (2009)                                       |
| ND3                                         | m.10207 C > T | p.P50L  | <b>Probably damaging</b> | 0                        | 0                         |                                                           |
| NADH-ubiquinone oxido-<br>reductase chain 3 |               |         |                          |                          |                           |                                                           |
| CYB                                         | m.15218 A > G | p.T158A | <b>Probably damaging</b> | 1.73                     | 886                       | Baklouti-Gargouri et al. (2014a)                          |
| Cytochrome b                                | m.15257 G > A | p.D171N | Benign                   | 1.53                     | 785                       |                                                           |
|                                             | m.15203 A > G | p.I153V | Benign                   | 0.04                     | 20                        |                                                           |
|                                             | m.14861 G > A | p.A39T  | Benign                   | 0.31                     | 158                       |                                                           |
|                                             | m.15077 G > A | p.E111K | <b>Probably damaging</b> | 0.22                     | 114                       |                                                           |
|                                             | m.15452 C > A | p.L236I | Benign                   | 9.37                     | 4795                      |                                                           |
|                                             | m.15734 G > A | p.A330T | Benign                   | 0.35                     | 177                       |                                                           |
|                                             | m.12187 C > A |         |                          | 0                        | 0                         | Baklouti-Gargouri et al. (2014a)                          |
| tRNA His (MT-TH)                            |               |         |                          |                          |                           |                                                           |

Continued



Table III Continued

| Gene                | Mutation  | Protein | PolyPhen-2 | MITOMAP                  |                           | Reference                                                                                                                                               |
|---------------------|-----------|---------|------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                     |           |         |            | GenBank<br>frequence (%) | GenBank<br>sequence count |                                                                                                                                                         |
| tRNA Leu I (MT-TL1) | m.3263C>T |         |            | 0                        | 0                         | Ni <i>et al.</i> (2017)<br>Folgerø <i>et al.</i> (1993); Huang <i>et al.</i> (1994); Martikainen <i>et al.</i> (2017); Spiropoulos <i>et al.</i> (2002) |
|                     | m.3243A>G |         |            | 0.02                     | 9                         |                                                                                                                                                         |

Each mutation in the mtDNA from the spermatozoa of infertile men has been catalogued. These mutations lead to an amino acid change in their protein. The PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) tool was used to predict the impact of the amino acid change on the protein. The Mitomap database was used to obtain the frequency and number of variants recovered from 7.26 human mitochondrial sequences (outside of the control region).

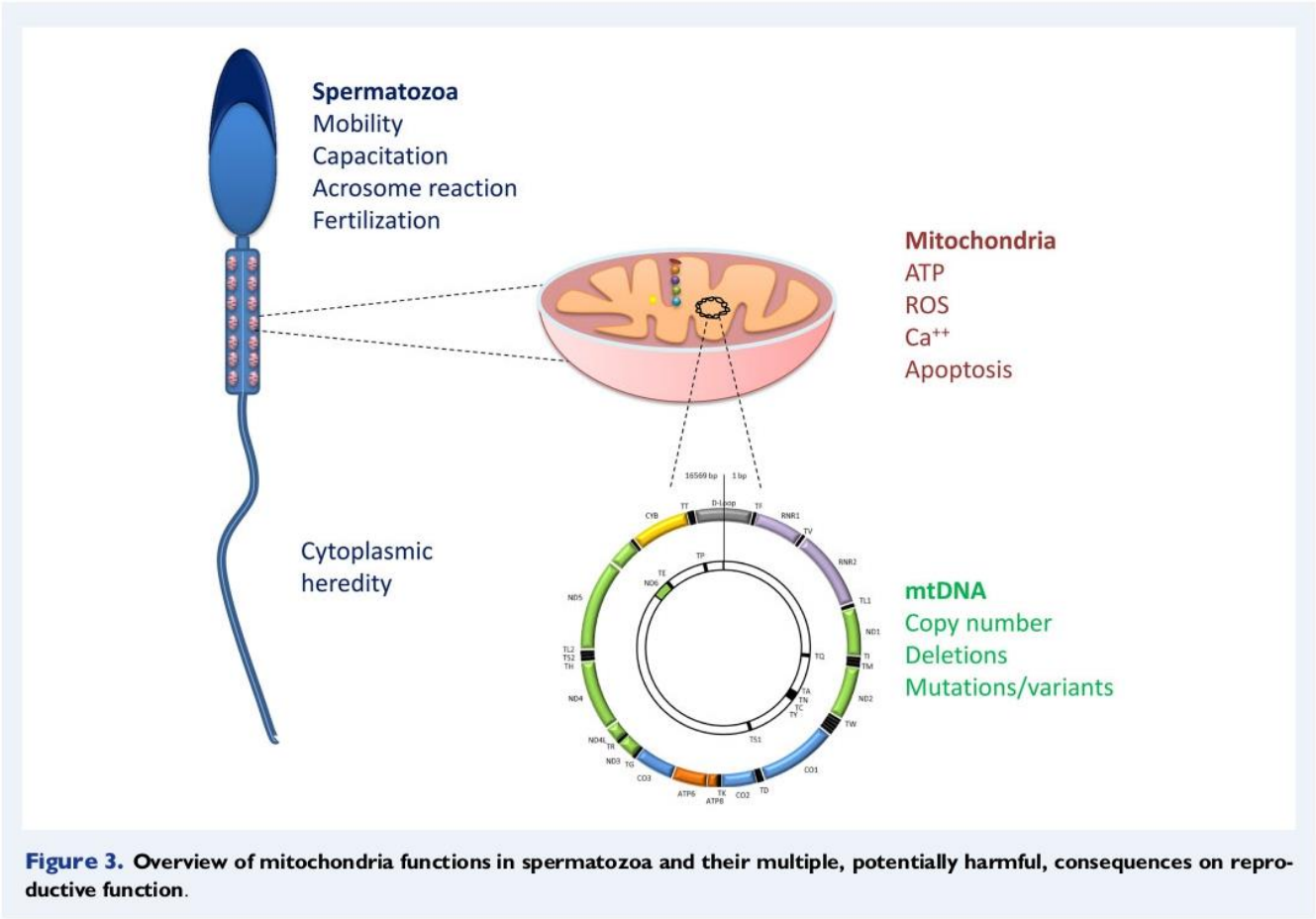


Figure 3. Overview of mitochondria functions in spermatozoa and their multiple, potentially harmful, consequences on reproductive function.

these variants are neutral or of uncertain pathogenicity (Vertika *et al.*, 2020). Other studies have looked at variants of mtDNA in the blood of infertile patients. mtDNA is highly polymorphic with regard to some single-nucleotide polymorphisms (SNPs), in particular mtDNA haplogroups that characterize diverse human population groups (www.mitomap.org) (Torroni *et al.*, 1996). SNPs and mtDNA haplogroups

result in differences in the performance of certain mitochondrial functions without this being considered as a dysfunction (Gómez-Durán *et al.*, 2010) but rather as an individual susceptibility or resistance to certain pathologies. Therefore, some mitochondrial haplogroups are thought to be linked to different reproductive capabilities. For example, in a European population, it has been shown that haplogroup T was overrepresented among asthenospermic patients, while

haplogroup H was overrepresented among normospermic patients (Ruiz-Pesini et al., 2000). Similarly, sperm motility has been linked to sub-haplogroups U in European populations (Montiel-Sosa et al., 2006) and to haplogroup R and a reduced risk of asthenospermia in a Chinese population (Feng et al., 2013). Finally, in 2015, it was shown, in a large population, that two specific SNPs already associated with mitochondrial pathologies were associated with an alteration in sperm count and/or sperm motility: m.16179C>T and m.12361A>G (Lu et al., 2015). The same team in 2017 also demonstrated that the m.11696G>A mutation was associated with significantly greater risk of asthenospermia (Ji et al., 2017). However, the link between haplogroups or SNPs and fertility has been challenged by other authors (Pereira et al., 2007; Palanichamy and Zhang, 2011; Mossman et al., 2012; Gómez-Carballa et al., 2017; Skowronek et al., 2017).

## Conclusion

Mitochondria in spermatozoa have a distinctive structure and functional features. They are at the centre of the metabolism which allows spermatozoa to use the different energy substrates available during their journey to the site of fertilization. They are also involved in the redox balance, calcium regulation and apoptotic pathways which are necessary for flagellar movement, capacitation, acrosomal reaction and gametic fusion. Thus, in many cases, a deterioration in any one of these different functions may very well be linked to an alteration in sperm parameters and/or fertility (Fig. 3). The link between the mitochondrial genome and sperm quality seems more complex. The quantity of mtDNA in spermatozoa and the presence of large deletions in mtDNA are directly correlated to sperm quality. In contrast, the effect of mutations seems to be more heterogeneous, depending on their pathogenicity (Fig. 3).

The importance of the role of mitochondria in reproduction, and particularly the quality of gametes, has emerged in recent years with a number of publications on the subject that have opened up new frontiers of investigation and understanding of infertility. While oocyte mitochondria are recognized as essential to early embryonic development, paternal mitochondria, which seem to be non-essential after fertilization, are crucial to sperm function and fertilization.

## Data availability

All data are included in the manuscript.

## Acknowledgements

We acknowledge the support of the University Hospital of Angers, the University of Angers, the INSERM and the CNRS.

## Authors' roles

M.B. and P.M.P. carried out a systematic literature review and wrote the paper. They take primary responsibility for the paper. P.R. and P.M.P. both contributed towards the work of the team on which this review is based. P.E.B. and A.S. are the clinicians responsible for

recruiting the patients included in our previous and ongoing studies. All the authors contributed to the revision of the article and approved the final version.

## Funding

Funding was provided by University Hospital of Angers and the Biomedicine Agency.

## Conflict of interest

None to declare.

## References

- Abasalt HC, Gholamali JS, Maryam GC, Infertility F. Lipid peroxidation and large-scale deletions of mitochondrial DNA in asthenoteratozoospermic patients. *Indian J Biochem Biophys* 2013; **50**:429–499.
- Acton BM, Lai I, Shang X, Jurisicova A, Casper RF. Neutral mitochondrial heteroplasmy alters physiological function in mice. *Biol Reprod* 2007;**77**:569–576.
- Adeoye O, Olawumi J, Opeyemi A, Christiania O. Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. *JBRA Assist Reprod* 2018;**22**:61–66.
- Agaronyan K, Morozov YI, Anikin M, Temiakov D. Replication-transcription switch in human mitochondria. *Science* 2015;**347**:548–551.
- Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol* 2015;**13**:37.
- Agarwal A, Virk G, Ong C, Du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health* 2014;**32**:1–17.
- Agnihotri SK, Agrawal AK, Hakim BA, Vishwakarma AL, Narender T, Sachan R, Sachdev M. Mitochondrial membrane potential (MMP) regulates sperm motility. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2016; **52**:953–960.
- Ahmed SDH, Ahsan S, Iqbal T, Burney SIA. Relationship of seminal free L-Carnitine with functional spermatozoal characteristics: results from an observational study conducted in a tertiary care hospital of Karachi, Pakistan. *J Pak Med Assoc* 2017;**67**:280–284.
- Ahmed SDH, Karira KA, Ahsan S. Role of L-carnitine in male infertility. *J Pak Med Assoc* 2011;**61**:732–736.
- Aitken RJ. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol Reprod Dev* 2017;**84**:1039–1052.
- Aitken RJ. Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. *Reproduction* 2020;**159**:R189–R201.
- Aitken RJ, Gibb Z, Baker MA, Drevet J, Gharagzloo P. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 2016;**28**:1–10.
- Aitken RJ, Irvine DS, Wu FC. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am J Obstet Gynecol* 1991;**164**:542–551.



- Aitken RJ, Koppers AJ. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl* 2011;**13**:36–42.
- Aitken RJ, Smith T, Jobling M, Baker M, De Iulius G. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl* 2014;**16**:31.
- Aitken RJ, Whiting S, De Iulius GN, McClymont S, Mitchell LA, Baker MA. Electrophilic aldehydes generated by sperm metabolism activate mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis by targeting succinate dehydrogenase. *J Biol Chem* 2012;**287**:33048–33060.
- Aknin-Seifer IE, Touraine RL, Lejeune H, Jimenez C, Chouteau J, Siffroi JP, McElreavey K, Bienvenu T, Patrat C, Levy R. Is the CAG repeat of mitochondrial DNA polymerase gamma (POLG) associated with male infertility? A multi-centre French study. *Hum Reprod* 2005;**20**:736–740.
- Al Zoubi MS, Al-Batayneh K, Alsmadi M, Rashed M, Al-Trad B, Al Khateeb W, Aljabali A, Otoum O, Al-Talib M, Batiha OA. 977-bp human mitochondrial DNA deletion is associated with asthenozoospermic infertility in Jordan. *Andrologia* 2020;**52**:e13379.
- Alcivar AA, Hake LE, Millette CF, Trasler JM, Hecht NB. Mitochondrial gene expression in male germ cells of the mouse. *Dev Biol* 1989;**135**:263–271.
- Amaral A, Lourenço B, Marques M, Ramalho-Santos J. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction* 2013;**146**:R163–R174.
- Amaral A, Paiva C, Attardo Parrinello C, Estanyol JM, Ballescà JL, Ramalho-Santos J, Oliva R. Identification of proteins involved in human sperm motility using high-throughput differential proteomics. *J Proteome Res* 2014;**13**:5670–5684.
- Amaral A, Ramalho-Santos J, St John JC. The expression of polymerase gamma and mitochondrial transcription factor A and the regulation of mitochondrial DNA content in mature human sperm. *Hum Reprod* 2007;**22**:1585–1596.
- Amaral S, Redmann K, Sanchez V, Mallidis C, Ramalho-Santos J, Schlatt S. UVB irradiation as a tool to assess ROS-induced damage in human spermatozoa. *Andrology* 2013;**1**:707–714.
- Ambulkar P, Chuadhari A, Pal A. Association of large scale 4977-bp “common” deletions in sperm mitochondrial DNA with asthenozoospermia and oligoasthenoteratozoospermia. *J Hum Reprod Sci* 2016;**9**:35.
- An C-N, Jiang H, Wang Q, Yuan R-P, Liu J-M, Shi W-L, Zhang Z-Y, Pu X-P. Down-regulation of DJ-1 protein in the ejaculated spermatozoa from Chinese asthenozoospermia patients. *Fertil Steril* 2011;**96**:19–23.e2.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981;**290**:457–465.
- Ankel-Simons F, Cummins JM. Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: implications for theories on human evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;**93**:13859–13863.
- Antelman J, Manandhar G, Yi Y-J, Li R, Whitworth KM, Sutovsky M, Agca C, Prather RS, Sutovsky P. Expression of mitochondrial transcription factor A (TFAM) during porcine gametogenesis and preimplantation embryo development. *J Cell Physiol* 2008;**217**:529–543.
- Archer SL. Mitochondrial dynamics—mitochondrial fission and fusion in human diseases. *N Engl J Med* 2013;**369**:2236–2251.
- Baccetti B, Capitani S, Collodel G, Strehler E, Piomboni P. Recent advances in human sperm pathology. *Contraception* 2002;**65**:283–287.
- Bahrehmand Namaghi I, Vaziri H. Sperm mitochondrial DNA deletion in Iranian infertiles with asthenozoospermia. *Andrologia* 2017;**49**:e12627.
- Baklouti-Gargouri S, Ghorbel M, Ben Mahmoud A, Mkaouer-Rebai E, Cherif M, Chakroun N, Sellami A, Fakhfakh F, Ammar-Keskes L. A novel m.6307A>G mutation in the mitochondrial COXI gene in asthenozoospermic infertile men in asthenozoospermic infertile men. *Mol Reprod Dev* 2013;**80**:581–587.
- Baklouti-Gargouri S, Ghorbel M, Ben Mahmoud A, Mkaouer-Rebai E, Cherif M, Chakroun N, Sellami A, Fakhfakh F, Ammar-Keskes L. Identification of a novel m.9588G > A missense mutation in the mitochondrial COIII gene in asthenozoospermic Tunisian infertile men. *J Assist Reprod Genet* 2014a;**31**:595–600.
- Baklouti-Gargouri S, Ghorbel M, Mahmoud Mkaouer-Rebai BA, Chakroun E, Sellami N, Fakhfakh AF, Ammar-Keskes L. Two novel mutations in COII and tRNAHis mitochondrial genes in asthenozoospermic infertile men. *Biochem Biophys Res Commun* 2014b;**450**:610–615.
- Barbagallo F, La Vignera S, Cannarella R, Aversa A, Calogero AE, Condorelli RA. Evaluation of sperm mitochondrial function: a key organelle for sperm motility. *J Clin Med* 2020;**9**:363.
- Barroso G, Taylor S, Morshedi M, Manzur F, Gaviño F, Oehninger S. Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. *Fertil Steril* 2006;**85**:149–154.
- Baumber J, Sabeur K, Vo A, Ball BA. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology* 2003;**60**:1239–1247.
- Bonanno O, Romeo G, Asero P, Pezzino FM, Castiglione R, Burrello N, Sidoti G, Frajese GV, Vicari E, D'Agata R. Sperm of patients with severe asthenozoospermia show biochemical, molecular and genomic alterations. *Reproduction* 2016;**152**:695–704.
- Bravo A, Treulen F, Uribe P, Boguen R, Felmer R, Villegas JV. Effect of mitochondrial calcium uniporter blocking on human spermatozoa. *Andrologia* 2015;**47**:662–668.
- Bugaj S, Pawlak P, Nizanski W, Molinska-Glura M, Partyka A, Molinski K, Bukowska D, Lechniak-Cieslak D. MtDNA content in spermatozoa of dogs with normal and impaired reproductive performance. *Reprod Biol* 2013;**13**:8.
- Bui AD, Sharma R, Henkel R, Agarwal A. Reactive oxygen species impact on sperm DNA and its role in male infertility. *Andrologia* 2018;**50**:e13012.
- Bunch DO. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S protein distribution during mouse spermatogenesis. *Biol Reprod* 1998;**58**:834–841.
- Calle-Guisado V, de Llera A, Martin-Hidalgo D, Mijares J, Gil M, Alvarez I, Bragado M, Garcia-Marin L. AMP-activated kinase in human spermatozoa: identification, intracellular localization, and key function in the regulation of sperm motility. *Asian J Androl* 2017;**19**:707.
- Carelli V. Keeping in shape the dogma of mitochondrial DNA maternal inheritance. *PLoS Genet* 2015;**11**:e1005179.



- Cassina A, Silveira P, Cantu L, Montes JM, Radi R, Sapiro R. Defective human sperm cells are associated with mitochondrial dysfunction and oxidant production. *Biol Reprod* 2015;**93**:119.
- Castillo J, Jodar M, Oliva R. The contribution of human sperm proteins to the development and epigenome of the preimplantation embryo. *Hum Reprod Update* 2018;**24**:535–555.
- Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 2009;**138**:628–644.
- Chai R-R, Chen G-W, Shi H-J, O W-S, Martin-DeLeon PA, Chen H. Prohibitin involvement in the generation of mitochondrial superoxide at complex I in human sperm. *J Cell Mol Med* 2017;**21**:121–129.
- Chan C-C, Shui H-A, Wu C-H, Wang C-Y, Sun G-H, Chen H-M, Wu G-J. Motility and protein phosphorylation in healthy and asthenozoospermic sperm. *J Proteome Res* 2009;**8**:5382–5386.
- Chandel NS. Mitochondria as signaling organelles. *BMC Biol* 2014;**12**:34.
- Contreras L, Drago I, Zampese E, Pozzan T. Mitochondria: the calcium connection. *Biochim Biophys Acta Bioenerget* 2010;**1797**:607–618.
- Cummins J. Mitochondrial DNA in mammalian reproduction. *Rev Reprod* 1998;**3**:172–182.
- Cummins J, Martin M. Goldblatt Semen levels of mitochondrial DNA deletions in men attending an infertility clinic do not correlate with phenotype: mtDNA deletions in semen. *Int J Androl* 1998;**21**:47–52.
- Darr CR, Moraes LE, Connon RE, Love CC, Teague S, Varner DD, Meyers SA. The relationship between mitochondrial DNA copy number and stallion sperm function. *Theriogenology* 2017;**94**:94–99.
- DeLuca SZ, O'Farrell PH. Barriers to male transmission of mitochondrial DNA in sperm development. *Dev Cell* 2012;**22**:660–668.
- Díez-Sánchez C, Ruiz-Pesini E, Lapenã AC, Montoya J, Pérez-Martos A, Enríquez JA, López-Pérez MJ. Mitochondrial DNA content of human spermatozoa. *Biol Reprod* 2003;**68**:180–185.
- Dutta S, Majzoub A, Agarwal A. Oxidative stress and sperm function: a systematic review on evaluation and management. *Arab J Urol* 2019;**17**:87–97.
- Eker C, Celik HG, Balci BK, Gunel T. Investigation of human paternal mitochondrial DNA transmission in ART babies whose fathers with male infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2019;**236**:183–192.
- Engel KM, Springsguth CH, Grunewald S. What happens to the unsuccessful spermatozoa? *Andrology* 2018;**6**:335–344.
- Espino J, Mediero M, Lozano GM, Bejarano I, Ortiz Á, García JF, Pariente JA, Rodríguez AB. Reduced levels of intracellular calcium releasing in spermatozoa from asthenozoospermic patients. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;**7**:11.
- Espinoza JA, Paasch U, Villegas JV. Mitochondrial membrane potential disruption pattern in human sperm. *Hum Reprod* 2009;**24**:2079–2085.
- Esteves SC, Zini A, Aziz N, Alvarez JG, Sabanegh ES, Agarwal A. Critical appraisal of World Health Organization's new reference values for human semen characteristics and effect on diagnosis and treatment of subfertile men. *Urology* 2012;**79**:16–22.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J Histochem Cytochem* 1982;**30**:279–280.
- Faja F, Carlini T, Coltrinari G, Finocchi F, Nespoli M, Pallotti F, Lenzi A, Lombardo F, Paoli D. Human sperm motility: a molecular study of mitochondrial DNA, mitochondrial transcription factor A gene and DNA fragmentation. *Mol Biol Rep* 2019;**46**:4113–4121.
- Fang F, Ni K, Shang J, Zhang X, Xiong C, Meng T. Expression of mitofusin 2 in human sperm and its relationship to sperm motility and cryoprotective potentials. *Exp Biol Med (Maywood)* 2018;**243**:963–969.
- Fawcett DW. A comparative view of sperm ultrastructure. *Biol Reprod* 1970;**2**:90–127.
- Feng G-F, Zhang J, Feng L-M, Shen N-X, Li L-J, Zhu Y-M. Mitochondrial DNA haplogroup associated with sperm motility in the Han population. *Asian J Androl* 2013;**15**:630–633.
- Ferramosca A, Focarelli R, Piomboni P, Coppola L, Zara V. Oxygen uptake by mitochondria in demembrated human spermatozoa: a reliable tool for the evaluation of sperm respiratory efficiency. *Int J Androl* 2008;**31**:337–345.
- Ferramosca A, Provenzano SP, Coppola L, Zara V. Mitochondrial respiratory efficiency is positively correlated with human sperm motility. *Urology* 2012;**79**:809–814.
- Ferramosca A, Zara V. Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. *Biomed Res Int* 2014;**2014**:1–8.
- Filosto M, Mancuso M, Vives-Bauza C, Vilà MR, Shanske S, Hirano M, Andreu AL, DiMauro S. Lack of paternal inheritance of muscle mitochondrial DNA in sporadic mitochondrial myopathies: lack of Paternal Inheritance of Muscle mtDNA. *Ann Neurol* 2003;**54**:524–526.
- Folgerø T, Bertheussen K, Lindal S, Torbergesen T, Øian P. Mitochondrial disease and reduced sperm motility. *Hum Reprod* 1993;**8**:1863–1868.
- Ford WCL. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum Reprod Update* 2004;**10**:387–399.
- Ford WCL. Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? *Hum Reprod Update* 2006;**12**:269–274.
- Gabriel MS, Chan SW, Alhathal N, Chen JZ, Zini A. Influence of microsurgical varicocelelectomy on human sperm mitochondrial DNA copy number: a pilot study. *J Assist Reprod Genet* 2012;**29**:759–764.
- Gallon F, Marchetti C, Jouy N, Marchetti P. The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability. *Fertil Steril* 2006;**86**:1526–1530.
- Geiss-Friedlander R, Melchior F. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;**8**:947–956.
- Gholinezhad M, Yousefnia-Pasha Y, Hosseinzadeh Colagar A, Mohammadoo-Khorasani M, Bidmeshkipour A. Comparison of large-scale deletions of the sperm mitochondrial DNA in normozoospermic and asthenoteratozoospermic men. *J Cell Biochem* 2019;**120**:1958–1968.
- Gibb Z, Lambourne SR, Aitken RJ. The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. *Biol Reprod* 2014;**91**:77.
- Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;**77**:6715–6719.



- Gómez-Carballa A, Pardo-Seco J, Martín-Torres F, Salas A. Phylogenetic and population-based approaches to mitogenome variation do not support association with male infertility. *J Hum Genet* 2017;**62**:361–371.
- Gómez-Durán A, Pacheu-Grau D, López-Gallardo E, Díez-Sánchez C, Montoya J, López-Pérez MJ, Ruiz-Pesini E. Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum Mole Genet* 2010;**19**:3343–3353.
- Gopalkrishnan K, Padwal V, D'Souza S, Shah R. Severe asthenozoospermia: a structural and functional study. *Int J Androl* 1995;**18**:67–74.
- Gray MW. Mitochondrial evolution. *Science* 1999;**283**:1476–1481.
- Grootegoed JA, Jansen R, Van Der Molen HJ. The role of glucose, pyruvate and lactate in ATP production by rat spermatocytes and spermatids. *Biochim Biophys Acta Bioenerget* 1984;**767**:248–256.
- Grunewald S, Baumann T, Paasch U, Glander H-J. Capacitation and acrosome reaction in nonapoptotic human spermatozoa. *Ann NY Acad Sci* 2006;**1090**:138–146.
- Grunewald S, Fitzl G, Springsguth C. Induction of ultra-morphological features of apoptosis in mature and immature sperm. *Asian J Androl* 2017;**19**:533.
- Grunewald S, Paasch U, Said T, Sharma R, Glander H, Agarwal A. Caspase activation in human spermatozoa in response to physiological and pathological stimuli. *Fertil Steril* 2005;**83**:1106–1112.
- Grunewald S, Said TM, Paasch U, Glander H-J, Agarwal A. Relationship between sperm apoptosis signalling and oocyte penetration capacity. *Int J Androl* 2008;**31**:325–330.
- Grunewald S, Sharma R, Paasch U, Glander H-J, Agarwal A. Impact of caspase activation in human spermatozoa. *Microsc Res Tech* 2009;**72**:878–888.
- Gu N-H, Zhao W-L, Wang G-S, Sun F. Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility. *Reprod Biol Endocrinol* 2019;**17**:66.
- Guo H, Gong Y, He B, Zhao R. Relationships between mitochondrial DNA content, mitochondrial activity, and boar sperm motility. *Theriogenology* 2017;**87**:276–283.
- Gur Y, Breitbart H. Protein synthesis in sperm: dialog between mitochondria and cytoplasm. *Mol Cell Endocrinol* 2008;**282**:45–55.
- Gürbüz B, Yaltı S, Fiçicioğlu C, Zehir K. Relationship between semen quality and seminal plasma total carnitine in infertile men. *J Obstet Gynaecol* 2003;**23**:653–656.
- Gut P, Verdin E. The nexus of chromatin regulation and intermediary metabolism. *Nature* 2013;**502**:489–498.
- Gyllenstein U, Wharton D, Josefsson A, Wilson AC. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature* 1991;**352**:255–257.
- Harris TP, Gomas KP, Weir F, Holyoake AJ, McHugh P, Wu M, Sin Y, Sin IL, Sin FYT. Molecular analysis of polymerase gamma gene and mitochondrial polymorphism in fertile and subfertile men. *Int J Androl* 2006;**29**:421–433.
- Hecht NB, Liem H, Kleene KC, Distel RJ, Ho S. Maternal inheritance of the mouse mitochondrial genome is not mediated by a loss or gross alteration of the paternal mitochondrial DNA or by methylation of the oocyte mitochondrial DNA. *Dev Biol* 1984;**102**:452–461.
- Hesser A, Darr C, Gonzales K, Power H, Scanlan T, Thompson J, Love C, Christensen B, Meyers S. Semen evaluation and fertility assessment in a purebred dog breeding facility. *Theriogenology* 2017;**87**:115–123.
- Hichri R, Amor H, Khammari M, Harzallah M, El Fekih S, Saad A, Ajina M, Ben Ali H. Apoptotic sperm biomarkers and the correlation between conventional sperm parameters and clinical characteristics. *Andrologia* 2018;**50**:e12813.
- Hildyard JCW, Halestrap AP. Identification of the mitochondrial pyruvate carrier in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 2003;**374**:607–611.
- Hirsch T, Marzo I, Kroemer G. Role of the mitochondrial permeability transition pore in apoptosis. *Biosci Rep* 1997;**17**:67–76.
- Holyoake AJ, McHugh P, Wu M, O'Carroll S, Benny P, Sin IL, Sin FYT. High incidence of single nucleotide substitutions in the mitochondrial genome is associated with poor semen parameters in men. *Int J Androl* 2001;**24**:175–182.
- Hosseinzadeh Colagar A, Karimi F. Large scale deletions of the mitochondrial DNA in astheno, asthenoterato and oligoasthenoterato-spermic men. *Mitochondrial DNA* 2014;**25**:321–328.
- Huang CC, Chen RS, Chen CM, Wang HS, Lee CC, Pang CY, Hsu HS, Lee HC, Wei YH. MELAS syndrome with mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene mutation in a Chinese family. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1994;**57**:586–589.
- Hutchison CA, Newbold JE, Potter SS, Edgell MH. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature* 1974;**251**:536–538.
- Ieremiadou F, Rodakis GC. Correlation of the 4977 bp mitochondrial DNA deletion with human sperm dysfunction. *BMC Res Notes* 2009;**2**:18.
- Jensen M, Leffers H, Petersen J, Andersen A, Jørgensen N, Carlsen E, Jensen T, Shakkebaek N, Rajpert-De Meyts E. Frequent polymorphism of the mitochondrial DNA polymerase gamma gene (POLG) in patients with normal spermiograms and unexplained subfertility. *Hum Reprod* 2004;**19**:65–70.
- Ji J, Xu M, Huang Z, Li L, Zheng H, Yang S, Li S, Jin L, Ling X, Xia Y et al. Mitochondrial DNA sequencing and large-scale genotyping identifies MT-ND4 gene mutation m.11696G>A associated with idiopathic oligoasthenospermia. *Oncotarget* 2017;**8**:52975–52982.
- Jiang M, Kauppila TES, Motori E, Li X, Atanassov I, Folz-Donahue K, Bonekamp NA, Albarran-Gutierrez S, Stewart JB, Larsson N-G. Increased total mtDNA copy number cures male infertility despite unaltered mtDNA mutation load. *Cell Metabol* 2017;**26**:429–436.e4.
- Jimenez-Gonzalez C, Michelangeli F, Harper CV, Barratt CLR, Publicover SJ. Calcium signalling in human spermatozoa: a specialized 'toolkit' of channels, transporters and stores. *Hum Reprod Update* 2006;**12**:253–267.
- Jodar M, Kalko S, Castillo J, Ballescà JL, Oliva R. Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients. *Hum Reprod* 2012;**27**:1431–1438.
- Jodar M, Selvaraju S, Sandler E, Diamond MP, Krawetz SA; for the Reproductive Medicine Network. The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs. *Hum Reprod Update* 2013;**19**:604–624.
- Kaneda H, Hayashi J, Takahama S, Taya C, Lindahl KF, Yonekawa H. Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;**92**:4542–4546.



- Kao S-H, Chao H-T, Liu H-W, Liao T-L, Wei Y-H. Sperm mitochondrial DNA depletion in men with asthenospermia. *Fertil Steril* 2004;**82**:66–73.
- Kao S-H, Chao H-T, Wei Y-H. Mitochondrial deoxyribonucleic acid 4977-bp deletion is associated with diminished fertility and motility of human sperm. *Biol Reprod* 1995;**52**:729–736.
- Kao SH, Chao HT, Wei YH. Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1998;**4**:657–666.
- Kasai T, Ogawa K, Mizuno K, Nagai S, Uchida Y, Ohta S, Fujie M, Suzuki K, Hirata S, Hoshi K. Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. *Asian J Androl* 2002;**4**:97–103.
- Koppers AJ, De Iuliis GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;**93**:3199–3207.
- Koppers AJ, Mitchell LA, Wang P, Lin M, Aitken RJ. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. *Biochem J* 2011;**436**:687–698.
- Krausz C, Guarducci E, Becherini L, degl'Innocenti S, Gerace L, Balercia G, Forti G. The clinical significance of the POLG gene polymorphism in male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;**89**:4292–4297.
- Kumar R, Venkatesh S, Kumar M, Tanwar M, Shasmsi MB, Kumar R, Gupta NP, Sharma RK, Talwar P, Dada R. Oxidative stress and sperm mitochondrial DNA mutation in idiopathic oligoasthenozoospermic men. *Indian J Biochem Biophys* 2009;**46**:172–177.
- de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 1997;**2**:48–54.
- Larsson N-G, Garman JD, Oldfors A, Barsh GS, Clayton DA. A single mouse gene encodes the mitochondrial transcription factor A and a testis-specific nuclear HMG-box protein. *Nat Genet* 1996;**13**:296–302.
- Larsson N-G, Oldfors A, David Garman J, Barsh GS, Clayton DA. Down-regulation of mitochondrial transcription factor A during spermatogenesis in humans. *Hum Mol Genet* 1997;**6**:185–191.
- Legros F, Malka F, Frachon P, Lombès A, Rojo M. Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *J Cell Sci* 2004;**117**:2653–2662.
- Lehti MS, Sironen A. Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects. *Biol Reprod* 2017;**97**:522–536.
- Levine H, Jørgensen N, Martino-Andrade A, Mendiola J, Weksler-Derri D, Mindlis I, Pinotti R, Swan SH. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Hum Reprod Update* 2017;**23**:646–659.
- Li K, Li W, Huang Y. Determination of free l-carnitine in human seminal plasma by high performance liquid chromatography with pre-column ultraviolet derivatization and its clinical application in male infertility. *Clin Chim Acta* 2007;**378**:159–163.
- Lindemann CB, Lesich KA. Functional anatomy of the mammalian sperm flagellum: mammalian sperm mechanics. *Cytoskeleton* 2016;**73**:652–669.
- Losano JDA, Padín JF, Méndez-López I, Angrimani DSR, García AG, Barnabe VH, Nichi M. The stimulated glycolytic pathway is able to maintain ATP levels and kinetic patterns of bovine epididymal sperm subjected to mitochondrial uncoupling. *Oxidat Med Cell Longevity* 2017;**2017**:1–8.
- Lozano GM, Bejarano I, Espino J, González D, Ortiz Á, García JF, Rodríguez AB, Pariente JA. Relationship between caspase activity and apoptotic markers in human sperm in response to hydrogen peroxide and progesterone. *J Reprod Dev* 2009;**55**:615–621.
- Lu C, Xu M, Wang R, Qin Y, Ren J, Wu W, Song L, Wang S, Zhou Z, Shen H et al. A genome-wide association study of mitochondrial DNA in Chinese men identifies two risk single nucleotide substitutions for idiopathic oligoasthenospermia. *Mitochondrion* 2015;**24**:87–92.
- Luo S, Valencia CA, Zhang J, Lee N-C, Slone J, Gui B, Wang X, Li Z, Dell S, Brown J et al. Biparental inheritance of mitochondrial DNA in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018;**115**:13039–13044.
- Luo S, Valencia CA, Zhang J, Lee N-C, Slone J, Gui B, Wang X, Li Z, Dell S, Brown J et al. Reply to Lutz-Bonengel et al.: Biparental mtDNA transmission is unlikely to be the result of nuclear mitochondrial DNA segments. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019;**116**:1823–1824.
- Luo S-M, Ge Z-J, Wang Z-W, Jiang Z-Z, Wang Z-B, Ouyang Y-C, Hou Y, Schatten H, Sun Q-Y. Unique insights into maternal mitochondrial inheritance in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;**110**:13038–13043.
- Luo S-M, Schatten H, Sun Q-Y. Sperm mitochondria in reproduction: good or bad and where do they go? *J Genet Genom* 2013;**40**:549–556.
- Lutz-Bonengel S, Parson W. No further evidence for paternal leakage of mitochondrial DNA in humans yet. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019;**116**:1821–1822.
- Lynch M, Koskella B, Schaack S. Mutation pressure and the evolution of organelle genomic architecture. *Science* 2006;**311**:1727–1730.
- Majzoub A, Agarwal A. Systematic review of antioxidant types and doses in male infertility: benefits on semen parameters, advanced sperm function, assisted reproduction and live-birth rate. *Arab J Urol* 2018;**16**:113–124.
- Malić Vončina S, Golob B, Ihan A, Kopitar AN, Kolbezen M, Zom B. Sperm DNA fragmentation and mitochondrial membrane potential combined are better for predicting natural conception than standard sperm parameters. *Fertil Steril* 2016;**105**:637–644.e1.
- Manfredi G, Thyagarajan D, Papadopoulou LC, Pallotti F, Schon EA. The fate of human sperm-derived mtDNA in somatic cells. *Am J Hum Genet* 1997;**61**:953–960.
- Mannowetz N, Wandemuth PM, Wennemuth G. Glucose is a pH-dependent motor for sperm beat frequency during early activation. *PLoS One* 2012;**7**:e41030.
- Mao G-H, Wang Y-N, Xu M, Wang W-L, Tan L, Tao S-B. Polymorphisms in the MT-ATP6 and MT-CYB genes in *in vitro* fertilization failure. *Mitochondrial DNA* 2015;**26**:20–24.
- Marchetti C, Jouy N, Leroy-Martin B, Defossez A, Formstecher P, Marchetti P. Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. *Hum Reprod* 2004;**19**:2267–2276.
- Marchetti C, Obert G, Deffosez A, Formstecher P, Marchetti P. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen



- species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum Reprod* 2002;**17**:1257–1265.
- Marchetti P, Ballot C, Jouy N, Thomas P, Marchetti C. Influence of mitochondrial membrane potential of spermatozoa on *in vitro* fertilisation outcome: mitochondrial membrane potential and IVF outcome. *Andrologia* 2012;**44**:136–141.
- Marchiani S, Tamburrino L, Giuliano L, Nosi D, Sarli V, Gandini L, Piomboni P, Belmonte G, Forti G, Baldi E *et al.* Sumoylation of human spermatozoa and its relationship with semen quality: sumoylation in ejaculated human sperm. *Int J Androl* 2011;**34**:581–593.
- Marchiani S, Tamburrino L, Ricci B, Nosi D, Cambi M, Piomboni P, Belmonte G, Forti G, Muratori M, Baldi E. SUMO1 in human sperm: new targets, role in motility and morphology and relationship with DNA damage. *Reproduction* 2014;**148**:453–467.
- Martikainen MH, Grady JP, Ng YS, Alston CL, Gorman GS, Taylor RW, McFarland R, Turnbull DM. Decreased male reproductive success in association with mitochondrial dysfunction. *Eur J Hum Genet* 2017;**25**:1162–1164.
- Martinez-Heredia J, de Mateo S, Vidal-Taboada JM, Balleca JL, Oliva R. Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. *Hum Reprod* 2008;**23**:783–791.
- Martin-Hidalgo D, Hurtado de Llera A, Calle-Guisado V, Gonzalez-Fernandez L, Garcia-Marin L, Bragado M. AMPK function in mammalian spermatozoa. *IJMS* 2018;**19**:3293.
- Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med* 2012;**9**:e1001356.
- Matalliotakis I, Koumantaki Y, Evageliou A, Matalliotakis G, Goumenou A, Koumantakis E. L-carnitine levels in the seminal plasma of fertile and infertile men: correlation with sperm quality. *Int J Fertil Womens Med* 2000;**45**:236–240.
- May-Panloup P, Chrétien M-F, Savagner F, Vasseur C, Jean M, Malhière Y, Reynier P. Increased sperm mitochondrial DNA content in male infertility. *Hum Reprod* 2003;**18**:550–556.
- Miki K, Qu W, Goulding EH, Willis WD, Bunch DO, Strader LF, Perreault SD, Eddy EM, O'Brien DA. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;**101**:16501–16506.
- Montiel-Sosa F, Ruiz-Pesini E, Enríquez JA, Marcuello A, Díez-Sánchez C, Montoya J, Wallace DC, López-Pérez MJ. Differences of sperm motility in mitochondrial DNA haplogroup U sublineages. *Gene* 2006;**368**:21–27.
- Moraes CR, Meyers S. The sperm mitochondrion: organelle of many functions. *Anim Reprod Sci* 2018;**194**:71–80.
- Moscatelli N, Lunetti P, Braccia C, Armirotti A, Pisanello F, De Vittorio M, Zara V, Ferramosca A. Comparative proteomic analysis of proteins involved in bioenergetics pathways associated with human sperm motility. *IJMS* 2019;**20**:3000.
- Moscatelli N, Spagnolo B, Pisanello M, Lemma ED, De Vittorio M, Zara V, Pisanello F, Ferramosca A. Single-cell-based evaluation of sperm progressive motility via fluorescent assessment of mitochondria membrane potential. *Sci Rep* 2017;**7**:17931.
- Mossman JA, Slate J, Birkhead TR, Moore HD, Pacey AA. Mitochondrial haplotype does not influence sperm motility in a UK population of men. *Hum Reprod* 2012;**27**:641–651.
- Mukai C, Travis A. What sperm can teach us about energy production: sperm energy production. *Reprod Domest Anim* 2012;**47**:164–169.
- Mundy AJ, Ryder TA, Edmonds DK. Asthenozoospermia and the human sperm mid-piece. *Hum Reprod* 1995;**10**:116–119.
- Musset B, Clark RA, DeCoursey TE, Petheo GL, Geiszt M, Chen Y, Cornell JE, Eddy CA, Brzyski RG, El Jamali A. NOX5 in human spermatozoa: expression, function, and regulation. *J Biol Chem* 2012;**287**:9376–9388.
- Nakada K, Sato A, Yoshida K, Morita T, Tanaka H, Inoue S-I, Yonekawa H, Hayashi J-I. Mitochondria-related male infertility. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;**103**:15148–15153.
- Ni F, Zhou Y, Zhang W, Wang X, Song X, Jiang H. Mitochondrial variations in the MT-ND4 and MT-TL1 genes are associated with male infertility. *Syst Biol Reprod Med* 2017;**63**:2–6.
- Nishimura Y, Yoshinari T, Naruse K, Yamada T, Sumi K, Mitani H, Higashiyama T, Kuroiwa T. Active digestion of sperm mitochondrial DNA in single living sperm revealed by optical tweezers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;**103**:1382–1387.
- Nowicka-Bauer K, Lepczynski A, Ozgo M, Kamieniczna M, Fraczek M, Stanski L, Olszewska M, Malcher A, Skrzypczak W, Kurpisz MK. Sperm mitochondrial dysfunction and oxidative stress as possible reasons for isolated asthenozoospermia. *J Physiol Pharmacol* 2018;**69**:403–417.
- Nowicka-Bauer K, Nixon B. Molecular changes induced by oxidative stress that impair human sperm motility. *Antioxidants* 2020;**9**:134.
- O'Connell M, McClure N, Powell LA, Steele EK, Lewis SEM. Differences in mitochondrial and nuclear DNA status of high-density and low-density sperm fractions after density centrifugation preparation. *Fertil Steril* 2003;**79**:754–762.
- O'Flaherty C. Orchestrating the antioxidant defenses in the epididymis. *Andrology* 2019;**7**:662–668.
- O'Flaherty C, Matsushita-Fournier D. Reactive oxygen species and protein modifications in spermatozoa. *Biol Reprod* 2017;**97**:577–585.
- Olson GE, Winfrey VP. Mitochondria-cytoskeleton interactions in the sperm midpiece. *J Struct Biol* 1990;**103**:13–22.
- Orsztynowicz M, Pawlak P, Podstawski Z, Nizanski W, Partyka A, Gotowiecka M, Kosiniak-Kamysz K, Lechniak D. Mitochondrial DNA copy number in spermatozoa of fertile stallions. *Reprod Dom Anim* 2016;**51**:378–385.
- Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, Khatri P, Krawetz SA. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* 2002;**360**:772–777.
- Otten ABC, Smeets HJM. Evolutionary defined role of the mitochondrial DNA in fertility, disease and ageing. *Hum Reprod Update* 2015;**21**:671–689.
- Paasch U, Grunewald S, Dathe S, Glander H-J. Mitochondria of human spermatozoa are preferentially susceptible to apoptosis. *Ann NY Acad Sci* 2004;**1030**:403–409.
- Palanichamy MG, Zhang Y-P. Identifying potential pitfalls in interpreting mitochondrial DNA mutations of male infertility cases. *Indian J Med Res* 2011;**134**:447–451.
- Paoli D, Gallo M, Rizzo F, Baldi E, Francavilla S, Lenzi A, Lombardo F, Gandini L. Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. *Fertil Steril* 2011;**95**:2315–2319.



- Parte PP, Rao P, Redij S, Lobo V, D'Souza SJ, Gajbhiye R, Kulkarni V. Sperm phosphoproteome profiling by ultra performance liquid chromatography followed by data independent analysis (LC-MSE) reveals altered proteomic signatures in asthenozoospermia. *J Proteom* 2012;**75**:5861–5871.
- Passarella S, de Bari L, Valenti D, Pizzuto R, Paventi G, Atlante A. Mitochondria and L-lactate metabolism. *FEBS Lett* 2008;**582**: 3569–3576.
- Patergnani S, Suski JM, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, Giorgi C, Marchi S, Missiroli S, Poletti F et al. Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs). *Cell Commun Signal* 2011;**9**:19.
- Pelliccione F, Micillo A, Cordeschi G, D'Angeli A, Necozone S, Gandini L, Lenzi A, Francavilla F, Francavilla S. Altered ultrastructure of mitochondrial membranes is strongly associated with unexplained asthenozoospermia. *Fertil Steril* 2011;**95**:641–646.
- Pereira L, Gonçalves J, Bandelt H-J. Mutation C11994T in the mitochondrial ND4 gene is not a cause of low sperm motility in Portugal. *Fertil Steril* 2008;**89**:738–741.
- Pereira L, Gonçalves J, Franco-Duarte R, Silva J, Rocha T, Arnold C, Richards M, Macaulay V. No Evidence for an mtDNA role in sperm motility: data from complete sequencing of asthenozoospermic males. *Mol Biol Evol* 2007;**24**:868–874.
- Piomboni P, Focarelli R, Stendardi A, Ferramosca A, Zara V. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility: mitochondria functionality in human spermatozoa. *Int J Androl* 2012;**35**:109–124.
- Du Plessis S, Agarwal A, Mohanty G, van der Linde M. Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use? *Asian J Androl* 2015;**17**:230.
- Publicover S, Harper CV, Barratt C. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> signalling in sperm—making the most of what you've got. *Nat Cell Biol* 2007;**9**:235–242.
- Pyle A, Hudson G, Wilson IJ, Coxhead J, Smertenko T, Herbert M, Santibanez-Koref M, Chinnery PF. Extreme-depth re-sequencing of mitochondrial DNA finds no evidence of paternal transmission in humans. *PLoS Genet* 2015;**11**:e1005040.
- Rajender S, Rahul P, Mahdi AA. Mitochondria, spermatogenesis and male infertility. *Mitochondrion* 2010;**10**:419–428.
- Ramalho-Santos J, Varum S, Amaral S, Mota PC, Sousa AP, Amaral A. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Hum Reprod Update* 2009;**15**:553–572.
- Ramió-Lluch L, Fernández-Novell J, Peña A, Colás C, Cebrián-Pérez J, Muñio-Blanco T, Ramírez A, Concha I, Rigau T, Rodríguez-Gil J. 'In Vitro' capacitation and acrosome reaction are concomitant with specific changes in mitochondrial activity in boar sperm: evidence for a nucleated mitochondrial activation and for the existence of a capacitation-sensitive subpopulational structure: mitochondria in capacitation and acrosome reaction. *Reprod Domest Anim* 2011;**46**: 664–673.
- Rando OJ. Daddy issues: paternal effects on phenotype. *Cell* 2012;**151**:702–708.
- Rantanen A, Jansson M, Oldfors A, Larsson N-G. Downregulation of Tfam and mtDNA copy number during mammalian spermatogenesis. *Mammal Genome* 2001;**12**:787–792.
- Reinhardt K, Dowling DK, Morrow EH. Mitochondrial replacement, evolution, and the clinic. *Science* 2013;**341**:1345–1346.
- Reynier P, Chrétien M-F, Penisson-Besnier I, Malthiery Y, Rohmer V, Lestienne P. Male infertility associated with multiple mitochondrial DNA rearrangements. *Comptes Rendus de L'Académie Des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* 1997;**320**:629–636.
- Rhemrev JP, van Overveld FW, Haenen GR, Teerlink T, Bast A, Vermeiden JP. Quantification of the nonenzymatic fast and slow TRAP in a postaddition assay in human seminal plasma and the antioxidant contributions of various seminal compounds. *J Androl* 2000;**21**:913–920.
- Rodríguez PC, Satorre MM, Beconi MT. Effect of two intracellular calcium modulators on sperm motility and heparin-induced capacitation in cryopreserved bovine spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2012;**131**:135–142.
- Rodríguez-Gil JE, Bonet S. Current knowledge on boar sperm metabolism: comparison with other mammalian species. *Theriogenology* 2016;**85**:4–11.
- Rolland M, Le Moal J, Wagner V, Royère D, De Mouzon J. Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26 609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. *Hum Reprod* 2013;**28**:462–470.
- Rosati AJ, Whitcomb BW, Brandon N, Buck Louis GM, Mumford SL, Schisterman EF, Pilsner JR. Sperm mitochondrial DNA biomarkers and couple fecundity. *Hum Reprod* 2020;**35**:deaa191–2625.
- Rossi A, Pizzo P, Filadi R. Calcium, mitochondria and cell metabolism: a functional triangle in bioenergetics. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2019;**1866**:1068–1078.
- Rovio AT, Marchington DR, Donat S, Schuppe H-C, Abel J, Fritsche E, Elliott DJ, Laippala P, Ahola AL, McNay D et al. Mutations at the mitochondrial DNA polymerase (POLG) locus associated with male infertility. *Nat Genet* 2001;**29**:261–262.
- Ruiz-Pesini E, Díez C, Lapeña AC, Pérez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Arenas J, López-Pérez MJ. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clin Chem* 1998;**44**: 1616–1620.
- Ruiz-Pesini E, Díez-Sánchez C, López-Pérez MJ, Enríquez JA. The role of the mitochondrion in sperm function: is there a place for oxidative phosphorylation or is this a purely glycolytic process? *Curr Top Dev Biol.* 2007;**77**:3–19.
- Ruiz-Pesini E, Lapeña A-C, Díez-Sánchez C, Pérez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Díaz M, Urriés A, Montoro L, López-Pérez MJ et al. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet* 2000;**67**: 682–696.
- Ruiz-Pesini E, Lapeña AC, Díez C, Álvarez E, Enríquez JA, López-Pérez MJ. Seminal quality correlates with mitochondrial functionality. *Clin Chim Acta* 2000;**300**:97–105.
- Said T, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Baumann T, Kriegel C, Li L, Glander H-J, Thomas AJ, Paasch U. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an *in vitro* model I. *Biol Reprod* 2006;**74**: 530–537.
- Sánchez R, Sepúlveda C, Risopatrón J, Villegas J, Giojalas LC. Human sperm chemotaxis depends on critical levels of reactive oxygen species. *Fertil Steril* 2010;**93**:150–153.
- Sato M, Sato K. Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2013;**1833**:1979–1984.



- Satoh M, Kuroiwa T. Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Exp Cell Res* 1991;**196**: 137–140.
- Saunders CM, Laman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, Lai FA. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development* 2002;**129**:3533–3544.
- Sawyer DE, Mercer BG, Wiklendt AM, Aitken RJ. Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa. *Mut Res Fundam Mol Mechanis Mutagen* 2003;**529**:21–34.
- Schmidt H, Carter AP. Review: structure and mechanism of the dynein motor ATPase. *Biopolymers* 2016;**105**:557–567.
- Schuffner A, Morshedi M, Vaamonde D, Duran EH, Oehninger S. Effect of different incubation conditions on phosphatidylserine externalization and motion parameters of purified fractions of highly motile human spermatozoa. *J Androl* 2002;**23**:194–201.
- Schwartz M, Vissing J. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 2002;**347**:576–580.
- Selvi Rani D, Vanniarajan A, Gupta NJ, Chakravarty B, Singh L, Thangaraj K. A novel missense mutation C11994T in the mitochondrial ND4 gene as a cause of low sperm motility in the Indian subcontinent. *Fertil Steril* 2006;**86**:1783–1785.
- Shabani Nashtaei M, Amidi F, Sedighi Gilani MA, Aleyasin A, Bakhshalizadeh S, Naji M, Nekoonam S. Protective features of resveratrol on human spermatozoa cryopreservation may be mediated through 5' AMP-activated protein kinase activation. *Andrology* 2017;**5**:313–326.
- Sharpley MS, Marciniak C, Eckel-Mahan K, McManus M, Crimi M, Waymire K, Lin CS, Masubuchi S, Friend N, Koike M et al. Heteroplasmy of mouse mtDNA is genetically unstable and results in altered behavior and cognition. *Cell* 2012;**151**:333–343.
- Sheikh N, Goodarzi M, Al-Havaejee Safari BH, Amiri M, Najafi I, Hadeie RJ. L-carnitine level in seminal plasma of fertile and infertile men. *J Res Health Sci* 2007;**7**:43–48.
- Shen S, Wang J, Liang J, He D. Comparative proteomic study between human normal motility sperm and idiopathic asthenozoospermia. *World J Urol* 2013;**3**:1395–1401.
- Shitara H, Kaneda H, Sato A, Inoue K, Ogura A, Yonekawa H, Hayashi JI. Selective and continuous elimination of mitochondria microinjected into mouse eggs from spermatids, but not from liver cells, occurs throughout embryogenesis. *Genetics* 2000;**156**: 1277–1284.
- Sinha A, Singh V, Yadav S. Multi-omics and male infertility status integration and future prospects. *Front Biosci* 2017;**9**:375–394.
- Siva AB, Kameshwari DB, Singh V, Pavani K, Sundaram CS, Rangaraj N, Deenadayal M, Shivaji S. Proteomics-based study on asthenozoospermia: differential expression of proteasome alpha complex. *MHR: Basic Sci Reprod Med* 2010;**16**:452–462.
- Skowronek MF, Velazquez T, Mut P, Figueiro G, Sans M, Bertoni B, Sapiro R. Associations between male infertility and ancestry in South Americans: a case control study. *BMC Med Genet* 2017;**18**: 78.
- Song GJ, Lewis V. Mitochondrial DNA integrity and copy number in sperm from infertile men. *Fertil Steril* 2008;**90**:2238–2244.
- Song W-H, Yi Y-J, Sutovsky M, Meyers S, Sutovsky P. Autophagy and ubiquitin-proteasome system contribute to sperm mitophagy after mammalian fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;**113**: E5261–E5270.
- Sousa AP, Amaral A, Baptista M, Tavares R, Caballero Campo P, Caballero Peregrín P, Freitas A, Paiva A, Almeida-Santos T, Ramalho-Santos J. Not all sperm are equal: functional mitochondria characterize a subpopulation of human sperm with better fertilization potential. *PLoS One* 2011;**6**:e18112.
- Spinelli JB, Haigis MC. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat Cell Biol* 2018;**20**:745–754.
- Spiropoulos J, Turnbull DM, Chinnery PF. Can mitochondrial DNA mutations cause sperm dysfunction? *Mol Hum Reprod* 2002;**8**: 719–721.
- St John J, Sakkas D, Dimitriadi K, Barnes A, Maclin V, Ramey J, Barratt C, Jonge CD. Failure of elimination of paternal mitochondrial DNA in abnormal embryos. *The Lancet* 2000;**355**:200.
- St John JC, Jokhi RP, Barratt CLR. Men with oligoasthenoteratozoospermia harbour higher numbers of multiple mitochondrial DNA deletions in their spermatozoa, but individual deletions are not indicative of overall aetiology. *Mol Hum Reprod* 2001;**7**:103–111.
- Stendardi A, Focarelli R, Piomboni P, Palumberi D, Serafini F, Ferramosca A, Zara V. Evaluation of mitochondrial respiratory efficiency during *in vitro* capacitation of human spermatozoa: sperm motility and oxidative phosphorylation. *Int J Androl* 2011;**34**: 247–255.
- Storey BT. Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *Int J Dev Biol* 2008;**52**:427–437.
- Sun Y, Zhang W-J, Zhao X, Yuan R-P, Jiang H, Pu X-P. PARK7 protein translocating into spermatozoa mitochondria in Chinese asthenozoospermia. *Reproduction* 2014;**148**:249–257.
- Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 1999;**402**:371–372.
- Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biol Reprod* 2000;**63**:582–590.
- Sutovsky P, Song W-H. Post-fertilisation sperm mitophagy: the tale of Mitochondrial Eve and Steve. *Reprod Fertil Dev* 2018;**30**:56.
- Talarczyk-Desole J, Kotwicka M, Jendraszak M, Pawelczyk L, Murawski M, Jędrzejczak P. Sperm midpiece apoptotic markers: impact on fertilizing potential in *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Cell* 2016;**29**:67–75.
- Talebi E, Karimian M, Nikzad H. Association of sperm mitochondrial DNA deletions with male infertility in an Iranian population. *Mitochondrial DNA Part A* 2018;**29**:615–623.
- Taylor RW, McDonnell MT, Blakely EL, Chinnery PF, Taylor GA, Howell N, Zeviani M, Briem E, Carrara F, Turnbull DM. Genotypes from patients indicate no paternal mitochondrial DNA contribution. *Ann Neurol* 2003;**54**:521–524.
- Taylor SL, Weng SL, Fox P, Duran EH, Morshedi MS, Oehninger S, Beebe SJ. Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality. *MHR: Basic Sci Reprod Med* 2004;**10**:825–834.
- Thangaraj K, Joshi MB, Reddy AG, Rasalkar AA, Singh L. Sperm mitochondrial mutations as a cause of low sperm motility. *J Androl* 2003;**24**:388–392.



- Thompson WE, Ramalho-Santos J, Sutovsky P. Ubiquitination of prohibitin in mammalian sperm mitochondria: possible roles in the regulation of mitochondrial inheritance and sperm quality control. *Biol Reprod* 2003;**69**:254–260.
- Tian M, Bao H, Martin FL, Zhang J, Liu L, Huang Q, Shen H. Association of DNA methylation and mitochondrial DNA copy number with human semen quality. *Biol Reprod* 2014;**91**:101.
- Toda C, Diano S. Mitochondrial UCP2 in the central regulation of metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2014;**28**:757–764.
- Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R, Obinu D, Savontaus ML, Wallace DC. Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics* 1996;**144**:1835–1850.
- Tourmen Y, Baris O, Dessen P, Jacques C, Malthiery Y, Reynier P. Structure and chromosomal distribution of human mitochondrial pseudogenes. *Genomics* 2002;**80**:71–77.
- Travis AJ, Foster JA, Rosenbaum NA, Visconti PE, Gerton GL, Kopf GS, Moss SB. Targeting of a germ cell-specific type I hexokinase lacking a porin-binding domain to the mitochondria as well as to the head and fibrous sheath of murine spermatozoa. *MBoC* 1998;**9**:263–276.
- Travis AJ, Sui D, Riedel KD, Hofmann NR, Moss SB, Wilson JE, Kopf GS. A novel NH<sub>2</sub>-terminal, nonhydrophobic motif targets a male germ cell-specific hexokinase to the endoplasmic reticulum and plasma membrane. *J Biol Chem* 1999;**274**:34467–34475.
- Tremellen K. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 2008;**14**:243–258.
- Treulen F, Uribe P, Boguen R, Villegas JV. Mitochondrial permeability transition increases reactive oxygen species production and induces DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2015;**30**:767–776.
- Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, Bohlooly-Y M, Gidlöf S, Oldfors A, Wibom R et al. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 2004;**429**:417–423.
- Troiano L, Granata ARM, Cossarizza A, Kalashnikova G, Bianchi R, Pini G, Tropea F, Carani C, Franceschi C. Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility. *Exp Cell Res* 1998;**241**:384–393.
- Turner RM. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod Fertil Dev* 2006;**18**:25.
- Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, Flohé L. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* 1999;**285**:1393–1396.
- Vafai SB, Mootha VK. Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature* 2012;**491**:374–383.
- van den Ameel J, Li AYZ, Ma H, Chinnery PF. Mitochondrial heteroplasmy beyond the oocyte bottleneck. *Semin Cell Dev Biol* 2020;**97**:156–166.
- Vaught RC, Dowling DK. Maternal inheritance of mitochondria: implications for male fertility? *Reproduction* 2018;**155**:R159–R168.
- Vertika S, Singh KK, Rajender S. Mitochondria, spermatogenesis, and male infertility - an update. *Mitochondrion* 2020;**54**:26–40.
- Vigodner M, Shrivastava V, Gutstein LE, Schneider J, Nieves E, Goldstein M, Feliciano M, Callaway M. Localization and identification of sumoylated proteins in human sperm: excessive sumoylation is a marker of defective spermatozoa. *Hum Reprod* 2013;**28**:210–223.
- Wai T, Ao A, Zhang X, Cyr D, Dufort D, Shoubridge EA. The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility I. *Biol Reprod* 2010;**83**:52–62.
- Wang J, Wang J, Zhang H-R, Shi H-J, Ma D, Zhao H-X, Lin B, Li R-S. Proteomic analysis of seminal plasma from asthenozoospermia patients reveals proteins that affect oxidative stress responses and semen quality. *Asian J Androl* 2009;**11**:484–491.
- Wang M-J, Ou J-X, Chen G-W, Wu J-P, Shi H-J, O W-S, Martin-DeLeon PA, Chen H. Does prohibitin expression regulate sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and male fertility? *Antioxid Redox Signal* 2012;**17**:513–519.
- Wang X, Qian H, Huang X, Li J, Zhang J, Zhu N, Chen H, Zhu C, Wang J, Zhang P et al. UCP2 Mitigates the loss of human spermatozoa motility by promoting mROS elimination. *Cell Physiol Biochem* 2018;**50**:952–962.
- Wang X, Sharma R, Sikka S, Thomas AJ, Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 2003;**80**:531–535.
- Wilton LJ, Temple-Smith PD, de Kretser DM. Quantitative ultrastructural analysis of sperm tails reveals flagellar defects associated with persistent asthenozoospermia. *Hum Reprod* 1992;**7**:510–516.
- World Health Organization (ed). *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*, 5th edn. Geneva: World Health Organization, 2010.
- Wu H, Huffman AM, Whitcomb BW, Josyula S, Labrie S, Tougas E, Rahil T, Sites CK, Pilsner JR. Sperm mitochondrial DNA measures and semen parameters among men undergoing fertility treatment. *Reprod BioMed Online* 2019a;**38**:66–75.
- Wu H, Whitcomb BW, Huffman A, Brandon N, Labrie S, Tougas E, Lynch K, Rahil T, Sites CK, Pilsner JR. Associations of sperm mitochondrial DNA copy number and deletion rate with fertilization and embryo development in a clinical setting. *Hum Reprod* 2019b;**34**:163–170.
- Yabuuchi A, Beyhan Z, Kagawa N, Mori C, Ezoe K, Kato K, Aono F, Takehara Y, Kato O. Prevention of mitochondrial disease inheritance by assisted reproductive technologies: prospects and challenges. *Biochim Biophys Acta* 2012;**1820**:637–642.
- Youle RJ, van der Blik AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 2012;**337**:1062–1065.
- Zhang G, Wang Z, Ling X, Zou P, Yang H, Chen Q, Zhou N, Sun L, Gao J, Zhou Z et al. Mitochondrial biomarkers reflect semen quality: results from the MARCHS Study in Chongqing, China. *PLoS One* 2016a;**11**:e0168823.
- Zhang J, Jiang W, Zhou Q, Ni M, Liu S, Zhu P, Wu Q, Li W, Zhang M, Xia X. CAG-repeat polymorphisms in the polymerase  $\gamma$  gene and male infertility: a meta-analysis. *Andrologia* 2016b;**48**:970–977.
- Zhang W-D, Zhang Z, Jia L-T, Zhang L-L, Fu T, Li Y-S, Wang P, Sun L, Shi Y, Zhang H-Z. Oxygen free radicals and mitochondrial signaling in oligospermia and asthenospermia. *Mol Med Rep* 2014;**10**:1875–1880.
- Zhao C, Huo R, Wang F-Q, Lin M, Zhou Z-M, Sha J-H. Identification of several proteins involved in regulation of sperm motility by proteomic analysis. *Fertil Steril* 2007;**87**:436–438.

- Zhao X, Li N, Guo W, Hu X, Liu Z, Gong G, Wang A, Feng J, Wu C. Further evidence for paternal inheritance of mitochondrial DNA in the sheep (*Ovis aries*). *Heredity* 2004;**93**:399–403.
- Zhao Y, Li Q, Yao C, Wang Z, Zhou Y, Wang Y, Liu L, Wang Y, Wang L, Qiao Z. Characterization and quantification of mRNA transcripts in ejaculated spermatozoa of fertile men by serial analysis of gene expression. *Hum Reprod* 2006;**21**:1583–1590.
- Zhou Q, Li H, Li H, Nakagawa A, Lin JIJ, Lee E-S, Harry BL, Skeen-Gaar RR, Suehiro Y, William D et al. Mitochondrial endonuclease G mediates breakdown of paternal mitochondria upon fertilization. *Science* 2016;**353**:394–399.
- Zopfgen A. Relationship between semen quality and the seminal plasma components carnitine, alpha-glucosidase, fructose, citrate and granulocyte elastase in infertile men compared with a normal population. *Hum Reprod* 2000;**15**:840–845.
- Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev* 2014;**94**:909–950.
- Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, Silachev DN, Pevzner IB, Jankauskas SS, Babenko VA, Zorov SD, Balakireva AV, Juhaszova M et al. Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem* 2018;**552**:50–59.





# Objectifs de la thèse

Ce travail a été réalisé sur un ensemble d'échantillons biologiques inclus dans la biocollection « fertilité » du laboratoire de Biologie de la reproduction du CHU d'Angers. Les échantillons d'intérêt ont été collectés chez des patients, pris en charge en AMP dans le centre, ayant accepté de participer à cette biocollection et caractérisés, soit par des altérations marquées des paramètres spermatiques (Oligo-Asthénozoospermique (OA) sévères) soit par des paramètres spermatiques normaux. Ces échantillons d'intérêt ont été préparés à partir de l'éjaculat réalisé par les patients le jour de leur tentative d'AMP. Il s'agit de spermatozoïdes d'une part, et du liquide séminal d'autre part.

La première partie du travail porte sur l'étude de l'ADNmt des spermatozoïdes. L'objectif principal de ce projet est d'étudier parallèlement la quantité et la qualité de l'ADNmt dans les spermatozoïdes de patients OA sévères par rapport à des patients présentant un spermogramme normal.

Une quantité plus élevée du nombre de copies de l'ADNmt dans les spermatozoïdes de patients infertiles a déjà été mise en évidence dans l'équipe en utilisant une technique de PCR quantitative. Nous avons voulu vérifier ce résultat en utilisant une nouvelle technique de PCR plus performante: la PCR digitale.

L'étude exhaustive de la séquence de l'ADNmt des spermatozoïdes n'a jamais été réalisée. Il nous a semblé intéressant de mettre au point la technique de séquençage NGS (Next-Generation Sequencing) afin d'identifier les grands réarrangements et les mutations ponctuelles de l'ADNmt présents dans les spermatozoïdes d'hommes, présentant ou non une altération de leurs paramètres spermatiques.

Il nous semblait notamment intéressant de mettre en relation l'augmentation du nombre de copies d'ADNmt des spermatozoïdes de patients infertiles avec une possible altération de la qualité de cet ADNmt. Outre l'intérêt physiopathologique, dans la perspective d'une AMP, l'utilisation de spermatozoïdes riches en ADNmt (pouvant déséquilibrer les mécanismes de transmission uniparentale maternelle de ce génome) s'avérerait problématique si ce dernier était montré comme plus fréquemment altéré.

La seconde partie de ce travail porte sur l'identification des métabolites présents dans le liquide séminal (LS) des patients de la cohorte grâce à une nouvelle technologie « omique » : la métabolomique. Cette étude a pour objectif de mettre au point une approche standardisée de métabolomique ciblée et quantitative utilisant la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem, avec le kit Biocrates Absolute IDQ p180. Le liquide séminal est le reflet de l'environnement du spermatozoïde et de leurs interactions. Ces interactions sont particulièrement importantes puisqu'elles permettent au spermatozoïde d'acquérir progressivement son pouvoir fécondant. L'identification des constituants du LS est une voie vers une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'acquisition de la « compétence spermatique » mais aussi dans la survenue de l'infertilité, avec en outre, la perspective de pouvoir caractériser de nouveaux biomarqueurs.



# Matériels et méthodes

## 1. Cohorte de patients

### 1.1. Inclusion des patients à l'étude

La biocollection sur laquelle s'appuie notre étude a été approuvée par le comité d'éthique du CHU d'Angers (Number DC-2014-2224 et AC-2016-2799).

L'étude porte sur le sperme de 44 patients :

- 24 patients contrôles présentant un spermogramme normal avec des valeurs conformes à celle de l'OMS (World Health Organization, 2010), soit une numération supérieure à 15 millions/mL ou 39 millions dans l'éjaculat, une mobilité progressive supérieure à 32% et une morphologie typique supérieure à 23% (classification de David modifiée) ou 4% (classification de Kruger). Les patients sont pris en charge en IIU ou FIV classique dans le cadre d'une infertilité d'origine féminine.
- 20 patients infertiles présentant une oligo-asthénospermie sévère (OA) avec des valeurs inférieures à celles de l'OMS (World Health Organization, 2010) et dont le TMSC (Total Motile Sperm Count) (volume du sperme \* nombre de spermatozoïdes \* mobilité progressive) /100 est inférieur ou égal à 5 M selon la publication d'Hamilton en 2015 (Hamilton *et al.*, 2015). Les patients sont uniquement pris en charge en ICSI pour infertilité masculine.

### 1.2. Préparation des échantillons

Le recueil du sperme a été effectué le jour de la tentative d'insémination intra-utérine, de FIV ou de FIV avec ICSI. L'ensemble des patients avait un délai d'abstinence compris entre 3 et 5 jours. Après liquéfaction, le sperme a été analysé (numération et mobilité). Une fois la technique d'AMP réalisée, un millilitre du reliquat de sperme a été récupéré et traité pour l'étude. Le sperme a été déposé sur un gradient de densité (Puresperm (Nidacon, Gothenburg, Sweden) / FertiCult IVF Medium (FertiPro, Beernem, Belgique)) de deux phases (40 et 90%) et centrifugé à 300 g pendant 20 minutes. Les spermatozoïdes les plus denses se retrouvent dans la couche 90%, tandis que les spermatozoïdes les moins intègres restent dans la couche 40%.

Le liquide séminal resté sur le gradient après centrifugation a été isolé, centrifugé à 10000 g pendant 5 minutes (afin d'éliminer les débris cellulaires), puis congelé à -80°C. Ce liquide séminal était destiné à l'étude métabolomique.

Les phases 90 et 40% ont été récupérées individuellement dans 2.5 ml de solution de lavage FertiCult IVF Medium (FertiPro, Beernem, Belgique) et centrifugées à 600 g pendant 10 minutes. Le culot de spermatozoïdes a été asséché, puis 250 µl de FertiCult IVF Medium (FertiPro, Beernem, Belgique) ont été ajoutés délicatement sur ce culot afin de réaliser pendant 2 heures une migration ascendante permettant d'isoler les spermatozoïdes



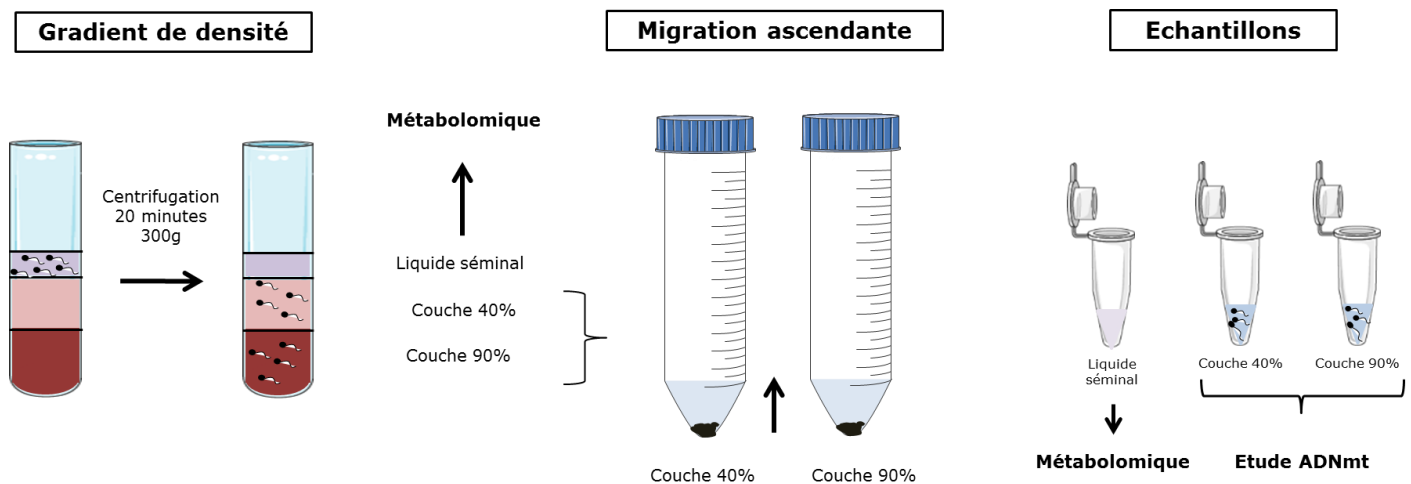


Figure 22 : Préparation du sperme.

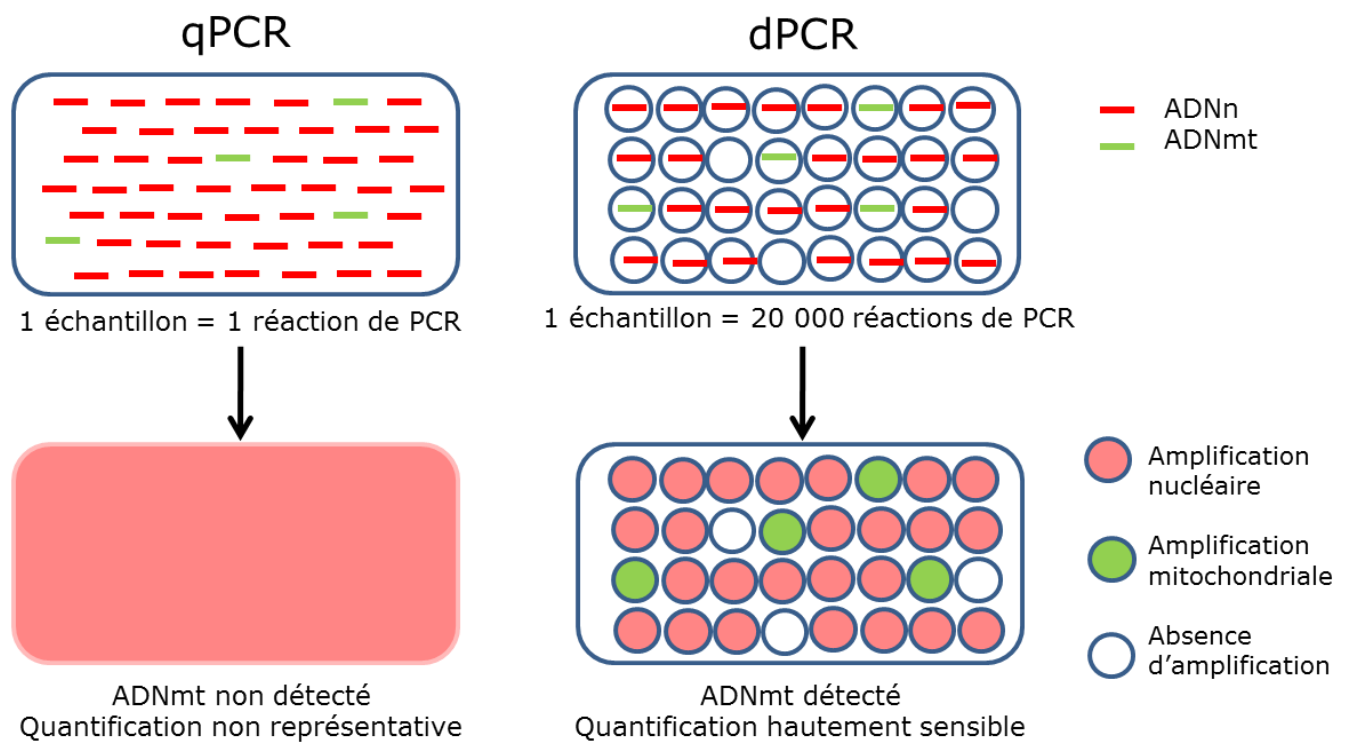


Figure 23 : Comparaison de la PCR quantitative et de la PCR digitale.

(Adaptée de (Perez-Toralla et al., 2015)).

des cellules rondes et des débris cellulaires. Les deux échantillons de spermatozoïdes issus des phases 40 et 90% ont été congelés à -80°C dans l'attente de l'extraction d'ADN destiné à l'étude de l'ADNmt (Figure 22).

## 2. Etude de l'ADNmt

### 2.1. Extraction de l'ADN total des spermatozoïdes

A partir de l'ADN extrait des spermatozoïdes nous avons d'une part quantifié l'ADNmt par PCR digitale et d'autre part réalisé le séquençage haut débit de cet ADNmt. L'extraction a été faite à l'aide du kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel®, Hoerdts, France) suivant les recommandations du fournisseur. La lyse des spermatozoïdes permet de libérer l'ADN. Cette lyse est possible grâce à l'action de 200 µl de la solution Lysis Buffer B3, de 25 µl de protéinase K, ainsi que 10 µl de dithiothreitol (1 M). L'ajout supplémentaire de dithiothreitol a été nécessaire pour casser les ponts disulfures de la capsule mitochondriale du spermatozoïde (Sutovsky *et al.*, 1997; Ursini *et al.*, 1999). Les échantillons sont incubés au bain-marie à 70°C pendant 15 minutes avant l'ajout de 210 µl d'éthanol absolu pour précipiter l'ADN. La totalité de l'échantillon est placée sur une colonne avec une membrane de silice. Une centrifugation d'une minute à 11 000 g est réalisée afin que l'ADN se lie à la membrane de silice. Deux lavages de la colonne sont effectués, avec entre chaque une centrifugation d'une minute à 11 000 g. Le premier lavage est réalisé avec 500 µl de la solution BW et le second avec 600 µl de la solution B5. Après chaque lavage le contenu du réceptacle est jeté. Une dernière centrifugation est nécessaire afin d'évacuer tout le liquide de la membrane. L'ADN a été élué dans 60 µl de la solution d'élution préalablement chauffée à 70°C. Après centrifugation d'une minute à 11 000 g l'ADN n'est plus lié à la membrane de silice mais est retrouvé dans la solution d'élution. Cet ADN a été dosé au Qubit® 2.0 Fluorometer en utilisant le kit Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fischer technologies).

### 2.2. PCR digitale

L'ADNmt a été quantifié par une nouvelle technique, hautement sensible et précise : la PCR digitale (dPCR). Elle permet une meilleure détection des copies de l'ADNmt que la PCR quantitative classique (qPCR). De plus, elle permet une quantification absolue (nombre de copies d'ADNmt/spermatozoïde) (Figure 23).

La dPCR a été réalisée selon le protocole du fournisseur (QuantStudio 3D digitale, Applied Biosystems). Le gène *MT-ND1* a été utilisé pour quantifier le nombre de copies d'ADNmt et le gène *BAX* pour quantifier le nombre de copies du génome nucléaire (correspondant au nombre de spermatozoïdes) (Table 5). Le ratio génome mitochondrial sur génome nucléaire permet d'obtenir un nombre de copies d'ADNmt par spermatozoïde. Le couple d'amorces pour le gène *MT-ND1* a été testé sur de l'ADN de cellules dépourvues d'ADNmt (cellules Rho0) afin de vérifier l'absence d'amplification de pseudogènes par ces amorces. Tous les échantillons ainsi que les

Table 5 : Amorces et sondes pour la dPCR.

| Gènes         | Amorces                                                                                           | Sonde                                                                                                                                              |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>MT-ND1</b> | F : 5' CCCTAAAACCCGCCACATCT 3'<br>R : 5' GAGCGATGGTGAGAGCTAAGGT 3'<br>Produit de séquence : 69 pb | /5'-FAM/CCATCACCC/ZEN/TCTACATCACCGCCC/3IABkFQ<br>Fluorochrome FAM :<br>Longueur d'onde d'excitation : 495 nm<br>Longueur d'onde d'émission: 520 nm |
| <b>BAX</b>    | F : 5' TTCATCCAGGATCGAGCAGG 3'<br>R : 5' TGAGACACTCGCTCAGCTTC 3'<br>Produit de séquence : 103 pb  | /5'HEX/CCCGAGCTG/ZEN/GCCCTGGACCCGGT/3IABkFQ/<br>Fluorochrome HEX :<br>Longueur d'onde d'excitation : 530 nm<br>Longueur d'onde d'émission: 555 nm  |

Table 6 : Amorces pour l'amplification de l'ADNmt.

|                   | Amorces                                                           | Produit de séquence |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------|---------------------|
| <b>Amplicon 1</b> | F : 5' CCTAGCCCACTTCTTACCACA 3'<br>R : 5' GGTGAACTCACTGGAACGGG 3' | 8397 pb             |
| <b>Amplicon 2</b> | F : 5' CAGGGTTGGTCAATTCGT 3'<br>R : 5' GCTTGGATTAAGGCGACAG 3'     | 8289 pb             |

contrôles positifs (produits de PCR pour les deux gènes d'intérêt d'ADN de fibroblastes humain) et un contrôle négatif (H<sub>2</sub>O) ont été effectués en duplicat.

Brièvement, le volume final à déposer sur une puce est de 14.5 µl répartis comme suit : 1 X QuantStudio 3D digital PCR Mastermix v2 (Applied Biosystems), 10.6 nM de chaque amorce, 2.3 nM de sonde et d'ADN (2 µl ND1; 6.75 µl BAX). Chaque échantillon a été déposé sur une puce (QuantStudio™ 3D Digital PCR Chip v2) à l'aide de l'appareil QuantStudio™ 3D Digital PCR Chip Loader (Applied Biosystems). Ensuite les puces ont été placées dans un thermocycleur (ProFlex™ 2x Flat PCR System (Applied Biosystems) selon le programme : 10 minutes à 96°C suivi de 39 cycles (2 minutes à 60°C; 30 secondes à 98°C; 2 minutes à 60°C) et 25°C à l'infini. Les puces ont été lues à l'aide de l'appareil 3D Digital PCR Apparatus (Applied Biosystems) et analysées avec le logiciel en ligne QuantStudio3D (v.3.1.6-PRC-build18).

## 2.3. Séquençage haut débit (NGS)

### 2.3.1. Amplification de l'ADNmt

Pour réaliser le séquençage haut débit de l'ADNmt des spermatozoïdes nous avons utilisé la technologie Ion Torrent®. Après extraction de l'ADN des échantillons nous obtenons l'ADN total, nucléaire et mitochondrial. Il est d'abord nécessaire de surreprésenter l'ADNmt en l'amplifiant spécifiquement. Pour cela il est possible de réaliser des amplifications par PCR longues distances (Long-Range PCR) avec un couple d'amorces amplifiant la totalité du génome mitochondrial en une seule fois ou deux couples d'amorces amplifiant deux longs fragments chevauchants ou plus.

Le génome mitochondrial des spermatozoïdes a tout d'abord été amplifié en deux longs fragments de 8397 pb et 8289 pb. Les deux couples d'amorces sont localisées dans les gènes *MT-RNR1* et *MT-ATP6* et ont été testés sur de l'ADN de cellules Rho0 (Table 6). Les longues PCR ont été réalisées avec LA Taq polymérase (Takara Bio Europe SAS, Saint-Germain-en-Laye, France). Chaque réaction a été effectuée dans un volume final de 50 µl comme suit : 1 X de Buffer, 0.4 mM de dNTP, 0.4 mM de chaque amorce, 2.5 unités de Taq et 5 µl d'ADN. Le programme d'amplification a été réalisé comme suit : 1 minute à 94°C suivi de 35 cycles (10 secondes à 98°C ; 15 minutes à 68°C ; 3 minutes à 72°C) et 10 minutes à 72°C. Les produits de PCR ont été visualisés sur gel d'agarose (1%) par électrophorèse avant d'avoir été purifiés et quantifiés au Qubit® 2.0 Fluorometer en utilisant le kit Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

### 2.3.2. Construction d'une librairie

La construction d'une librairie de séquençage permet d'amplifier des fragments d'une taille spécifique pour l'utilisation du séquenceur qui ont été fragmentés et associés à des adaptateurs spécifiques.



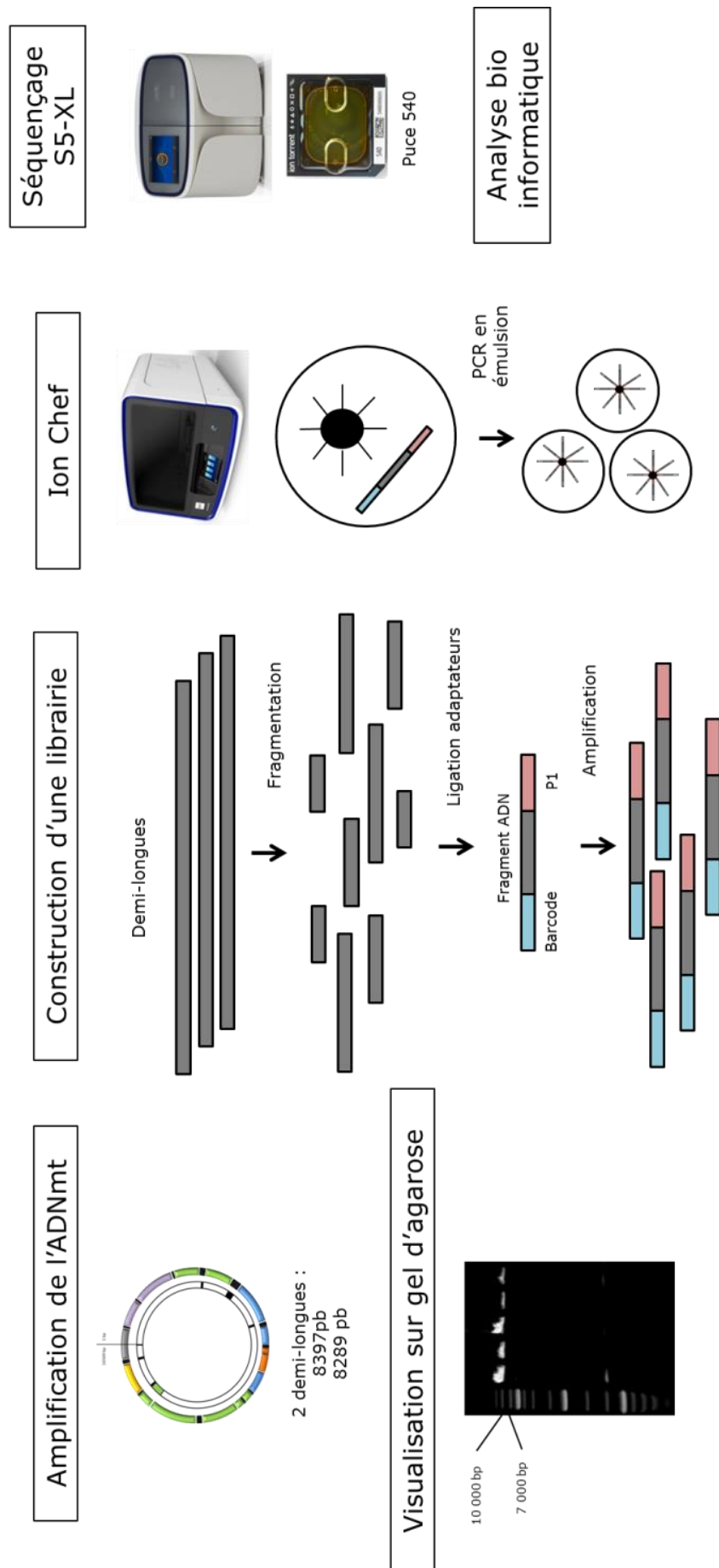


Figure 24 : Etapes du séquençage.

Pour chaque échantillon, 150 ng du produit d'amplification de chacun des deux longs fragments ont été poolés. La librairie a été réalisée avec le kit Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) selon les recommandations du fournisseur. La première étape permet de fragmenter de façon enzymatique l'ADN. Ensuite les extrémités des fragments d'ADN sont liés à un adaptateur Ion Xpress™ P1 d'un côté et un barcode Ion Xpress™ de l'autre. Un barcode est spécifique d'un échantillon et permet par la suite l'identification des échantillons. Les fragments d'une taille de 200 pb sont sélectionnés par électrophorèse par le système E-gel Sizeselect (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La librairie finale est ensuite amplifiée avec Platinum® PCR SuperMix High Fidelity (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Toutes les purifications ont été réalisées avec des billes magnétiques Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

### 2.3.3. PCR en émulsion et séquençage

La PCR émulsion permet l'amplification clonale des fragments d'ADN sur des billes qui seront réparties sur une puce semi conductrice composée de micro-puits contenant les réactifs de séquençage (taq polymérase et dNTPs). Le principe du séquenceur est de détecter de faibles variations de pH générées par l'expulsion d'un proton quand un nucléotide est incorporé au fragment d'ADN à synthétiser. La variation de pH va être traduite en signal électrique détecté par le séquenceur. Ensuite l'analyse des données consiste à transformer le signal électrique en séquence d'ADN. Les séquences de chaque fragment obtenues sont alignées sur le génome de référence mitochondrial (NC\_012920.1) afin de reconstituer le génome mitochondrial dans son ensemble.

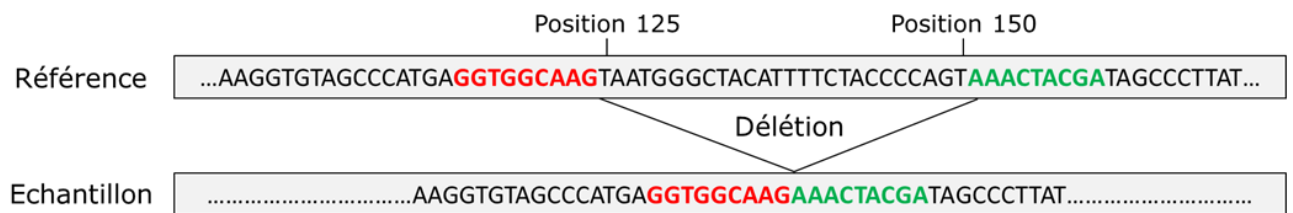
Une dilution à 100 pM a été réalisée avant de rassembler les échantillons et de les placer dans l'automate Ion Chef (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) pour une PCR émulsion. Les échantillons ont ensuite été séquencés en utilisant une plateforme de séquençage à haut débit Ion Torrent S5-XL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) sur une puce 540 (contenance en données : 60-80 millions de reads). Sur chaque puce un contrôle positif (ADN issu de fibroblastes humain) et un contrôle négatif contenant de l'eau ont été séquencés (Figure 24).

### 2.3.4. Traitement bio-informatique

L'objectif de l'analyse bio-informatique est de rechercher les variations entre le génome de référence et les échantillons. L'étude des variations de l'ADNmt repose sur l'analyse des variants (SNP, petites Indels (insertion-délétion) et des grands réarrangements.

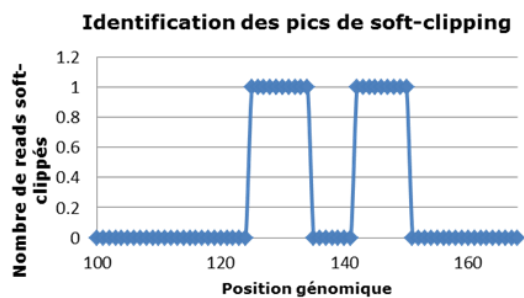
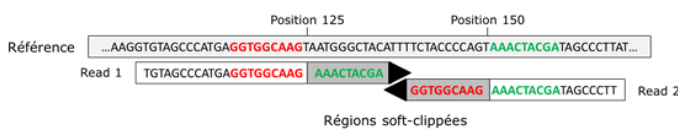
- Recherche de variants ponctuels et petites Indels

La première étape consiste à identification des variants, l'étape de « calling ». Ensuite vient l'étape d'annotation des variants, c'est à dire localiser leur position génomique et prédire leur impact fonctionnel. Puis la priorisation correspond au tri des variants afin de faire ressortir des variants possiblement impliqués dans la pathologie

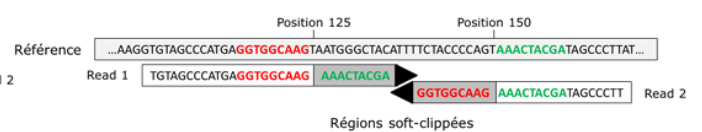


## Détection des délétions par l'outil eKlipse

### 1. Distribution du soft-clipping



### 2. Récupération des séquences soft-clippées

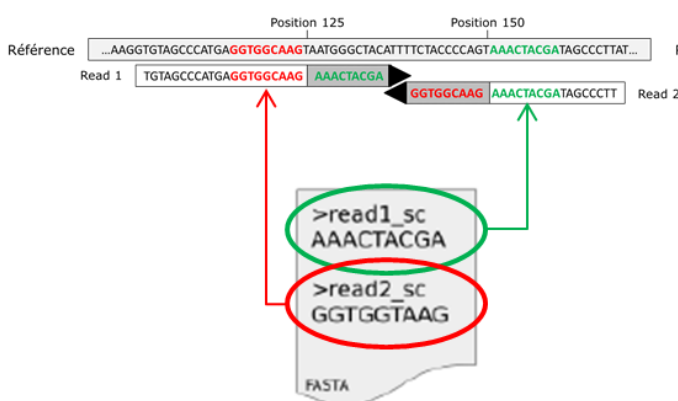


```
>read1_sc
AACTACGA

>read2_sc
GGTGGTAAG

FASTA
```

### 3. BLAT des séquences soft-clippées



### 4. Etablir des liens entre les positions soft-clippées et le BLAT

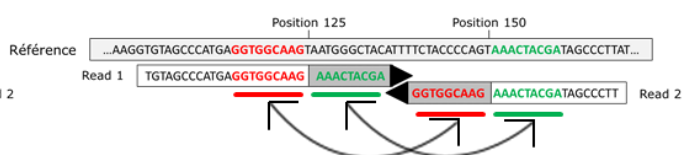


Figure 25 : Fonctionnement de l'outil eKlipse.

(Adaptée de (Bris, 2017).

recherchée. Cette dernière étape est cependant difficile du aux manques de bases de données spécifiques de l'ADNmt et des outils dédiés uniquement au génome mitochondrial.

Un pipeline bioinformatique du laboratoire « Niourk » réalise ces trois étapes. Nous obtenons un fichier excel avec tous les variants identifiés par échantillon. De ces données commence un travail d'expertise biologique. L'application de filtres permet de trier et prioriser les variants et déterminer ceux en lien avec l'échantillon d'intérêt.

- Recherche de grands réarrangements

L'outil eKLIpse a été développé au laboratoire pour prédire la présence de délétions au sein du génome mitochondrial (Goudenège *et al.*, 2019). Cet outil est basé sur l'analyse du soft-clipping qui consiste à rogner les extrémités des reads qui ne s'alignent pas sur la référence. L'outil eKLIpse va utiliser ces extrémités rognées pour prédire la présence de délétion. Tout d'abord l'outil va récupérer toutes les séquences soft-clippées afin d'identifier des pics de soft-clipping. Ensuite ces séquences sont récupérées sous un format fasta et blastées sur le génome de référence pour identifier les possible liens entre deux pics de soft-clipping. Si un lien existe entre les deux, la présence d'une délétion est prédite (Figure 25). In fine les résultats analysés par l'outil eKLIpse sont représentées sous la forme d'un circos correspondant à l'ADNmt avec la présence les pics de soft-clipping, des délétions et leur pourcentage cumulé et la profondeur de la couverture (Figure 26). L'outil reporte également dans un fichier excel tous les grands réarrangements avec leurs positions exactes, la fréquence et la classification des délétions.

Dans le cadre du séquençage de l'ADNmt des spermatozoïdes, les variants ont été filtrés selon plusieurs critères. Tout d'abord nous n'avons pris en compte que les variants de haute confiance, les variants détectés par au moins quatre callers sur six (Torrent Suite Variant Caller, GATK [PMID:20644199], VarScan [PMID:25553206], SNVer [PMID:21813454], LoFreq [PMID:23066108] et Platypus [PMID:25017105]). Pour filtrer les artefacts de séquençage récurrents, nous avons utilisé notre propre base de données de variants d'ADNmt (CHU d'Angers) comprenant plus de 5000 échantillons et nous n'avons conservé que les variants trouvés dans moins de 20% de nos runs. Les variants d'haplogroupe et les variants synonymes ont également été filtrés. Enfin tous les variants annotés comme polymorphisme dans la base de données Mitomap (<http://www.mitomap.org>) ont été exclus.

L'outil eKLIpse a été utilisé pour étudier les grands réarrangements de l'ADNmt (Goudenège *et al.*, 2019). Nous avons exclu la région des amorces pour l'analyse pour éviter les artefacts (positions 725-870 ; 8898-8918 et 9140-9158) (analyse de 98,9 % du génome mitochondrial). Nous avons conservé les paramètres recommandés par défaut de Ion Torrent mais le downsampling a été désactivé.

### 2.3.5. Isolement de l'ADNmt circulaire

Afin de dégrader l'ADN linéaire et ne garder que l'ADNmt circulaire, 1 µg d'ADN total extrait de 4 patients du groupe contrôle a été traité avec 10 unités d'exonucléase ATP-dépendant (Plasmid-Safe ATP-dependent DNase kit, Epicentre, USA) dans un mix contenant : 1 X de PlasmidSafe Buffer, 1 mM d'ATP, et incubé 12 heures à

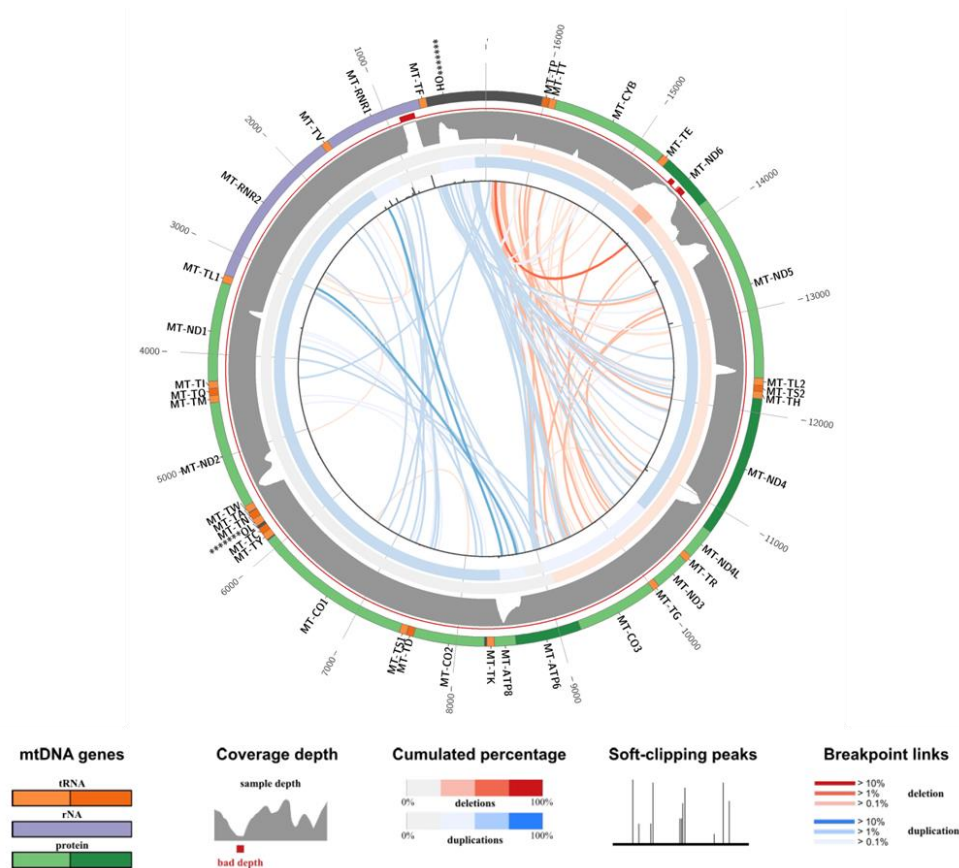


Figure 26 : Représentation d'un échantillon suite à l'analyse d'eKLipse.

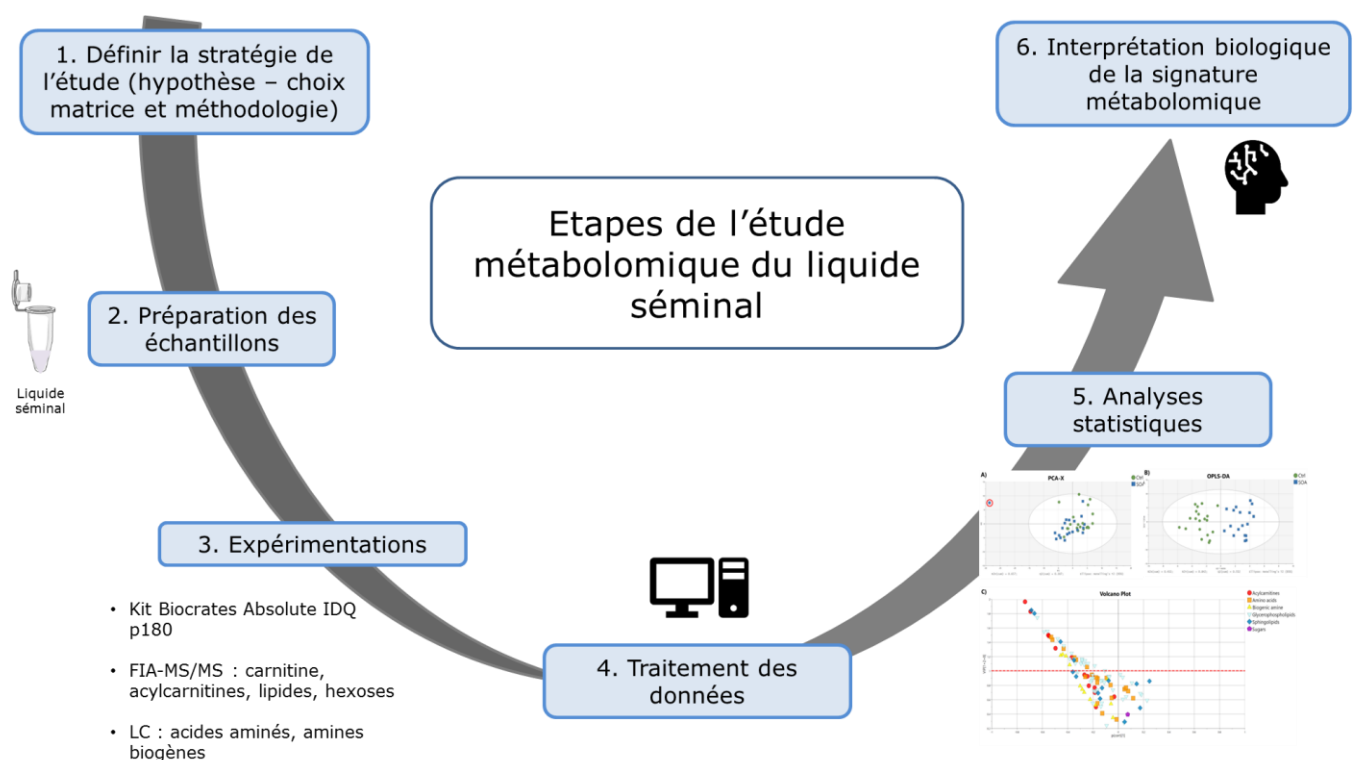


Figure 27 : Etude métabolomique du liquide séminal.



37°C. Ensuite l'ADNmt circulaire a été purifié à l'aide des billes magnétiques Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Les échantillons ont été amplifiés et séquencés comme décrit précédemment.

### 3. Etude métabolomique du liquide séminal

#### 3.1. Stratégie de l'étude

Les études métabolomiques sont possibles sous deux approches différentes : soit une analyse non ciblée, elle représente une approche globale afin d'obtenir une liste de métabolites la plus exhaustive possible de l'échantillon d'intérêt, soit une analyse ciblée, elle permet de détecter et quantifier des métabolites déterminés préalablement. Ensuite suivant l'approche la plus adaptée aux échantillons et à l'hypothèse posée, différentes techniques expérimentales sont choisies pour déterminer les métabolites d'un échantillon. La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse (MS) sont les deux techniques le plus souvent utilisées.

Dans le but d'obtenir des résultats d'une grande sensibilité, il est nécessaire d'établir en amont de l'étude un workflow afin de maîtriser et minimiser les sources de variabilité et d'erreur de chaque étape. Celui-ci définit la problématique, le choix de la matrice, la stratégie de l'étude (nombre d'échantillon, conditions de collecte et de stockage, type d'approche), la préparation des échantillons, l'acquisition et le traitement des données, l'analyse statistique et l'interprétation biologique (Figure 27).

#### 3.2. Kit biocrates

Une approche métabolomique ciblée et quantitative a été réalisée avec le kit Biocrates® Absolute IDQ p180 (Biocrates Life sciences AG). Ce dernier a été utilisé sur un spectromètre de masse, le QTRAP 5500, SCIEX, et a permis de quantifier ou semi-quantifier jusqu'à 188 molécules endogènes différentes : carnitine libre (C0), 39 acylcarnitines (C), la somme des hexoses (H1), 21 acides aminés, 21 amines biogènes et 105 lipides. Dans ce kit, les lipides ont été répartis en quatre classes différentes : 14 lysophosphatidylcholines (lysoPC), 38 diacylphosphatidylcholines (PCaa), 38 acyl-alkyl-phosphatidylcholines (PCae), et 15 sphingomyélines (SM).

Après décongélation, chaque échantillon de liquide séminal a été mélangé par vortex et centrifugé à 4°C pendant 5 minutes à 5000 g. Dix microlitres de chaque échantillon ont ensuite été déposés sur la plaque à 96 puits du kit pour l'extraction en phase solide et traités selon les recommandations du fournisseur. Par la suite, les acides aminés et des amines biogènes ont été dérivés pour la quantification. Les extraits ont finalement été repris dans la phase mobile avant l'analyse FIA et LC-MS/MS. Sept points des calibrateurs ont également été ajoutés à la plaque à 96 puits du kit afin de générer des courbes d'étalonnage pour la quantification des acides



aminés et des amines biogènes avec trois contrôles de qualité (QC) composés d'échantillons de plasma humain à trois niveaux de concentration (faible (QC1), moyen (QC2) et élevé (QC3)).

L'analyse par injection de flux continu couplé au spectromètre de masse en tandem (FIA-MS/MS) a été utilisée pour l'analyse de la carnitine, des acylcarnitines, des lipides et des hexoses. La chromatographie liquide (LC) couplé au spectromètre de masse en tandem, quant à elle, a été utilisée pour l'analyse et la quantification des acides aminés et des amines biogènes.

### 3.3. Analyses des données de métabolomique

Après validation des contrôles de qualité du kit, les données métabolomiques brutes obtenues ont été transformées en log10 et centrées sur la moyenne afin de réduire la contribution des molécules les plus intenses. L'analyse multivariée a été réalisée avec Simca -P + v 16.0.1 (Umetrics). Une analyse en composantes principales (ACP) non supervisée a été utilisée pour étudier la structure de la population de données métabolomiques, et les graphiques T2 et DModX de Hotelling ont été analysés pour détecter les valeurs aberrantes. Une analyse discriminante orthogonale partielle des moindres carrés (OPLS-DA) supervisée a ensuite été réalisée. Plusieurs graphiques ont été considérés pour analyser notre signature : le S-plot (visualisation de l'intensité et de la fiabilité), le graphique des colonnes de chargement avec intervalles de confiance jackknife, le graphique des coefficients et le graphique de l'importance variable en projection (VIP). Seuls les métabolites dont la valeur VIP était supérieure à 1 ont été retenus. Le modèle OPLS-DA a fait l'objet d'une validation croisée en excluant une fraction d'un septième des échantillons et des répliques sept fois. La qualité et les performances des modèles ont été évaluées à l'aide du Q2Y(cum) (qualité de la prédiction), du R2Y(cum) (qualité de l'ajustement), de l'analyse de variance par validation croisée (CVANOVA) et du test de permutation (évaluation du risque de surajustement).

En plus des informations recueillies à partir des métabolites individuels, plusieurs sommes et ratios, ayant une signification métabolique dans un large éventail de troubles appartenant au spectre des maladies métaboliques, ont été calculés à l'aide du module RatioExplorer fourni par Biocrates®. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Systat, version 15.0 (SPSS Inc). Les différences ont été considérées comme significatives à une valeur p-value < 0.05.



# Résultats

## 1. Etude du génome mitochondrial d'hommes oligoasthénospermiques sévères

### 1.1. Le séquençage haut débit couplé à la PCR digitale montre que la réduction du contenu en ADNmt dans les spermatozoïdes les plus fertiles s'accompagne d'une augmentation de la dégradation de l'ADNmt.

Ce travail est présenté sous la forme d'une publication en soumission dans le journal *Human Reproduction*.

**Introduction :** Les mitochondries sont reconnues comme essentielles aux spermatozoïdes, cependant leur rôle physiopathologique exact et leur fonctionnement sont complexes. Il est établi que le spermatozoïde est quasiment dépourvu d'ADNmt. Il existe un consensus sur le fait que le taux d'ADNmt est abaissé dans les spermatozoïdes les plus fertiles, mais la littérature est contradictoire sur le rôle des altérations de l'intégrité de l'ADNmt dans l'infertilité masculine. Le séquençage haut débit permettant une analyse exhaustive des réarrangements et des mutations de l'ADNmt n'a jamais été utilisé dans ce contexte.

**Objectif :** Ce travail avait pour objectif d'étudier le lien entre le nombre de copies d'ADNmt dans les spermatozoïdes, l'intégrité de ce génome et la fertilité masculine.

**Matériels et méthodes :** Il s'agit d'une étude observationnelle portant sur 44 échantillons de sperme obtenus auprès de 44 hommes en cours d'une procédure d'AMP au CHU d'Angers, en France, d'Octobre 2018 à Novembre 2020. Les hommes ont été classés en deux groupes, l'un comprenant 20 patients atteints d'oligoasthénospermie sévère (SOA) et l'autre comprenant 24 patients avec des paramètres spermatiques normaux, qui ont servi de groupe contrôle.

Pour chaque patient, l'ADNmt a été isolé des spermatozoïdes provenant des couches 40 et 90% du gradient de densité. La moyenne du nombre de copies d'ADNmt de chaque échantillon a été évaluée à l'aide d'une PCR digitale. Le séquençage haut débit (NGS) a été réalisé à l'aide du séquenceur Ion Torrent Proton. Le traitement du signal et l'appel des variants ont été effectués par le pipeline de prétraitement intégré, les variants ont été analysés à l'aide d'un pipeline interne et l'outil eKLIPse a été utilisé pour étudier les grands réarrangements de l'ADNmt. La distribution et le type de réarrangements et de variants ont été comparés entre le groupe SOA et le groupe contrôle, d'une part, et entre la couche de gradient 40 et 90, d'autre part.

**Résultats:** Le contenu en ADNmt des spermatozoïdes des patients du groupe SOA était significativement plus élevé que celui des spermatozoïdes des patients du groupe contrôle ( $p$ -value < 0,0001). De même, ce contenu





était plus élevé dans les spermatozoïdes de la couche 40 par rapport à la couche 90, contenant les spermatozoïdes les plus fertiles, tant pour les contrôles ( $p$ -value < 0,0001) que pour les patients SOA ( $p$ -value = 0,002). La fréquence des délétions et duplications de l'ADNmt était significativement plus élevée dans le groupe contrôle ( $p$ -value = 0,002). La plupart des grands réarrangements étaient de classe II et III, c'est-à-dire potentiellement liés à des cassures d'ADN, et leur nombre était réduit par l'élimination de l'ADNmt linéaire des échantillons. Les variants hétéroplasmiques étaient plus fréquemment trouvés dans le groupe SOA ( $p$ -value = 0,05) et dans les couches 40 ( $p$ -value = 0.03), mais sans avoir aucune conséquence fonctionnelle. Ces résultats réfutent l'hypothèse d'un mécanisme compensatoire qui, en cas d'altération de l'ADNmt des spermatozoïdes, augmenterait le nombre total de copies pour compenser un déficit énergétique. Ils suggèrent plutôt que les grands réarrangements de l'ADNmt sont concomitants au processus de réduction du contenu de l'ADNmt dans les spermatozoïdes les plus potentiellement fertiles.

**Discussion :** L'ADNmt des spermatozoïdes est le siège de nombreux réarrangements et paradoxalement les spermatozoïdes les plus potentiellement féconds sont significativement les plus affectés et les moins riches en ADNmt. La dégradation de l'ADNmt dans les spermatozoïdes les plus potentiellement féconds est un résultat nouveau qui va à l'encontre de tout ce qui était généralement admis. Nous pensons que cette découverte est le résultat d'un phénomène physiologique d'élimination active de l'ADNmt paternel dans les spermatozoïdes contribuant à la transmission uniparentale maternelle de l'ADNmt.

**Mots-clés:** Infertilité masculine, ADN mitochondrial, Oligoasthénospermie, Spermatozoïdes, Séquençage haut débit (NGS), PCR digitale





Draft Manuscript For Review. Reviewers should submit their review at  
<http://mc.manuscriptcentral.com/humrep>

**Deep sequencing coupled with digital PCR shows that mitochondrial DNA content reduction in the most fertile spermatozoa is accompanied by increased mtDNA degradation**

|                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Journal:                      | <i>Human Reproduction</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Manuscript ID                 | Draft                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Manuscript Type:              | Original Article                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Date Submitted by the Author: | n/a                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Complete List of Authors:     | <p>Boguenet, Magalie; University of Angers, INSERM U1083, CNRS 6015, MITOVASC, Equipe MitoLab</p> <p>Desquirit, Valérie; University Hospital Centre Angers, Biochimie et biologie moléculaire; University of Angers, INSERM U1083, CNRS 6015, MITOVASC, Equipe MitoLab</p> <p>Goudenege, David; University Hospital Centre Angers, Biochimie et biologie moléculaire; University of Angers, INSERM U1083, CNRS 6015, MITOVASC, Equipe MitoLab</p> <p>Bris, Céline; University Hospital Centre Angers, Biochimie et biologie moléculaire; University of Angers, INSERM U1083, CNRS 6015, MITOVASC, Equipe MitoLab</p> <p>Boucret, Lisa; University Hospital Centre Angers, Biologie de la reproduction</p> <p>Blanchet, Odile; University Hospital Centre Angers</p> <p>Procaccio, Vincent; University Hospital Centre Angers, Biochimie et biologie moléculaire; University of Angers, INSERM U1083, CNRS 6015, MITOVASC, Equipe MitoLab</p> <p>Bouet, Pierre-Emmanuel; University Hospital Centre Angers, Gynécologie et obstétrique</p> <p>Reynier, Pascal; University Hospital Centre Angers, Biochimie et biologie moléculaire; University of Angers, INSERM U1083, CNRS 6015, MITOVASC, Equipe MitoLab</p> <p>May-Panloup, Pascale; University Hospital Centre Angers, Biologie de la reproduction; University of Angers, INSERM U1083, CNRS 6015, MITOVASC, Equipe MitoLab</p> |
| Keywords:                     | MALE INFERTILITY, MITOCHONDRIAL DNA, OLIGOASTHENOSPERMIA, SPERMATOZOA, NEXT-GENERATION SEQUENCING, DIGITAL PCR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

<https://academic.oup.com/humrep>

|                  |             |
|------------------|-------------|
| Subject Section: | Infertility |
|                  |             |

SCHOLARONE™  
Manuscripts

<https://academic.oup.com/humrep>



1 Title page

2 Title: Deep sequencing coupled with digital PCR shows that mitochondrial DNA content  
3 reduction in the most fertile spermatozoa is accompanied by increased mtDNA degradation

4 Running title: Spermatozoa mtDNA deep sequencing

5 Authors: Initials and family name

6 M.Boguenet<sup>1\*</sup>, V.Desquirit-Dumas<sup>1,2</sup>, D.Goudenège<sup>1,2</sup>, C.Bris<sup>1,2</sup>, L.Boucret<sup>3</sup>, O.Blanchet<sup>4</sup>,  
7 V.Procaccio<sup>1,2</sup>, P.E.Bouet<sup>5</sup>, P.Reynier<sup>1,2</sup> and P.May-Panloup<sup>1,3</sup>

8 ORCID : M.Boguenet: 0000-0002-5368-3402; V.Desquirit-Dumas: 0000-0001-9551-9400 ;  
9 D.Goudenège: 0000-0003-0738-2905; C.Bris: 0000-0003-2425-4446; L.Boucret: 0000-0003-  
10 1434-7235; O.Blanchet: 0000-0002-8275-8741; V.Procaccio: 0000-0002-1537-4684; P.E.Bouet :  
11 0000-0003-4568-1746; P.Reynier: 0000-0003-0802-4608 and P.May-Panloup: 0000-0001-7609-  
12 7265.

13 <sup>1</sup> Univ Angers, INSERM, CNRS, MITOVASC, Equipe MitoLab, SFR ICAT, F-49000 Angers,  
14 France

15 <sup>2</sup> Service de Biochimie et biologie moléculaire, Centre Hospitalier Universitaire, F-49000  
16 Angers, France

17 <sup>3</sup> Biologie de la reproduction, Centre Hospitalier Universitaire, F-49000 Angers, France

18 <sup>4</sup> CRB, BB-0033-00038, Centre Hospitalier Universitaire, F-49000 Angers, France

19 <sup>5</sup> Département d'obstétrique et de gynécologie, Centre Hospitalier Universitaire, F-49000 Angers,  
20 France

<https://academic.oup.com/humrep>

\* Correspondence address. E-mail: magalie.boguenet@univ-angers.fr

## Abstract

**Study question:** What is the link between mitochondrial DNA (mtDNA) copy number in spermatozoa, the integrity of this genome, and male fertility?

**Summary answer:** Sperm mtDNA is the site of numerous rearrangements affecting paradoxically more normal spermatozoa that also contain a reduced mtDNA copy number.

**What is known already:** There is a consensus that mtDNA content is decreased in the most fertile spermatozoa, in contrast, the literature is controversial regarding the role of qualitative alterations of this mtDNA in male infertility. High-throughput sequencing allowing an exhaustive analysis of mtDNA rearrangements and mutations has never been used in this context.

**Study design, size, duration:** This is an observational study of 44 semen samples obtained from 44 men undergoing assisted reproductive technology (ART) procedures at Angers University Hospital, France, from October 2018 to November 2020. The men were classified in two groups, one including 20 patients with severe oligoasthenospermia (SOA group) and the other including 24 patients with normal semen parameters (control group).

**Participants/materials, setting, methods:** For each patient, mtDNA was isolated from sperm fractions from the 40% and 90% layers of the density gradient. The average mtDNA content of each sample was assessed using digital PCR. Deep sequencing was performed using the Ion Torrent Proton for Next-Generation Sequencing. Signal processing and base calling were done via the embedded pre-processing pipeline, the variants were analysed using an in-house workflow

<https://academic.oup.com/humrep>

and the eKLIPse tool was used to study large mtDNA rearrangements. The distribution and the type of rearrangements and variants were compared between SOA and control patients on one hand, and between the 40% and 90% gradient layers, on the other hand.

**Main results and the role of chance:** The mtDNA content of spermatozoa from SOA patients was significantly higher than that of spermatozoa from control patients (p-value < 0.0001). Similarly, this content was higher in spermatozoa from the 40% layer compared to the 90% layer, containing the most fertile spermatozoa for both control (p-value < 0.0001) and SOA (p-value = 0.002) groups. The frequency of large mtDNA deletions and duplications was significantly higher in the control group (p-value = 0.002). Most of these rearrangements are potentially related to DNA breaks and their number was reduced by removal of the linear mtDNA from the samples. Heteroplasmic variants were found more frequently in the SOA group (p-value = 0.05) and in the 40% layer (p-value = 0.03), but they have no functional consequences. These results contradict the notion that sperm mtDNA alteration may be responsible for mitochondrial dysfunction and associated with some male infertility. They also refute the hypothesis of a compensatory mechanism that, in the case of sperm mtDNA alteration, would increase the total copy number to compensate for an energy deficit. Instead, they suggest that mtDNA rearrangements are concomitant with the process of reduction of mtDNA content in the most potentially fertile spermatozoa.

**Limitations, reasons for caution:** The study was conducted with a relatively small number of patients and samples, but despite this, the significance of the results is unambiguous.

**Wider implications of the findings:** The high instability of mtDNA in the most fertile spermatozoa is a novel result that contradicts everything that was generally accepted. We suggest

that this finding is related to a physiological phenomenon of active elimination of the paternal mtDNA in the spermatozoa, contributing to the maternal uniparental transmission of mtDNA.

#### **Study funding/competing interest(s):**

This work was supported by Angers University Hospital (grant AOI CHU Angers 2018), Angers University, and the French national research centers INSERM and CNRS. There are no competing interests.

#### **Trial registration number:** NA

Key words: male infertility / mitochondrial DNA / oligoasthenospermia / spermatozoa / Next-Generation Sequencing / digital PCR

## **Introduction**

Mitochondria, often referred as cell powerhouses, have for particular feature to possess their own genome. The mtDNA is a circular double-stranded molecule that contains 16 569 base pairs in humans, without introns. It encodes 13 proteins of the respiratory chain, as well as 2 ribosomal RNAs and 22 transfer RNAs used for the translation of mitochondrial mRNAs (Anderson *et al.*, 1981).

The oocyte is the richest cell of the body in mtDNA (approximately 200 000 copies/oocyte) (Otten and Smeets, 2015). This oocyte mtDNA content is associated with oocyte quality and seems essential for the initiation of embryonic development (May-Panloup *et al.*, 2007). Conversely, the spermatozoa are nearly devoid of mtDNA (approximately 10-100 copies/spermatozoon) (May-Panloup *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2016; Faja *et al.*, 2019). Thus,

<https://academic.oup.com/humrep>



gametes have diametrically opposite mtDNA content. This is the result of an overall amplification of the mitochondrial mass during oogenesis and a drastic reduction of this pool during spermatogenesis (Rantanen *et al.*, 2001; DeLuca and O'Farrell, 2012; Otten and Smeets, 2015). This numerical disproportion is one of the features leading to uniparental maternal transmission of mtDNA (Carelli, 2015).

Overall, if the role of paternal mitochondria becomes obsolete after fertilisation, their importance in spermatic function remains complex and poorly evaluated. Spermatozoa would be likely to use different substrates and metabolic pathways (glycolysis or oxidative phosphorylation) to provide the ATP required for their motility in an adaptive way depending on their environment, but also on the species considered (du Plessis *et al.*, 2015). Furthermore, mitochondrial ATP production by spermatozoa is thought to be crucial for their capacitation, acrosomal reaction and fertilising capacity (Vertika *et al.*, 2020).

Sperm mitochondria are located in the midpiece where they wrap around the axoneme in a helix forming the mitochondrial sheath (Fawcett, 1970; Gu *et al.*, 2019). Their involvement in male infertility has been highlighted by various studies. Altered structure of the mitochondrial sheath or defective respiratory chain have been associated with various alterations in sperm quality, as well as decreased sperm fertilising capacity (Gopalkrishnan *et al.*, 1995; Mundy *et al.*, 1995; Ruiz-Pesini *et al.*, 1998; Pelliccione *et al.*, 2011).

Sperm mtDNA quantity and quality have also been studied as potential factors related to male infertility. Paradoxically, it has been shown that higher quality spermatozoa have the lowest mtDNA content compared to those of oligoasthenospermic patients or those present in the lowest fertilising sperm fractions (for review see Boguenet *et al.*, 2021).



While studies about the link between increased spermatozoa mtDNA quantity and altered sperm parameters (except Kao *et al.*, 2004) or fertilising capacity of spermatozoa (Wu *et al.*, 2019b) are mostly unanimous in human research, those that focus on mtDNA quality are much less consensual. For example, several authors find an increased prevalence of mtDNA deletions in abnormal sperm (for review see Boguenet *et al.*, 2021) while others do not (Cummins *et al.*, 1998; Reynier *et al.*, 1998; St John *et al.*, 2001). In the same manner, studies about mtDNA point mutations are particularly heterogeneous regarding sequences studied, variants found and their involvement in male infertility (for review see Boguenet *et al.*, 2021).

Interestingly, a recent study shows that the increase in sperm mtDNA content could result from a compensatory phenomenon when mtDNA is mutated (Jiang *et al.*, 2017). We aimed to explore this hypothesis by analysing simultaneously the amount of mtDNA in spermatozoa and the integrity of this genome. Our objective was to quantify and analyse the sequence of sperm mtDNA in the same cohort of patients by using, for the first time to our knowledge, high-throughput sequencing and digital PCR. To this aim, we studied spermatozoa from 20 patients with severe oligoasthenospermia, compared to 24 patients with normal sperm parameters.

## Materials and methods

### Study population

We performed a prospective observational study in the laboratory of reproductive biology at the Angers University Hospital, between October 2018 and November 2020. In the severe oligoasthenospermia group, we included men with a total motile sperm count (TMSC)  $< 5.10^6$  undergoing *in vitro* fertilisation (IVF) with intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for severe

male factor infertility. The TMSC was calculated by multiplying the volume of the ejaculate by the sperm concentration and the percentage of progressive motile spermatozoa, divided by 100. In the control group, we included men with normal semen parameters according to the WHO criteria (World Health Organization, 2010) and with a TMSC  $> 5.10^6$  (Hamilton *et al.*, 2015), undergoing intrauterine insemination (IUI) or conventional IVF.

Patients were included if, at the end of the preparation of semen for ART, at least one millilitre of semen had not been used and could be dedicated to the study. We excluded patients who refused to sign the informed consent, patients who did not fit in any of the two study groups, and patients with associated comorbidities.

#### Ethical approval

All participants signed the informed consent prior to inclusion, and the collection of semen samples was approved by the Committee for the Protection of Individuals of Angers University Hospital, France (Number DC-2014-2224 and AC-2016-2799).

#### Sample preparation

Semen samples were collected on the day of the ART procedure (IUI or IVF/ICSI) by masturbation in the andrology laboratory, following an abstinence period between 3 and 5 days. A small fraction of the sample was taken for the assessment of the sperm parameters (count, motility, etc.), while another was used for the patient's treatment. One millilitre of the remaining semen was used for our study. The samples were centrifuged on a density gradient (Puresperm (Nidacon, Gothenburg, Sweden), FertiCult IVF Medium (FertiPro, Beernem, Belgium) of two phases (40% and 90%) at 300 g for 20 minutes. The two fractions were separated and washed in 2.5 mL of FertiCult IVF Medium (FertiPro, Beernem, Belgium) by centrifugation at 600 g for 10

minutes. Two hundred and fifty microlitres of FertiCult IVF medium (FertiPro, Beernem, Belgium) was added on the sperm pellet for 2 hours at room temperature to permit the spermatozoa to swim up. The supernatant was collected and stored at -80°C until DNA extraction.

#### Extraction of DNA

Total sperm DNA was extracted with the NucleoSpin® Tissue kit (Macherey-Nagel®, Hoerd, France) according to the manufacturer's recommendations. The only difference in procedure was the addition of dithiothreitol (1 M) in lysis buffer in order to break the disulphide bridges of the mitochondrial capsule (Sutovsky *et al.*, 1997; Ursini *et al.*, 1999). Elution of the total DNA was carried out in 60 µL of elution buffer solution preheated at 70°C. Total DNA was quantified on the Qubit® 2.0 Fluorometer using the Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

#### Quantification of mtDNA copy numbers by digital PCR

The mtDNA copy number per cell was quantified by digital PCR (QuantStudio 3D digital, Applied Biosystems) on the extracted total DNA. *MT-ND1* gene was used to quantify mtDNA copy number and *BAX* gene to quantify nuclear DNA copy number as the marker of cell number (Supplementary Table SI). *MT-ND1* gene primers were tested on DNA from cells lacking mtDNA (Rho0 cells) to check the absence of pseudogene amplification. The ratio of the copy number of these two genes provides the number of mtDNA copies per spermatozoon. Each sample, as well as a positive (purified PCR products from human fibroblast DNA) and a negative (H<sub>2</sub>O) control, were run in duplicate. The final dPCR reaction was distributed as follows: 1X QuantStudio 3D digital PCR Mastermix v2 (Applied Biosystems), 10.6 nM primers, 2.3 nM



probe, DNA (2  $\mu$ L *MT-ND1*; 6.75  $\mu$ L *BAX*). Each sample was loaded in a QuantStudio™ 3D Digital PCR Chip v2 using a QuantStudio™ 3D Digital PCR Chip Loader (Applied Biosystems). The chips were placed in a ProFlex™ 2x Flat PCR System (Applied Biosystems) and the above program was run: 10 minutes at 96°C then 39 cycles (2 minutes at 60°C; 30 seconds at 98°C; 2 minutes at 60°C) and hold at 25°C. The chips fluorescence were read with the QuantStudio™ 3D Digital PCR Apparatus (Applied Biosystems) and then analysed using Thermofisher QuantStudio3D software (v.3.1.6-PRC-build18).

## Next-Generation Sequencing

### *mtDNA amplification*

The mitochondrial genome was amplified in two large fragments of 8397 bp and 8289 bp. Primers were located in the *MT-RNR1* and *MT-ATP6* genes (Supplementary Table SII) and were tested on Rho0 cells to avoid amplification of pseudogenes. The long PCRs were performed with LA Taq polymerase (Takara Bio Europe SAS, Saint-Germain-en-Laye, France) according to the manufacturer's recommendations with 1X Buffer, 0.4 mM dNTP, 0.4 mM primers, 2.5 units Taq and 5  $\mu$ L DNA. An amplification program was performed as follows: 1 minute at 94°C followed by 35 cycles (10 seconds at 98°C; 15 minutes at 68°C; 3 minutes at 72°C) and 10 minutes at 72°C. PCR products were visualised on agarose gel (1%) by electrophoresis before being purified by magnetic beads separation and quantified on the Qubit® 2.0 Fluorometer using the Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

### *Library construction*

For each sample, 150 ng of the two amplified mtDNA fragments were pooled. Libraries were obtained with the Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham,

MA, USA), following the manufacturer's instructions. Briefly, mtDNA was fragmented by enzymatic fragmentation, and the Ion Xpress™ P1 and A Adapters and Ion Xpress™ Barcode were ligated to each mtDNA fragment extremities. The fragments of 200 bp were size selected by electrophoresis in the E-gel Sizeselect system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The final library was amplified with Platinum® PCR SuperMix High Fidelity (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). All purifications were performed with Agencourt® AMPure® XP reagent beads (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

#### *Emulsion PCR and Sequencing*

One hundred picomolar of each barcoded library were pooled and placed in the Ion Chef device (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), for emulsion PCR and chip loading. Then the samples were sequenced on a 540 chip using an Ion Torrent S5-XL high throughput sequencing platform (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A positive control (DNA from human fibroblasts) and a negative non-target template sample were also loaded on each chip.

#### *Data analysis*

Signal processing and base calling were done by the pre-processing embedded pipeline (Torrent Suite v.5.10.1). Demultiplexed reads were mapped on an mtDNA reference sequence (NC\_012920.1) before being analysed with a dedicated homemade pipeline for variants calling, as previously described (Boucret *et al.*, 2017). The variants filtering step was based on various criteria. First, we only considered high confidence variants, those called by at least 4 of the 6 callers used. To filter out recurrent sequencing artifacts, we have used our own mtDNA variant database including more than 5 000 samples and we only kept variants found in less than 20% of



our runs. Haplogroup and synonymous variants was also filtered. Finally, all variants annotated as polymorphism in the MITOMAP database were excluded.

Large mtDNA rearrangements were predicted with the dedicated eKLIPse tool, which is based on soft-clipping (Goudenège *et al.*, 2019). To avoid primer breakpoint artifacts, corresponding primer region was excluded (range 725-870; 8898-8918 and 9140-9158). We kept recommended default Ion Torrent parameters but reads downsampling was disabled.

#### Isolation of circular mtDNA

One microgram of genomic DNA extract from spermatozoa of 4 patients from the control group was treated with 10 units of the ATP-dependent exonuclease (Plasmid-Safe ATP-dependent DNase kit, Epicentre, USA) in a reaction mix containing 1X PlasmidSafe Buffer, 1 mM ATP, and incubated for 12 hours at 37°C to degrade the linear DNA and to leave only the circular mtDNA. The remaining circular DNA was purified using Agencourt® AMPure® XP reagent beads (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). The samples were then amplified, prepared and sequenced as described above.

#### Statistical analysis

The non-parametric Mann-Whitney test or the parametric t-test was used for quantitative variables and the chi-squared ( $\chi^2$ ) test for qualitative variables with GraphPad Prism, v.8.0. All the statistical tests were considered significant at p-value < 0.05.

### **Results**

#### Patients

We included 44 patients: 20 patients in the oligoasthenospermia (SOA) group and 24 patients in the control group. The characteristics of the patients were presented in Table I. There were no significant differences between the 2 groups regarding age, BMI, smoking habits and duration of abstinence. Unsurprisingly sperm parameters chosen to define our 2 groups were indeed different (sperm concentration, progressive motility and TMSC).

#### mtDNA copy numbers

The average mtDNA copy number per spermatozoon in each of the 2 groups and according to the gradient layer considered (40% and 90%) was reported in Table II. The mtDNA content per spermatozoon was significantly higher in the SOA group compared to the control group (p-value < 0.0001) (Fig. 1A). We also found a significant increase in mtDNA content in layer 40 compared to layer 90 in the control group (p-value < 0.0001) and SOA group (p-value = 0.02). Similarly, a difference of mtDNA content in layer 40, on the one hand, and layer 90, on the other hand, was found between the SOA group and the control group (p-value < 0.0001 in both cases) (Fig. 1B).

#### mtDNA rearrangements

##### 1. Number of large rearrangements

In total, 1 321 large rearrangements were found in the 88 spermatozoa samples studied. According to the work of Basu *et al.*, 468 of these rearrangements could be considered as deletions and 853 as complementary arc duplications showing a deletion that takes away one of the 2 replication origins (Basu *et al.*, 2020). All these rearrangements were different from each other except for a few ones (5/1321) and were not listed in the Mitobreak database which lists all major rearrangements described in humans and other species

258 ([http://mitobreak.portugene.com/cgi-bin/Mitobreak\\_home.cgi](http://mitobreak.portugene.com/cgi-bin/Mitobreak_home.cgi)). Seventy-six percent of these large  
259 rearrangements were found in the control group versus 24% in the SOA group (p-value <  
260 0.0001).

261 The so-called common deletion of 4977 bp, as well as other deletions described in the literature  
262 as possibly existing in spermatozoa (for review see Boguenet *et al.*, 2021) were not found in our  
263 analysis.

## 264 2. Types of large rearrangements

265 There are different types of large rearrangements divided into 3 classes. Some are formed in a  
266 part of the genome flanked by short perfect direct repeats greater than 5 nucleotides (class I),  
267 others are flanked by imperfect repeats (class II) and others have no repeats (class III).

268 The majority of the large rearrangements found in our cohort belonged to class II and III and thus  
269 would not involve perfect repeat areas (Supplementary Table SIII).

## 270 3. Cumulative frequency of large rearrangements

271 The cumulative frequency of large rearrangements was significantly higher in the control group  
272 than in the SOA group (layer 40 + 90) (p-value = 0.002) (Fig. 2A). The cumulative frequency of  
273 large rearrangements was significantly higher in layer 90 of the control group than in layer 40 of  
274 this group (p-value = 0.007) and in layer 90 of the SOA group (p-value = 0.0001) (Fig. 2B).  
275 There was no difference within the SOA group between layers 40 and 90. The large  
276 rearrangements in each sample were illustrated as deletion or duplication (eKLIPse) impacting  
277 the mtDNA shown as circos (Fig. 3). The set of deletions and duplications for each of the groups

considered was collected on a single circo. The individual circo. of each sample are available in Supplementary Fig. S1.

#### 4. Isolation of circular mtDNA

After degradation of linear DNA, allowing to focus only on circular mtDNA, in four control group samples, sequencing showed a net decrease in the number of large rearrangements (Fig. 4).

#### mtDNA variants

During evolution, non-pathogenic variations in the nucleotide sequence of mtDNA have become fixed defining groups of populations, called mitochondrial haplogroups (Wallace, 2018). We did not find any significant difference in mitochondrial haplogroup representation in the 2 patient groups (p-value = 0.46) (Supplementary Table SIV).

After application of different filters, variant analysis found 23 heteroplasmic variants in our cohort. One patient in the control group (1/24) and 5 patients in the SOA group (5/20) were affected by the presence of variants. The average number of variants found in the SOA group (1.1 variants/patient) was higher than in the control group (0.04 variants/patient) (p-value = 0.05). The variants were found significantly more often in layer 40 (18/23 or 78.3%) than in layer 90 (2/23 or 13%), while 2 variants were found in both layers 40 and 90 in 2 patients (2/23 or 8.7%) (p-value = 0.03).

The 23 variants were different from each other, none of them was found in several patients and therefore none of them could be used to characterise one of the 2 groups. The majority of the variants was not known from the Mitomap database or did not show obvious pathogenicity. None



298 of the proven pathogenic variants identified in the literature were found in our analysis  
299 (Supplementary Table SV).

## 300 Discussion

301 This study evaluated simultaneously the quantity and the quality of sperm mtDNA in patients  
302 with and without impaired semen parameters, using new generation techniques never used in this  
303 context until now.

304 Digital PCR allows absolute quantification of mtDNA copy number in an accurate, sensitive and  
305 reproducible manner (Laig *et al.*, 2020). Using this approach, we confirmed that mtDNA copy  
306 number was very low in spermatozoa from controls and was significantly increased in  
307 spermatozoa from patients with SOA. In addition, spermatozoa selected from layer 90 of the  
308 density gradient, which were potentially the most fertile (Yao *et al.*, 1996), contain significantly  
309 less mtDNA than those from layer 40, where the least fertile spermatozoa were concentrated.  
310 Thus, spermatozoa from layer 90 of control patients have less than one copy on average, which  
311 implies that some spermatozoa are completely devoid of mtDNA (Fig. 1). The counter-intuitive  
312 fact that spermatozoa need functional mitochondria but contain a very low number of mtDNA  
313 could be explained by an increased stability of mtDNA transcripts with a continued translation in  
314 spermatozoa (Hecht *et al.*, 1984). Our results are in agreement with the literature (Díez-Sánchez  
315 *et al.*, 2003; May-Panloup *et al.*, 2003; Kao *et al.*, 2004; Amaral *et al.*, 2007; Song and Lewis,  
316 2008; Gabriel *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2014; Bonanno *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016; Faja *et al.*,  
317 2019; Wu *et al.*, 2019b, 2019a) and the low mtDNA copy number of higher quality spermatozoa  
318 is to put in perspective the lack of paternal mtDNA transmission to offspring. This inverse



relationship between sperm quality and male gamete mtDNA copy number has led some authors to propose the quantification of sperm mtDNA as a marker of male fertility (Rosati *et al.*, 2020).

High-throughput sequencing technologies and their recent improvement in sensitivity and sequencing depth have allowed us, for the first time, to study the sperm mtDNA sequence in an exhaustive manner.

In addition, the eKLIPse algorithm developed by our team (Goudenège *et al.*, 2019), based on NGS soft-clipping, allowed us to detect and quantify large rearrangements present in sperm mtDNA. These large rearrangements correspond to mtDNA deletions that are considered by deduction as duplications if they carry one or both origins of replication (Basu *et al.*, 2020).

Very unexpectedly, we showed a higher frequency of these large rearrangements in the spermatozoa of control patients compared to those of SOA patients (Fig. 2). In the control group, these rearrangements were also significantly more frequent on the spermatozoa of layer 90 (the most fertile) than on those of layer 40.

Thus, it appears that in higher quality spermatozoa, there is not only a drastic reduction in copy number but also an increase in the number of large mtDNA rearrangements. The mechanisms of mtDNA deletion formation are complex and not yet fully understood (Falkenberg and Gustafsson, 2020). Current hypotheses are replication errors or double-strand breaks in mtDNA (Krishnan *et al.*, 2008; Nissanka *et al.*, 2019) that result in different types of deletions. Replication errors in mtDNA would result in class I and II deletions, and double-strand breaks would cause class II and III deletions (Chen *et al.*, 2011). So-called class I deletions are formed in a portion of the genome flanked by short direct perfect repeat sequences and account for

approximately 68% of deletions. So-called class II deletions (12%) are deletions flanked by imperfect repeats and class III deletions (20%) have no repeats (Damas *et al.*, 2014).

Among the large rearrangements identified in our study, we found very few class I deletions. In particular, we did not find the common deletion of 4977 bp, which has a direct repeated sequence of 13 nucleotides, nor the deletions of 4856 bp, 7436 bp and 7599 bp. However, these deletions have been most specifically studied in spermatozoa and have sometimes been linked to male infertility (Kao *et al.*, 1995, 1998; Ieremiadou and Rodakis, 2009; Abasalt *et al.*, 2013; Hosseinzadeh Colagar and Karimi, 2014; Ambulkar *et al.*, 2016; Bahrehmand Namaghi and Vaziri, 2017; Talebi *et al.*, 2018; Gholinezhad *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2019b; Al Zoubi *et al.*, 2020) although these findings are controversial (Cummins *et al.*, 1998; Reynier *et al.*, 1998; St John *et al.*, 2001). Without specifying their type, multiple mtDNA deletions have also been found in spermatozoa from fertile and infertile men (Reynier *et al.*, 1998; O'Connell *et al.*, 2002a, 2002b), with some authors linking their presence to impaired sperm quality (Kao *et al.*, 1995, 1998; Ieremiadou and Rodakis, 2009; Abasalt *et al.*, 2013; Hosseinzadeh Colagar and Karimi, 2014; Ambulkar *et al.*, 2016; Bahrehmand Namaghi and Vaziri, 2017; Talebi *et al.*, 2018; Gholinezhad *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2019b; Al Zoubi *et al.*, 2020). This discrepancy between the data in the literature concerning the link between the existence of mtDNA deletions in spermatozoa, their type, and male fertility is possibly due to the fact that these studies were carried out on different groups of patients (different types of sperm alteration), in a mostly targeted manner (only a few deletions studied), by older and less efficient techniques (targeted PCR and Sanger sequencing) and often without taking into account the possibility of bias linked to the existence of numerous mtDNA pseudogenes present in the nucleus.

In our study, we found mainly class II and III deletions. Their formation is likely to result from double-strand breaks of the mtDNA molecule. This finding, associated with the fact that these large rearrangements are heterogeneous and random, suggests that they would rather originate from a process of mtDNA degradation. Moreover, by eliminating linear mtDNA (that correspond to the degradation products of native circular mtDNA), we showed a decrease in the number of large rearrangements. This degradation phenomenon could be a specific process of normal spermatogenesis, leading to linearization and subsequent elimination of sperm mtDNA. Different mechanisms are known to contribute to the lack of transmission of paternal mtDNA: the depletion of sperm mtDNA during spermatogenesis (downregulation of TFAM protein levels (Rantanen *et al.*, 2001) and removal of a large part of the cytoplasm containing the mitochondria in the form of residual bodies), and the destruction of mitochondria after fertilisation (Sutovsky *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2016). As previously suggested in other species, mtDNA in normal spermatozoa must be degraded before fertilisation (Darr *et al.*, 2017). In some invertebrates, paternal mtDNA cleavage by an endonuclease G has been described during spermatogenesis (DeLuca and O'Farrell, 2012) or after fertilisation (Zhou *et al.*, 2016).

Thus, the formation of competent spermatozoa would require the elimination of paternal mtDNA by an active degradation process. The spermatozoa of control patients, and especially those from layer 90, carry the least and the most degraded mtDNA. In SOA patients, between layers 40 and 90, there is a less marked decrease in mtDNA copy number than in the control group and this is not associated with an increase in the large rearrangements frequency. In these patients, the mtDNA elimination mechanism could be defective and affect most of the spermatozoa.

We showed the presence of variants in spermatozoa samples with an overrepresentation in the SOA group on the one hand, and in layer 40 on the other hand. However, no variant allowing



discrimination between the different groups has obvious functional consequence or has been previously found associated with male infertility (Holyoake *et al.*, 2001; Thangaraj *et al.*, 2003; Selvi Rani *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2009; Baklouti-Gargouri *et al.*, 2013, 2014b, 2014a; Mao *et al.*, 2015; Ni *et al.*, 2017; Abd Elrahman *et al.*, 2021; Al Smadi *et al.*, 2021; Dahadhah *et al.*, 2021a, 2021b). This increase in the number of variants in the poorest spermatozoa could be simply related to a high mtDNA copy number resulting from an insufficient mtDNA degradation in a cell which, unlike the oocyte, does not have a mechanism for purifying its mtDNA, making it homoplasmic (bottleneck) (Hauswirth and Laipis, 1985).

In conclusion, our study does not justify retaining the hypothesis of a compensatory mechanism that, in the case of mtDNA alteration, would increase the total number of copies to compensate for an energy deficit. Indeed, we found a more degraded mtDNA in normal spermatozoa, but a low copy number. In the same manner, in abnormal spermatozoa, the variants are overrepresented but none of them have a functional consequence that could lead to the mtDNA increase observed in these cells.

However, our results suggest that spermatozoa are the site of an active process of degradation of mtDNA generating breaks, rearrangements and leading to its elimination. The fact that abnormal spermatozoa are less affected by this process seems at first sight rather counter-intuitive but could reflect an alteration of the physiological process of mtDNA elimination in spermatozoa.

Author's roles

406 M.B., P.R. and P.M.P., the principal investigators, take primary responsibility for the article.  
407 M.B., V.P., P.R. and P.M.P. contributed to the conception, design and coordination of the  
408 research. P.E.B. recruited the patients. M.B., V.D., D.G., C.B., L.B., O.B. contributed to the  
409 collection and analysis of data. M.B., V.D., D.G., C.B., P.R. and P.M.P. contributed to writing  
410 the article. M.B., V.D., D.G., C.B., L.B., P.R. and P.M.P. contributed to the revision of the article  
411 and the final version was approved by all the authors.

412

#### 413 Acknowledgments

414 We thank all the staff of the IVF laboratory for their help in collecting the samples

415

#### 416 Funding

417 This work was supported by Angers University Hospital (grant AOI CHU Angers 2018), the  
418 University of Angers, France, and the French national research centres, INSERM and the CNRS.

419

#### 420 Conflict of interest

421 The authors have no conflict of interest to disclose.

422

#### 423 References

<https://academic.oup.com/humrep>



- 424 Abasalt HC, Gholamali JS, Maryam GC, Infertility F. Lipid peroxidation and large-scale deletions of  
425 mitochondrial DNA in asthenoteratozoospermic patients. *Indian J Biochem Biophys* 2013;**50**:8.
- 426 Abd Elrahman MM, El makawy AI, Hassanane MS, Alam SS, Hassan NHA, Amer MK. Assessment of  
427 correlation between asthenozoospermia and mitochondrial DNA mutations in Egyptian infertile  
428 men. *J Genet Eng Biotechnol* 2021;**19**:11.
- 429 Al Smadi MA, Hammadeh ME, Solomayer E, Batiha O, Altalib MM, Jahmani MY, Shboul MA, Nusair  
430 B, Amor H. Impact of Mitochondrial Genetic Variants in ND1, ND2, ND5, and ND6 Genes on  
431 Sperm Motility and Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) Outcomes. *Reprod Sci* [Internet]  
432 2021; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s43032-020-00449-3>.
- 433 Al Zoubi MS, Al-Batayneh K, Alsmadi M, Rashed M, Al-Trad B, Al Khateeb W, Aljabali A, Otoum O,  
434 Al-Talib M, Batiha O. 4,977-bp human mitochondrial DNA deletion is associated with  
435 asthenozoospermic infertility in Jordan. *Andrologia* 2020;**52**:e13379.
- 436 Amaral A, Ramalho-Santos J, St John JC. The expression of polymerase gamma and mitochondrial  
437 transcription factor A and the regulation of mitochondrial DNA content in mature human sperm.  
438 *Human Reproduction* 2007;**22**:1585–1596.
- 439 Ambulkar P, Chuadhari A, Pal A. Association of large scale 4977-bp “common” deletions in sperm  
440 mitochondrial DNA with asthenozoospermia and oligoasthenoteratozoospermia. *J Hum Reprod*  
441 *Sci* 2016;**9**:35.
- 442 Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, Bruijn MHL de, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP,  
443 Roe BA, Sanger F, *et al*. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*  
444 1981;**290**:457–465.
- 445 Bahrehmand Namaghi I, Vaziri H. Sperm mitochondrial DNA deletion in Iranian infertiles with  
446 asthenozoospermia. *Andrologia* 2017;**49**:e12627.
- 447 Baklouti-Gargouri S, Ghorbel M, Ben Mahmoud A, Mkaouar-Rebai E, Chakroun N, Sellami A, Fakhfakh  
448 F, Ammar-Keskes L. Two novel mutations in COII and tRNAHis mitochondrial genes in

- 449 asthenozoospermic infertile men. *Biochemical and Biophysical Research Communications*  
 450 2014a;**450**:610–615.
- 451 Baklouti-Gargouri S, Ghorbel M, Ben Mahmoud A, Mkaouar-Rebai E, Cherif M, Chakroun N, Sellami A,  
 452 Fakhfakh F, Ammar-Keskes L. A novel m.6307A>G mutation in the mitochondrial *COXI* gene in  
 453 asthenozoospermic infertile men in asthenozoospermic infertile men. *Mol Reprod Dev*  
 454 2013;**80**:581–587.
- 455 Baklouti-Gargouri S, Ghorbel M, Ben Mahmoud A, Mkaouar-Rebai E, Cherif M, Chakroun N, Sellami A,  
 456 Fakhfakh F, Ammar-Keskes L. Identification of a novel m.9588G > A missense mutation in the  
 457 mitochondrial *COIII* gene in asthenozoospermic Tunisian infertile men. *J Assist Reprod Genet*  
 458 2014b;**31**:595–600.
- 459 Basu S, Xie X, Uhler JP, Hedberg-Oldfors C, Milenkovic D, Baris OR, Kimoloi S, Matic S, Stewart JB,  
 460 Larsson N-G, *et al.* Accurate mapping of mitochondrial DNA deletions and duplications using  
 461 deep sequencing. *PLoS Genet* 2020;**16**:e1009242.
- 462 Boguenet M, Bouet P-E, Spiers A, Reynier P, May-Panloup P. Mitochondria: their role in spermatozoa  
 463 and in male infertility. *Human Reproduction Update* 2021;dmab001.
- 464 Bonanno O, Romeo G, Asero P, Pezzino FM, Castiglione R, Burrello N, Sidoti G, Frajese GV, Vicari E,  
 465 D'Agata R. Sperm of patients with severe asthenozoospermia show biochemical, molecular and  
 466 genomic alterations. *Reproduction* 2016;**152**:695–704.
- 467 Boucret L, Bris C, Seegers V, Goudenège D, Desquirit-Dumas V, Domin-Bernhard M, Ferré-L'Hotellier  
 468 V, Bouet PE, Descamps P, Reynier P, *et al.* Deep sequencing shows that oocytes are not prone to  
 469 accumulate mtDNA heteroplasmic mutations during ovarian ageing. *Human Reproduction*  
 470 2017;**32**:2101–2109.
- 471 Carelli V. Keeping in Shape the Dogma of Mitochondrial DNA Maternal Inheritance. In Larsson N-G,  
 472 editor. *PLoS Genet* 2015;**11**:e1005179.
- 473 Chen T, He J, Huang Y, Zhao W. The generation of mitochondrial DNA large-scale deletions in human  
 474 cells. *J Hum Genet* 2011;**56**:689–694.

- 475 Cummins, Jequier, Martin, Mehmet, Goldblatt. Semen levels of mitochondrial DNA deletions in men  
476 attending an infertility clinic do not correlate with phenotype: mtDNA deletions in semen.  
477 *International Journal of Andrology* 1998;**21**:47–52.
- 478 Dahadhah FW, Jaweesh MS, Al Zoubi MS, Alarjah MIA, Hammadeh ME, Amor H. Mitochondrial  
479 nicotinamide adenine dinucleotide hydride dehydrogenase (NADH) subunit 4 (MTND4)  
480 polymorphisms and their association with male infertility. *J Assist Reprod Genet* 2021a;.
- 481 Dahadhah FW, Saleh Jaweesh M, Al Zoubi MS, Issam Abu Alarjah M, Hammadeh ME, Amor H. Lack of  
482 association between single polymorphic variants of the mitochondrial nicotinamide adenine  
483 dinucleotide dehydrogenase 3, and 4L (MT-ND3 and MT-ND4L) and male infertility. *Andrologia*  
484 2021b;**53**:e14139.
- 485 Damas J, Cameiro J, Amorim A, Pereira F. MitoBreak: the mitochondrial DNA breakpoints database.  
486 *Nucleic Acids Res* 2014;**42**:D1261-1268.
- 487 Darr CR, Moraes LE, Connon RE, Love CC, Teague S, Varner DD, Meyers SA. The relationship between  
488 mitochondrial DNA copy number and stallion sperm function. *Theriogenology* 2017;**94**:94–99.
- 489 DeLuca SZ, O'Farrell PH. Barriers to Male Transmission of Mitochondrial DNA in Sperm Development.  
490 *Developmental Cell* 2012;**22**:660–668.
- 491 Díez-Sánchez C, Ruiz-Pesini E, Lapeña AC, Montoya J, Pérez-Martos A, Enríquez JA, López-Pérez MJ.  
492 Mitochondrial DNA Content of Human Spermatozoa. *Biology of Reproduction* 2003;**68**:180–185.
- 493 Faja F, Carlini T, Coltrinari G, Finocchi F, Nespoli M, Pallotti F, Lenzi A, Lombardo F, Paoli D. Human  
494 sperm motility: a molecular study of mitochondrial DNA, mitochondrial transcription factor A  
495 gene and DNA fragmentation. *Mol Biol Rep* 2019;**46**:4113–4121.
- 496 Falkenberg M, Gustafsson CM. Mammalian mitochondrial DNA replication and mechanisms of deletion  
497 formation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2020;**55**:509–524.
- 498 Fawcett DW. A Comparative View of Sperm Ultrastructure. *Biology of Reproduction* 1970;**2**:90–127.



- 499 Gabriel MS, Chan SW, Alhathal N, Chen JZ, Zini A. Influence of microsurgical varicocelectomy on  
500 human sperm mitochondrial DNA copy number: a pilot study. *J Assist Reprod Genet*  
501 2012;**29**:759–764.
- 502 Gholinezhad M, Yousefnia-pasha Y, Hosseinzadeh Colagar A, Mohammadoo-Khorasani M,  
503 Bidmeshkipour A. Comparison of large-scale deletions of the sperm mitochondrial DNA in  
504 normozoospermic and asthenoteratozoospermic men. *J Cell Biochem* 2019;**120**:1958–1968.
- 505 Gopalkrishnan K, Padwal V, D’Souza S, Shah R. Severe asthenozoospermia: a structural and functional  
506 study. *Int J Androl* 1995;**18**:67–74.
- 507 Goudenège D, Bris C, Hoffmann V, Desquirit-Dumas V, Jardel C, Rucheton B, Bannwarth S, Paquis-  
508 Flucklinger V, Lebre AS, Colin E, *et al.* eKLIPse: a sensitive tool for the detection and  
509 quantification of mitochondrial DNA deletions from next-generation sequencing data. *Genet Med*  
510 2019;**21**:1407–1416.
- 511 Gu N-H, Zhao W-L, Wang G-S, Sun F. Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals  
512 relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility. *Reprod Biol*  
513 *Endocrinol* 2019;**17**:66.
- 514 Hamilton JAM, Cissen M, Brandes M, Smeenk MJJ, Bruin JP de, Kremer JAM, Nelen WLDM, Hamilton  
515 CJCM. Total motile sperm count: a better indicator for the severity of male factor infertility than  
516 the WHO sperm classification system. *Human Reproduction* 2015;**30**:1110–1121.
- 517 Hauswirth W, Laipis PJ. Transmission genetics of mammalian mitochondria: a molecular model and  
518 experimental evidence. *Achievement and perspectives of mitochondrial research* 1985;**2**., p. 49–  
519 59. Elsevier Science Publishers.
- 520 Hecht NB, Liem H, Kleene KC, Distel RJ, Ho S. Maternal inheritance of the mouse mitochondrial  
521 genome is not mediated by a loss or gross alteration of the paternal mitochondrial DNA or by  
522 methylation of the oocyte mitochondrial DNA. *Developmental Biology* 1984;**102**:452–461.

- 523 Holyoake AJ, McHugh P, Wu M, O'Carroll S, Benny P, Sin IL, Sin FYT. High incidence of single  
524 nucleotide substitutions in the mitochondrial genome is associated with poor semen parameters in  
525 men. *Int J Androl* 2001;**24**:175–182.
- 526 Hosseinzadeh Colagar A, Karimi F. Large scale deletions of the mitochondrial DNA in astheno,  
527 asthenoterato and oligoasthenoterato-spermic men. *Mitochondrial DNA* 2014;**25**:321–328.
- 528 Ieremiadou F, Rodakis GC. Correlation of the 4977 bp mitochondrial DNA deletion with human sperm  
529 dysfunction. *BMC Res Notes* 2009;**2**:18.
- 530 Jiang M, Kauppila TES, Motori E, Li X, Atanassov I, Folz-Donahue K, Bonekamp NA, Albarran-  
531 Gutierrez S, Stewart JB, Larsson N-G. Increased Total mtDNA Copy Number Cures Male  
532 Infertility Despite Unaltered mtDNA Mutation Load. *Cell Metabolism* 2017;**26**:429-436.e4.
- 533 Kao S-H, Chao H-T, Liu H-W, Liao T-L, Wei Y-H. Sperm mitochondrial DNA depletion in men with  
534 asthenospermia. *Fertility and Sterility* 2004;**82**:66–73.
- 535 Kao S-H, Chao H-T, Wei Y-H. Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid 4977-bp Deletion is Associated  
536 with Diminished Fertility and Motility of Human Sperm. *Biology of Reproduction* 1995;**52**:729–  
537 736.
- 538 Kao SH, Chao HT, Wei YH. Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of  
539 motility and fertility of human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1998;**4**:657–666.
- 540 Krishnan KJ, Reeve AK, Samuels DC, Chinnery PF, Blackwood JK, Taylor RW, Wanrooij S, Spelbrink  
541 JN, Lightowlers RN, Turnbull DM. What causes mitochondrial DNA deletions in human cells?  
542 *Nat Genet* 2008;**40**:275–279.
- 543 Kumar R, Venkatesh S, Kumar M, Tanwar M, Shasmsi MB, Kumar R, Gupta NP, Sharma RK, Talwar P,  
544 Dada R. Oxidative stress and sperm mitochondrial DNA mutation in idiopathic  
545 oligoasthenozoospermic men. *Indian J Biochem Biophys* 2009;**46**:172–177.
- 546 Laig M, Fekete C, Majumdar N. Digital PCR and the QuantStudio™ 3D Digital PCR System. *Methods*  
547 *Mol Biol* 2020;**2065**:209–231.



- 548 Mao G-H, Wang Y-N, Xu M, Wang W-L, Tan L, Tao S-B. Polymorphisms in the *MT-ATP6* and *MT-CYB*  
 549 genes in *in vitro* fertilization failure. *Mitochondrial DNA* 2015;**26**:20–24.
- 550 May-Panloup P, Chretien M-F, Malthiery Y, Reynier P. Mitochondrial DNA in the oocyte and the  
 551 developing embryo. *Curr Top Dev Biol* 2007;**77**:51–83.
- 552 May-Panloup P, Chrétien M-F, Savagner F, Vasseur C, Jean M, Malthi ry Y, Reynier P. Increased sperm  
 553 mitochondrial DNA content in male infertility. *Human Reproduction* 2003;**18**:550–556.
- 554 Mundy AJ, Ryder TA, Edmonds DK. Asthenozoospermia and the human sperm mid-piece. *Human*  
 555 *Reproduction* 1995;**10**:116–119.
- 556 Ni F, Zhou Y, Zhang W, Wang X, Song X, Jiang H. Mitochondrial variations in the *MT-ND4* and *MT-TL1*  
 557 genes are associated with male infertility. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 2017;**63**:2–  
 558 6.
- 559 Nissanka N, Minczuk M, Moraes CT. Mechanisms of Mitochondrial DNA Deletion Formation. *Trends*  
 560 *Genet* 2019;**35**:235–244.
- 561 O’Connell M, McClure N, Lewis SEM. Mitochondrial DNA deletions and nuclear DNA fragmentation in  
 562 testicular and epididymal human sperm. *Hum Reprod* 2002a;**17**:1565–1570.
- 563 O’Connell M, McClure N, Lewis SEM. A comparison of mitochondrial and nuclear DNA status in  
 564 testicular sperm from fertile men and those with obstructive azoospermia. *Hum Reprod*  
 565 2002b;**17**:1571–1577.
- 566 Otten ABC, Smeets HJM. Evolutionary defined role of the mitochondrial DNA in fertility, disease and  
 567 ageing. *Hum Reprod Update* 2015;**21**:671–689.
- 568 Pelliccione F, Micillo A, Cordeschi G, D’Angeli A, Necozone S, Gandini L, Lenzi A, Francavilla F,  
 569 Francavilla S. Altered ultrastructure of mitochondrial membranes is strongly associated with  
 570 unexplained asthenozoospermia. *Fertility and Sterility* 2011;**95**:641–646.
- 571 Plessis S du, Agarwal A, Mohanty G, Linde M van der. Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what  
 572 fuel do spermatozoa use? *Asian J Androl* 2015;**17**:230.

- 573 Rantanen A, Jansson M, Oldfors A, Larsson N-G. Downregulation of Tfam and mtDNA copy number  
574 during mammalian spermatogenesis. *Mammalian Genome* 2001;**12**:787–792.
- 575 Reynier P, Chrétien MF, Savagner F, Larcher G, Rohmer V, Barrière P, Malthiery Y. Long PCR analysis  
576 of human gamete mtDNA suggests defective mitochondrial maintenance in spermatozoa and  
577 supports the bottleneck theory for oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;**252**:373–377.
- 578 Rosati AJ, Whitcomb BW, Brandon N, Buck Louis GM, Mumford SL, Schisterman EF, Pilsner JR. Sperm  
579 mitochondrial DNA biomarkers and couple fecundity. *Human Reproduction* 2020;deaa191.
- 580 Ruiz-Pesini E, Diez C, Lapeña AC, Pérez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Arenas J, López-Pérez MJ.  
581 Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clinical Chemistry*  
582 1998;**44**:1616–1620.
- 583 Selvi Rani D, Vanniarajan A, Gupta NJ, Chakravarty B, Singh L, Thangaraj K. A novel missense  
584 mutation C11994T in the mitochondrial ND4 gene as a cause of low sperm motility in the Indian  
585 subcontinent. *Fertility and Sterility* 2006;**86**:1783–1785.
- 586 Song GJ, Lewis V. Mitochondrial DNA integrity and copy number in sperm from infertile men. *Fertility*  
587 *and Sterility* 2008;**90**:2238–2244.
- 588 Song W-H, Yi Y-J, Sutovsky M, Meyers S, Sutovsky P. Autophagy and ubiquitin–proteasome system  
589 contribute to sperm mitophagy after mammalian fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA*  
590 2016;**113**:E5261–E5270.
- 591 St John JC, Jokhi RP, Barratt CLR. Men with oligoasthenoteratozoospermia harbour higher numbers of  
592 multiple mitochondrial DNA deletions in their spermatozoa, but individual deletions are not  
593 indicative of overall aetiology. *Molecular Human Reproduction* 2001;**7**:103–111.
- 594 Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. Ubiquitinated Sperm  
595 Mitochondria, Selective Proteolysis, and the Regulation of Mitochondrial Inheritance in  
596 Mammalian Embryos. *Biology of Reproduction* 2000;**63**:582–590.

- 597 Sutovsky P, Tengowski MW, Navara CS, Zoran SS, Schatten G. Mitochondrial sheath movement and  
 598 detachment in mammalian, but not nonmammalian, sperm induced by disulfide bond reduction.  
 599 *Mol Reprod Dev* 1997;**47**:79–86.
- 600 Talebi E, Karimian M, Nikzad H. Association of sperm mitochondrial DNA deletions with male infertility  
 601 in an Iranian population. *Mitochondrial DNA Part A* 2018;**29**:615–623.
- 602 Thangaraj K, Joshi MB, Reddy AG, Rasalkar AA, Singh L. Sperm Mitochondrial Mutations as a Cause of  
 603 Low Sperm Motility. *Journal of Andrology* 2003;**24**:388–392.
- 604 Tian M, Bao H, Martin FL, Zhang J, Liu L, Huang Q, Shen H. Association of DNA Methylation and  
 605 Mitochondrial DNA Copy Number with Human Semen Quality. *Biology of Reproduction*  
 606 2014;**91**:101.
- 607 Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, Flohé L. Dual Function of the  
 608 Selenoprotein PHGPx During Sperm Maturation. *Science* 1999;**285**:1393–1396.
- 609 Vertika S, Singh KK, Rajender S. Mitochondria, spermatogenesis, and male infertility - an update.  
 610 *Mitochondrion* 2020;**S1567724920300489**.
- 611 Wallace DC. Mitochondrial genetic medicine. *Nat Genet* 2018;**50**:1642–1649.
- 612 World Health Organization, editor. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human*  
 613 *semen*. 2010; World Health Organization: Geneva.
- 614 Wu H, Huffman AM, Whitcomb BW, Josyula S, Labrie S, Tougias E, Rahil T, Sites CK, Pilsner JR.  
 615 Sperm mitochondrial DNA measures and semen parameters among men undergoing fertility  
 616 treatment. *Reproductive BioMedicine Online* 2019a;**38**:66–75.
- 617 Wu H, Whitcomb BW, Huffman A, Brandon N, Labrie S, Tougias E, Lynch K, Rahil T, Sites CK, Pilsner  
 618 JR. Associations of sperm mitochondrial DNA copy number and deletion rate with fertilization  
 619 and embryo development in a clinical setting. *Human Reproduction* 2019b;**34**:163–170.
- 620 Yao YQ, Ng V, Yeung WS, Ho PC. Profiles of sperm morphology and motility after discontinuous  
 621 multiple-step Percoll density gradient centrifugation. *Andrologia* 1996;**28**:127–131.



Zhang G, Wang Z, Ling X, Zou P, Yang H, Chen Q, Zhou N, Sun L, Gao J, Zhou Z, *et al.* Mitochondrial Biomarkers Reflect Semen Quality: Results from the MARCHS Study in Chongqing, China. In Yao Y-G, editor. *PLoS ONE* 2016;**11**:e0168823.

Zhou Q, Li H, Li H, Nakagawa A, Lin JJ, Lee E-S, Harry BL, Skeen-Gaar RR, Suehiro Y, William D, *et al.* Mitochondrial endonuclease G mediates breakdown of paternal mitochondria upon fertilization. *Science* 2016;**353**:394–399.

#### Figure legends

**Figure 1:** mtDNA copy numbers per spermatozoon in SOA and control groups and according to gradient layers (40% and 90%).

**Figure 2:** Cumulative frequency of mtDNA rearrangements in SOA and control groups and according to gradient layers (40% and 90%).

**Figure 3:** Representation of all the deletions and duplications determined by eKLIPse in the two groups according to the gradient layers.

All large rearrangements of all samples from each group were collected on a single circos.

*The individual circos of each sample are available in Supplementary Fig. S1. The outer circle represents the mtDNA genome. The following circle represents the median of the cumulative frequencies. Deletions are visualised in the centre of the circles as red lines and duplications in blue lines. The width of the red line varies according to the percentage of heteroplasmy. The three dark grey regions correspond to the areas of the primers excluded from the analysis (range 725-870; 8898-8918 and 9140-9158).*

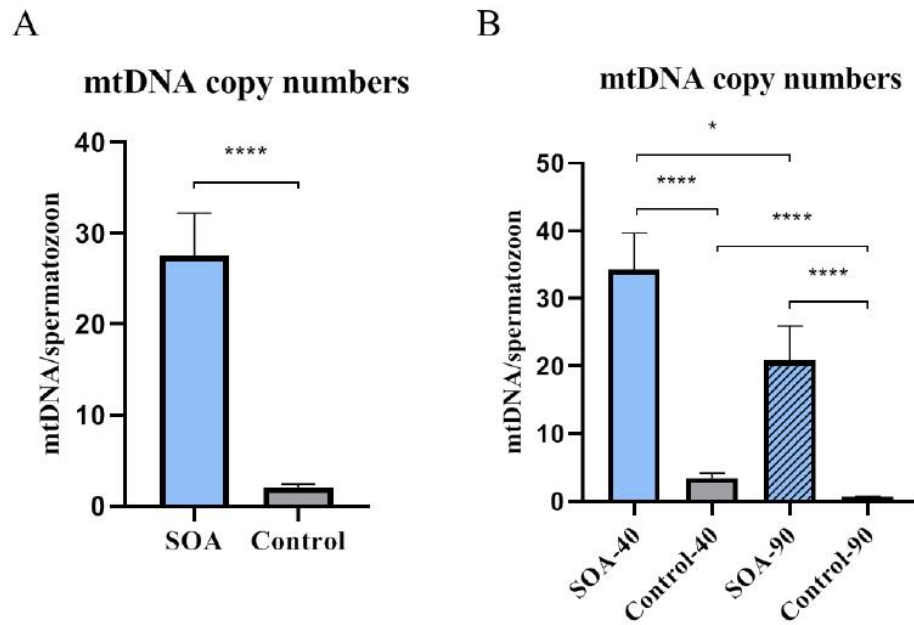
**Figure 4:** mtDNA rearrangements by eKLIPse before and after isolation of mtDNA circular in four men from the control group.

The outer circle represents the mtDNA genome. The following circle provides data on the sequencing coverage. The next circle represents the median of the cumulative frequencies. Deletions are visualised in the centre of the circles as red lines and duplications in blue lines. The width of the red line varies according to the percentage of heteroplasmy. The three dark grey regions correspond to the areas of the primers excluded from the analysis (range 725-870; 8898-8918 and 9140-9158).

**Supplementary Figure S1:** Representation of large rearrangements of each sample by eKLIPse.

The outer circle represents the mtDNA genome. The following circle contains data related to the sequencing coverage. Deletions are visualised in the centre of the circles as red lines and duplications in blue lines. The width of the red line varies according to the percentage of heteroplasmy. The three dark grey regions correspond to the areas of the primers excluded from the analysis (range 725-870; 8898-8918 and 9140-9158).

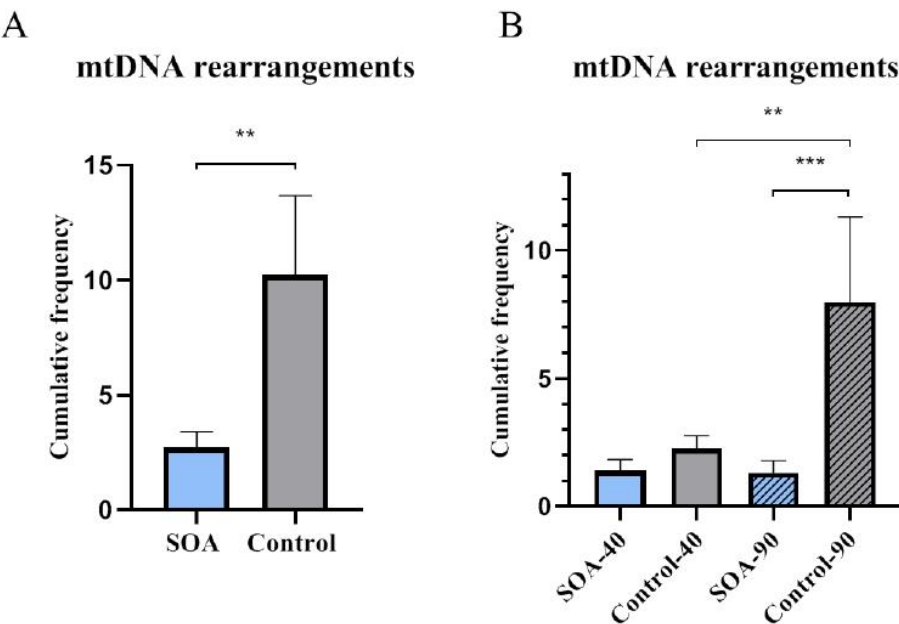




mtDNA copy numbers per spermatozoon in SOA and control groups and according to gradient layers (40% and 90%).

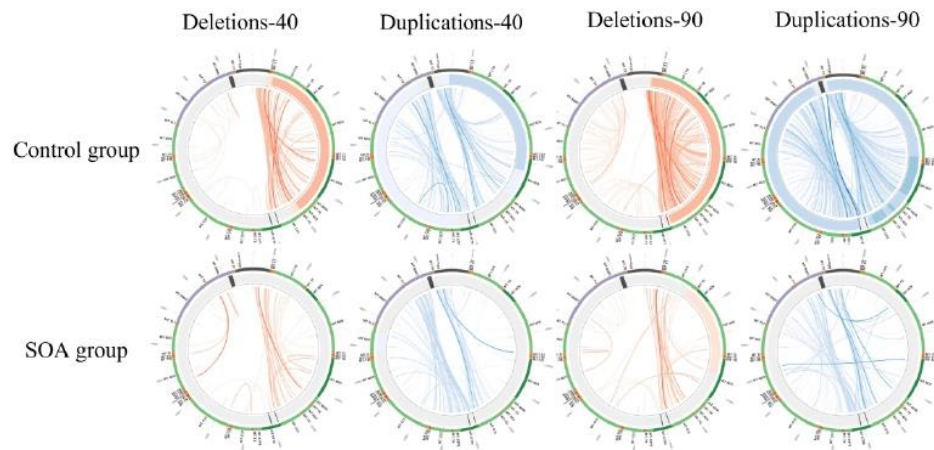
87x68mm (300 x 300 DPI)

<https://academic.oup.com/humrep>



Cumulative frequency of mtDNA rearrangements in SOA and control groups and according to gradient layers (40% and 90%).

87x61mm (300 x 300 DPI)

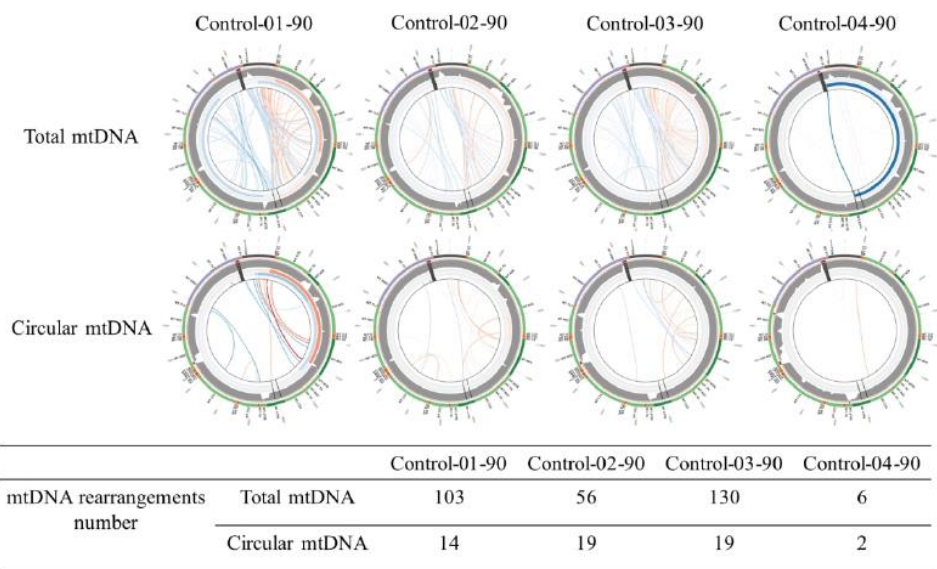


Representation of all the deletions and duplications determined by eKLIPse in the two groups according to the gradient layers.

All large rearrangements of all samples from each group were collected on a single circos.

The individual circos of each sample are available in Supplementary Fig. S1. The outer circle represents the mtDNA genome. The following circle represents the median of the cumulative frequencies. Deletions are visualised in the centre of the circles as red lines and duplications in blue lines. The width of the red line varies according to the percentage of heteroplasmy. The three dark grey regions correspond to the areas of the primers excluded from the analysis (range 725-870; 8898-8918 and 9140-9158).

295x142mm (300 x 300 DPI)



mtDNA rearrangements by eKLIPse before and after isolation of mtDNA circular in four men from the control group.

The outer circle represents the mtDNA genome. The following circle provides data on the sequencing coverage. The next circle represents the median of the cumulative frequencies. Deletions are visualised in the centre of the circles as red lines and duplications in blue lines. The width of the red line varies according to the percentage of heteroplasmy. The three dark grey regions correspond to the areas of the primers excluded from the analysis (range 725-870; 8898-8918 and 9140-9158).

143x85mm (300 x 300 DPI)



Table I: Characteristics of patients.

Abbreviations: BMI: body mass index (kg/m<sup>2</sup>); TMSC: total motile sperm count.

|                              |                                                | SOA group<br>N = 20               | Control group<br>N = 24 | <i>p</i> -value |
|------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|-----------------|
| <b>Age (years)</b>           |                                                | 35.8 ± 6.5                        | 35.5 ± 6.5              | 0.89            |
| <b>BMI</b>                   |                                                | 24.7 ± 4.1                        | 26.4 ± 4.5              | 0.26            |
| <b>Smoking status</b>        | <b>Non-smoker</b>                              | 14                                | 10                      | 0.17            |
|                              | <b>Smoker</b>                                  | 3                                 | 7                       |                 |
|                              | <b>Information missing</b>                     | 3                                 | 7                       |                 |
| <b>Infertility treatment</b> | <b>IUI</b>                                     | 0                                 | 9                       | < 0.0001        |
|                              | <b>IVF</b>                                     | 0                                 | 14                      |                 |
|                              | <b>ICSI</b>                                    | 20                                | 1                       |                 |
| <b>Semen parameters</b>      | <b>Sperm volume (mL)</b>                       | 3.2 ± 1.1                         | 3.9 ± 1.6               | 0.09            |
|                              | <b>Sperm concentration (10<sup>6</sup>/mL)</b> | 4.7 ± 2.8                         | 96.6 ± 41.9             | < 0.0001        |
|                              | <b>Motility (a+b) %</b>                        | 20.1 ± 16.2                       | 60 ± 11.7               | < 0.0001        |
|                              | <b>Normal morphology (%)</b>                   | Krüger classification<br>5 ± 3.5  | 13 ± 10                 | 0.07            |
|                              |                                                | David classification<br>9.7 ± 8.9 | 25.3 ± 10.2             | 0.0021          |
|                              | <b>Abstinence (Days)</b>                       | 3 ± 1                             | 3.8 ± 1.6               | 0.15            |
|                              | <b>TMSC</b>                                    | 2.3 ± 1.6                         | 214.3 ± 111.9           | < 0.0001        |

Table II: mtDNA copy numbers in spermatozoa of SOA and control group.

|       | SOA group     | Control group | SOA-40        | SOA-90        | Control-40    | Control-90  |
|-------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-------------|
|       | N = 20        | N = 24        |               |               |               |             |
| Mean  | 27.51         | 2.04          | 34.25         | 20.78         | 3.44          | 0.64        |
| Range | (3.18– 82.97) | (0.23–7.30)   | (4.78– 83.86) | (1.58– 90.07) | (0.26– 14.11) | (0.11–2.47) |

<https://academic.oup.com/humrep>

Supplementary Table SI: Primers and probes for digital PCR.

| Genes         | Primers                                                                                        | Probes                                                                                                                                 |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>MT-NDI</i> | F : 5'-CCCTAAAACCCGCCACATCT-3'<br>R : 5'-GAGCGATGGTGAGAGCTAAGGT-3'<br>Sequence product : 69 bp | /5'-FAM/CCATCACCC/ZEN/TCTACATCACCGCCC/3IABkFQ/<br>Fluorochrome FAM :<br>excitation wavelength : 495 nm<br>emission wavelength : 520 nm |
| <i>BAX</i>    | F : 5'-TTCATCCAGGATCGAGCAGG-3'<br>R : 5'-TGAGACACTCGCTCAGCTTC-3'<br>Sequence product : 103 bp  | /5'-HEX/CCCGAGCTG/ZEN/GCCCTGGACCCGGT/3IABkFQ/<br>Fluorochrome HEX :<br>excitation wavelength : 530 nm<br>emission wavelength : 555 nm  |

Supplementary Table SII: Primers mtDNA amplification.

|            | Primers                                                           | Sequence products |
|------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------|
| Amplicon 1 | F : 5'-CCTAGCCCACTTCTTACCACA-3'<br>R : 5'-GGTGAAGTCACTGGAACGGG-3' | 8397 bp           |
| Amplicon 2 | F : 5'-CAGGGTTGGTCAATTTTCGT-3'<br>R : 5'-GCTTGGATTAAGGCGACAG-3'   | 8289 bp           |

Supplementary Table SIII: Classification of rearrangements.

| Rearrangements   |                        |                             |
|------------------|------------------------|-----------------------------|
| Class            | SOA group<br>(N = 317) | Control group<br>(N = 1004) |
| <b>Class I</b>   | 18 (5.7%)              | 31 (3.1%)                   |
| <b>Class II</b>  | 206 (65%)              | 635 (63.2%)                 |
| <b>Class III</b> | 93 (29.3%)             | 338 (33.7%)                 |

<https://academic.oup.com/humrep>

Supplementary Table SIV: Distribution of haplogroups.

| <b>Haplogroup</b> | <b>SOA group</b> | <b>Control group</b> |
|-------------------|------------------|----------------------|
|                   | <b>N = 20</b>    | <b>N = 24</b>        |
| <b>H</b>          | 9                | 12                   |
| <b>HV</b>         | 1                | 2                    |
| <b>U</b>          | 3                | 3                    |
| <b>J</b>          | 3                | 2                    |
| <b>V</b>          | 2                | 0                    |
| <b>L3</b>         | 1                | 0                    |
| <b>A</b>          | 1                | 0                    |
| <b>T</b>          | 0                | 2                    |
| <b>I</b>          | 0                | 1                    |
| <b>X</b>          | 0                | 1                    |
| <b>L1</b>         | 0                | 1                    |

<https://academic.oup.com/humrep>

Supplementary Table SV: Variants in control and SOA group.

|                      | Mitomap             | Variants    | Type            | Localization    | Control group |           | SOA group |           | Heteroplasmy (%) |
|----------------------|---------------------|-------------|-----------------|-----------------|---------------|-----------|-----------|-----------|------------------|
|                      |                     |             |                 |                 | Layer 40%     | Layer 90% | Layer 40% | Layer 90% |                  |
| <b>Control group</b> | No result           | m.9847 T>C  | Missense        | <i>MT-COX3</i>  | X             |           |           |           | 8.8              |
|                      | No result           | m.1180 T>C  | UnclassifiedSNV | <i>MT-RNR1</i>  |               |           | X         |           | 5.6              |
|                      | No result           | m.1514 A>G  | UnclassifiedSNV | <i>MT-RNR1</i>  |               |           | X         |           | 9.2              |
|                      | No result           | m.1969 G>A  | UnclassifiedSNV | <i>MT-RNR2</i>  |               |           | X         |           | 14               |
|                      | Result              | m.2143 G>A  | UnclassifiedSNV | <i>MT-RNR2</i>  |               |           | X         |           | 7                |
|                      | Result              | m.2873 A>G  | UnclassifiedSNV | <i>MT-RNR2</i>  |               |           | X         |           | 15.5             |
|                      | No result           | m.2920 C>T  | UnclassifiedSNV | <i>MT-RNR2</i>  |               |           | X         |           | 6.1              |
|                      | No result           | m.4091 A>G  | Stop            | <i>MT-ND1</i>   |               |           |           | X         | 7.3              |
|                      | No result           | m.4293 A>G  | UnclassifiedSNV | <i>MT-TRNI</i>  |               |           | X         |           | 3.8              |
|                      | No result           | m.4912 C>T  | Missense        | <i>MT-ND2</i>   |               |           | X         |           | 6.2              |
| <b>SOA group</b>     | Possibly benign     | m.5693 T>C  | UnclassifiedSNV | <i>MT-TRNN</i>  |               |           |           | X         | 9.6              |
|                      | Result              | m.6930 G>A  | Stop            | <i>MT-COX1</i>  |               |           | X         |           | 8.2              |
|                      | No result           | m.7033 T>C  | Missense        | <i>MT-COX1</i>  |               |           | X         |           | 6.7              |
|                      | Result              | m.7158 A>T  | Missense        | <i>MT-COX1</i>  |               |           | X         | X         | 17 and 16.4      |
|                      | No result           | m.8213 G>A  | Missense        | <i>MT-COX2</i>  |               |           | X         |           | 7                |
|                      | Possibly benign     | m.9898 A>G  | Missense        | <i>MT-COX3</i>  |               |           | X         |           | 4                |
|                      | No result           | m.11418 A>G | Missense        | <i>MT-ND4</i>   |               |           |           | X         | 9.7              |
|                      | No result           | m.11663 C>A | Missense        | <i>MT-ND4</i>   |               |           | X         | X         | 98.5             |
|                      | No result           | m.12219 A>G | UnclassifiedSNV | <i>MT-TRNS2</i> |               |           | X         |           | 1.8              |
|                      | No result           | m.12263 T>C | UnclassifiedSNV | <i>MT-TRNS2</i> |               |           | X         |           | 1.7              |
|                      | No result           | m.13505 A>G | Missense        | <i>MT-ND5</i>   |               |           | X         |           | 4.1              |
|                      | Possibly pathogenic | m.15539 C>T | Missense        | <i>MT-CYTB</i>  |               |           | X         |           | 8.8              |
|                      | No result           | m.15543 C>A | Missense        | <i>MT-CYTB</i>  |               |           | X         |           | 9.4              |

<https://academic.oup.com/humrep>

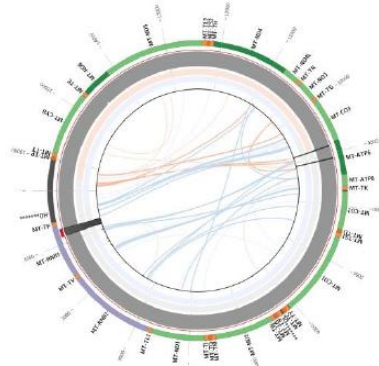


Layer 40%

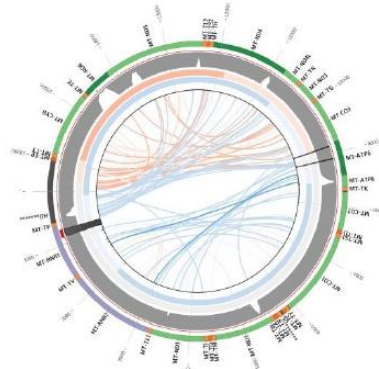
Layer 90%

Layer 40%

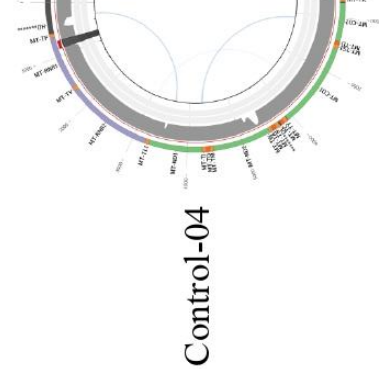
Layer 90%



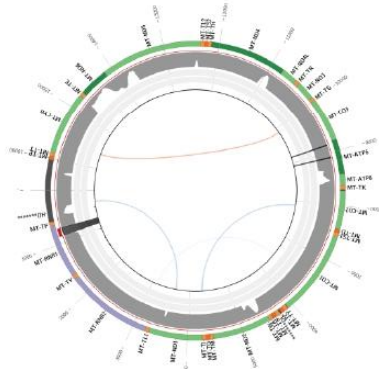
Control-01



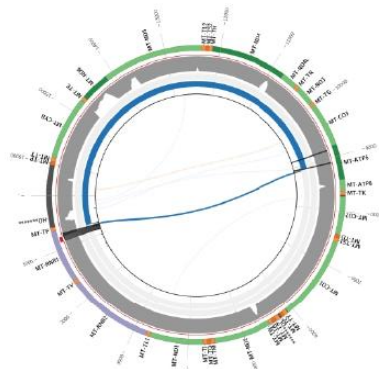
Control-02



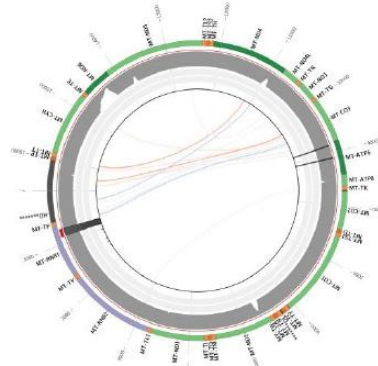
Control-04



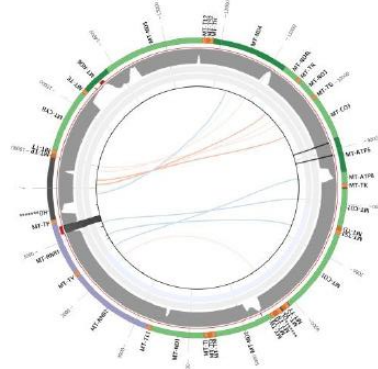
Control-05



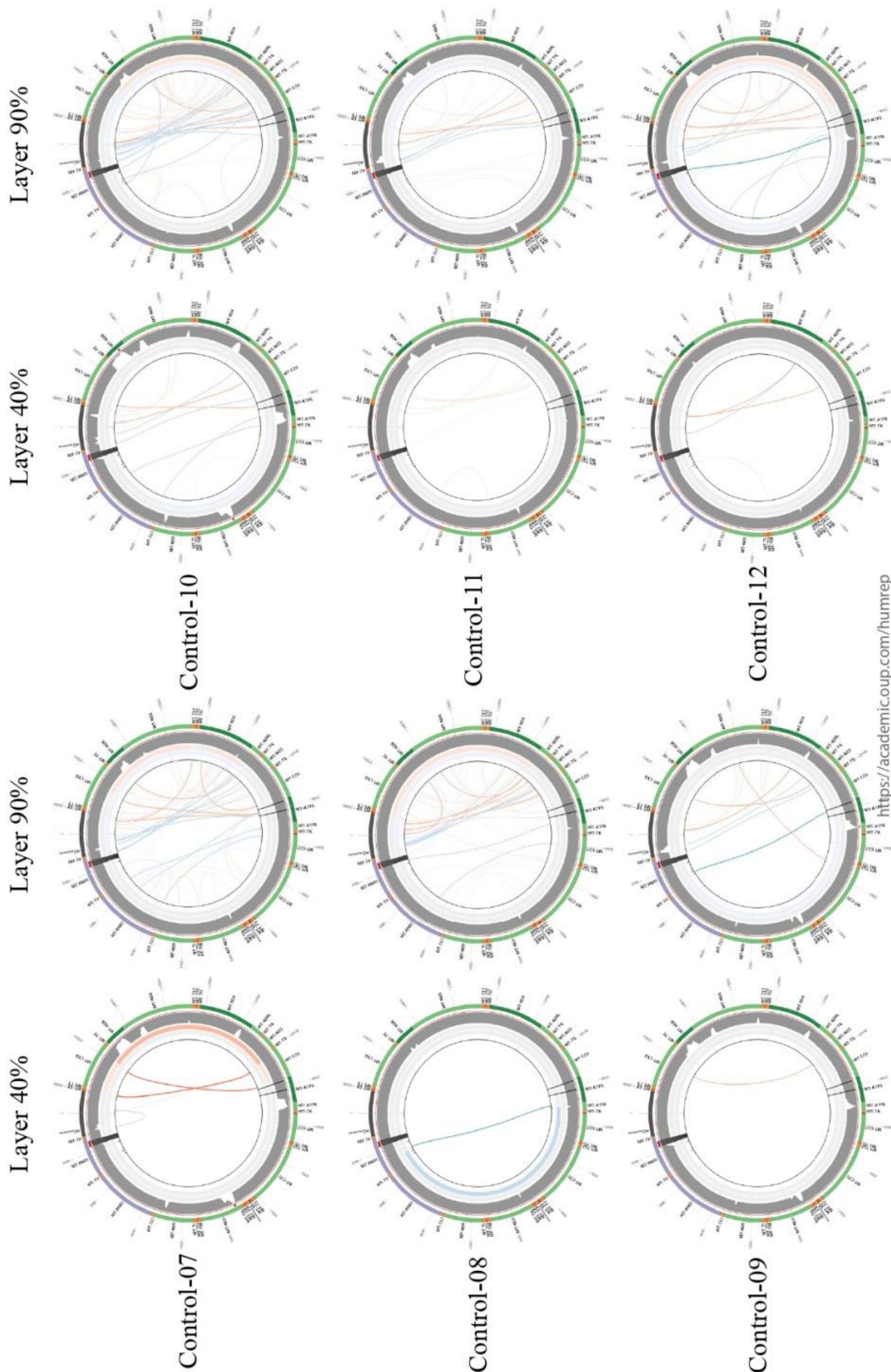
Control-03



Control-06



<https://academic.oup.com/humrep>



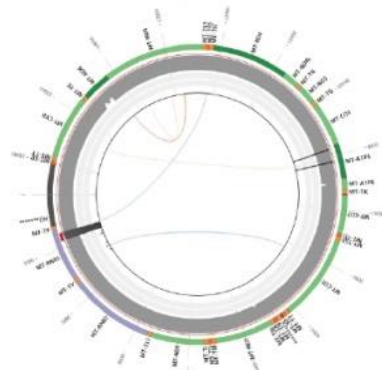


Layer 40%

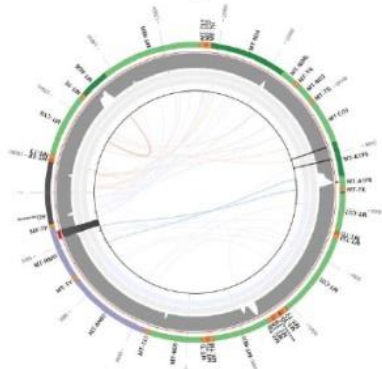
Layer 90%

Layer 40%

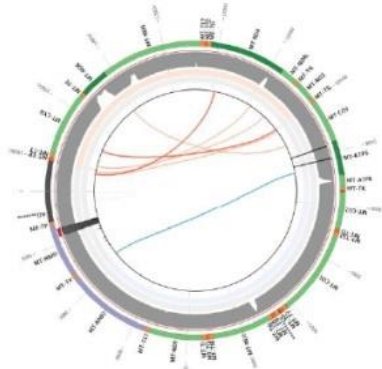
Layer 90%



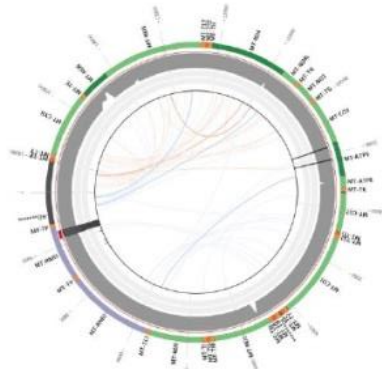
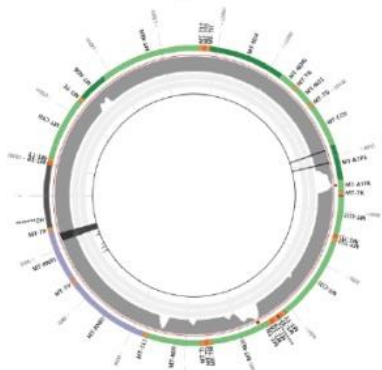
Control-13



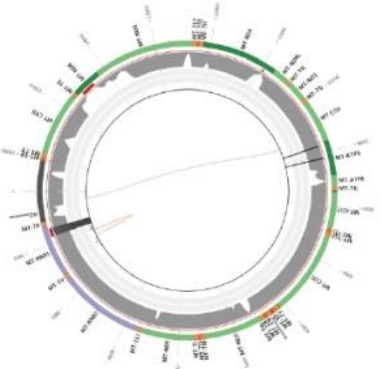
Control-16



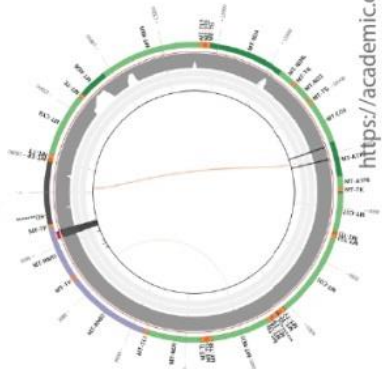
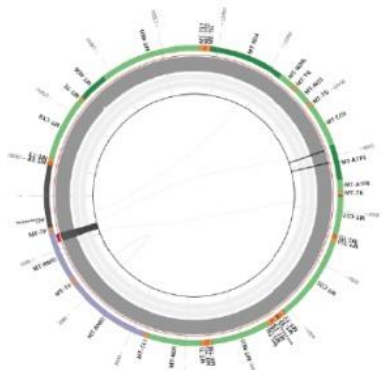
Control-14



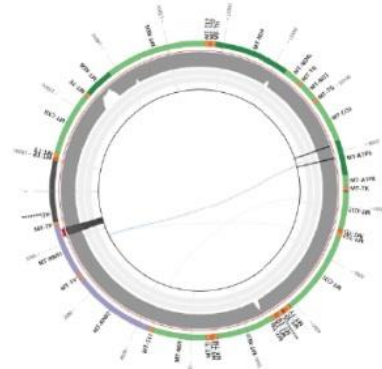
Control-17



Control-15



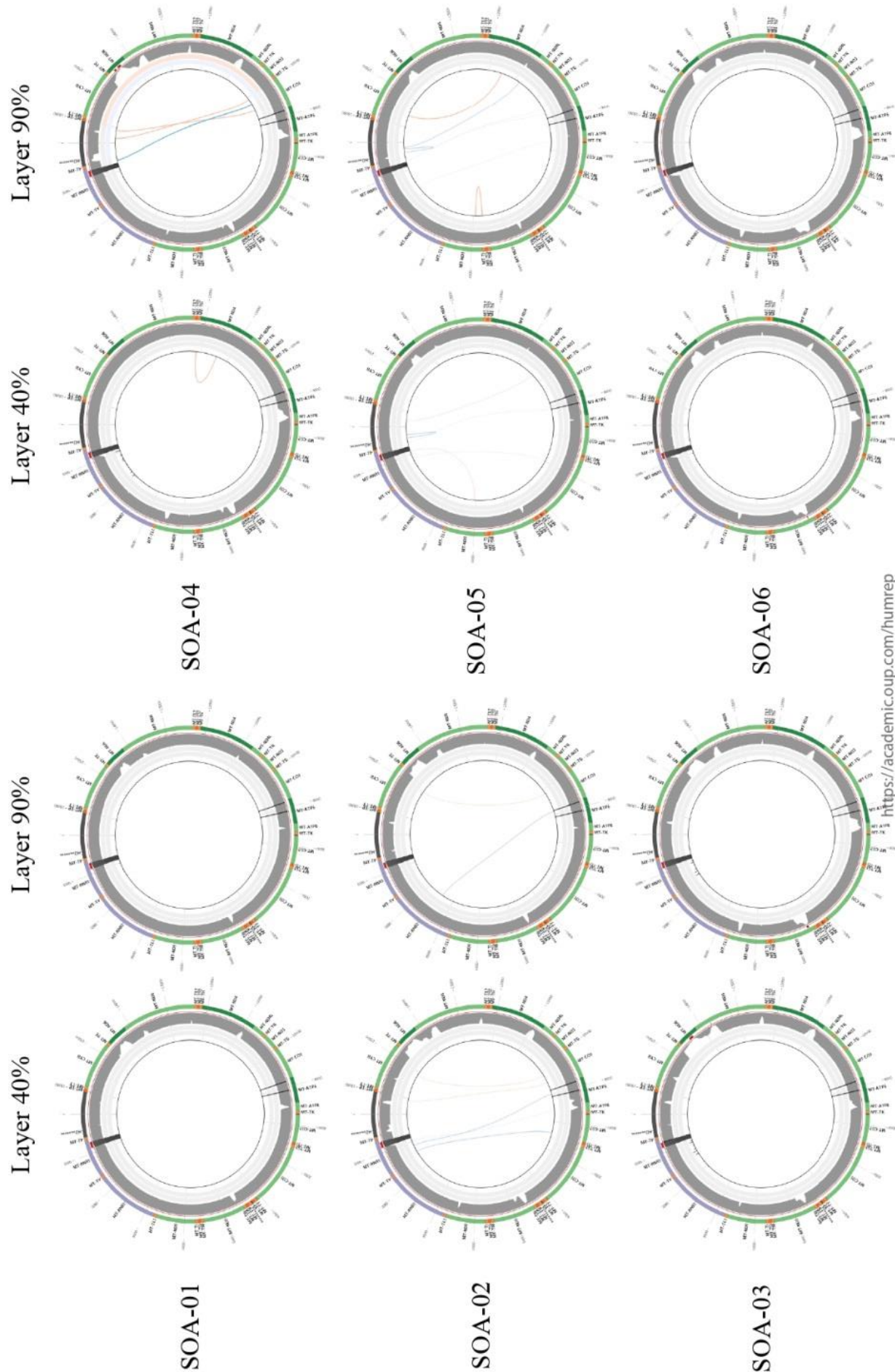
Control-18



<https://academic.oup.com/humrep>

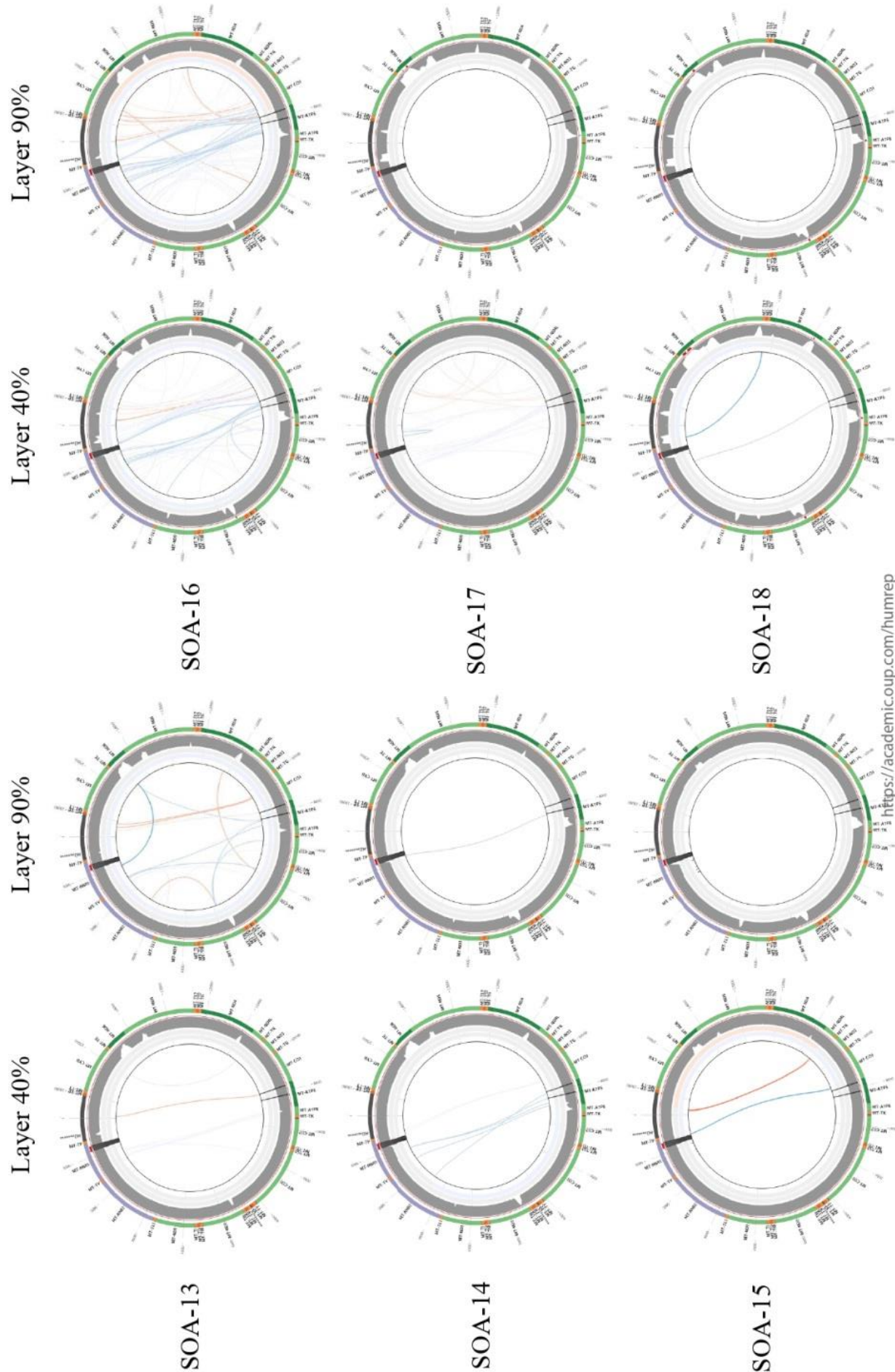








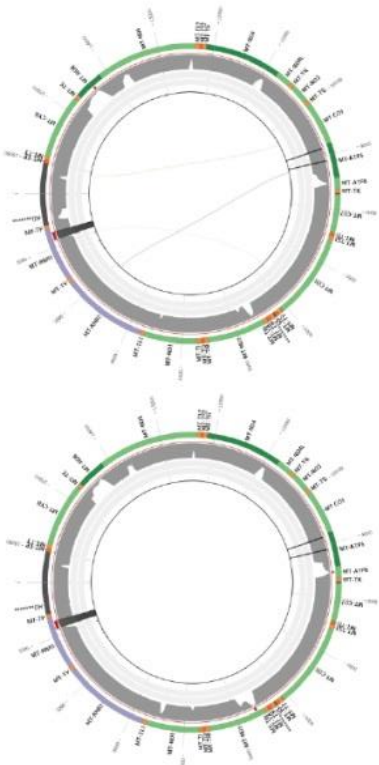




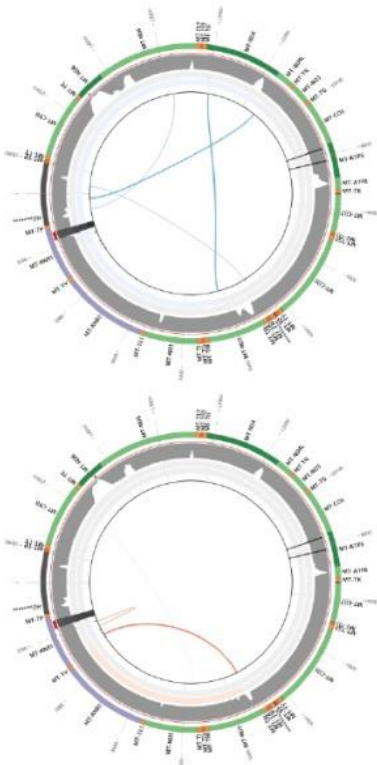
<https://academic.oup.com/humrep>

Layer 90%

Layer 40%

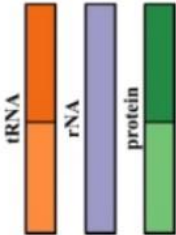


SOA-19

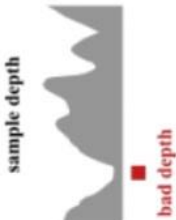


SOA-20

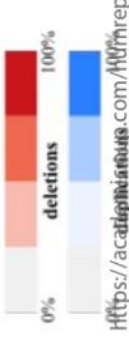
mtDNA genes



Coverage depth



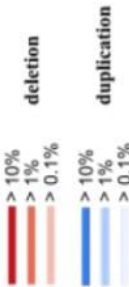
Cumulated percentage



Soft-clipping peaks



Breakpoint links









## 1.2. Le défi de l'amplification de l'ADNmt des spermatozoïdes

Lors du séquençage de l'ADNmt des spermatozoïdes nous nous sommes heurtés à plusieurs difficultés, du fait de la spécificité des échantillons de spermatozoïdes. Dans les deux groupes considérés la quantité d'ADNmt initiale était très faible : dans le groupe contrôle les spermatozoïdes possèdent peu d'ADNmt et dans le groupe SOA ils en possèdent plus mais sont moins nombreux. En outre, il s'est avéré que les spermatozoïdes contiennent de l'ADNmt dégradé. Ces deux constatations rendent compte de la difficulté à utiliser la technique habituelle de notre équipe (amplification de 2 grands fragments de l'ADNmt d'environ 8 kpb).

Nous avons dans un premier temps utilisé un kit d'amplification spécifique de l'ADNmt, le kit REPLI-g (Qiagen). Le kit permet l'amplification du génome mitochondrial dans sa totalité à partir d'une concentration faible d'ADN (1 ng d'ADN total) avec une amplification par déplacement multiple. Suite à cette amplification par REPLI-g nous avons tenté de séquencer la totalité de notre cohorte avec la technologie Ion Torrent. Le premier rapport de séquençage a révélé une bonne qualité technique du run sur plusieurs points : le chargement de la puce, la taille des reads et le nombre de reads par échantillon. Cependant lors de l'alignement des reads sur le génome mitochondrial de référence, seulement 10% des reads s'alignaient, correspondant à 1% de bases alignées. L'alignement des reads est visualisé sur la Figure 28 à l'aide du logiciel IGV (Integrative Genome Viewer). Nous pouvons observer en A. un alignement normal des reads sur le génome mitochondrial de référence (en rose les reads sens et en bleu les reads antisens). En B. nous observons l'alignement des reads suite à une amplification par REPLI-g. Toutes les couleurs, autre que rose et bleu, représentent des bases soft-clippées, non alignées. Ces résultats de séquençage, selon l'amplification, sont issus du même patient. Cette différence atteste d'un dysfonctionnement de l'amplification par REPLI-g sur l'ADNmt spermatique.

Nous avons donc conclu à la contre-indication de l'utilisation de REPLI-g pour l'amplification de l'ADNmt spermatique destiné au NGS. Les préconisations d'utilisation du kit précisent qu'il ne doit pas être utilisé dans le cas d'ADN dégradé, ce qui se trouve être le cas de l'ADNmt spermatique. Nous n'avions pas cette information avant l'étude et d'autres non plus (Al Smadi *et al.*, 2021; Al Zoubi *et al.*, 2020; Dahadhah, Jaweesh, *et al.*, 2021; Dahadhah, Saleh Jaweesh, *et al.*, 2021).

## 2. Signature métabolomique dans le liquide séminal d'hommes oligoasthénospermiques sévères

Ce travail est présenté sous la forme d'un article publié dans le journal *Andrology* en 2020.

**Introduction :** *Le facteur masculin est incriminé dans environ 50% des cas d'infertilité. L'approche métabolomique a récemment été utilisée dans l'évaluation de la qualité du sperme et de la fertilité masculine.*



**Objectif :** Notre objectif a été d'analyser la signature métabolomique du liquide séminal chez les hommes atteints d'oligoasthénospermie sévère et à la comparer à celles des hommes dont les paramètres du sperme sont normaux, afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'infertilité masculine sévère.

**Matériels et méthodes :** Nous avons analysé la signature métabolomique du liquide séminal de 20 hommes présentant une oligoasthénospermie sévère (nombre total de spermatozoïdes mobiles avant lavage  $< 5.10^6$ ) (groupe SOA) et les avons comparées à celles de 20 hommes présentant des paramètres spermatiques normaux (groupe contrôle). Nous avons utilisé une approche standardisée de métabolomique ciblée et quantitative utilisant la chromatographie liquide haute performance, couplée à la spectrométrie de masse en tandem, et le kit Biocrates Absolute IDQ p180.

**Résultats :** Parmi les 188 métabolites analysés, 110 ont été mesurés avec précision dans le liquide séminal. Un modèle robuste discriminant les deux populations ( $Q^2(\text{cum}) = 55,2\%$ ) a été obtenu par OPLS-DA (orthogonal partial least-squares discriminant analysis), basé sur la baisse des concentrations de 37 métabolites dont la VIP (variable importante pour la projection) est supérieure à 1. Globalement, chez les hommes atteints de SOA, on observe une baisse significative de : 17 phosphatidylcholines et 4 sphingomyélines ; 5 acylcarnitines, la L-carnitine libre étant le métabolite le plus discriminant; 6 acides aminés (glutamate, aspartate, méthionine, tryptophane, proline et alanine) ; et 4 amines biogènes (spermine, spermidine, sérotonine et  $\alpha$ -aminoacide). De plus, à partir de 27 sommes et ratios suggérés par Biocrates, nous mettons en évidence une augmentation significative de la  $\beta$ -oxydation dans le groupe SOA tandis que l'activité de la spermine synthase et de deux désaturases sont retrouvées significativement diminuées dans ce groupe.

**Discussion :** Notre signature comprend plusieurs changements métaboliques ayant différents impacts sur la qualité du sperme : un changement dans la composition des phospholipides et la saturation de leurs acides gras qui est potentiellement liée à la détérioration des membranes du sperme ; une carence en carnitine qui peut avoir un impact négatif sur la production d'énergie via l'oxydation des acides gras et la phosphorylation oxydative ; et un niveau réduit d'acides aminés et d'amines biogènes qui peut conduire à des voies métaboliques et de signalisation dérégulées.

Nous fournissons un aperçu global des défauts métaboliques associés à l'altération structurelle et fonctionnelle des spermatozoïdes dans l'oligoasthénospermie sévère. Ces résultats offrent de nouvelles perspectives sur la compréhension de l'infertilité masculine qui pourraient aider à développer des outils diagnostiques et de futurs traitements spécifiques.

**Mots-clés:** Infertilité masculine, Métabolomique, Oligoasthénospermie, Liquide séminal





# Metabolomic signature of the seminal plasma in men with severe oligoasthenospermia

Magalie Boguenet<sup>1</sup> | Cinzia Bocca<sup>1</sup> | Pierre-Emmanuel Bouet<sup>1,2</sup> | Orianne Serri<sup>2</sup> |  
Stéphanie Chupin<sup>3</sup> | Lydie Tessier<sup>3</sup> | Odile Blanchet<sup>4</sup> | Hady El Hachem<sup>5</sup> | Juan  
Manuel Chao de la Barca<sup>1,3</sup> | Pascal Reynier<sup>1,3</sup> | Pascale May-Panloup<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup>Unité Mixte de Recherche MITOVASC, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) 6015, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1083, Université d'Angers, Angers, France

<sup>2</sup>Département de Médecine de la Reproduction, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

<sup>3</sup>Département de Biochimie et Génétique, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

<sup>4</sup>CRB - BB-0033-00038, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

<sup>5</sup>Department of Reproductive Medicine, Saint Joseph Fertility Center, Beirut, Lebanon

## Correspondence

Pascale May-Panloup, Département de Médecine de la Reproduction, Centre Hospitalier Universitaire, Angers 49933, France.

Email: pamaypanloup@chu-angers.fr

## Abstract

**Background:** Male factor is incriminated in approximately 50% of cases of infertility. The metabolomic approach has recently been used in the assessment of sperm quality and male fertility.

**Materials and methods:** We analyzed the metabolomic signatures of the seminal plasma in 20 men with severe oligoasthenospermia (prewash total motile sperm count < 5.10<sup>6</sup>) (SOA) and compared it to 20 men with normal semen parameters, with a standardized approach of targeted and quantitative metabolomics using high-performance liquid chromatography, coupled with tandem mass spectrometry, and the Biocrates Absolute IDQ p180 kit.

**Results:** Among the 188 metabolites analyzed, 110 were accurately measured in the seminal plasma. A robust model discriminating the two populations ( $Q_{2(cum)} = 55.2\%$ ) was obtained by OPLS-DA (orthogonal partial least-squares discriminant analysis), based on the drop in concentrations of 37 metabolites with a VIP (variable important for projection) greater than 1. Overall, in men with SOA, there was a significant decrease in: 17 phosphatidylcholines and four sphingomyelins; acylcarnitines, with free L-carnitine being the most discriminating metabolite; polyunsaturated fatty acids; six amino acids (glutamate, aspartate, methionine, tryptophan, proline, and alanine); and four biogenic amines (spermine, spermidine, serotonin, and alpha-aminoadipate).

**Discussion:** Our signature includes several metabolic changes with different impacts on the sperm quality: a change in phospholipid composition and the saturation of their fatty acids that is potentially linked to the deterioration of sperm membranes; a carnitine deficiency that can negatively impact the energy production via fatty acid oxidation and oxidative phosphorylation; and a decreased level of amino acids and biogenic amines that can lead to dysregulated metabolic and signaling pathways.

**Conclusion:** We provide a global overview of the metabolic defects contributing to the structural and functional alteration of spermatozoa in severe oligoasthenospermia. These findings offer new insights into the pathophysiology of male factor infertility that could help to develop future specific treatments.

## KEYWORDS

lipidomics, male infertility, metabolomics, oligoasthenospermia, seminal plasma

## 1 | INTRODUCTION

Infertility is the inability of a couple to conceive after 12 months of unprotected intercourse and affects around 10% of couples worldwide.<sup>1</sup> In approximately 50% of cases, a male factor is incriminated, whether isolated (30%), or combined with a female factor (20%).<sup>2</sup> Male factor infertility is thought to be on the rise, with studies showing a significant deterioration of semen quality over the past decades.<sup>3,4</sup> Several factors have been incriminated, among which an increased exposure to environmental toxins such as pesticides and endocrine disruptors.<sup>5</sup>

The seminal plasma is comprised of secretions from the testis, the epididymis, the prostate, the seminal vesicles, and the bulbourethral and periurethral glands. It supports the survival of the spermatozoa and plays a crucial part in their maturation and the acquisition of fertilizing capacity. The analysis of the composition of the seminal fluid can help understand the physiologic mechanisms involved in sperm maturation, as well as the pathological variations.

The analysis of the seminal fluid composition has long been used in the diagnosis of male factor infertility, and recently, the omics approach has been added to the assessment.<sup>6</sup> Metabolomics, defined as the comprehensive analysis of the small metabolites (<1500 Dalton) of a biological system, is a highly reliable method to assess the seminal plasma, since it reflects not only its genetic make-up, but the environmental factors' influence as well. It has recently been used in the analysis of the seminal fluid in men with male factor infertility. However, there is a large heterogeneity in the methods used, the populations included, and the results reported, and no clear conclusion has been made so far.<sup>7-16</sup> Moreover, the majority of these studies used the World Health Organization (WHO) reference values for sperm characteristics.<sup>17</sup> The WHO classification has important clinical implications, but has some limits, in particular its low predictive value for spontaneous pregnancies.<sup>18,19</sup> Meanwhile, the use of the prewash total motile sperm count (TMSC) has been suggested as a better indicator of the severity of male factor infertility.<sup>19</sup>

Therefore, we aimed to analyze the metabolomic signatures of the seminal plasma in men with severe oligoasthenospermia (TMSC < 5.10<sup>6</sup>) and compare it to men with normal semen parameters, in order to better understand the mechanisms involved in severe male factor infertility. We used a highly standardized targeted metabolomic approach, measuring 188 metabolites, coupled with high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry.

## 2 | MATERIAL AND METHODS

### 2.1 | Study population

We performed a prospective observational study at the Reproductive medicine department of the Angers University Hospital, between

October 2018 and July 2019. In the severe oligoasthenospermia (SOA) group, we included men with severe oligoasthenospermia (oligoasthenospermia according the WHO criteria and a TMSC < 5.10<sup>6</sup>), undergoing in vitro fertilization (IVF) with intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for severe male factor infertility. The TMSC is calculated by multiplying the volume of the ejaculate in milliliters by the sperm concentration and the percentage of progressive motile spermatozoa (a and b), divided by 100%. In the control group, we included men with normal semen parameters according the WHO criteria (and TMSC > 5.10<sup>6</sup>), undergoing intrauterine insemination (IUI) or classic IVF.

All patients who were treated at the department during the study period and signed the informed consent were eligible for inclusion and were included in one of the two groups, based on their TMSC. We excluded from the study patients who refused to sign the informed consent, patients who did not fit in any of the two study groups (patients with isolated or complex semen abnormalities but with a TMSC > 5.10<sup>6</sup>), as well as patients with associated medical conditions or taking long-term treatments. None of the included patients had any metabolic condition or had lifestyle habits associated with altered sperm parameters (chronic exposure to toxins, tobacco, alcohol, or drugs), and none was taking any medications or supplements to improve sperm quality.

### 2.2 | Ethical Approval

All participants signed the informed consent prior to inclusion, and the study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Angers, France (Number DC-2014-2224 and AC-2017-2993).

### 2.3 | Sample preparation

All included patients had a sperm analysis performed in the 6 months preceding the study as part of their infertility workup. The sperm samples were collected on the day of the procedure (IUI or IVF) by masturbation in the andrology laboratory, following an abstinence period of 3 to 5 days. A small fraction of the sample was taken for the assessment of the sperm parameters (count, motility...), while another was used for treatment. The sperm morphology was not assessed on the day as data from the previous sperm analysis were used, based on the David<sup>20</sup> or Krüger<sup>21</sup> classifications. The samples were centrifuged on a density gradient to isolate the seminal plasma (1ml), which was later centrifuged for 5 minutes at 10 000 g in order to remove the remaining cells. The final plasma was then frozen at -80°C for the metabolomic analysis.



## 2.4 | Targeted metabolomic analysis

We performed the targeted quantitative metabolomic analysis as previously described.<sup>22</sup> In brief, we used the Biocrates® Absolute IDQ p180 kit (Biocrates Life sciences AG), which uses mass spectrometry (QTRAP 5500, SCIEX) to quantify up to 188 different endogenous molecules: free carnitine (CO), 39 acylcarnitines (C), the sum of hexoses (H1), 21 amino acids, 21 biogenic amines, and 105 lipids. In the kit we used, the lipids are distributed in four different classes: 14 lysophosphatidylcholines (lysoPC), 38 diacylphosphatidylcholines (PCaa), 38 acyl-alkyl-phosphatidylcholines (PCae), and 15 sphingomyelins (SM). We used flow-injection analysis with tandem mass spectrometry (FIA-MS/MS) for the analysis of carnitine, acylcarnitines, lipids, and hexoses. We used liquid chromatography (LC) to separate amino acids and biogenic amines before quantitation with mass spectrometry.

After thawing, each seminal fluid sample was vortexed and centrifuged at 4°C for 5 minutes at 5000 g. Ten microliters of each sample was then added to the filter on the upper wells of the 96-well plate. Metabolites were extracted and derivatized for the quantitation of amino acids and biogenic amines. The extracts were finally diluted with MS running solvent before FIA and LC-MS/MS analysis. Three quality controls (QCs) composed of human plasma samples at three concentration levels (low (QC1), medium (QC2), and high (QC3)) were used to evaluate the performance of the analytical assay. A seven-point serial dilution of calibrators was added to the kit's 96-well plate to generate calibration curves for the quantification of amino acids and biogenic amines.

## 2.5 | Statistical analysis

The univariate statistical analysis was performed with Systat software, version 15.0 (SPSS Inc). The non-parametric Mann-Whitney test was used for quantitative variables, and the chi-squared test ( $\chi^2$ ) was used for qualitative variables. Differences were considered significant at  $P$ -value < .05.

After validation of the kit quality controls, the raw metabolomic data were  $\log_{10}$  transformed and mean-centered to reduce the contribution of the most intense molecules.

Multivariate analysis was performed with Simca -P + v 16.0.1 (Umetrics). Unsupervised principal component analysis (PCA) was used to investigate the metabolomic data population structure, and Hotelling's T2 and DModX plots were visually inspected for detecting outliers. In order to highlight any SOA signature, a supervised orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA) was carried out. Several plots were considered to analyze our signature: S-plot (visualization of intensity and reliability), loading column plot with jackknife confidence intervals, coefficient plot and variable importance in projection (VIP) plot. Only metabolites with a VIP value higher than 1 were retained. The OPLS-DA model was cross-validated by leaving out a one-seventh fraction of the samples and replicates seven times. The quality and performance of the models were assessed using the  $Q^2Y(\text{cum})$  (goodness of the prediction), the  $R^2Y(\text{cum})$  (goodness of the fit), the cross-validation analysis of variance (CV-ANOVA), and the permutation test (evaluation of the overfitting risk).

In addition to the information gathered from individual metabolites, several sums and ratios, with metabolic significance in a wide range of disorders belonging to the metabolic disease spectrum, were

**TABLE 1** Characteristics of participants

|                       |                                           | SOA group<br>n = 20 | Control group<br>n = 20 | P-<br>value |
|-----------------------|-------------------------------------------|---------------------|-------------------------|-------------|
| Age (years)           |                                           | 35.6 ± 6.4          | 37.3 ± 7.6              | 0.42        |
| BMI status            | BMI                                       | 24.9 ± 3.3          | 26.9 ± 4.7              | 0.24        |
| Smoking status        | Non-smoker                                | 11                  | 7                       | 0.4         |
|                       | Smoker                                    | 5                   | 7                       |             |
|                       | Information missing                       | 4                   | 6                       |             |
| Infertility treatment | IUI                                       | 0                   | 8                       | 1.4E-8      |
|                       | IVF                                       | 0                   | 11                      |             |
|                       | ICSI                                      | 20                  | 1                       |             |
| Semen parameters      | Sperm volume (mL)                         | 3.2 ± 1.2           | 4.2 ± 1.6               | .037        |
|                       | Sperm concentration (10 <sup>6</sup> /mL) | 5 ± 3.6             | 94.9 ± 43.8             | 6.7E-8      |
|                       | Motility (a + b) %                        | 21.1 ± 15.9         | 58.5 ± 11.8             | 1.0E-6      |
|                       | Normal morphology (%)                     | 4.2 ± 4.0           | 9.9 ± 4.0               | 0.05        |
|                       | Days of abstinence                        | 9.8 ± 8.9           | 28.2 ± 8.7              | 0.001       |
|                       | TMSC                                      | 3 ± 1.2             | 3.6 ± 1.6               | .24         |
|                       |                                           | 2.6 ± 1.7           | 220.4 ± 119.1           | 6.8E-8      |

Note: significant  $P$ -values < .05.

Abbreviations: BMI, body mass index (kg/m<sup>2</sup>); TMSC, total motile sperm count.

calculated using the RatioExplorer module provided by Biocrates®. Statistical analysis was performed using Systat software, version 15.0 (SPSS Inc). Differences were considered significant at  $P$ -value  $< .05$ .

### 3 | RESULTS

#### 3.1 | Patients' characteristics

We included 20 patients in the SOA group and 20 in the control group. Patients' characteristics are shown in Table 1. There were no significant differences between the two groups in terms of mean age, BMI, and smoking status. As expected, all sperm parameters were significantly better in the control group compared to the SOA group.

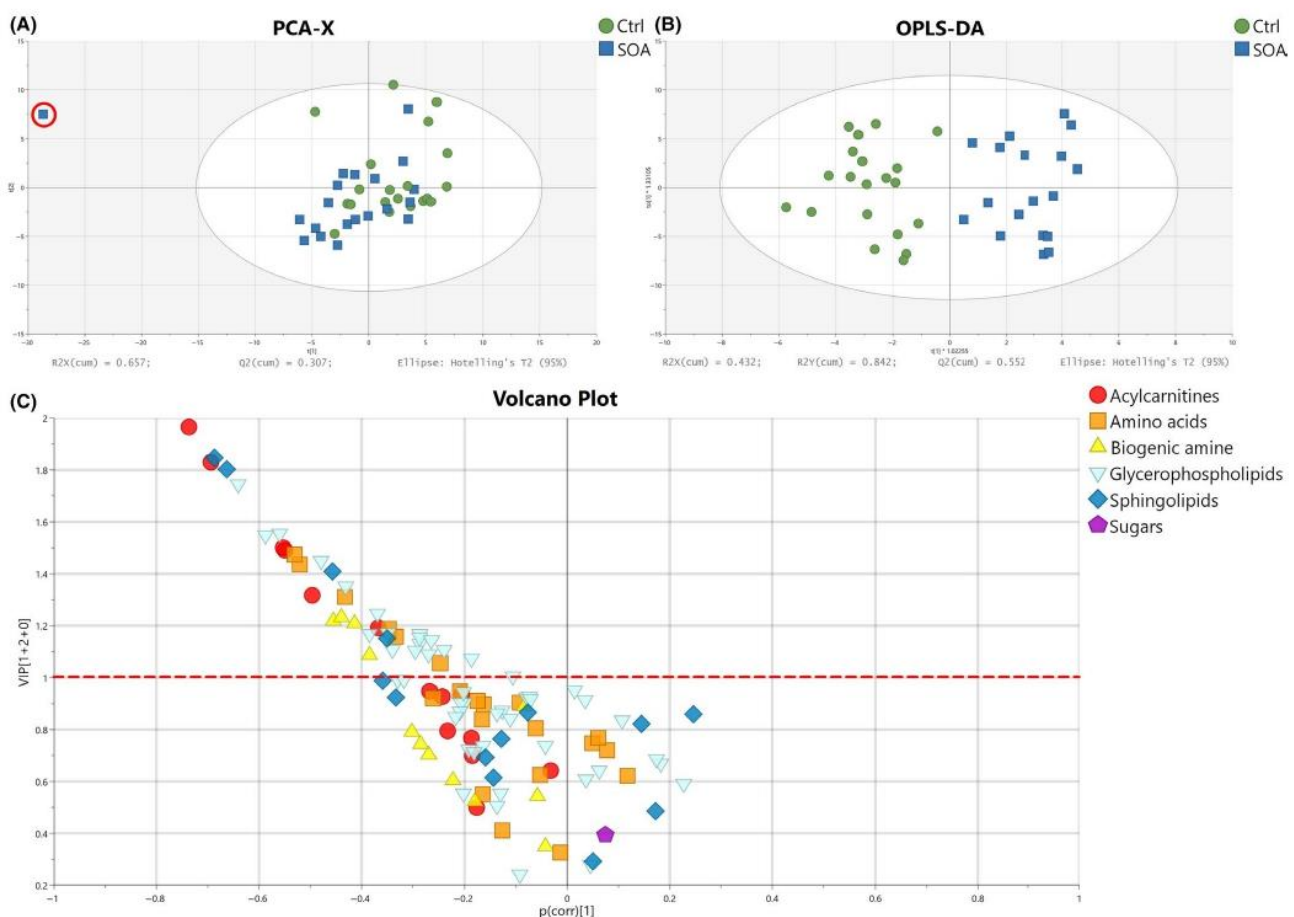
#### 3.2 | Metabolomic signature

Among the 188 metabolites analyzed, 110 were accurately detected in the seminal fluid samples. Among these, glycerophospholipids

were the most detected ( $>40\%$  with 4 lysophosphatidylcholines and 44 phosphatidylcholines) followed by amino acids ( $>20\%$ ). Acyl carnitines (14 species), biogenic amines (12 molecules), and sphingolipids (14 lipids), on the other hand, were less detected ( $<15\%$  each). These raw data are listed in Table S1.

According to the unsupervised PCA approach disclosing a strong outlier (Figure 1A), we decided to exclude one patient of the SOA group from the original dataset. Supervised OPLS-DA analysis leads to the construction of a model (Figure 1B) with good predictive ability ( $Q^2_{(cum)} = 55.2\%$ ) and good performances during the permutation (for 999 permutations,  $Q^2$ : (0.0,  $-0.588$ )) and the CV-ANOVA tests ( $P$ -value =  $1.35 \times 10^{-4}$ ). This discriminant model was obtained from 37 molecules with a VIP value higher than 1.0 and a  $p(\text{corr})$  smaller than  $-0.2$  (Figure 1C). The negative  $p(\text{corr})$  indicates that all these molecules discriminating SOA from control groups were down-regulated. The 37 discriminant metabolites are summarized in Table 2.

The 37 metabolites with a  $VIP > 1$  included carnitine (C0), five acylcarnitines (C3; C5; C5:1; C5-OH (C3-DC-M); C6 (C4:1-DC), six amino acids (glutamate, aspartate, methionine, tryptophan,



**FIGURE 1** The metabolomic signature. (A) Unsupervised PCA score plot of the two populations (Ctrl: green circles; SOA: blue squares). This approach shows the presence of an outlier on the SOA cohort (highlighted in red). (B) Supervised OPLS-DA score plot of the two populations. The model constructed with the 110 accurately measured molecules (shown in 1C) is able to discriminate the SOA from the Control groups with the  $t[1]$  axis. (C) Volcano plot displaying the contribution of each metabolite to the model described in 1A according to the VIP and the  $p(\text{corr})$  value



proline and alanine), four biogenic amines (spermine, spermidine, serotonin, alpha-aminoadipate), four sphingomyelins (SM (OH) C14:1; SM C16:1; SM (OH) C16:1; SM C18:1), and seventeen phosphatidylcholines.

Among the 27 sums and ratios suggested by Biocrates®, five were found significant: (C2 + C3)/C0 and C2/C0, measuring the beta-oxidation activity, were higher in the SOA group; spermine/spermidine, measuring the activity of the spermine synthase, was lower in the SOA group; and the sum of polyunsaturated fatty acids (PUFA) "aa" and "ae" species were both decreased (Figure 2). The sum of PUFA aa reflect the action of desaturases on diacyl phosphatidylcholine, whereas PUFA ae reflect the action of desaturases on choline plasmalogens.

## 4 | DISCUSSION

The current study aimed to find a specific metabolomic signature in the seminal plasma of men with severe oligoasthenospermia (TMSC < 5.10<sup>6</sup>) compared to men with normal semen parameters. We found a drop of 37 metabolites among the 110 accurately measured (34%) in the seminal plasma, which provided a robust multivariate model discriminating men with SOA from controls. This model gives a global view of the metabolites affected in men with severely altered sperm parameters, many of which have already been associated with low sperm quality.

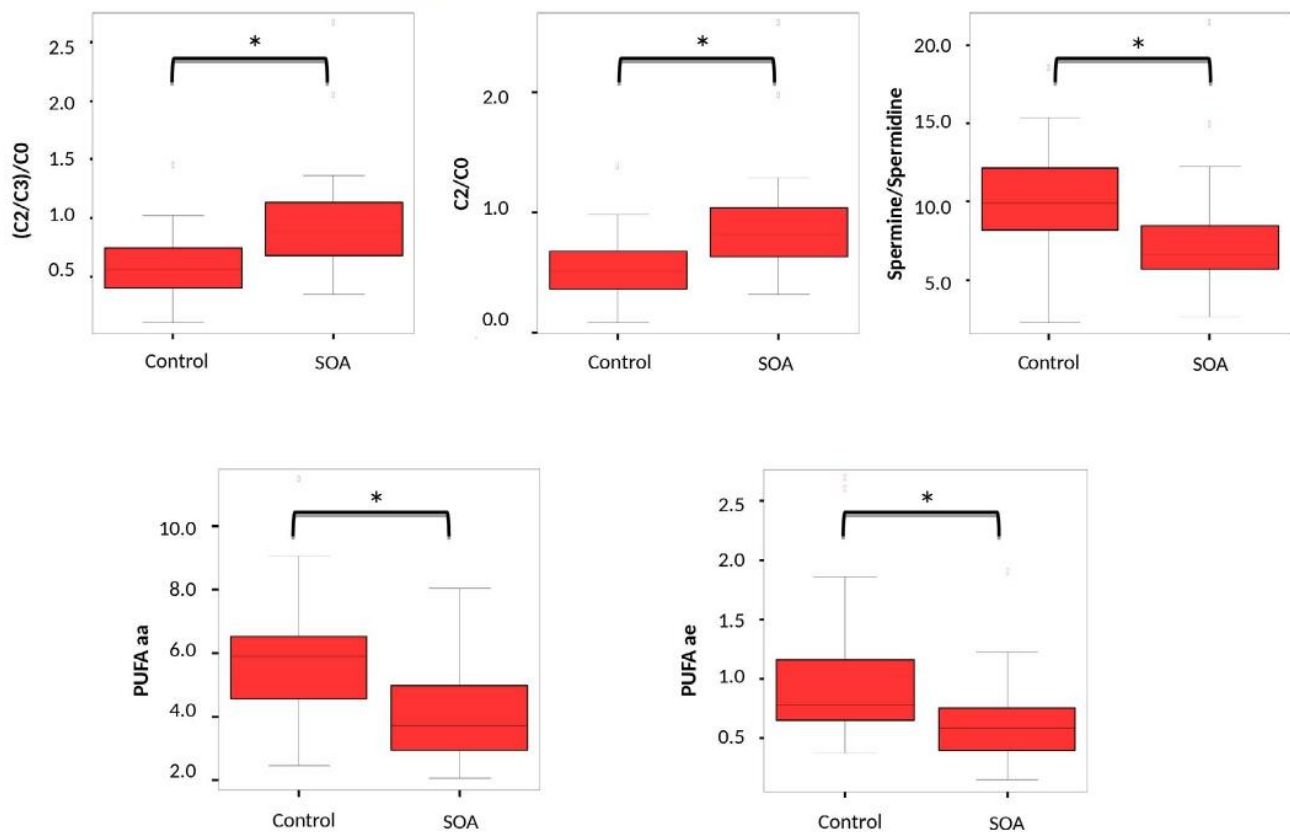
The first group of metabolites we found affected in men with SOA was the acylcarnitines, with the free L-carnitine being the most discriminating metabolite. Physiologically, free carnitine goes from the blood plasma to the epididymal lumen where it is concentrated, and then through the sperm plasma membrane by passive diffusion.<sup>23</sup> The increase in carnitine concentration is paralleled by the acquisition of sperm motility in the epididymal lumen.<sup>23</sup> Several studies have already confirmed the relation between carnitines and sperm quality, linking the carnitine concentration in the seminal plasma to several sperm parameters<sup>24-29</sup> and fertility.<sup>27,28,30</sup> More recently, metabolomic studies have confirmed a positive correlation between carnitine concentration in the seminal plasma and sperm concentration in the ejaculate.<sup>15,31</sup> By combining with carnitine, fatty acids form acylcarnitines, which allow their transport across the inner mitochondrial membrane to supply energy through beta-oxidation. They support spermatogenesis, sperm maturation, and flagellar movement.<sup>32,33</sup> We found the ratios (C2 + C3)/C0 and C2/C0 to be increased in the SOA group, confirming that carnitine deficiency impacts the beta-oxidation activity.

We also found a drop in 17 phosphatidylcholines and four sphingomyelins in men with SOA. Phosphatidylcholines and sphingomyelins are both major components of sperm membranes. Phosphatidylcholines, originating from the epididymis (70%) and the annex glands (30%), affect the sperm membrane's fluidity, its adhesion capacities, and the signaling mechanisms of the gametic interaction.<sup>34-36</sup> They play a central role in sperm maturation and fertilizing ability. Our findings are in accordance with previous studies showing

**TABLE 2** The 37 relevant metabolites characterizing the SOA group multivariate signature. Molecules were sorted by decreasing VIP value. For each metabolite, the table shows the family, the p(corr) value, and the VIP value

| Identification  | Multivariate analysis |               |           |
|-----------------|-----------------------|---------------|-----------|
| Molecules       | Family                | p(corr) value | VIP value |
| C0              | Acylcarnitines        | -0.736656     | 1.96625   |
| SM C18:1        | Sphingolipids         | -0.687275     | 1.8482    |
| C5:1            | Acylcarnitines        | -0.694464     | 1.82965   |
| SM C16:1        | Sphingolipids         | -0.663643     | 1.803340  |
| PC aa C38:6     | Glycerophospholipids  | -0.641072     | 1.745760  |
| PC aa C40:4     | Glycerophospholipids  | -0.559448     | 1.55432   |
| PC aa C42:5     | Glycerophospholipids  | -0.5874       | 1.54878   |
| C5-OH (C3-DC-M) | Acylcarnitines        | -0.55347      | 1.50091   |
| C3              | Acylcarnitines        | -0.550273     | 1.4894    |
| Glutamic acid   | Amino acids           | -0.530735     | 1.47222   |
| PC ae C40:6     | Glycerophospholipids  | -0.478276     | 1.4501    |
| Aspartic acid   | Amino acids           | -0.520613     | 1.43571   |
| SM (OH) C14:1   | Sphingolipids         | -0.455994     | 1.40969   |
| PC aa C38:5     | Glycerophospholipids  | -0.430107     | 1.35169   |
| C5              | Acylcarnitines        | -0.496284     | 1.31682   |
| Proline         | Amino acids           | -0.433497     | 1.31101   |
| PC ae C38:6     | Glycerophospholipids  | -0.368607     | 1.24613   |
| Spermine        | Biogenic amines       | -0.438913     | 1.23255   |
| Serotonin       | Biogenic amines       | -0.454194     | 1.21927   |
| Spermidine      | Biogenic amines       | -0.413942     | 1.20983   |
| C6 (C4:1-DC)    | Acylcarnitines        | -0.367226     | 1.19188   |
| Alanine         | Amino acids           | -0.346291     | 1.18906   |
| PC aa C40:5     | Glycerophospholipids  | -0.347858     | 1.17274   |
| PC aa C34:2     | Glycerophospholipids  | -0.28633      | 1.16797   |
| PC ae C34:0     | Glycerophospholipids  | -0.385049     | 1.16792   |
| Methionine      | Amino acids           | -0.332658     | 1.15761   |
| PC aa C36:3     | Glycerophospholipids  | -0.286133     | 1.15403   |
| SM (OH) C16:1   | Sphingolipids         | -0.349997     | 1.15255   |
| PC aa C38:4     | Glycerophospholipids  | -0.263939     | 1.14334   |
| PC aa C28:1     | Glycerophospholipids  | -0.286532     | 1.12958   |
| PC ae C40:5     | Glycerophospholipids  | -0.338994     | 1.1084    |
| PC aa C36:2     | Glycerophospholipids  | -0.239998     | 1.10575   |
| PC aa C38:0     | Glycerophospholipids  | -0.295603     | 1.10359   |
| PC aa C36:4     | Glycerophospholipids  | -0.269367     | 1.08957   |
| Alpha-AAA       | Biogenic amines       | -0.384829     | 1.08609   |
| PC aa C38:3     | Glycerophospholipids  | -0.187424     | 1.07225   |
| Tryptophan      | Amino acids           | -0.247878     | 1.05603   |

an association between altered phosphatidylcholines concentrations in seminal plasma and male fertility.<sup>37,38</sup> Moreover, recent metabolomic studies have reported a decrease in phosphatidylcholines in the



**FIGURE 2** Box plot of the relevant ratios and sums in the two groups of patients. *P*-values were obtained using the Mann-Whitney test. \*: significant *P*-values < .05. Polyunsaturated glycerophosphorylcholine (PUFA ae and aa;  $\mu\text{mol/L}$ ); ratio of short-chain acylcarnitine to free carnitine  $((C2 + C3)/C0)$ ; ratio of acetylcarnitine to free carnitine ( $C2/C0$ ); ratio of spermine/spermidine)

seminal plasma of infertile patients,<sup>7</sup> while a positive correlation was found between the concentration of these glycerophospholipids in the seminal plasma and the sperm concentration and motility.<sup>31</sup>

Our analysis also showed a significant decrease in polyunsaturated fatty acids in the seminal plasma of patients with SOA compared to controls. The sums of PUFA "aa" and "ae" were both decreased, indicating a reduced ability of desaturases to limit the saturation of fatty acids in the seminal plasma. Our findings are in accordance with the study by Conquer et al in men with asthenospermia<sup>39</sup> and could be related to the peroxidation phenomena linked to the oxidative stress in infertile patients.<sup>40</sup> The sperm membrane contains different unsaturated fatty acids, and its lipid structure is directly impacted by the lipid composition of the seminal plasma. Studies have reported significantly increased levels of saturated fatty acids in the sperm plasma membrane of infertile men.<sup>40</sup> Similarly, in animals, impaired sperm performance has been associated with a high level of saturated fatty acid in the sperm plasma membrane.<sup>41,42</sup>

On the other hand, we noted a significant decrease in six amino acids (glutamate, aspartate, methionine, tryptophan, proline, and alanine) in men with SOA compared to controls. Previous metabolomic studies have also reported a significant decrease in various amino acids, including the ones we identified, in the seminal plasma of men with male factor infertility.<sup>12,43</sup> Among these amino acids, glutamate is the most

abundant in the seminal plasma, and its concentration is correlated with the sperm concentration,<sup>31</sup> whereas aspartate is correlated with the number and motility of the sperm.<sup>16</sup> Both these amino acids have been repeatedly shown to be decreased in men with male factor infertility.<sup>7,14,16,42</sup> The decrease in only six out of all the amino acids analyzed constitutes an argument in favor of a specific deregulated metabolic or signaling pathway, instead of a proteostasis disturbance.

We also found four biogenic amines (spermine, spermidine, serotonin, and alpha-amino adipate) with reduced concentrations in men with SOA. Spermine and spermidine, found at the highest concentration in the seminal plasma, are thought to be responsible for its characteristic odor.<sup>44</sup> They are polyamines derived from arginine and play pleiotropic functions in genomic stability and expression, as well as in cell proliferation.<sup>43</sup> Spermine also has a role in sperm decapacitation, which allows the spermatozoa to perform its acrosomal reaction at the right time.<sup>46</sup> Spermine concentration in the seminal plasma has been positively correlated with sperm motility, and negatively correlated with anomalies of the intermediate piece.<sup>15,31</sup> Furthermore, the spermine/spermidine ratio, which measures the activity of the spermine synthase, was significantly lower in the SOA group, indicating an impairment of the polyamine biosynthetic pathway. Alpha-amino adipate is an intermediate metabolite of the lysine biosynthesis and, to date, has never been linked to sperm quality or male infertility.



We found decreased concentrations in men with SOA compared to controls, suggesting it is a potential new metabolomic biomarker of altered sperm parameters. Finally, serotonin was also significantly decreased in men with SOA, further confirming its important role in sperm physiology. Indeed, mammalian spermatozoa express a broad number of serotonin neuroreceptors, and serotonin has been shown to increase motility and tyrosine phosphorylation in human spermatozoa,<sup>47</sup> while selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) can impair semen quality.<sup>48</sup> This finding also confirms the ability of metabolomics to reflect the patient's exposome.

It is worth noting that five of the metabolites in our signature are involved in N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function. Indeed, glutamate, aspartate, and alpha-aminoadipate (a glutamate analogue) activate the NMDA receptor,<sup>49</sup> while spermine and spermidine inhibit it.<sup>50</sup> The NMDA receptor is thought to be involved in the acrosomal reaction,<sup>51</sup> and our finding could reflect a functional dysregulation of this receptor in the spermatozoa of infertile patients.

In conclusion, our study has shown a significant decrease in the concentration of 34% of the metabolites involved in the seminal plasma metabolome in men with severe oligoasthenospermia. Our metabolomic signature includes some molecules that have already been linked to altered sperm parameters in previous studies, albeit in a sparse way, and new ones. By using strict inclusion criteria based on the TMSC instead of the WHO classification, we believe our signature to be more specifically linked to male fertility. The signature includes several metabolic changes with different impacts on the sperm quality: a change in phospholipid composition and the saturation of their fatty acids that is potentially linked to the deterioration of sperm membranes; a carnitine deficiency that can negatively impact the energy production via oxidative phosphorylation and fatty acids oxidation; and a decreased level of amino acids and biogenic amines that can lead to dysregulated metabolic and signaling pathways. More and larger studies are needed to confirm these early metabolomic findings that offer new insights into the pathophysiology of male infertility, and could help in the development of future treatments.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to the individuals participating in this study. We acknowledge the support from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the University of Angers, and the Angers University Hospital.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflict of interest to disclose.

## AUTHORS' CONTRIBUTIONS

MB, PMP, and PR, the principal investigators, take primary responsibility for the paper. MB, CB, PMP, and PR contributed to the conception, design, and coordination of the research. MB, CB, PEB, OS, SC, LT, and JM CB contributed to the collection and analysis of data. MB, CB, OB, HEH, PR, and PMP contributed to writing the manuscript.

MB, CB, HEH, JM CB, PR, and PMP contributed to the revision of the article, and the final version was approved by all the authors.

## ORCID

Pascale May-Panloup  <https://orcid.org/0000-0001-7609-7265>

## REFERENCES

- Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLoS Med.* 2012;9(12):e1001356.
- Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015;13:37.
- Rolland M, Le Moal J, Wagner V, Royère D, De Mouzon J. Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26 609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. *Hum Reprod.* 2013;28(2):462-470.
- Levine H, Jørgensen N, Martino-Andrade A, et al. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Hum Reprod Update.* 2017;23(6):646-659.
- Mima M, Greenwald D, Ohlander S. Environmental Toxins and Male Fertility. *Curr Urol Rep.* 2018;19(7):50.
- Sinha A, Singh V, Yadav S. Multi-omics and male infertility: Status, integration and future prospects. *Front Biosci (Schol Ed).* 2017;9:375-394.
- Gupta A, Mahdi AA, Shukla KK, et al. Efficacy of Withania somnifera on seminal plasma metabolites of infertile males: A proton NMR study at 800MHz. *J Ethnopharmacol.* 2013;149(1):208-214.
- Gilany K, Moazeni-Pourasil RS, Jafarzadeh N, Savadi-Shiraz E. Metabolomics fingerprinting of the human seminal plasma of asthenozoospermic patients: Metabolome of Asthenozoospermic Men. *Mol Reprod Dev.* 2014;81(1):84-86.
- Jayaraman V, Ghosh S, Sengupta A, Srivastava S, Sonawat HM, Narayan PK. Identification of biochemical differences between different forms of male infertility by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31(9):1195-1204.
- Zhang X, Diao R, Zhu X, Li Z, Cai Z. Metabolic characterization of asthenozoospermia using nontargeted seminal plasma metabolomics. *Clin Chim Acta.* 2015;450:254-261.
- Zhao K, Zhang J, Xu Z, et al. Metabolomic Profiling of Human Spermatozoa in Idiopathic Asthenozoospermia Patients Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *BioMed Res Int.* 2018;2018:8327506.
- Chen L, Wen C-W, Deng M-J, et al. Metabolic and transcriptional changes in seminal plasma of asthenozoospermia patients. *Biomed Chromatogr.* 2020;34(3):e4769.
- Mumcu A, Karaer A, Dogan B, Tuncay G. Metabolomics analysis of seminal plasma in patients with idiopathic Oligoasthenoteratozoospermia using high-resolution NMR spectroscopy. *Andrology.* 2020;8(2):450-456.
- Mehrpour B, Chashmian S, Nobakht F, et al. Metabolic profiling of seminal plasma from teratozoospermia patients. *J Pharm Biomed Anal.* 2020;178:112903.
- Xu Y, Lu H, Wang Y, Zhang Z, Wu Q. Comprehensive metabolic profiles of seminal plasma with different forms of male infertility and their correlation with sperm parameters. *J Pharm Biomed Anal.* 2020;177:112888.
- Murgia F, Corda V, Serrenti M, et al. Seminal Fluid Metabolomic Markers of Oligozoospermic Infertility in Humans. *Metabolites.* 2020;10(2):64.
- World Health Organization, ed. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. World Health Organization; 2010.



18. Esteves SC, Zini A, Aziz N, Alvarez JG, Sabanegh ES Jr, Agarwal A. Critical Appraisal of World Health Organization's New Reference Values for Human Semen Characteristics and Effect on Diagnosis and Treatment of Subfertile Men. *Urology*. 2012;79(1):16-22.
19. Hamilton JAM, Cissen M, Brandes M, et al. Total motile sperm count: a better indicator for the severity of male factor infertility than the WHO sperm classification system. *Hum Reprod*. 2015;30(5):1110-1121.
20. Auger J. Assessing human sperm morphology: top models, underdogs or biometrics? *Asian J Androl*. 2010;12(1):36-46.
21. Kruger TF, Ackerman SB, Simmons KF, Swanson RJ, Brugo SS, Acosta AA. A Quick, Reliable Staining Technique for Human Sperm Morphology. *Arch Androl*. 1987;18(3):275-277.
22. Bouet P-E, Chao de la Barca JM, El Hachem H, et al. Metabolomics shows no impairment of the microenvironment of the cumulus-oocyte complex in women with isolated endometriosis. *Reprod Biomed Online*. 2019;39(6):885-892.
23. Jeulin C, Lewin LM. Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. *Hum Reprod Update*. 1996;2(2):87-102.
24. Matalliotakis I, Koumantaki Y, Evageliou A, Matalliotakis G, Goumenou A, Koumantakis E. L-carnitine levels in the seminal plasma of fertile and infertile men: correlation with sperm quality. *Int J Fertil Womens Med*. 2000;45(3):236-240.
25. Gürbüz B, Yaltı S, Fiçioğlu C, Zehir K. Relationship between semen quality and seminal plasma total carnitine in infertile men. *J Obstet Gynaecol*. 2003;23(6):653-656.
26. Li K, Li W, Huang Y. Determination of free L-carnitine in human seminal plasma by high performance liquid chromatography with pre-column ultraviolet derivatization and its clinical application in male infertility. *Clin Chim Acta*. 2007;378(1-2):159-163.
27. Sheikh N, Goodarzi M, Bab Al-Havaejee H, et al. L-carnitine level in seminal plasma of fertile and infertile men. *J Res Health Sci*. 2007;7(1):43-48.
28. Ahmed SD, Karira KA, Jagdesh AS. Role of L-carnitine in male infertility. *J Pak Med Assoc*. 2011;61(8):732-736.
29. Ahmed SD, Ahsan S, Iqbal T, Burney SI. Relationship of seminal free L-Carnitine with functional spermatozoal characteristics: Results from an observational study conducted in a tertiary care hospital of Karachi, Pakistan. *J Pak Med Assoc*. 2017;67(2):280-284.
30. Zöpfgen A, Priem F, Sudhoff F, et al. Relationship between semen quality and the seminal plasma components carnitine, alpha-glucosidase, fructose, citrate and granulocyte elastase in infertile men compared with a normal population. *Hum Reprod*. 2000;15(4):840-845.
31. Engel KM, Baumann S, Rolle-Kampczyk U, Schiller J, von Bergen M, Grunewald S. Metabolomic profiling reveals correlations between spermogram parameters and the metabolites present in human spermatozoa and seminal plasma. *PLoS One*. 2019;14(2):e0211679.
32. Ferramosca A, Focarelli R, Piomboni P, Coppola L, Zara V. Oxygen uptake by mitochondria in demembrated human spermatozoa: a reliable tool for the evaluation of sperm respiratory efficiency. *Int J Androl*. 2008;31(3):337-345.
33. Gibb Z, Lambourne SR, Quadrelli J, Smith ND, Aitken RJ. L-Carnitine and Pyruvate Are Prosurvival Factors During the Storage of Stallion Spermatozoa at Room Temperature. *Biol Reprod*. 2015;93(4):104.
34. Roldan ER, Fraggio C. Phospholipase A2 activation and subsequent exocytosis in the Ca<sup>2+</sup>/ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa. *J Biol Chem*. 1993;268(19):13962-13970.
35. Zanetti SR, Monclus MdLÁ, Rensetti DE, Fornés MW, Avelaño MI. Differential involvement of rat sperm choline glycerophospholipids and sphingomyelin in capacitation and the acrosomal reaction. *Biochimie*. 2010;92(12):1886-1894.
36. Wittmann A, Grimm MOW, Scherthan H, et al. Sphingomyelin Synthase 1 Is Essential for Male Fertility in Mice. *PLoS One*. 2016;11(10):e0164298.
37. Miesusset R, Bujan L, Mansat A, Pontonnier F, Grandjean H, Chap H. Glycerophosphocholine in seminal plasma of fertile and infertile men. *Int J Androl*. 1988;11(5):405-413.
38. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Rosecrans R, Perez-Pelaez M, Al-Hasani S, Zaneveld LJ. Chemical constituents of human seminal plasma: relationship to fertility. *Andrologia*. 1989;21(5):423-428.
39. Conquer JA, Martin JB, Tummon I, Watson L, Tekpetey F. Fatty acid analysis of blood serum, seminal plasma, and spermatozoa of normozoospermic vs. Asthenozoospermic males. *Lipids*. 1999;34(8):793-799.
40. Khosrowbeygi A, Zarghami N. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of oxidative stress biomarkers in subfertile males. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2007;77(2):117-121.
41. Macías García B, González Fernández L, Ortega Ferrusola C, et al. Membrane Lipids of the Stallion Spermatozoon in Relation to Sperm Quality and Susceptibility to Lipid Peroxidation. *Reprod Domest Anim*. 2011;46(1):141-148.
42. Tang L-X, Yuan D-J, Wang Q-L, et al. Association of decreased spermatozoa omega-3 fatty acid levels and increased oxidative DNA damage with varicocele in infertile men: a case control study. *Reprod Fertil Dev*. 2016;28(5):648-654.
43. Qiao S, Wu W, Chen M, et al. Seminal plasma metabolomics approach for the diagnosis of unexplained male infertility. *PLoS One*. 2017;12(8):e0181115.
44. Mann T. Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. *J Reprod Fertil*. 1974;37(1):179-188.
45. Pegg AE. Functions of Polyamines in Mammals. *J Biol Chem*. 2016;291(29):14904-14912.
46. Rubinstein S, Breitbart H. Role of spermine in mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biochem J*. 1991;278(1):25-28.
47. Jiménez-Trejo F, Tapia-Rodríguez M, Cerbón M, et al. Evidence of 5-HT components in human sperm: implications for protein tyrosine phosphorylation and the physiology of motility. *Reproduction*. 2012;144(6):677-685.
48. Safarinejad MR. Sperm DNA. Damage and Semen Quality Impairment After Treatment With Selective Serotonin Reuptake Inhibitors Detected Using Semen Analysis and Sperm Chromatin Structure Assay. *J Urol*. 2008;180(5):2124-2128.
49. Biscoe TJ, Evans RH, Francis AA, et al. D-α-Aminoadipate as a selective antagonist of amino acid-induced and synaptic excitation of mammalian spinal neurones. *Nature*. 1977;270(5639):743-745.
50. Rao TS, Cler JA, Oei EJ, et al. The polyamines, spermine and spermidine, negatively modulate N-methyl-D-aspartate (NMDA) and quisqualate receptor mediated responses in vivo: Cerebellar cyclic GMP measurements. *Neurochem Int*. 1990;16(2):199-206.
51. Hu JH, Yang NA, Ma YH, et al. Identification of Glutamate Receptors and Transporters in Mouse and Human Sperm. *J Androl*. 2004;25(1):140-146.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

**How to cite this article:** Boguenet M, Bocca C, Bouet P-E, et al. Metabolomic signature of the seminal plasma in men with severe oligoasthenospermia. *Andrology*. 2020;00:1-8. <https://doi.org/10.1111/andr.12882>



# Discussion

## 1. Le génome mitochondrial des spermatozoïdes

Nous avons confirmé un nombre de copies d'ADNmt plus élevé dans les spermatozoïdes de plus mauvaise qualité (OA et couche 40%), confortant la littérature. Deux hypothèses sont envisageables : soit il existe une dysfonction au cours de la spermatogenèse faisant que l'ADNmt est moins bien éliminé, soit il s'agit d'un phénomène de régulation compensatoire potentiellement liée à une anomalie de cet ADNmt comme cela a pu être suggéré chez la souris (Jiang *et al.*, 2017).

Nous avons séquencé le génome mitochondrial des spermatozoïdes, ce qui n'avait pas été réalisé jusqu'alors d'après la littérature.

Nous apportons un résultat novateur puisque nous montrons une fréquence de grands réarrangements plus importante dans l'ADNmt des spermatozoïdes de meilleure qualité. Nous émettons l'hypothèse d'une dégradation de l'ADNmt associée à son élimination dans les spermatozoïdes normaux en vue d'une transmission uniquement maternelle.

Les spermatozoïdes de plus mauvaise qualité présentent une quantité plus importante d'ADNmt avec une plus faible fréquence de grands réarrangements. Ces résultats nous permettent d'exclure l'hypothèse d'une augmentation du nombre de copies d'ADNmt dans ces spermatozoïdes en compensation d'une altération de cet ADNmt. L'hypothèse d'une dysfonction lors de la spermatogenèse entraînant un défaut de dégradation et d'élimination de l'ADNmt semble donc plus appropriée.

Plusieurs questions restent en suspens dans ce travail, la première porte sur le mécanisme dérégulé lors de la spermatogenèse qui ne permettrait pas une réduction correcte de la quantité d'ADNmt. La seconde question concerne le système de dégradation de l'ADNmt dans les spermatozoïdes normaux. Il serait intéressant d'explorer l'hypothèse de l'action d'une endonucléase mitochondriale (EndoG), comme celle décrite chez les invertébrés (DeLuca and O'Farrell, 2012).

Ce résultat est intéressant à mettre en perspective avec l'utilisation de l'ICSI dans des OA sévères pour laquelle la transmission de copies d'ADNmt paternel pourrait être envisagée, notamment en cas de dépassement des capacités d'élimination ovocytaire (Eker *et al.*, 2019; Sutovsky *et al.*, 2004). Une possible double transmission de l'ADNmt est une question encore débattue aujourd'hui, certaines études ont mis en évidence la présence d'ADNmt d'origine paternel dans des embryons anormaux (St John *et al.*, 2000), chez un homme atteint d'une myopathie mitochondriale (Schwartz and Vissing, 2002) et chez des individus sains (Luo *et al.*, 2018) alors que d'autres non (Pyle *et al.*, 2015; Rius *et al.*, 2019; Schwartz and Vissing, 2004). Néanmoins, certains auteurs insistent sur le risque de conclure à une hétéroplasmie et à une transmission biparentale, en raison d'une mauvaise prise en compte des pseudogènes dont certains pourraient ressembler à l'ADNmt paternel (Lutz-Bonengel and Parson, 2019; Wei *et al.*, 2020).



Afin d'aller plus loin dans l'évaluation du génome mitochondrial des spermatozoïdes, il faudrait s'affranchir de l'étape d'amplification. Le séquençage haut débit de 2<sup>ème</sup> génération est basé sur une amplification initiale puis une fragmentation de l'ADN amplifié pour ne lire que des fragments courts de moins de 300pb. Ce type de séquençage représente une limite puisque les petits fragments d'ADNmt en cours de dégradation et certaines duplications ne sont, de fait, pas pris en compte. Ainsi il n'est pas possible d'avoir une représentation exhaustive de l'ensemble de l'ADNmt d'un échantillon. Le séquençage de 3<sup>ème</sup> génération permettrait de s'affranchir de ces limites, c'est le cas de Pacific biosciences (Alkanaq *et al.*, 2019) et Nanopore (Zascavage, Hall, *et al.*, 2019; Zascavage, Thorson, *et al.*, 2019). Ces technologies permettent de séquencer entièrement l'ADNmt en tant que molécule unique, sans étape d'amplification ni de fragmentation et donc d'analyser les réarrangements dans leur intégralité. Cependant les outils bio-informatiques déjà développés ne sont pas compatibles avec le séquençage de 3<sup>ème</sup> génération puisque l'outil eKLIPse fonctionne sur la base du soft-clipping. Cette nouvelle technologie nécessite des améliorations dans le domaine de la bio-informatique sur l'analyse des données.

## 2. La métabolomique dans le cadre d'une infertilité masculine

Nous avons identifié une signature métabolomique dans le liquide séminal d'hommes OA sévères comprenant 37 métabolites sous-régulés. Cette signature met en évidence une association entre l'altération de la qualité spermatique et des modifications de la membrane plasmique du spermatozoïde, de la production énergétique et des voies métaboliques et de signalisation.

Il aurait été intéressant d'analyser le métabolome des spermatozoïdes de notre cohorte pour comprendre les interactions entre spermatozoïdes et le liquide séminal. Ces données auraient pu compléter l'étude d'Engel qui utilisait la même technique métabolomique (Engel *et al.*, 2019).

Cette première étude nous encourage à poursuivre l'étude métabolomique du liquide séminal à la recherche de biomarqueurs qui pourraient s'avérer très utiles dans certaines pathologies comme l'azoospermie.

Il existe deux catégories d'azoospermie : l'azoospermie obstructive (AO) et l'azoospermie non obstructive (ou sécrétoire) (ANO). Aujourd'hui il est possible de différencier une AO d'une ANO par un dosage biochimique du liquide séminal notamment (cf paragraphe 1.3.2). En revanche, en cas de ANO il n'est pas possible de prévoir l'existence d'une spermatogenèse résiduelle. Seule la biopsie testiculaire permet de conclure, et dans 50% des cas seulement elle permet de retrouver et de congeler des spermatozoïdes pour la réalisation ultérieure d'une AMP. L'intérêt de trouver des biomarqueurs non invasifs pour prédire le succès d'une TESE (Testicular Sperm Extraction) est donc extrêmement important et l'étude du métabolome du liquide séminal est particulièrement intéressante dans ce contexte.

A notre connaissance, seulement trois études se sont intéressées à la métabolomique du liquide séminal chez les ANO afin de déterminer des potentiels marqueurs d'une spermatogenèse active (Gilany *et al.*, 2017, 2018; Zhang *et al.*, 2017). L'équipe de Gilany *et al.*, ont travaillé sur deux cohortes de patients ANO conduisant à une





TESE positive ou négative. La première étude a identifié 36 métabolites discriminants les deux groupes d'ANO, mais seulement 5 étaient répertoriés dans la base de données Human Metabolome database. La seconde étude a suggéré la voie des polyols comme base de recherche pour identifier des biomarqueurs. L'équipe de Zhang *et al*, ont identifiés 24 métabolites comme des potentiels biomarqueurs, impliqués dans les voies de la production énergétique, le stress oxydatif et l'apoptose dans la spermatogenèse.

Même si le spermogramme reste l'examen central de l'exploration de l'infertilité masculine, la métabolomique devrait contribuer à mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans des types particuliers d'altérations spermatiques comme les azoospermies ou les infertilités inexpliquées et à déterminer des biomarqueurs utiles dans la caractérisation de ces pathologies.



## Conclusion et perspectives

Mon travail de thèse s'est centré sur l'exploration du fonctionnement spermatique et l'infertilité masculine en utilisant des techniques de nouvelle génération : métabolomique et NGS.

L'objectif central, s'inscrivait dans la thématique de notre équipe de recherche, à savoir le rôle de la mitochondrie dans la reproduction et en l'occurrence dans la fertilité masculine.

Malgré les différentes difficultés que nous avons rencontrées, du fait de la spécificité de nos échantillons (quantité de matériel et altération de l'ADNmt notamment) et de la période traversée (arrêt des manipulations en raison du Covid), nous ouvrons des pistes sur l'exploration du liquide séminal par les techniques de métabolomique et apportons des connaissances nouvelles sur la physiologie mitochondriale au cours de la spermatogenèse en lien avec la transmission uniparentale de l'ADNmt.

Ce travail s'est poursuivi :

- Sur le versant métabolomique, par l'exploration du liquide séminal de patients présentant une azoospermie ou atteints d'un cancer testiculaire
- Sur le versant mitochondrial en étoffant les premiers résultats obtenus par deux étudiantes en master 2 que j'ai co-encadrées. Brièvement :

La première étude, menée par Jeanne Dasty, consistait à quantifier l'ADNmt des spermatozoïdes dans un modèle murin portant une mutation dans le gène mitochondrial *Mt-Nd6*. Nous cherchions à compléter mon travail de thèse en déterminant si la présence de cette mutation était associée à une augmentation du contenu en ADNmt qui pourrait expliquer la persistance de la fertilité de ces souris. Nous n'avons pas mis en évidence de phénomène compensatoire dans ce contexte. Néanmoins ce résultat ne peut pas être généralisé à toutes les mutations de l'ADNmt.

La seconde étude, réalisée par Pauline Teixeira, a porté sur la caractérisation mitochondriale des spermatozoïdes humains par une approche de microscopie à fluorescence dite de super résolution. Les nouveaux outils d'imagerie, offrent la possibilité d'analyser de manière très fine les relations entre le contenu en ADNmt, la morphologie et la distribution des mitochondries, ainsi que la localisation des protéines mitochondriales. L'objectif était de mettre au point la technique d'imagerie sur les spermatozoïdes et pour cela nous nous sommes intéressés au marquage de l'ADNmt. Ce travail a permis, pour la première fois, d'observer la disposition de l'ADNmt dans les mitochondries spermatiques sur cellule isolée. Les résultats obtenus renforcent nos résultats de dPCR puisque nous mettons en évidence une augmentation de la quantité d'ADNmt chez les spermatozoïdes avec une morphologie anormale en comparaison aux spermatozoïdes normaux morphologiquement.





## Bibliographie

- Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2015;**13**:37.
- Al Smadi MA, Hammadeh ME, Solomayer E, Batiha O, Altalib MM, Jahmani MY, Shboul MA, Nusair B, Amor H. Impact of Mitochondrial Genetic Variants in ND1, ND2, ND5, and ND6 Genes on Sperm Motility and Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) Outcomes. *Reprod Sci* 2021. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s43032-020-00449-3>. Accessed January 25, 2021.
- Al Zoubi MS, Al-Batayneh K, Alsmadi M, Rashed M, Al-Trad B, Al Khateeb W, Aljabali A, Otoum O, Al-Talib M, Batiha O. 4,977-bp human mitochondrial DNA deletion is associated with asthenozoospermic infertility in Jordan. *Andrologia* 2020;**52**:e13379.
- Alkanaq AN, Hamanaka K, Sekiguchi F, Taguri M, Takata A, Miyake N, Miyatake S, Mizuguchi T, Matsumoto N. Comparison of mitochondrial DNA variants detection using short- and long-read sequencing. *J Hum Genet* 2019;**64**:1107–1116.
- Amaral A, Castillo J, Ramalho-Santos J, Oliva R. The combined human sperm proteome: cellular pathways and implications for basic and clinical science. *Human Reproduction Update* 2014;**20**:40–62.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981;**290**:457–465.
- Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 1999;**23**:147.
- Archer SL. Mitochondrial Dynamics — Mitochondrial Fission and Fusion in Human Diseases. Longo DL (ed). *N Engl J Med* 2013;**369**:2236–2251.
- Auger J. Assessing human sperm morphology: top models, underdogs or biometrics? *Asian Journal of Andrology* 2010;**12**:36–46.
- Balciuniene J, Balciunas D. A Nuclear mtDNA Concatemer (Mega-NUMT) Could Mimic Paternal Inheritance of Mitochondrial Genome. *Front Genet* 2019;**10**:518.
- Bansal SK, Gupta N, Sankhwar SN, Rajender S. Differential Genes Expression between Fertile and Infertile Spermatozoa Revealed by Transcriptome Analysis. *PLoS One* 2015;**10**:e0127007.
- Barberet J, Boucret L, Fauque P, May-Panloup P. Assistance médicale à la procréation : techniques actuelles et nouveaux horizons. *Revue Francophone des Laboratoires* 2018;**2018**:43–51.
- Basu S, Xie X, Uhler JP, Hedberg-Oldfors C, Milenkovic D, Baris OR, Kimoloi S, Matic S, Stewart JB, Larsson N-G, et al. Accurate mapping of mitochondrial DNA deletions and duplications using deep sequencing. *PLoS Genet* 2020;**16**:e1009242.
- Benda C. Ueber die Spermatogenese der Vertebraten und höherer Evertebraten, II. Theil: Die Histiogenese der Spermien. In: *Archiv Für Anatomie Und Physiologie*. 1898, 393–398.
- Boguenet M, Bouet P-E, Spiers A, Reynier P, May-Panloup P. Mitochondria: their role in spermatozoa and in male infertility. *Human Reproduction Update* 2021:dmab001.
- Bonekamp NA, Larsson N-G. SnapShot: Mitochondrial Nucleoid. *Cell* 2018;**172**:388–388.e1.
- Bris C. Influence de la génétique mitochondriale en pathologie Apport des techniques de séquençage haut débit. 2017.

- Bris C, Desquirit-Dumas V, Gueguen N, Amati-Bonneau P, Reynier P, Procaccio V. Pathologies liées à des mutations de l'ADN mitochondrial. *Revue Francophone des Laboratoires* 2018;**2018**:71–80.
- Caballero-Campo P, Lira-Albarrán S, Barrera D, Borja-Cacho E, Godoy-Morales HS, Rangel-Escareño C, Larrea F, Chirinos M. Gene transcription profiling of astheno- and normo-zoospermic sperm subpopulations. *Asian J Androl* 2020;**22**:608–615.
- Chandel NS, Schumacker PT. Cells depleted of mitochondrial DNA ( $p^0$ ) yield insight into physiological mechanisms. *FEBS Letters* 1999;**454**:173–176.
- Chen T, He J, Huang Y, Zhao W. The generation of mitochondrial DNA large-scale deletions in human cells. *J Hum Genet* 2011;**56**:689–694.
- Cornwall GA. New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update* 2009;**15**:213–227.
- Dacheux J-L, Dacheux F. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction* 2014;**147**:R27–42.
- Dahadhah FW, Jaweesh MS, Al Zoubi MS, Alarjah MIA, Hammadeh ME, Amor H. Mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide hydride dehydrogenase (NADH) subunit 4 (MTND4) polymorphisms and their association with male infertility. *J Assist Reprod Genet* 2021.
- Dahadhah FW, Saleh Jaweesh M, Al Zoubi MS, Issam Abu Alarjah M, Hammadeh ME, Amor H. Lack of association between single polymorphic variants of the mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase 3, and 4L (MT-ND3 and MT-ND4L) and male infertility. *Andrologia* 2021;**53**:e14139.
- Damas J, Carneiro J, Amorim A, Pereira F. MitoBreak: the mitochondrial DNA breakpoints database. *Nucleic Acids Res* 2014;**42**:D1261–1268.
- Damas J, Samuels DC, Carneiro J, Amorim A, Pereira F. Mitochondrial DNA Rearrangements in Health and Disease-A Comprehensive Study. *Human Mutation* 2014;**35**:1–14.
- De Martino C, Floridi A, Marcante ML, Malorni W, Barcellona PS, Bellocci M, Silvestrini B. Morphological, histochemical and biochemical studies on germ cell mitochondria of normal rats. *Cell and Tissue Research* 1979;**196**:1–22.
- DeLuca SZ, O'Farrell PH. Barriers to Male Transmission of Mitochondrial DNA in Sperm Development. *Developmental Cell* 2012;**22**:660–668.
- D'Souza AR, Minczuk M. Mitochondrial transcription and translation: overview. *Essays Biochem* 2018;**62**:309–320.
- Eker C, Celik HG, Balci BK, Gunel T. Investigation of human paternal mitochondrial DNA transmission in ART babies whose fathers with male infertility. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2019;**236**:183–192.
- Engel KM, Baumann S, Rolle-Kampczyk U, Schiller J, von Bergen M, Grunewald S. Metabolomic profiling reveals correlations between spermiogram parameters and the metabolites present in human spermatozoa and seminal plasma. Amendola R (ed). *PLOS ONE* 2019;**14**:e0211679.
- Exploration de la fonction de reproduction : versant masculin*. Bioforma. 2009.
- Falkenberg M. Mitochondrial DNA replication in mammalian cells: overview of the pathway. Garone C, Minczuk M (eds). *Essays in Biochemistry* 2018;**62**:287–296.
- Falkenberg M, Gustafsson CM. Mammalian mitochondrial DNA replication and mechanisms of deletion formation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2020;**55**:509–524.

- Falkenberg M, Larsson N-G, Gustafsson CM. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu Rev Biochem* 2007;**76**:679–699.
- Fawcett DW. A Comparative View of Sperm Ultrastructure. *Biology of Reproduction* 1970;**2**:90–127.
- Feng G-F, Zhang J, Feng L-M, Shen N-X, Li L-J, Zhu Y-M. Mitochondrial DNA haplogroup associated with sperm motility in the Han population. *Asian J Androl* 2013;**15**:630–633.
- Fiehn O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp Funct Genomics* 2001;**2**:155–168.
- Fu L, Liu Y, An Q, Zhang J, Tong Y, Zhou F, Lu W, Liang X, Gu Y. Glycolysis metabolic changes in sperm cryopreservation based on a targeted metabolomic strategy. *Int J Clin Exp Pathol* 2019;**12**:1775–1781.
- Geoffroy-Siraudin C, Loundou AD, Romain F, Achard V, Courbière B, Perrard M-H, Durand P, Guichaoua M-R. Decline of semen quality among 10 932 males consulting for couple infertility over a 20-year period in Marseille, France. *Asian J Androl* 2012;**14**:584–590.
- Gilany K, Jafarzadeh N, Mani-Varnosfaderani A, Minai-Tehrani A, Sadeghi MR, Darbandi M, Darbandi S, Amini M, Arjmand B, Pahlevanzadeh Z. Metabolic Fingerprinting of Seminal Plasma from Non-obstructive Azoospermia Patients: Positive Versus Negative Sperm Retrieval. *J Reprod Infertil* 2018;**19**:109–114.
- Gilany K, Mani-Varnosfaderani A, Minai-Tehrani A, Mirzajani F, Ghassempour A, Sadeghi MR, Amini M, Rezadoost H. Untargeted metabolomic profiling of seminal plasma in nonobstructive azoospermia men: A noninvasive detection of spermatogenesis. *Biomed Chromatogr* 2017;**31**.
- Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, Hirano M, Koga Y, McFarland R, Suomalainen A, Thorburn DR, Zeviani M, Turnbull DM. Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primers* 2016;**2**:16080.
- Gorman GS, Schaefer AM, Ng Y, Gomez N, Blakely EL, Alston CL, Feeney C, Horvath R, Yu-Wai-Man P, Chinnery PF, et al. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann Neurol* 2015;**77**:753–759.
- Goudenège D, Bris C, Hoffmann V, Desquirit-Dumas V, Jardel C, Rucheton B, Bannwarth S, Paquis-Flucklinger V, Lebre AS, Colin E, et al. eKLIPse: a sensitive tool for the detection and quantification of mitochondrial DNA deletions from next-generation sequencing data. *Genet Med* 2019;**21**:1407–1416.
- Gray MW. Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;**4**:a011403.
- Gray MW, Burger G, Lang BF. Mitochondrial Evolution. *Science* 1999;**283**:1476–1481.
- Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 1998;**9**:411–416.
- Hamilton JAM, Cissen M, Brandes M, Smeenk MJ, de Bruin JP, Kremer JAM, Nelen WLD, Hamilton CJM. Total motile sperm count: a better indicator for the severity of male factor infertility than the WHO sperm classification system. *Human Reproduction* 2015;**30**:1110–1121.
- Hao S-L, Ni F-D, Yang W-X. The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis. *Gene* 2019;**706**:201–210.
- Hauswirth W, Laipis PJ. Transmission genetics of mammalian mitochondria: a molecular model and experimental evidence. In: *Achievement and Perspectives of Mitochondrial Research*. Vol 2. Elsevier Science Publishers, 1985, 49–59.
- Ho H-C, Wey S. Three dimensional rendering of the mitochondrial sheath morphogenesis during mouse spermiogenesis. *Microscopy Research and Technique* 2007;**70**:719–723.

- Jiang M, Kauppila TES, Motori E, Li X, Atanasov I, Folz-Donahue K, Bonekamp NA, Albarran-Gutierrez S, Stewart JB, Larsson N-G. Increased Total mtDNA Copy Number Cures Male Infertility Despite Unaltered mtDNA Mutation Load. *Cell Metabolism* 2017;**26**:429-436.e4.
- Jodar M, Soler-Ventura A, Oliva R, Molecular Biology of Reproduction and Development Research Group. Semen proteomics and male infertility. *J Proteomics* 2017;**162**:125-134.
- Joshi M, Rajender S. Long non-coding RNAs (lncRNAs) in spermatogenesis and male infertility. *Reprod Biol Endocrinol* 2020;**18**:103.
- Kaguni LS. DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase. *Annu Rev Biochem* 2004;**73**:293-320.
- Krausz C, Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility. *Nat Rev Urol* 2018;**15**:369-384.
- Krishnan KJ, Reeve AK, Samuels DC, Chinnery PF, Blackwood JK, Taylor RW, Wanrooij S, Spelbrink JN, Lightowlers RN, Turnbull DM. What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? *Nat Genet* 2008;**40**:275-279.
- Kruger TF, Ackerman SB, Simmons KF, Swanson RJ, Brugo SS, Acosta AA. A Quick, Reliable Staining Technique for Human Sperm Morphology. *Archives of Andrology* 1987;**18**:275-277.
- Krzastek SC, Smith RP, Kovac JR. Future diagnostics in male infertility: genomics, epigenetics, metabolomics and proteomics. *Transl Androl Urol* 2020;**9**:S195-S205.
- Kukat C, Davies KM, Wurm CA, Spähr H, Bonekamp NA, Kühl I, Joos F, Polosa PL, Park CB, Posse V, et al. Cross-strand binding of TFAM to a single mtDNA molecule forms the mitochondrial nucleoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2015;**112**:11288-11293.
- Kukat C, Wurm CA, Spähr H, Falkenberg M, Larsson N-G, Jakobs S. Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;**108**:13534-13539.
- Levine H, Jørgensen N, Martino-Andrade A, Mendiola J, Weksler-Derri D, Mindlis I, Pinotti R, Swan SH. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Human Reproduction Update* 2017;**23**:646-659.
- Levy R, Sermondade N, Hafhouf E, Dupont C, Benzacken B, Aknin-Seifer I. À la recherche d'une étiologie génétique chez les hommes infertiles. 2010;**12**:4-11.
- Luo S, Valencia CA, Zhang J, Lee N-C, Slone J, Gui B, Wang X, Li Z, Dell S, Brown J, et al. Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018;**115**:13039-13044.
- Lutz-Bonengel S, Niederstätter H, Naue J, Koziel R, Yang F, Sängler T, Huber G, Berger C, Pflugradt R, Strobl C, et al. Evidence for multi-copy Mega-NUMTs in the human genome. *Nucleic Acids Res* 2021;**49**:1517-1531.
- Lutz-Bonengel S, Parson W. No further evidence for paternal leakage of mitochondrial DNA in humans yet. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019;**116**:1821-1822.
- Margulis L. *Origin of Eukaryotic Cells: Evidence and Research Implications for a Theory of the Origin and Evolution of Microbial, Plant, and Animal Cells on the Precambrian Earth*. Yale University Press, 1970.
- Marshall C, Parson W. Interpreting NUMTs in forensic genetics: Seeing the forest for the trees. *Forensic Sci Int Genet* 2021;**53**:102497.
- Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. Low N (ed). *PLoS Medicine* 2012;**9**:e1001356.



- May-Panloup P, Boguenet M, El Hachem H, Bouet P-E, Reynier P. Embryo and Its Mitochondria. *Antioxidants* 2021;**10**:139.
- May-Panloup P, Desquiere V, Morinière C, Ferré-L'Hôtellier V, Lemerle S, Boucret L, Lehais S, Chao de la Barca JM, Descamps P, Procaccio V, et al. Mitochondrial macro-haplogroup JT may play a protective role in ovarian ageing. *Mitochondrion* 2014;**18**:1–6.
- Meinhardt A, Wilhelm B, Seitz J. Expression of mitochondrial marker proteins during spermatogenesis. *Human Reproduction Update* 1999;**5**:108–119.
- Montjean D, De La Grange P, Gentien D, Rapinat A, Belloc S, Cohen-Bacrie P, Menezo Y, Benkhalifa M. Sperm transcriptome profiling in oligozoospermia. *J Assist Reprod Genet* 2012;**29**:3–10.
- Mortimer D. The functional anatomy of the human spermatozoon: relating ultrastructure and function. *Mol Hum Reprod* 2018;**24**:567–592.
- Nass MM, Nass S. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. I. Fixation and electron staining reactions. *J Cell Biol* 1963;**19**:593–611.
- Nissanka N, Minczuk M, Moraes CT. Mechanisms of Mitochondrial DNA Deletion Formation. *Trends Genet* 2019;**35**:235–244.
- Otani H, Tanaka O, Kasai K-I, Yoshioka T. Development of mitochondrial helical sheath in the middle piece of the mouse spermatid tail: Regular dispositions and synchronized changes. *The Anatomical Record* 1988;**222**:26–33.
- Ott M, Amunts A, Brown A. Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis. *Annu Rev Biochem* 2016;**85**:77–101.
- Otten ABC, Smeets HJM. Evolutionary defined role of the mitochondrial DNA in fertility, disease and ageing. *Hum Reprod Update* 2015;**21**:671–689.
- Paiva C, Amaral A, Rodriguez M, Canyellas N, Correig X, Ballescà JL, Ramalho-Santos J, Oliva R. Identification of endogenous metabolites in human sperm cells using proton nuclear magnetic resonance ((1) H-NMR) spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Andrology* 2015;**3**:496–505.
- Panner Selvam MK, Finelli R, Agarwal A, Henkel R. Proteomics and metabolomics — Current and future perspectives in clinical andrology. *Andrologia* 2020. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/and.13711>. Accessed July 6, 2020.
- Perez-Toralla K, Pekin D, Bartolo J-F, Garlan F, Nizard P, Laurent-Puig P, Baret J-C, Taly V. PCR digitale en micro-compartiments: I. Détection sensible de séquences d'acides nucléiques rares. *Med Sci (Paris)* 2015;**31**:84–92.
- Persson Ö, Muthukumar Y, Basu S, Jenner L, Uhler JP, Berglund A-K, McFarland R, Taylor RW, Gustafsson CM, Larsson E, et al. Copy-choice recombination during mitochondrial L-strand synthesis causes DNA deletions. *Nat Commun* 2019;**10**:759.
- Puertas MJ, González-Sánchez M. Insertions of mitochondrial DNA into the nucleus-effects and role in cell evolution. *Genome* 2020;**63**:365–374.
- Pyle A, Hudson G, Wilson IJ, Coxhead J, Smertenko T, Herbert M, Santibanez-Koref M, Chinnery PF. Extreme-Depth Re-sequencing of Mitochondrial DNA Finds No Evidence of Paternal Transmission in Humans. Larsson N-G (ed). *PLoS Genet* 2015;**11**:e1005040.
- Rahman J, Rahman S. Mitochondrial medicine in the omics era. *Lancet* 2018;**391**:2560–2574.
- Ramalho-Santos J, Schatten G, Moreno RD. Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. *Biol Reprod* 2002;**67**:1043–1051.

- Ramalho-Santos J, Varum S, Amaral S, Mota PC, Sousa AP, Amaral A. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Human Reproduction Update* 2009;**15**:553–572.
- Rantanen A, Jansson M, Oldfors A, Larsson N-G. Downregulation of Tfam and mtDNA copy number during mammalian spermatogenesis. *Mammalian Genome* 2001;**12**:787–792.
- Rato L, Alves MG, Socorro S, Duarte AI, Cavaco JE, Oliveira PF. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nat Rev Urol* 2012;**9**:330–338.
- Rius R, Cowley MJ, Riley L, Puttick C, Thorburn DR, Christodoulou J. Biparental inheritance of mitochondrial DNA in humans is not a common phenomenon. *Genet Med* 2019;**21**:2823–2826.
- Robberson DL, Kasamatsu H, Vinograd J. Replication of mitochondrial DNA. Circular replicative intermediates in mouse L cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972;**69**:737–741.
- Roger AJ, Muñoz-Gómez SA, Kamikawa R. The Origin and Diversification of Mitochondria. *Curr Biol* 2017;**27**:R1177–R1192.
- Rolland M, Le Moal J, Wagner V, Royère D, De Mouzon J. Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26 609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. *Human Reproduction* 2013;**28**:462–470.
- Russell OM, Gorman GS, Lightowlers RN, Turnbull DM. Mitochondrial Diseases: Hope for the Future. *Cell* 2020;**181**:168–188.
- Schwartz M, Vissing J. Paternal Inheritance of Mitochondrial DNA. *The New England Journal of Medicine* 2002;5.
- Schwartz M, Vissing J. No evidence for paternal inheritance of mtDNA in patients with sporadic mtDNA mutations. *J Neurol Sci* 2004;**218**:99–101.
- Sinha A, Singh V, Yadav S. Multi-omics and male infertility status integration and future prospects. *Front Biosci* 2017;**9**:375–394.
- Sissler M, Hashem Y. Mitochondrial assembly comes into view. *Nat Struct Mol Biol* 2021;**28**:631–633.
- Song W-H, Yi Y-J, Sutovsky M, Meyers S, Sutovsky P. Autophagy and ubiquitin–proteasome system contribute to sperm mitophagy after mammalian fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;**113**:E5261–E5270.
- St John J, Sakkas D, Dimitriadis K, Barnes A, Maclin V, Ramey J, Barratt C, Jonge CD. Failure of elimination of paternal mitochondrial DNA in abnormal embryos. *The Lancet* 2000;**355**:200.
- Stanton PG. Regulation of the blood-testis barrier. *Semin Cell Dev Biol* 2016;**59**:166–173.
- Suomalainen A, Isohanni P. Mitochondrial DNA depletion syndromes--many genes, common mechanisms. *Neuromuscul Disord* 2010;**20**:429–437.
- Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 1999;**402**:371–372.
- Sutovsky P, Tengowski MW, Navara CS, Zoran SS, Schatten G. Mitochondrial sheath movement and detachment in mammalian, but not nonmammalian, sperm induced by disulfide bond reduction. *Mol Reprod Dev* 1997;**47**:79–86.
- Sutovsky P, Van Leyen K, McCauley T, Day BN, Sutovsky M. Degradation of paternal mitochondria after fertilization: implications for heteroplasmy, assisted reproductive technologies and mtDNA inheritance. *Reproductive BioMedicine Online* 2004;**8**:24–33.

- Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial M-L, Ducot B, Lansac J, Lopes P, Tabaste J-M, Spira A. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1 850 000) of three French regions (1988–1989)\*. *Human Reproduction* 1991;**6**:811–816.
- Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem* 2018;**62**:341–360.
- Touré A, Martinez G, Kherraf Z-E, Cazin C, Beurois J, Arnoult C, Ray PF, Coutton C. The genetic architecture of morphological abnormalities of the sperm tail. *Hum Genet* 2020. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00439-020-02113-x>. Accessed September 1, 2020.
- Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, Flohé L. Dual Function of the Selenoprotein PHGPx During Sperm Maturation. *Science* 1999;**285**:1393–1396.
- Varuzhanyan G, Chan DC. Mitochondrial dynamics during spermatogenesis. *J Cell Sci* 2020;**133**.
- Varuzhanyan G, Chen H, Rojansky R, Ladinsky MS, McCaffery JM, Chan DC. Mitochondrial fission factor (Mff) is required for organization of the mitochondrial sheath in spermatids. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2021;**1865**:129845.
- Varuzhanyan G, Ladinsky MS, Yamashita S, Abe M, Sakimura K, Kanki T, Chan DC. *Fis1* ablation in the male germline disrupts mitochondrial morphology and mitophagy, and arrests spermatid maturation. *Development* 2021;**148**:dev199686.
- Varuzhanyan G, Rojansky R, Sweredoski MJ, Graham RL, Hess S, Ladinsky MS, Chan DC. Mitochondrial fusion is required for spermatogonial differentiation and meiosis. *Elife* 2019;**8**:e51601.
- Vashisht A, Gahlay GK. Using miRNAs as diagnostic biomarkers for male infertility: opportunities and challenges. *Mol Hum Reprod* 2020;**26**:199–214.
- Virtanen HE, Jørgensen N, Toppari J. Semen quality in the 21st century. *Nat Rev Urol* 2017;**14**:120–130.
- Wallace DC. Mitochondrial genetic medicine. *Nat Genet* 2018;**50**:1642–1649.
- Wei W, Pagnamenta AT, Gleadall N, Sanchis-Juan A, Stephens J, Broxholme J, Tuna S, Odhams CA, Fratter C, Turro E, et al. Nuclear-mitochondrial DNA segments resemble paternally inherited mitochondrial DNA in humans. *Nat Commun* 2020;**11**:1740.
- Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, Guo AC, Liang K, Vázquez-Fresno R, Sajed T, Johnson D, Li C, Karu N, et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res* 2018;**46**:D608–D617.
- World Health Organization (ed). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 5th ed. Geneva: World Health Organization, 2010.
- World Health Organization. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen Sixth Edition*. 6th ed. Geneva: World Health Organization, 2021.
- Zascavage RR, Hall CL, Thorson K, Mahmoud M, Sedlazeck FJ, Planz JV. Approaches to Whole Mitochondrial Genome Sequencing on the Oxford Nanopore MinION. *Curr Protoc Hum Genet* 2019;**104**:e94.
- Zascavage RR, Thorson K, Planz JV. Nanopore sequencing: An enrichment-free alternative to mitochondrial DNA sequencing. *Electrophoresis* 2019;**40**:272–280.
- Zhang J, Wang Q, Wang M, Jiang M, Wang Y, Sun Y, Wang J, Xie T, Tang C, Tang N, et al. GASZ and mitofusin-mediated mitochondrial functions are crucial for spermatogenesis. *EMBO Rep* 2016;**17**:220–234.
- Zhang Z, Zhang Y, Liu C, Zhao M, Yang Y, Wu H, Zhang H, Lin H, Zheng L, Jiang H. Serum Metabolomic Profiling Identifies Characterization of Non-Obstructive Azoospermic Men. *Int J Mol Sci* 2017;**18**:E238.

Zhao K, Zhang J, Xu Z, Xu Y, Xu A, Chen W, Miao C, Liu S, Wang Z, Jia R. Metabolomic Profiling of Human Spermatozoa in Idiopathic Asthenozoospermia Patients Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *BioMed Research International* 2018;**2018**:1-8.



# Tables des illustrations

|                                                                                                    |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 1 : Représentation de la prévalence de l'infertilité. ....                                  | 1   |
| Figure 2 : Anatomie de l'appareil génital chez l'homme. ....                                       | 1   |
| Figure 3 : La spermatogenèse. ....                                                                 | 3   |
| Figure 4 : Les étapes de la spermiogenèse. ....                                                    | 3   |
| Figure 5: Structure d'un spermatozoïde. ....                                                       | 5   |
| Figure 6 : Représentation des anomalies spermatiques de l'infertilité masculine. ....              | 9   |
| Figure 7 : Marqueurs biochimiques du liquide séminal. ....                                         | 11  |
| Figure 8 : La cascade des OMICs. ....                                                              | 11  |
| Figure 9 : Schéma de la structure mitochondriale. ....                                             | 17  |
| Figure 10 : Métabolisme énergétique mitochondrial. ....                                            | 17  |
| Figure 11 : Représentation de l'ADNmt et sa région non codante. ....                               | 21  |
| Figure 12 : Schéma du réplisome. ....                                                              | 23  |
| Figure 13 : Réplication de l'ADNmt d'après le modèle de déplacement de brin. ....                  | 23  |
| Figure 14 : Transmission mitochondriale maternelle. ....                                           | 25  |
| Figure 15 : Représentation des haplogroupes mitochondriaux. ....                                   | 25  |
| Figure 16 : Symptômes cliniques retrouvés dans les pathologies mitochondriales. ....               | 27  |
| Figure 17 : Notion d'hétéroplasmie et d'homoplasmie. ....                                          | 29  |
| Figure 18 : Mutations ponctuelles et délétion commune de l'ADNmt. ....                             | 29  |
| Figure 19 : Formation des délétions. ....                                                          | 31  |
| Figure 20 : Formation de l'hélice mitochondriale au cours de la spermiogenèse chez la souris. .... | 33  |
| Figure 21 : Morphologie mitochondriale et besoins énergétiques lors de la spermatogenèse. ....     | 35  |
| Figure 22 : Préparation du sperme. ....                                                            | 67  |
| Figure 23 : Comparaison de la PCR quantitative et de la PCR digitale. ....                         | 67  |
| Figure 24 : Etapes du séquençage. ....                                                             | 71  |
| Figure 25 : Fonctionnement de l'outil eKLipse. ....                                                | 73  |
| Figure 26 : Représentation d'un échantillon suite à l'analyse d'eKLipse. ....                      | 75  |
| Figure 27 : Etude métabolomique du liquide séminal. ....                                           | 75  |
| Figure 28 : Alignement des reads après séquençage sur le logiciel IGV. ....                        | 133 |



## Table des tableaux

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 1 : Cinétique de la spermatogenèse. ....                                                                              | 5  |
| Table 2 : Normes de l'OMS. ....                                                                                             | 9  |
| Table 3 : Les complexes de la chaîne respiratoire et leurs sous-unités codées par le génome mitochondrial ou nucléaire..... | 19 |
| Table 4: Différences du code génétique universel et mitochondrial.....                                                      | 21 |
| Table 5 : Amorces et sondes pour la dPCR.....                                                                               | 69 |
| Table 6 : Amorces pour l'amplification de l'ADNmt .....                                                                     | 69 |





# ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) Magalie BOGUENET  
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une  
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,  
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.  
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées  
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **11 / 10 / 2021**

**Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint  
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université  
40 rue de rennes – BP 73532  
49035 Angers cedex

Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00







**Titre :** L'altération de l'ADN mitochondrial dans l'infertilité masculine.

**Mots clés :** Infertilité masculine, Mitochondrie, ADN mitochondrial, Oligoasthénospermie, Sperme, Technologies omics

**Résumé :** L'infertilité concerne plus de 50 millions de couples dans le monde et le facteur masculin est incriminé dans 50% des cas. Les mitochondries sont reconnues comme essentielles aux spermatozoïdes, notamment pour la motilité flagellaire, la capacitation, la réaction acrosomique et la fusion gamétique. L'altération des fonctions mitochondriales pourraient être liées à la baisse de la qualité du sperme et à l'infertilité.

L'objectif principal de ce travail était d'approfondir nos connaissances sur le lien entre le génome mitochondrial des spermatozoïdes et l'infertilité masculine, mais aussi d'évaluer l'environnement métabolique des spermatozoïdes en cas d'altération des paramètres spermatiques.

Nous avons mis en évidence, avec le séquençage haut débit, une fréquence de grands réarrangements plus importante dans

l'ADNmt les spermatozoïdes de meilleure qualité, parallèlement à la diminution significative de leur taux d'ADNmt. Nous pensons que cette découverte est le résultat d'un phénomène physiologique d'élimination active de l'ADNmt paternel dans les spermatozoïdes contribuant à la transmission uniparentale maternelle de l'ADNmt.

L'étude métabolomique du liquide séminal nous a permis d'obtenir un aperçu global des défauts métaboliques contribuant à l'altération structurelle et fonctionnelle des spermatozoïdes dans l'oligoasthénospermie sévère.

Ces résultats offrent de nouvelles perspectives sur la compréhension de l'infertilité masculine qui pourraient aider à développer des outils diagnostiques et de futurs traitements spécifiques.

**Title :** Mitochondrial DNA alteration in male infertility.

**Keywords :** Male infertility, Mitochondria, Mitochondrial DNA, Oligoasthenospermia, Sperm, Omics technologies

**Abstract :** Infertility affects more than 50 million couples worldwide and the male factor is involved in 50% of cases. Mitochondria are known to be essential for spermatozoa, including flagellar motility, capacitation, acrosome reaction and gametic fusion. Impaired mitochondrial function could be linked to decreased sperm quality and infertility.

The main objective of this work was to improve our knowledge of the link between the mitochondrial genome of spermatozoa and male infertility, but also to evaluate the metabolic environment of spermatozoa in case of altered sperm parameters.

We found, with high-throughput sequencing, a higher frequency of large rearrangements in the

mtDNA of higher quality sperm, in parallel with a significant decrease in their mtDNA content. We believe that this finding is the result of a physiological phenomenon of active removal of paternal mtDNA in spermatozoa contributing to maternal uniparental transmission of mtDNA.

The metabolomic study of seminal plasma allowed us to obtain a comprehensive overview of the metabolic defects contributing to the structural and functional alteration of spermatozoa in severe oligoasthenospermia.

These results offer new insights into the understanding of male infertility that may help to develop diagnostic tools and specific future treatments.