



HAL
open science

Étude de l'impact du stress oxydant sur le noyau spermatique humain

Benoît Berby

► **To cite this version:**

Benoît Berby. Étude de l'impact du stress oxydant sur le noyau spermatique humain. Médecine humaine et pathologie. 2017. dumas-01463072

HAL Id: dumas-01463072

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01463072v1>

Submitted on 9 Feb 2017

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

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

UNIVERSITE DE ROUEN

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Année 2017

**THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE**

Mémoire valant lieu de thèse pour l'obtention du titre de docteur en médecine et du diplôme d'études spécialisées en biologie médicale.

Présentée et soutenue publiquement le 20 janvier 2017

par

BERBY Benoît, Jean
Né le 22 avril 1989

**Etude de l'impact du stress oxydant
sur le noyau spermatique humain**

Président du jury : Pr B. Macé

Directrice de thèse : Pr N. Rives

ANNEE UNIVERSITAIRE 2016 - 2017

U.F.R. DE MEDECINE ET DE-PHARMACIE DE ROUEN

DOYEN :

Professeur Pierre FREGER

ASSESEURS :

Professeur Michel GUERBET

Professeur Benoit VEBER

Professeur Pascal JOLY

Professeur Stéphane MARRET

I – MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric **ANSELME** HCN Cardiologie

Mme Isabelle **AUQUIT AUCKBUR** HCN Chirurgie plastique

Mr Fabrice **BAUER** HCN Cardiologie

Mme Soumeya **BEKRI** HCN Biochimie et biologie moléculaire

Mr Ygal **BENHAMOU** HCN Médecine interne

Mr Jacques **BENICHOU** HCN Bio statistiques et informatique médicale

Mr Olivier **BOYER** UFR Immunologie

Mr François **CARON** HCN Maladies infectieuses et tropicales

Mr Philippe **CHASSAGNE** (détachement) HCN Médecine interne (gériatrie) – Détachement

Mr Vincent **COMPERE** HCN Anesthésiologie et réanimation chirurgicale

Mr Jean-Nicolas **CORNU** HCN Urologie

Mr Antoine **CUVELIER** HB Pneumologie

Mr Pierre **CZERNICHOW** (surnombre) HCH Epidémiologie, économie de la santé

Mr Jean-Nicolas **DACHER** HCN Radiologie et imagerie médicale

Mr Stéfán **DARMONI** HCN Informatique médicale et techniques de communication

Mr Pierre **DECHELOTTE** HCN Nutrition

Mr Stéphane **DERREY** HCN Neurochirurgie

Mr Frédéric **DI FIORE** CB Cancérologie

Mr Fabien **DOGUET** HCN Chirurgie Cardio Vasculaire

Mr Jean **DOUCET** SJ Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie

Mr Bernard **DUBRAY** CB Radiothérapie

Mr Philippe **DUCROTTE** HCN Hépatogastro-entérologie

Mr Frank **DUJARDIN** HCN Chirurgie orthopédique - Traumatologique

Mr Fabrice **DUPARC** HCN Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique

Mr Eric **DURAND** HCN Cardiologie

Mr Bertrand **DUREUIL** HCN Anesthésiologie et réanimation chirurgicale

Mme Hélène **ELTCHANINOFF** HCN Cardiologie

Mr Thierry **FREBOURG** UFR Génétique

Mr Pierre **FREGER** HCN Anatomie - Neurochirurgie

Mr Jean François **GEHANNO** HCN Médecine et santé au travail

Mr Emmanuel **GERARDIN** HCN Imagerie médicale

Mme Priscille **GERARDIN** HCN Pédopsychiatrie

Mr Michel **GODIN** (surnombre) HB Néphrologie

M. Guillaume **GOURCEROL** HCN Physiologie

Mr Dominique **GUERROT** HCN Néphrologie

Mr Olivier **GUILLIN** HCN Psychiatrie Adultes

Mr Didier **HANNEQUIN** HCN Neurologie

Mr Fabrice **JARDIN** CB Hématologie

Mr Luc-Marie **JOLY** HCN Médecine d'urgence

Mr Pascal **JOLY** HCN Dermato – Vénérologie

Mme Bouchra **LAMIA** Havre Pneumologie

Mme Annie **LAQUERRIERE** HCN Anatomie et cytologie pathologiques

Mr Vincent **LAUDENBACH** HCN Anesthésie et réanimation chirurgicale

Mr Joël **LECHEVALLIER** HCN Chirurgie infantile

Mr Hervé **LEFEBVRE** HB Endocrinologie et maladies métaboliques

Mr Thierry **LEQUERRE** HB Rhumatologie

Mme Anne-Marie **LEROI** HCN Physiologie

Mr Hervé **LEVESQUE** HB Médecine interne

Mme Agnès **LIARD-ZMUDA** HCN Chirurgie Infantile

Mr Pierre Yves **LITZLER** HCN Chirurgie cardiaque

Mr Bertrand **MACE** HCN Histologie, embryologie, cytogénétique

M. David **MALTETE** HCN Neurologie

Mr Christophe **MARGUET** HCN Pédiatrie

Mme Isabelle **MARIE** HB Médecine interne

Mr Jean-Paul **MARIE** HCN Oto-rhino-laryngologie

Mr Loïc **MARPEAU** HCN Gynécologie - Obstétrique

Mr Stéphane **MARRET** HCN Pédiatrie

Mme Véronique **MERLE** HCN Epidémiologie

Mr Pierre **MICHEL** HCN Hépatogastro-entérologie

M. Benoit **MISSET** HCN Réanimation Médicale

Mr Jean-François **MUIR** (surnombre) HB Pneumologie

Mr Marc **MURAINÉ** HCN Ophtalmologie

Mr Philippe **MUSETTE** HCN Dermatologie - Vénérologie

Mr Christophe **PEILLON** HCN Chirurgie générale

Mr Christian **PFISTER** HCN Urologie

Mr Jean-Christophe **PLANTIER** HCN Bactériologie - Virologie

Mr Didier **PLISSONNIER** HCN Chirurgie vasculaire

Mr Gaëtan **PREVOST** HCN Endocrinologie

Mr Jean-Christophe **RICHARD** (détachement) HCN Réanimation médicale - Médecine d'urgence

Mr Vincent **RICHARD** UFR Pharmacologie

Mme Nathalie **RIVES** HCN Biologie du développement et de la reproduction

Mr Horace **ROMAN** HCN Gynécologie - Obstétrique

Mr Jean-Christophe **SABOURIN** HCN Anatomie - Pathologie

Mr Guillaume **SAVOYE** HCN Hépatogastrologie

Mme Céline **SAVOYE-COLLET** HCN Imagerie médicale

Mme Pascale **SCHNEIDER** HCN Pédiatrie

Mr Michel **SCOTTE** HCN Chirurgie digestive

Mme Fabienne **TAMION** HCN Thérapeutique

Mr Luc **THIBERVILLE** HCN Pneumologie
Mr Christian **THUILLEZ** (surnombre) HB Pharmacologie
Mr Hervé **TILLY** CB Hématologie et transfusion
M. Gilles **TOURNEL** HCN Médecine Légale
Mr Olivier **TROST** HCN Chirurgie Maxillo-Faciale
Mr Jean-Jacques **TUECH** HCN Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre **VANNIER** (surnombre) HCN Pédiatrie génétique
Mr Benoît **VEBER** HCN Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre **VERA** CB Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric **VERIN** HB Service Santé Réadaptation
Mr Eric **VERSPYCK** HCN Gynécologie obstétrique
Mr Olivier **VITTECOQ** HB Rhumatologie
Mr Jacques **WEBER** HCN Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Noëlle **BARBIER-FREBOURG** HCN Bactériologie – Virologie
Mme Carole **BRASSE LAGNEL** HCN Biochimie
Mme Valérie **BRIDOUX HUYBRECHTS** HCN Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard **BUCHONNET** HCN Hématologie
Mme Mireille **CASTANET** HCN Pédiatrie
Mme Nathalie **CHASTAN** HCN Neurophysiologie
Mme Sophie **CLAEYSSENS** HCN Biochimie et biologie moléculaire
Mr Moïse **COEFFIER** HCN Nutrition
Mr Manuel **ETIENNE** HCN Maladies infectieuses et tropicales
Mr Serge **JACQUOT** UFR Immunologie
Mr Joël **LADNER** HCN Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste **LATOCHE** UFR Biologie cellulaire
Mr Thomas **MOUREZ** HCN Virologie
Mme Muriel **QUILLARD** HCN Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia **ROLLIN** HCN Médecine du Travail
Mr Mathieu **SALAUN** HCN Pneumologie
Mme Pascale **SAUGIER-VEBER** HCN Génétique
Mme Anne-Claire **TOBENAS-DUJARDIN** HCN Anatomie

Mr David **WALLON** HCN Neurologie

PROFESSEUR AGREGÉ OU CERTIFIÉ

Mr Thierry **WABLE** UFR Communication

I – PHARMACIE

PROFESSEURS

Mr Thierry **BESSON** Chimie Thérapeutique

Mr Jean-Jacques **BONNET** Pharmacologie

Mr Roland **CAPRON** (PU-PH) Biophysique

Mr Jean **COSTENTIN** (Professeur émérite) Pharmacologie

Mme Isabelle **DUBUS** Biochimie

Mr Loïc **FAVENNEC** (PU-PH) Parasitologie

Mr Jean Pierre **GOULLE** (Professeur émérite) Toxicologie

Mr Michel **GUERBET** Toxicologie

Mme Isabelle **LEROUX - NICOLLET** Physiologie

Mme Christelle **MONTEIL** Toxicologie

Mme Martine **PESTEL-CARON** (PU-PH) Microbiologie

Mme Elisabeth **SEGUIN** Pharmacognosie

Mr Rémi **VARIN** (PU-PH) Pharmacie clinique

Mr Jean-Marie **VAUGEOIS** Pharmacologie

Mr Philippe **VERITE** Chimie analytique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Mme Cécile **BARBOT** Chimie Générale et Minérale

Mr Jérémy **BELLIEN** (MCU-PH) Pharmacologie

Mr Frédéric **BOUNOURE** Pharmacie Galénique

Mr Abdeslam **CHAGRAOUI** Physiologie

Mme Camille **CHARBONNIER** Statistiques

Mme Marie Catherine **CONCE-CHEMTOB** Législation pharmaceutique et économie de la santé

Mme Elizabeth **CHOSSON** Botanique

Mme Cécile **CORBIERE** Biochimie

Mr Eric **DITTMAR** Biophysique

Mme Nathalie **DOURMAP** Pharmacologie

Mme Isabelle **DUBUC** Pharmacologie
Mme Dominique **DUTERTE- BOUCHER** Pharmacologie
Mr Abdelhakim **ELOMRI** Pharmacognosie
Mr François **ESTOUR** Chimie Organique
Mr Gilles **GARGALA** (MCU-PH) Parasitologie
Mme Najla **GHARBI** Chimie analytique
Mme Marie-Laure **GROULT** Botanique
Mr Hervé **HUE** Biophysique et mathématiques
Mme Laetitia **LE GOFF** Parasitologie - Immunologie
Mme Hong **LU** Biologie
Mme Marine **MALLETER** Biologie Cellulaire
Mme Sabine **MENAGER** Chimie organique
Mme Tiphaine **ROGEZ-FLORENT** Chimie analytique
Mr Mohamed **SKIBA** Pharmacie galénique
Mme Malika **SKIBA** Pharmacie galénique
Mme Christine **THARASSE** Chimie thérapeutique
Mr Frédéric **ZIEGLER** Biochimie

PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile **GUERARD-DETUNCQ** Pharmacie officinale
Mr Jean-François **HOUIVET** Pharmacie officinale

PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde **GUERIN** Anglais

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

Mme Sandrine **DAHYOT** Bactériologie

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mme Hanane **GASMI** Galénique
Mme Benedetta **CORNELIO** Chimie organique

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile **BARBOT** Chimie Générale et minérale
Mr Thierry **BESSON** Chimie thérapeutique
Mr Roland **CAPRON** Biophysique

Mme Marie-Catherine **CONCE-CHEMTOB** Législation et économie de la santé

Mme Elisabeth **CHOSSON** Botanique

Mr Jean-Jacques **BONNET** Pharmacodynamie

Mme Isabelle **DUBUS** Biochimie

Mr Loïc **FAVENNEC** Parasitologie

Mr Michel **GUERBET** Toxicologie

Mr François **ESTOUR** Chimie organique

Mme Isabelle **LEROUX-NICOLLET** Physiologie

Mme Martine **PESTEL-CARON** Microbiologie

Mme Elisabeth **SEGUIN** Pharmacognosie

Mr Mohamed **SKIBA** Pharmacie galénique

Mr Rémi **VARIN** Pharmacie clinique

Mr Philippe **VERITE** Chimie analytique

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR

Mr Jean-Loup **HERMIL** UFR Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS

Mr Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine Générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

Mr Pascal **BOULET** UFR Médecine générale

Mr Emmanuel **HAZARD** UFR Médecine Générale

Mme Lucile **PELLERIN** UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN** UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX** UFR Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

Mr Serguei **FETISSOV** (med) Physiologie (ADEN)

Mr Paul **MULDER** (phar) Sciences du Médicament

Mme Su **RUAN** (med) Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil **ADRIOUCH** (med) Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)

Mme Gaëlle **BOUGEARD-DENOYELLE** (med) Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)

Mme Carine **CLEREN** (med) Neurosciences (Néovasc)

M. Sylvain **FRAINEAU** (phar) Physiologie (Inserm U 1096)

Mme Pascaline **GAILDRAT** (med) Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)

Mr Nicolas **GUEROUT** (med) Chirurgie Expérimentale

Mme Rachel **LETELLIER** (med) Physiologie

Mme Christine **RONDANINO** (med) Physiologie de la reproduction

Mr Antoine **OUVRARD-PASCAUD** (med) Physiologie (Unité Inserm 1076)

Mr Frédéric **PASQUET** Sciences du langage, orthophonie

Mme Isabelle **TOURNIER** (med) Biochimie (UMR 1079)

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

HCN - Hôpital Charles Nicolle HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CB - Centre Henri Becquerel CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation SJ – Saint Julien Rouen

Par délibération en date du 3 mars 1967, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend aucune approbation ou désapprobation.

Remerciements

À mon jury :

Pr Nathalie Rives

Je vous suis reconnaissant de m'avoir accueilli dans le service et de m'avoir permis de suivre mon intérêt pour la recherche. J'espère pouvoir continuer à apprendre auprès de la grande professionnelle que vous êtes. Je vous remercie de votre confiance.

Pr Bertrand Macé

Je vous remercie d'avoir accepté de présider mon jury et de partager votre connaissance inépuisable du corps universitaire français avec moi. Promis, je n'essaierai plus de vous congeler pour des problèmes administratifs.

Pr Martine Pestel-Caron

J'ai beaucoup apprécié mon passage dans votre service, et si je n'avais pas cédé à l'appel des eucaryotes, j'aurais aimé poursuivre dans le royaume des bactéries et des antibiotiques.

Dr Brigitte Clavier

Un biologiste, *a fortiori* spécialisé dans le gamète mâle, perdu parmi des gynécologues, ça ne paraissait pas évident... Pourtant vous avez, et m'avez, accepté immédiatement. Je vous remercie de cette confiance. J'ai un grand plaisir à vous côtoyer et apprendre le plus possible sur le côté féminin de la reproduction.

À mes collègues et amis :

À ceux du laboratoire de biologie de la reproduction – CECOS : **France**, qui m'a simplement tout appris, avec patience et méticulosité, merci encore. **Fanny**, pour toutes ces discussions, sur tout sujet, sérieux ou crétin, mais toujours essentiel ! Je n'oublie pas non plus **Clémence**, **Audrey**, **Céline**, **Solmaz**, et **Pierre** le « petit nouveau ».

J'ai également une pensée particulière pour nos techniciennes, **Sophie**, **Elodie**, **Lydie** et **Julie** ainsi que notre technicien, **Romain**. Former un interne, ça prend du temps, c'est lourd, merci de l'avoir fait.

À ceux de l'EA 4308 « Gamétogenèse et qualité du gamète mâle » : **Christine** pour nos discussions et fous rires, **Ludovic** parce qu'on a tous besoin d'un viking rôliste noctambule et maniaque dans son entourage, **Antoine**, mais si on est tous de vrais docteurs ;), **Trochette** et son poney, ses minions et ses talents de dessinatrice, **Amandine** et **Julie**.

À celle qui est entre les deux : **Véro**, merci pour ces techniques, ces FISH, ces séances de fluo-microscopie, ces FISH, ces pauses, ces FISH ! Deux cent soixante treize mille cent quatre-vingt neuf spermatozoïdes, 273 189, te rends-tu compte !

Aux internes de BDR et notre tache de porter le flambeau : **Cynthia** et **Aurélié**

À toute l'équipe du centre clinique d'assistance médicale à la procréation : les gynécos **Cécile**, **Isabella**, **Maria** et les sages-femmes **Sylvie**, **Matthieu**, **Amandine**.

À ma co-interne si particulière, chef et amie: **Isabelle**, I. Motte, la Motte.

François et Elise : mes très chers Anciens, dignes représentants de la fière Cristolie en terre normande. Merci pour votre accueil, votre gentillesse et votre amitié toujours renouvelés.

Jennifer et Florian : parce que vous allez me manquer, pour tout ce que vous savez et tous les bons moments passés ensemble, en stage pour Jennifer qui est la seule à m'avoir supporté si longtemps (elle à survécu !) et à l'extérieur pour Florian.

Cédric :

Schnappi :

À tous les Rouennais de naissance ou d'adoption qui m'ont accueilli et ont rendu mon arrivée géniale : **Victor**, **Elise**, **Elsa**, **Anaïs**, **Jovani**, **Simon**, Julien, et tous nos jeunes

À tous mes co-internes qui ont subi ma ponctualité douteuse.

Aux cliniciens qui ont enduré nos discussions techniques : Imène, Véro, Anne-Lise, Julie, Pierre, Simone,

À tous ceux qui ont rendu mes études de médecine meilleures : **Samuel**, **Simon**, **Jeff**, l'**EMC**, tous les carabins et carabines cristoliens.

À **ma famille** pour son soutien continu et sans faille.

À **Camille** : pour tout.

A mon jeune interlocuteur, / Je dirai donc que nous vivons une période difficile
où les bases de ce qu'on appelait la Morale / et qu'on appelle aujourd'hui l'Éthique,
sont remises constamment en cause, / en particulier dans les domaines du don de la vie,
de la manipulation de la vie, / de l'interruption de la vie.
Dans ces domaines, / de terribles questions nous attendent dans les décennies à venir.
Oui nous vivons une période difficile / où l'individualisme systématique,
le profit à n'importe quel prix, / le matérialisme, l'emportent sur les forces de l'esprit.
(...)
Mais je dirai à mon jeune interlocuteur que malgré tout cela,
Il faut croire à la grandeur de l'aventure humaine.

Que dire à un jeune de vingt ans - Hélié Denoix de Saint Marc

Liste des abréviations

•O₂⁻ : anion superoxyde
2'-dG : 2'-désoxyguanosine
5mC : 5-méthyl-cytosine
8-OHdG : 8-hydroxy-désoxyguanosine
A : adénine
ADN : acide désoxyribonucléique
C : cytosine
CECOS : centre d'étude et de conservation des œufs et du sperme
ERO : Espèces réactives de l'oxygène
FISH : fluorescence *in situ* hybridization
FITC : fluoresceïne isothiocyanate
FIV : fécondation *in vitro*
FRU : *fluorescence relative units*
G : guanine
GPx : peroxydases du glutathion
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
HOBr : acide hypobromeux
HOCl : acide hypochloreux
ICSI : *intra cytoplasmic sperm injection*
IIU : insémination intra-utérine
kb : kilobase
LTL : *leukocyte telomere length*
STL : *sperm telomere length*
MSOME : motile sperm organelle morphology examination
NaOH : hydroxyde de sodium
NO• radical nitroxy
NO• : oxyde nitrique
NOS : oxyde nitrique synthase
O₂ : dioxygène
OAT : oligoasthénotérazoospermie
OH• : radical hydroxyle
OMS : organisation mondiale de la santé
ONOO• : acide peroxy-nitrique
pb : paires de base
PBS : *phosphate-buffered saline*
PBST : PBS + Tween
PFA : paraformaldéhyde
PNA : *peptid nucleic acid*
POT1 : *protection of telomeres 1*
Q-FISH : FISH quantitative
qPCR : *quantitative polymerase chain reaction*
RAP1 : *repressor/activator protein 1*
T : thymine
TRF1&2 : *telomeric repeat binding factor 1&2*
TUNEL : *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*
WHO : *World health organization*

Liste des figures et tableaux.

Figure 1. Condensation de la chromatine au cours de la spermatogenèse (adapté d'après Braun, Carell et Yuen *et al.*)

Figure 2. Localisation et organisation des télomères (adapté d'après Boitou)

Figure 3. Espèces réactives de l'oxygène (ERO) et noyau du spermatozoïde (adapté d'après Noblanc et Gill-Sharma *et al.*)

Figure 4. Schéma expérimental de l'étude

Figure 5. Résultats possibles en hybridation *in situ* fluorescente à l'aide de sondes centromériques des chromosomes X, Y et 18

Figure 6. Corrélation entre l'âge des patients et les paramètres télomériques

Figure 7. Détection des espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans les spermatozoïdes

Figure 8. Dommages spécifiques du stress oxydant à l'ADN spermatique

Figure 9. Condensation de l'ADN spermatique

Figure 10. Fragmentation de l'ADN spermatique

Figure 11. Distribution de la longueur relative et du nombre des télomères spermatiques

Figure 12. Distribution de la longueur relative et du nombre des télomères dans les noyaux spermatiques des cas et des témoins

Figure 13. Corrélogramme selon la méthode des cercles du groupe des cas

Figure 14. Diagramme de Venn des altérations nucléaires spermatiques

Figure 15. Fonctions de densité des altérations nucléaires spermatiques

Figure 16. Corrélations entre défaut de condensation de la chromatine, nombre de télomères et présence d'ERO cytosoliques au sein du groupe des cas

Figure 17. Représentation des distributions des altérations spermatiques étudiées

Tableau I. Paramètres spermatiques conventionnels

Tableau II. Altérations nucléaires spermatiques évaluées dans le groupe des cas et le groupe des témoins

SOMMAIRE

Remerciements.....	I
Liste des abréviations.....	III
Liste des figures et tableaux.....	IV
Introduction.....	1
1. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant.....	
2. Télomères et spermatozoïdes.....	3
3. Objectif du travail.....	4
Matériels et méthodes.....	5
1. Population étudiée.....	5
2. Analyse des paramètres spermatiques conventionnels.....	5
3. Analyse des altérations nucléaires spermatique.....	5
3.1. Préparation des lames.....	6
3.2. Stress oxydant évalué par CellROX®.....	7
3.3. Etude du marquage du 8-OHdG.....	8
3.4. Condensation de la chromatine spermatique par coloration au bleu d'aniline.....	9
3.5. Fragmentation de l'ADN par la technique TUNEL.....	9
3.6. Anomalies chromosomiques dans les noyaux spermatiques par FISH.....	10
3.7. Nombre et longueur relative des télomères par PNA-FISH.....	11
4. Analyse des résultats.....	12
Résultats et méthodes.....	13
1. Description de la population.....	13
2. Analyse comparée des altérations du noyau spermatique entre les cas et les témoins.....	13
2.1. Analyse des altérations spermatiques liées au stress oxydant.....	13
2.2. Condensation de l'ADN spermatique.....	14
2.3. Fragmentation de l'ADN spermatique.....	14
2.4. Anomalies chromosomiques spermatiques.....	14
2.5. Nombre et de la longueur relative des télomères.....	14
3. Analyse comparative des altérations du noyau spermatique au sein du groupe des cas..	16
3.1. Corrélation entre défaut de condensation de la chromatine spermatique et nombre de signaux télomériques.....	16
3.2. Réalisation d'un diagramme de Venn et choix des seuils.....	17
3.3. Analyse du sous groupe des cas présentant de forts taux d'ERO d'origine cytosolique.....	18
Discussion.....	19
Bibliographie.....	27
Résumé	

Introduction

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO), connues également sous les noms de radicaux libres ou de dérivés actifs de l'oxygène, sont des sous-produits toxiques de la respiration cellulaire (Figure 1). Leur accumulation en grand nombre, ou un défaut en agents antioxydants, est à l'origine d'une situation pathologique appelée stress oxydant ou stress oxydatif (Migdal et Serres 2011). Il existe de nombreuses sources de stress oxydant, particulièrement dans les voies urogénitales : processus infectieux ou inflammatoires local, varicocèle, antécédent de cryptorchidie ou de torsion testiculaire, exposition à des toxiques (méthoxyéthanol, toluène, soufre, cadmium, plomb, cigarettes), etc. Compte tenu de son cytoplasme extrêmement réduit, le spermatozoïde contient une faible quantité d'agents anti-oxydants, notamment enzymatiques et a donc une capacité anti-oxydante très limitée ; l'environnement local est par conséquent responsable de son exposition au stress oxydant.

Cependant, les ERO, quand elles sont présentes dans des concentrations modérées, ont un rôle majeur dans la maturation post-testiculaire des spermatozoïdes (Agarwal *et al.*, 2014). En dehors des situations de stress oxydant, elles vont alors agir comme des seconds messagers, un rôle dont la connaissance s'approfondit depuis plusieurs années. Parmi leur spectre d'action, on peut noter la formation de ponts dissulfures inter-protaminiques favorisant la compaction de l'ADN spermatique et la condensation du noyau (Noblanc, *et al.*, 2012) ainsi que la phosphorylation de tyrosines membranaires préparant la capacitation et l'hyperactivation flagellaire (Aitken *et al.*, 2010).

Des altérations des paramètres classiques du spermogramme sont observées en situation de stress oxydant : l'augmentation des taux séminaux d'ERO mesurée par chimiluminescence a été statistiquement corrélée à la présence d'une oligozoospermie, d'une asthénozoospermie, d'une tératozoospermie ou d'une oligoasthénotératozoospermie (OAT) (Agarwal *et al.*, 2014). Une autre manière d'étudier l'impact direct du stress oxydant sur la molécule d'ADN consiste à mettre en évidence des dommages à l'ADN spécifiques d'une exposition oxydative, tels que la présence d'adduits hydroxyle sur les nucléosides (Aitken *et al.*, 2014), détectable, par exemple, grâce au marquage de la 8-oxo-désoxyguanosine (8-OHdG), forme anormalement oxydée de la guanosine

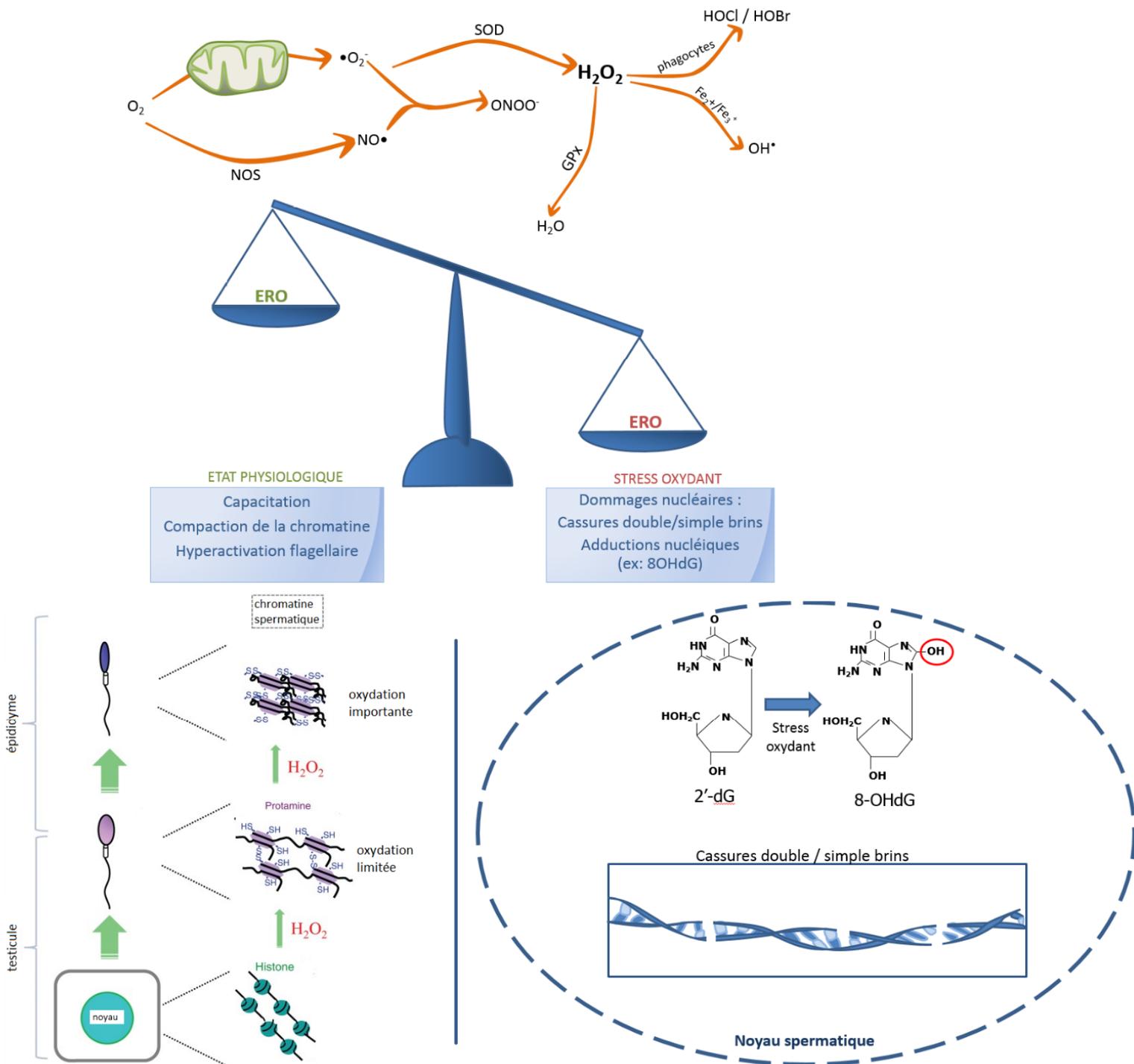


Figure 1 : Espèces réactives de l'oxygène (ERO) et noyau du spermatozoïde (adapté d'après Noblanc et Gill-Sharma *et al.*).

Les ERO produites principalement par la respiration cellulaire opérée dans la mitochondrie mais pouvant provenir de sources extracellulaires sont des messagers utiles lors de la spermatogenèse et de la maturation spermatique post-testiculaire. Elles sont impliquées dans les processus de capacitation, de condensation de la chromatine et d'hyperactivation du spermatozoïde. Quand elles sont présentes en excès, elles sont à l'origine d'une situation appelée stress oxydant ou stress oxydatif qui peut être responsable de nombreux dommages cellulaires et notamment nucléaires. Parmi ceux-ci, on note par exemple l'adduction d'un groupement hydroxyle sur la désoxyguanosine aboutissant à la formation de 8-hydroxy-désoxyguanosine (8-OHdG) ou formation de cassures simple ou double brins au sein de l'ADN spermatique.

O_2 : dioxygène; $\bullet O_2^-$: anion superoxyde; $NO\bullet$ radical nitroxyde ; $OH\bullet$: radical hydroxyle ; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène ; $NO\bullet$: oxyde nitrique ; $HOCl$: acide hypochloreux ; $HOBr$: acide hypobromeux ; $ONOO^-$: acide peroxy-nitrique ; NOS : oxyde nitrique synthase ; GPx : peroxydases du glutathion ; 2'-dG : 2'-désoxyguanosine ; 8-OHdG : 8-hydroxy-désoxyguanosine.

dans le noyau spermatique (Cambi *et al.*, 2013). Cette modification chromatinienne est reproductible *in vitro* par exposition du sperme au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à haute concentration. Le taux de spermatozoïdes marqués au 8-OHdG est significativement augmenté chez les patients présentant des altérations spermatiques telles que décrites précédemment. Nous savons également que les méthodes de préparation du sperme en AMP peuvent augmenter le taux de spermatozoïdes marqués par un anticorps anti 8-OHdG (Kim *et al.*, 2015).

Parmi les marqueurs de qualité du noyau spermatique humain non spécifique du stress oxydant, en plus des paramètres classiques du spermogramme, existent notamment l'étude de la fragmentation de l'ADN spermatique par méthode TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling*), celle de la condensation de l'ADN spermatique par coloration au bleu d'aniline, l'hybridation *in situ* par fluorescence à l'aide sondes centromériques pour évaluer l'état d'aneuploïdie du noyau spermatique. Ces marqueurs ont chacun montré leur association à des altérations des paramètres spermatiques classiques (Rocca *et al.*, 2016 ; Cariati *et al.*, 2016). Ils ont également été reliés entre eux à divers degrés sans pour autant qu'une redondance systématique soit observée, suggérant qu'ils permettent en association d'acquiescer une plus grande finesse dans la description des populations infertiles mâles. Cette liste non exhaustive peut être notamment complétée par un intérêt croissant pour les télomères spermatiques.

Les télomères sont des structures en boucle situées aux extrémités des chromosomes et constituées d'une séquence TTAGGG répétée n fois et se terminant par une queue poly-adénosine (Solov'eva *et al.*, 2004). Ils sont chaperonnés par un complexe protéique protecteur appelée télosome (Figure 2). Cette organisation est très conservée au cours de l'évolution et se retrouve dans tout le domaine des eucaryotes. Les télomères assurent le maintien de l'intégrité du chromosome et empêchent la reconnaissance de sa terminaison comme une cassure double brin par les mécanismes de la réparation cellulaire (Siderakis et Tarsounas 2007). Ils constituent également les points d'appariement des chromosomes homologues lors de la division cellulaire. Leur longueur est variable d'un individu à l'autre mais oscille, chez l'homme, entre 5 et 20kb. La réplication de la séquence type est permise par une transcriptase inverse spécifique nommée télomérase qui s'exprime dans très peu de tissus chez l'adulte, en dehors des cellules souches somatiques et de réactivations pathologiques comme dans le cas du cancer (Ozturk, 2015). Lors

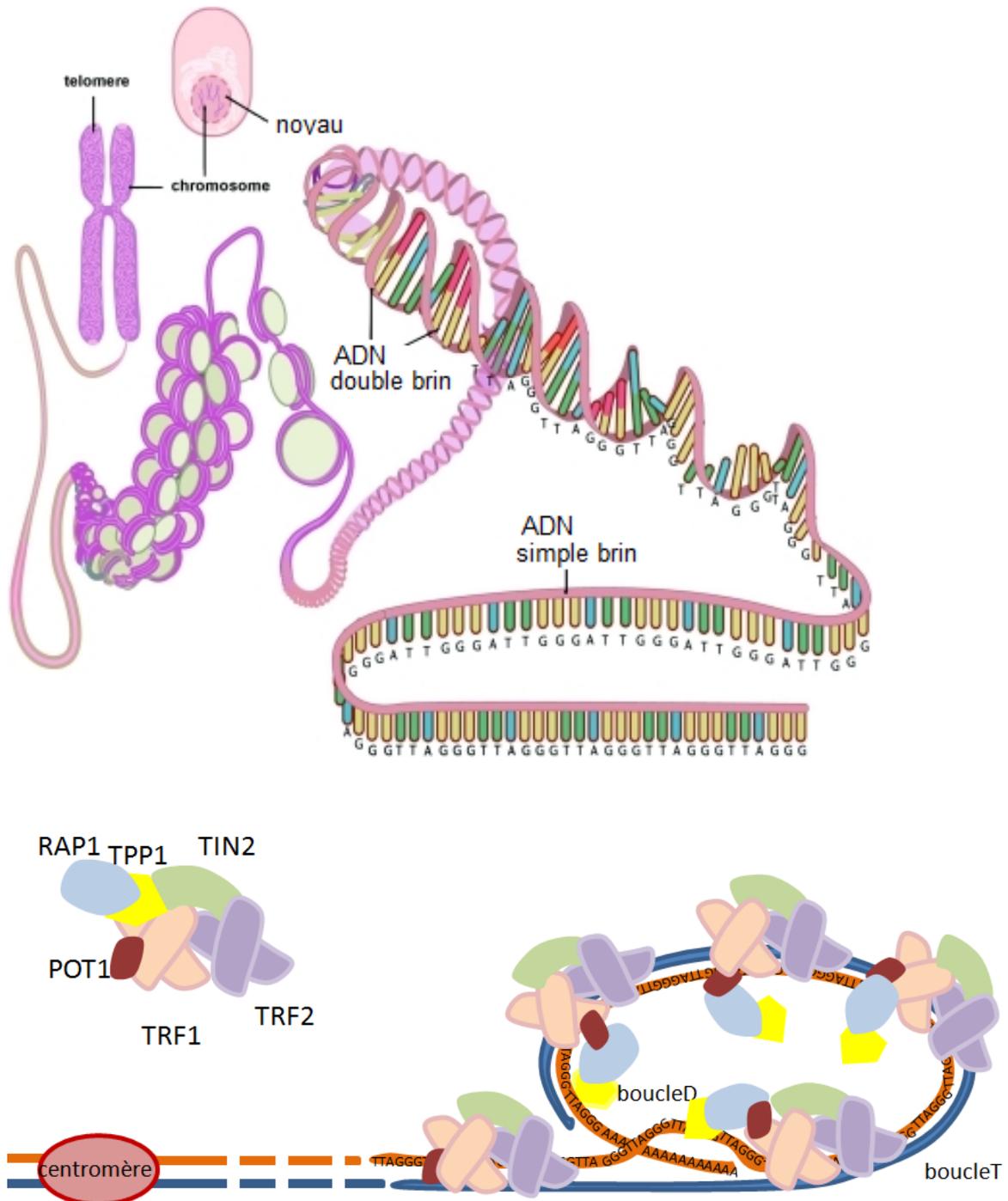


Figure 2 : Localisation et organisation des télomères (adapté d'après Boitou)

Séquences (TTAGGG) $_n$ répétées situées à l'extrémité des chromosomes, les télomères sont les structures terminales des chromosomes. Ils se terminent par une queue polyA qui vient terminer la boucle spécifique de la structure télomérique. Ils sont coiffés par le télosome, un ensemble de protéines chaperonnes à visée stabilisatrice et protectrice.

ADN : acide désoxyribonucléique; POT1 : *protection of telomeres 1*; RAP1 : *repressor/activator protein 1*; TIN2 : *TRF1 and TRF2 interacting nuclear factor 2*; TPP1 : *tripeptidyl-peptidase 1*; TRF1&2 : *telomeric repeat binding factor 1&2*.

de chaque division cellulaire, la longueur des télomères diminue et en l'absence de télomérase, dans l'immense majorité des tissus, celle-ci n'est pas renouvelée (Kalmbach *et al.*, 2013). Quand la longueur des télomères a atteint une taille critique, la protection de l'intégrité chromatinienne n'est plus assurée et la cellule entre en sénescence. On a ainsi pu parler d' « horloge biologique » à propos de la longueur des télomères.

Dans la lignée germinale, les spermatogonies et les spermatoocytes I expriment la télomérase, et à très haut niveau, ce qui en fait un tissu unique. La longueur moyenne des télomères spermatiques n'est que peu diminuée en comparaison de celle mesurée dans les spermatogonies dont ils sont issus, (Jørgensen *et al.*, 2013). Ce mécanisme permet la transmission à la descendance de télomères de taille non diminuée (Turner et Hartshorne, 2013). De plus, il a été observé une plus grande longueur moyenne des télomères spermatiques chez les hommes âgés que chez les hommes jeunes, ce dans plusieurs études (p. ex : Kimura *et al.*, 2008; Ferlin *et al.*, 2013; Turner and Hartshorne 2013; Rocca *et al.*, 2016). Ces données, bien que relativisées par certains (Stindl, 2016), seraient un avantage sélectif à la progéniture de l'homme âgé, potentiellement utile à la survie de l'espèce en favorisant la transmission d'un patrimoine génétique susceptible de se diviser plus de fois, donc d'entrer en sénescence plus tardivement. Les télomères spermatiques ont une longueur moyenne (*sperm telomere length*, STL) supérieure à celle des leucocytes circulants (*leucocyte telomere length*, LTL) (Kimura et al. 2008; Aston et al. 2012).

La STL est diminuée chez les patients infertiles par comparaison à des sujets fertiles (Kimura *et al.*, 2008; Aston *et al.*, 2012). Chez les hommes infertiles présentant une oligozoospermie, la longueur des télomères spermatiques est significativement diminuée par rapport à ce qui est constaté chez des hommes également infertiles mais néanmoins normozoospermiques, et ceci alors que la longueur des télomères leucocytaires ne diffère pas entre les deux groupes (Reig-Viader *et al.*, 2014). La STL et la LTL sont nécessairement des valeurs moyennes, tenant compte de la méthode de mesure utilisée : réaction de polymérase en chaîne quantitative (qPCR) sur l'éjaculat total ou sur une fraction leucocytaire sanguine. Ces outils ne permettent pas d'obtenir une évaluation cellule par cellule de la taille ou du nombre de dimères télomériques constitués au sein de la chromatine.

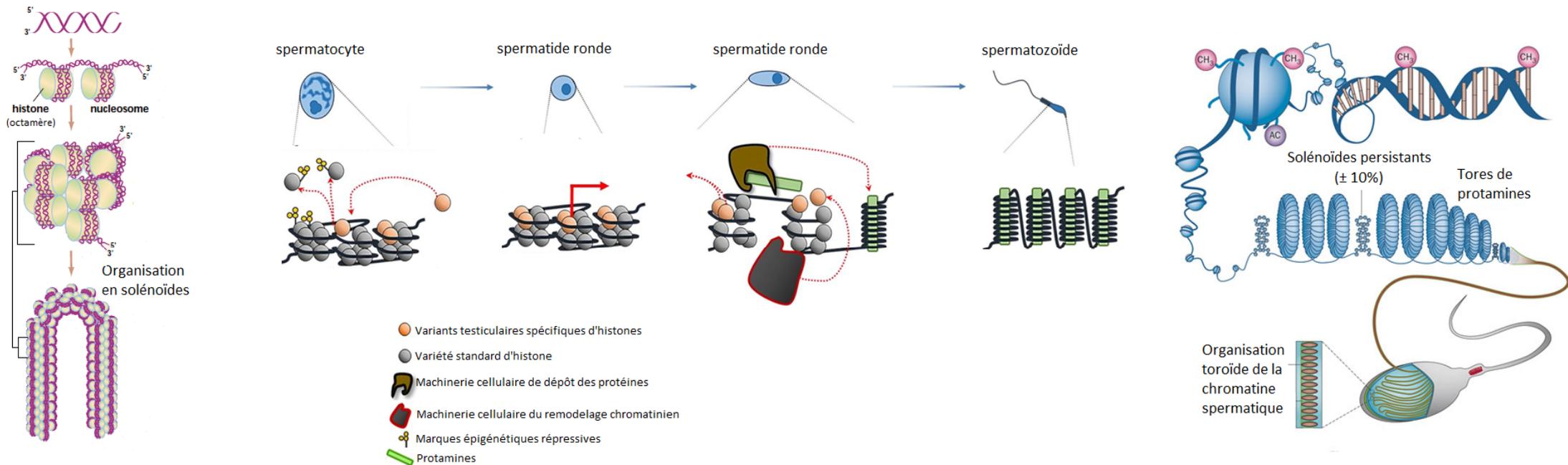


Figure 3 : Condensation de la chromatine au cours de la spermatogenèse (adapté d'après Braun, Carell et Yuen *et al.*,)

La condensation de la chromatine spermatique est un processus complexe qui s'opère lors de la spermatogenèse à partir du stade de spermatocyte pour aboutir à un remplacement de 90% des histones par des protéines de transition puis des protamines au stade spermatozoïde. Ce remplacement entraîne une modification majeure de l'organisation de la chromatine dans le noyau spermatique par comparaison à celle observée dans les noyaux des cellules somatiques caractérisée par une compaction du noyau en abandonnant l'organisation habituelle en solénoïdes pour adopter une organisation en tores.

Ceci est permis a contrario par des techniques visuelles telles que la PNA-FISH (*peptidic nucleic acid - fluorescence in situ hybridization*), effectuée au microscope à épifluorescence et que nous avons retenue pour notre étude (Turner et Hartshorne, 2013).

Peu de travaux se sont penchés sur le lien entre stress oxydant et longueur des télomères spermatiques. Le stress oxydant est admis comme l'une des principales causes de raccourcissement des télomères dans les cellules somatiques (Moskovtsev et al. 2010). Nous n'avons trouvé que deux études récentes faisant état d'investigations à ce sujet et elles arrivaient à des conclusions contradictoires concernant un éventuel lien entre mesure des ERO par chimioluminescence et longueur moyenne des télomères spermatique évaluée par qPCR alors qu'elles émanent de la même équipe (Thilagavathi *et al.*, 2013; Mishra *et al.*, 2016). Le premier travail ne rapportait pas de lien entre ces deux paramètres (Thilagavathi *et al.*, 2013) tandis que le second l'établissait (Mishra et al. 2016). La deuxième étude citée a été cependant effectuée sur une population presque quatre fois plus importante ($n=57$ versus $n= 214$).

Partant des travaux récents concernant le lien entre anomalies de longueur des télomères spermatiques et infertilité d'une part, entre stress oxydant et altérations nucléaires spermatiques d'autre part, ainsi que de la connaissance des liens entre stress oxydant et raccourcissement télomérique, nous avons voulu étudier l'ensemble de ces éléments. L'objectif de ce projet recherche a été d'analyser, dans une étude pilote, l'expression d'ERO cytosoliques et nucléaires dans les noyaux de spermatozoïdes d'hommes infertiles présentant une oligoasthénospermie (OAT) et d'hommes aux paramètres spermatiques normaux, en majorité fertiles, et d'évaluer le retentissement de la présence d'ERO sur la qualité nucléaire spermatique, en étudiant plus spécifiquement un marqueur d'atteinte oxydative de l'ADN, le nombre et la longueur des télomères, l'aneuploïdie, la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN.

Matériels et méthodes

1. Population étudiée

Les patients de notre étude sont des hommes en âge de procréer qui ont consulté au sein du Laboratoire de Biologie de la Reproduction-CECOS du CHU-Hôpitaux de Rouen entre le 28 janvier et le 22 août 2016 pour la réalisation d'un spermogramme dans le cadre de l'exploration d'une infertilité du couple ou d'une tentative d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) par insémination intra-utérine (IIU), fécondation *in vitro* classique (FIV) ou par micro-injection de spermatozoïdes dans le cytoplasme ovocytaire (ICSI).

Les patients n'ont pas émis d'opposition à l'utilisation, dans le cadre de la recherche, des résidus du recueil de sperme à l'issue d'examens biologiques. Les caractéristiques du sperme ont été comparées entre les deux groupes. Le premier groupe, celui des cas, comprend trente deux sujets présentant une oligozoospermie le jour du recueil comprise entre 3 et 10 millions de spermatozoïdes/mL, associée ou non à d'autres anomalies du spermogramme (asthénozoospermie, tératozoospermie ou nécrozoospermie). Le second groupe, celui des témoins, comprend vingt sujets présentant des paramètres spermatiques normaux définis selon les critères de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (WHO, 2011), dont la fertilité était prouvée pour certains d'entre eux.

2. Analyse des paramètres spermatiques conventionnels

Les échantillons de sperme ont été collectés par masturbation dans un réceptacle stérile (Clinisperm[®], CML, Nemours, France) après un délai d'abstinence sexuelle conseillé compris entre 3 et 5 jours. Un temps de liquéfaction d'au moins 10 minutes est observé avant tout traitement du sperme. Les spermogrammes ont été interprétés selon les critères du manuel de l'OMS (WHO, 2011). Les paramètres spermatiques étudiés comprenaient le volume de l'éjaculat (mL), la concentration spermatique (millions/mL), la numération spermatique totale (millions/éjaculat), la vitalité spermatique (%), la mobilité progressive (a+b ; %).

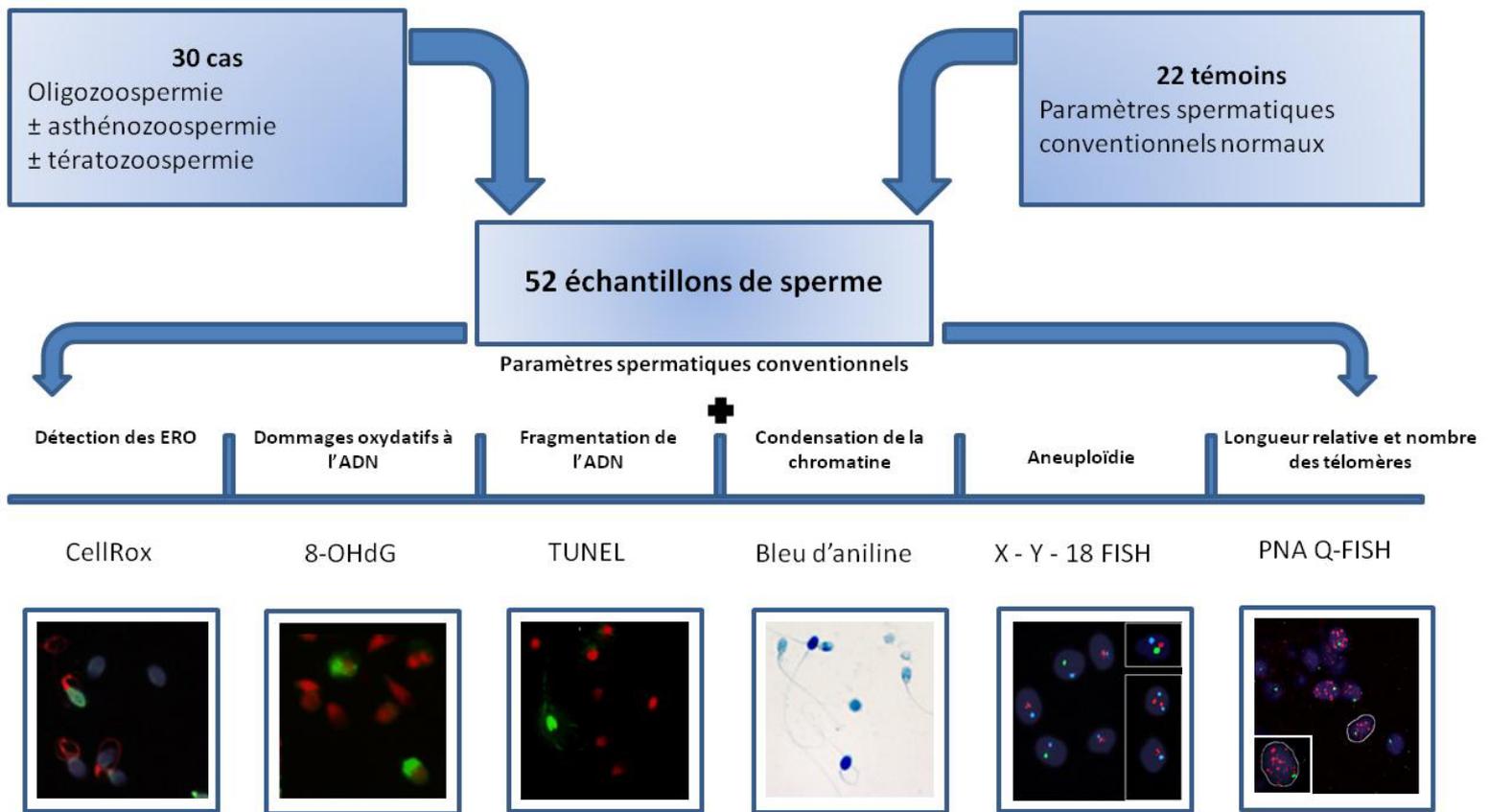


Figure 4 : Schéma expérimental de l'étude

Dans notre étude, 32 échantillons de sperme ont été recueillis et analysés, 20 dans le groupe des cas présentant des altérations des paramètres spermatiques conventionnels et 12 dans le groupe de témoins. Les définitions retenues de l'oligozoospermie, de l'asthénozoospermie et de la térazozoospermie sont celles de la 5^{ème} édition du Manuel d'examen et de traitement de la semence humaine de l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO, 2011). Les altérations nucléaires spermatiques ont été évaluées par une détection des ERO à la fois cytosoliques (marquage au CellROX DeepRed) et nucléaires (marquage au CellROX[®] Green Reagent), l'étude des dommages oxydatifs à l'ADN (immunofluorescence dirigée contre le 8-OHdG), de la fragmentation de l'ADN spermatique (méthode TUNEL), de la condensation de la chromatine spermatique (coloration au bleu d'aniline), de l'aneuploïdie (FISH centromérique des chromosomes X, Y et 18) ainsi que la mesure de la longueur relative et la numération des télomères (PNA Q-FISH).

8-OHdG = 8-hydroxy-désoxyguanosine ; ERO = espèces réactives de l'oxygène ; FISH = fluorescence *in situ hybridization* ; PNA Q-FISH = FISH quantitative avec des sondes peptidiques dirigées contre les acides nucléiques (PNA=*peptid nucleic acid*) ; TUNEL = *terminal dexynucleotil transferase dUTP nick-end labelling*.

3. Analyse des altérations nucléaires spermatiques

3.1. Préparation des lames

Chaque échantillon de sperme a été lavé deux fois à l'aide du PBS (Phosphate-Buffered Saline, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) 1X pendant 10 minutes à 2000 tours/minute. Le culot de centrifugation obtenu a été divisé en quatre parts. Une première partie du culot a servi à l'analyse du stress oxydant par la technique du CellROX[®]. La deuxième partie a été remise en suspension dans du paraformaldéhyde (PFA) (Sigma-Aldrich) 3,7% pour une durée supérieure ou égale à 15 minutes ; la suspension obtenue a été étalée sur des lames (Superfrost Plus[®], Menzel Gläser, Braunschweig, Allemagne) qui ont été utilisées pour le marquage du 8-OHdG. La troisième partie du culot a été étalée sur des lames (Superfrost Plus[®],) avant d'être fixée avec de la glutaraldéhyde 3% (Glutaraldéhyde[®], Sigma, Saint Louis, MO, Etats-Unis) pendant 30 minutes à température ambiante. Ces lames ont été utilisées pour la coloration au bleu d'aniline. La dernière partie du culot a été remise en suspension dans du méthanol pur (Méthanol RPE, Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, France) puis fixée durant 30 minutes à -20°C avant d'être étalée sur des lames (Superfrost Plus[®]). Ces dernières ont été utilisées pour la technique TUNEL et les analyses par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH X-Y-18 et PNA Q-FISH)

3.2. Analyse du stress oxydant par CellROX[®]

Le CellROX[®] est une sonde vitale fluorogène qui pénètre la cellule et, quand elle est oxydée par les ERO présentes dans le compartiment cellulaire visé, émet une fluorescence spécifique. Le CellROX[®] Green (Molecular Probes, Eugene, OR, Etats-Unis) a permis l'étude du stress oxydant du noyau situé dans la tête du spermatozoïde et le CellROX[®] DeepRed (Molecular Probes) l'étude du stress oxydant issu du cytosol. Un autocontrôle positif a été pratiqué sur chacun des échantillons par l'incubation 10 à 20 minutes dans du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à la concentration de 30% (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Autriche), en parallèle de la manipulation de l'échantillon testé.

Le sperme récupéré à l'étape de préparation des lames a donc été incubé 10 minutes soit avec du peroxyde d'hydrogène, soit avec du PBS 1X avant de subir un lavage dans du PBS 1X. Le culot a été resuspendu dans 1 mL de PBS 1X puis mis en présence des sondes

CellROX® green (1 µL) et CellROX® DeepRed (1 µL) pendant 10 minutes à l'abri de la lumière avant de subir un nouveau lavage en PBS 1X puis d'être remis en suspension dans du formaldéhyde 3,7% (Sigma-Aldrich) pendant 15 minutes afin de fixer la préparation. A l'issue de cette procédure, les noyaux ont été contre-colorés au 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI II, Adgenix, Voisin le Bretonneux, France) dilué au 1/100ème dans de l'antifade. La lecture des lames s'est faite dès la fin de la préparation compte tenu de l'évanescence rapide de la fluorescence dégagée par ces sondes : les photographies des spermatozoïdes ont été prises au plus tard 12h après la fin de la manipulation. Les lames ont été observées au grossissement 600x à immersion à l'aide d'un microscope automatique à épifluorescence (Olympus BX61, Tokyo, Japon) associé à un analyseur d'image (Bioview Duet® ver. 2.3, Nes Ziona, Israël). L'objectif a été d'analyser 500 spermatozoïdes par lame. L'ajustement de l'intensité de fluorescence nécessaire à la positivité a été effectué sur chaque échantillon par rapport au contrôle positif.

3.3. Etude du marquage du 8-OHdG

L'immunofluorescence dirigée contre le 8-hydroxy-2-désoxyguanosine a pour but de mettre en évidence l'adduction d'un groupement hydroxyle sur le désoxyribonucléotide guanosine. Cette modification est spécifique d'une atteinte oxydative à l'ADN. Elle permet donc de mesurer directement bien qu'incomplètement l'action des ERO sur la molécule d'ADN. L'anticorps dirigé contre la base modifiée se fixe selon un profil spécifique reconnaissable.

Suite à une réhydratation en PBST (PBS, BioMérieux et Tween 20®, Sigma-Aldrich), les lames ont subi une décondensation par NaOH 1M pendant 2 minutes. Deux rinçages successifs ont été effectués avant saturation des sites non spécifiques par de l'albumine sérique bovine 5% (BSA, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) pendant 30 minutes en chambre humide à température ambiante. Après deux rinçages au PBST, l'anticorps murin anti 8-OHdG (clone 15A3, NB110-96878, Novus Biologicals, Littleton, CO) dilué avec du BSA au 1/500^{ème} a été déposé sur la lame avant incubation pendant 12h à +4°C. L'étape de révélation intervenait après trois rinçages au PBST avec le dépôt d'un anticorps anti-Fc IgG couplé au fluorochrome Alexa 488 et incubation pendant 1h à +4°C. Trois rinçages successifs au PBST précédaient le séchage avant contre-

coloration à l'iodure de propidium dilué au 1/1000^{ème}. L'objectif a été d'analyser 500 spermatozoïdes, qui devaient être contre-colorés en rouge par l'iodure de propidium. Nous avons considéré comme positif un spermatozoïde dont au moins 50% de la tête était fluorescente en vert ou présentait un marquage spécifique au niveau du noyau (en bande centrale). Les fluorescences pointillées ont été exclues comme non-spécifiques.

3.4. Analyse de la condensation de la chromatine spermatique par coloration au bleu d'aniline

La coloration au bleu d'aniline permet de définir le degré de condensation de la chromatine du noyau spermatique et par conséquent le niveau de maturité nucléaire spermatique. En effet, l'ADN spermatique contient des histones qui sont progressivement remplacées par des protamines au cours de la maturation spermatique, permettant ainsi la forte compaction de l'ADN. Ce processus est incomplet, 10 à 15% des histones se maintenant finalement. Les noyaux riches en histones des spermatozoïdes immatures sont riches en lysine et vont donc réagir positivement à la coloration, prenant une couleur bleue, tandis que les noyaux plus riches en protamines des spermatozoïdes matures, qui contiennent beaucoup de cystéine, vont rester incolores ou très pâles.

Les lames rincées deux fois à l'eau distillée ont été colorées par un bain de bleu d'aniline 5% à pH 3,5 pendant 5 minutes (Gurr[®], BDH Laboratory Supplies, Angleterre). Elles ont ensuite été rapidement rincées deux fois à l'eau distillée puis déshydratées dans des bains d'alcool (70°, 90°, 100°) pendant 3 minutes chacun avant montage en Eukitt (Eukitt[™], EUK 100, CML, Nemours, France). Un témoin négatif est obtenu sans incubation préalable des échantillons avec le colorant. La lecture s'est faite sous lumière blanche au grossissement 1000x et en immersion à l'aide d'un microscope optique (Olympus BX21). Au total, 500 spermatozoïdes sont analysés pour chacune des lames étudiées. A été considéré comme positif un spermatozoïde pour lequel la coloration bleue occupait plus de 50% de la surface de la tête. A été considéré comme négatif, un spermatozoïde pour lequel la coloration bleue occupait moins de 50% de la surface de la tête.

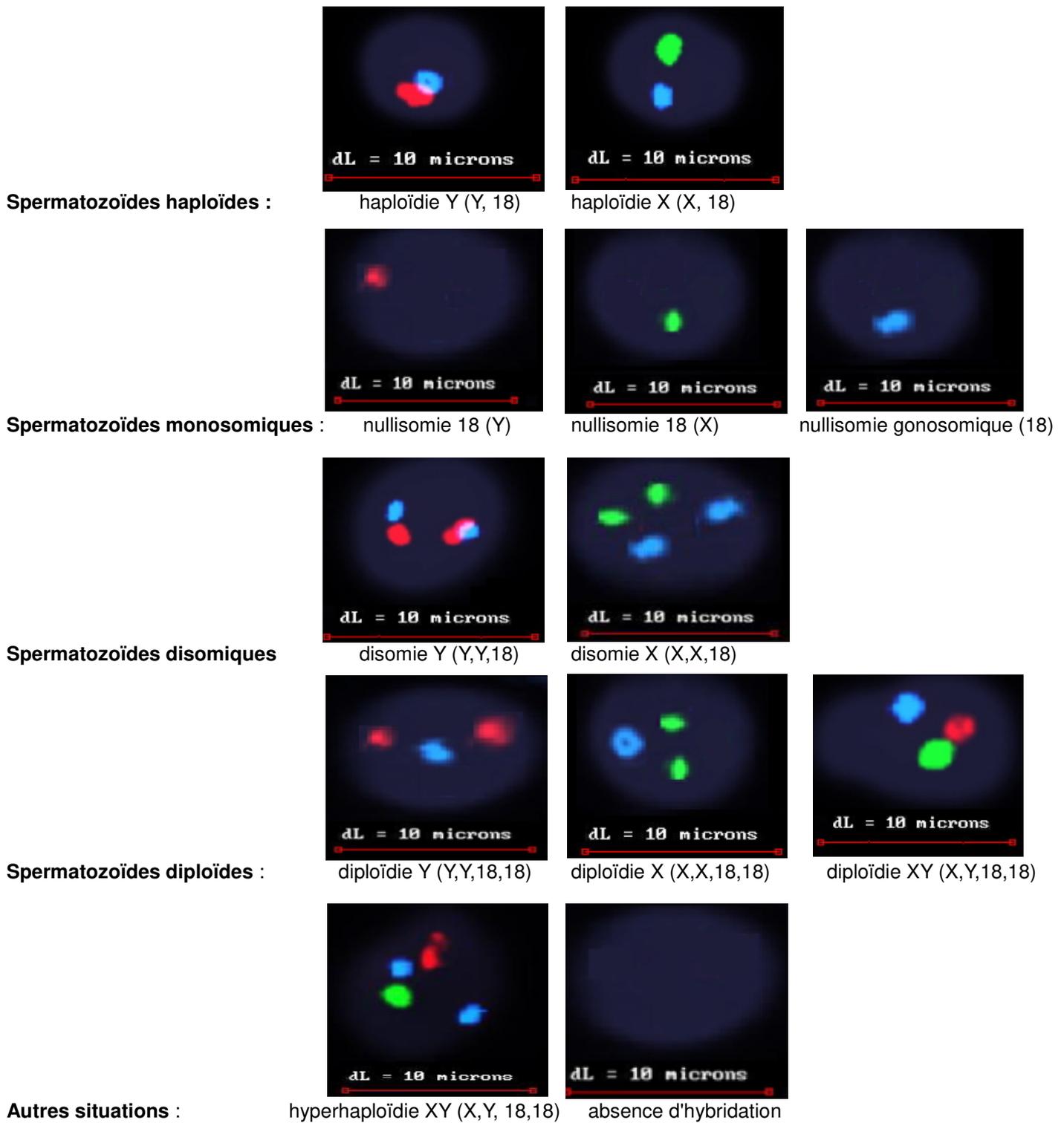


Figure 5 : Résultats possibles en FISH X,Y,18

Hybridation *in situ* en fluorescence en triple marquage utilisant des sondes centromériques pour les chromosomes sexuels (X en vert et Y en rouge) et pour le chromosome 18 (en bleu) permettant la détermination de l'aneuploïdie des chromosomes sexuels et la distinction entre spermatozoïdes haploïdes, hyperhaploïdes, diploïdes ou hypohaploïdes.

3.5. Détection de la fragmentation de l'ADN par la technique TUNEL

La technique dite de TUNEL (*In situ* Cell Death Kit Detection POD[®], Roche, Mannheim, Allemagne) permet d'observer *in situ* la fragmentation de l'ADN nucléaire spermatique. Les cassures simple ou double brins sont visualisées grâce à l'incorporation de nucléotides marqués au FITC (fluoresceine isothiocyanate), au niveau de l'extrémité 3'OH de ces cassures, par l'action d'une enzyme : la terminal désoxynucléotidyl transférase (TdT).

Les lames ont été réhydratées 10 minutes dans du PBS 1X avant trempage de 2 minutes dans un bocal d'acétone, puis rincées deux fois 10 minutes dans du PBS 1X. Ensuite, elles ont été incubées pendant 1 heure en chambre humide à 37°C avec le réactif composé de l'enzyme (la TdT) et de son substrat (nucléotides marqués au FITC), conformément à la procédure du fournisseur (*In situ* Cell Death Kit Detection POD[®]). Les lames ont été ensuite rincées deux fois dans du PBS 1X pendant 10 minutes puis déshydratées 3 fois 1 minute dans des bains d'éthanol (70°, 90°, 100°) avant contre coloration à l'iodure de propidium (dilué au 1/1000ème dans de l'antifade). Le témoin négatif a été obtenu sans incubation préalable des lames avec l'enzyme. Le témoin positif a été obtenu par traitement préalable de spermatozoïdes témoins à la DNase. Les lames ont été observées au grossissement 1000x à immersion à l'aide d'un microscope automatique à fluorescence associé à un analyseur d'image. L'analyse a porté sur 500 spermatozoïdes pour chacune des lames. Les spermatozoïdes dont le noyau émettait une fluorescence verte possèdent un ADN hyper-fragmenté. Les noyaux spermatiques ont été considérés comme fragmentés si plus de 50% de la surface de la tête spermatique émet une fluorescence verte. Les marquages verts punctiformes ont été exclus.

3.6. Evaluation du taux d'anomalies chromosomiques dans les noyaux spermatiques par FISH

L'hybridation *in situ* de sondes fluorescentes (FISH) est une technique de cytogénétique moléculaire qui permet d'étudier des marquages chromosomiques. Elle vise un appariement spécifique entre une séquence cible d'acides nucléiques et une sonde nucléotidique complémentaire. La FISH en triple marquage utilisée dans cette étude, a permis d'évaluer le taux d'aneuploïdie spermatique des chromosomes sexuels (X et Y) et d'un autosome (chromosome 18) à l'aide de sondes centromériques dirigées contre les séquences α -satellites.

L'hybridation simultanée de ces sondes permet d'identifier les noyaux haploïdes normaux et les situations d'aneuploïdies. Les trois sondes utilisées étaient couplées à fluorochrome émettant dans le bleu pour le chromosome 18 (CEP 18 Spectrum Aqua Blue[®], Abbott, Rungis, France) à fluorochrome émettant dans le vert pour le chromosome X (CEP X Spectrum Green[®]) et à une fluorochrome émettant dans rouge pour le chromosome Y (CEP Y Spectrum Orange[®]).

La décondensation des noyaux spermatiques a été effectuée par exposition à l'hydroxyde de sodium (NaOH) à la concentration finale de 1M pendant une durée de 1 minute 30 à 2 minutes puis stoppée par immersion des lames dans du tampon SSC 2X pendant 2 fois 2 minutes. Les lames ont ensuite été déshydratées grâce à de l'éthanol (2 minutes à 70°, 90°, 100°). Un mélange des sondes diluées au 1/3 dans du tampon d'hybridation (CEP Hybridization Buffer[®], Abbott) a ensuite été déposé entre lame et lamelle. La dénaturation simultanée de l'ADN spermatique et des sondes, réalisée par chauffage à 80°C pendant 5 minutes et l'hybridation proprement, à 37°C pendant une nuit, a été effectuée dans un appareil à hybrider (ThermoBrite[®], Abbot Molecular, Teddington, Royaume Uni). Les lames ont ensuite été lavées, d'abord dans du SSC 0,4X / NP40 0,3% (Ipegal[®], Sigma) à 73°C pendant 2 minutes puis SSC 2X / NP40 0,3% à température ambiante pendant 1 minute avant déshydratation par bains croissants d'éthanol (70°, 90°, 100°) d'1 minute chacun. La contre-coloration a été effectuée au DAPI dilué au 1/100ème dans de l'antifade (Antifade[®], MP-QBio-Gene, Illkirch, France). L'observation des lames s'effectue à l'aide d'un microscope à fluorescence automatisé associé à un analyseur d'images, au grossissement 1000X. Cinq mille spermatozoïdes ont été analysés pour chacun des sujets (Rives *et al.*, 2000). L'aneuploïdie correspond à la somme des spermatozoïdes disomiques et hyperhaploïdes, l'hyperploïdie correspond à la somme des spermatozoïdes aneuploïdes et diploïdes.

3.7. Evaluation du nombre et de la longueur relative des télomères par PNA-FISH

L'évaluation du nombre et de la longueur des télomères a été effectuée à l'aide de l'hybridation *in situ* en fluorescence quantitative (Q-FISH) en utilisant des sondes PNA (Peptide Nucleic Acid) couplées à un fluorochrome. Ces sondes PNA sont des analogues synthétiques d'ADN dans lequel le squelette phosphodiester est remplacé par des unités répétitives de

N-(2-aminoéthyl) glycine dans laquelle les bases puriques et pyrimidiques sont attachées par l'intermédiaire d'une liaison carbonyle méthyle, d'une grande stabilité.

Les lames ont été lavées avec du PBS 1X pendant 2 minutes, avant une décondensation par NaOH 1M pendant 3 minutes puis rinçage avec du SSC 2X pendant 2 minutes et déshydratation à l'éthanol (70°, 90°, 100°) pendant 2 minutes chaque. Les lames décondensées supportent un stockage à -20°C. Les lames ont été lavées au TBS (Tris Buffered Saline, Dako Denmark, Glostrup, Danemar) 1X, puis fixées dans du formaldéhyde à 3,7%, 2 minutes et lavées à nouveau au TBS avant déshydratation à l'éthanol (70°, 90°, 100°) pendant 2 minutes chacun. Les sondes télomériques sont issues du kit K5326 (DakoCytomation, Copenhague, Danemark) et la sonde dirigée contre le centromère du chromosome 2 (CEP2) nous été fournie par DakoCytomation. Le mélange des sondes diluées dans le tampon d'hybridation selon les recommandations du fournisseur a été déposé entre lame et lamelle avant dénaturation pendant 5 minutes à 80°C puis hybridation pendant 2 heures à 22°C. L'hybridation est arrêtée par une solution de rinçage (VIAL3, K5326, DakoCytomation). Les lames sont enfin lavées avec la solution de lavage (VIAL4, K5326, DakoCytomation) pendant 5 minutes au bain-marie à 65°C avant déshydratation finale dans des bains d'alcool (70°, 90°, 100°) pendant 2 minutes chacun. Les noyaux spermatiques sont contre-colorés par le DAPI dilué au 1/100ème dans de l'antifade. Les lames sont observées au grossissement 600x à immersion à l'aide d'un microscope automatique à épifluorescence associé à un analyseur d'image. Un programme informatique dédié à la quantification de la mesure de la longueur des télomères a été développé spécifiquement par le fournisseur pour le laboratoire (Bioview, Nes Ziona, Israël) . L'intensité de fluorescence intégrée du centromère du chromosome 2 et des télomères est déterminée automatiquement pour chacun des noyaux spermatiques et calculée après soustraction de l'intensité de fluorescence du fond/autofluorescence et correction pour les temps d'exposition d'image et d'acquisition. L'intensité de fluorescence du centromère du chromosome 2 est considérée comme étant stable, celles des télomères est dépendante de la longueur de la séquence télomérique, la longueur des télomères évaluée par cette technique est donc relative.

La taille relative des télomères est exprimée en unités arbitraires de fluorescence via la formule suivante : FRU (Fluorescence Relative Units) = (Intensité de fluorescence des télomères/Intensité de fluorescence du centromère du chromosome 2) × 100. L'évaluation du nombre et de la taille des télomères a été effectuée sur 200 noyaux spermatiques pour chacun des échantillons. Les noyaux pris en considération dans l'analyse devaient être isolés, ni accolés et ni chevauchants, et chaque noyau devait contenir un seul spot fluorescent vert correspondant au centromère du chromosome 18 pour s'assurer de l'haploïdie du spermatozoïde.

4. Analyse des résultats

Les données collectées dans un tableur (OpenOffice Suite, Apache Software Foundation, 2014) ont été analysées grâce au logiciel R v3.2.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), avec les bibliothèques de fonctions base, stat, prettyR, Hmisc, corrplot, corrgram. Les analyses comparatives intéressant le stress oxydant, les anomalies du nombre des chromosomes, la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN, la longueur relative et le nombre de télomères ont fait appel à un test non paramétrique de Mann et Whitney. Une correction de Holme a été appliquée à ces analyses multiples. La recherche de corrélation s'est effectuée selon la méthode Spearman. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type. Pour chacun des tests, une valeur de p inférieure à 0,05 a été considérée comme significative.

	Groupe Cas	Groupe Témoins
	moy. ± e.t	
Durée d'abstinence (jours)	5,3 ±2,63	5,6 ±2,06
Volume (mL)	4,57 ±1,09	4,40 ±1,92
pH	8,1 ±0,18	7,9 ±0,20
Concentration (10 ⁶ spz /mL)	6,8 ±2,48	46,2 ±22,71
Numération totale (10 ⁶ spz/éjaculat)	30,3 ±10,69	191,7 ±109
Leucytospermie (10 ⁶ cellules rondes/mL)	0,3 ±0,44	0,4 ±0,59
Mobilité a+b (%)	33,5 ±8,57	40,5 ±5,54
Vitalité (%)	74,8 ±10,39	79,8 ±6,45
Formes typiques (%)	31,5 ±12,97	49,1 ±12,80

Tableau I : Paramètres spermatisques conventionnels

Evaluation des paramètres spermatisques en accord avec l'OMS 2011. L'évaluation de la tératozoospermie (nombre de spermatozoïdes à morphologie typique) a été effectuée selon la classification de David modifiée.

Spz = spermatozoïde, moy. = moyenne, e.t. = écart type.

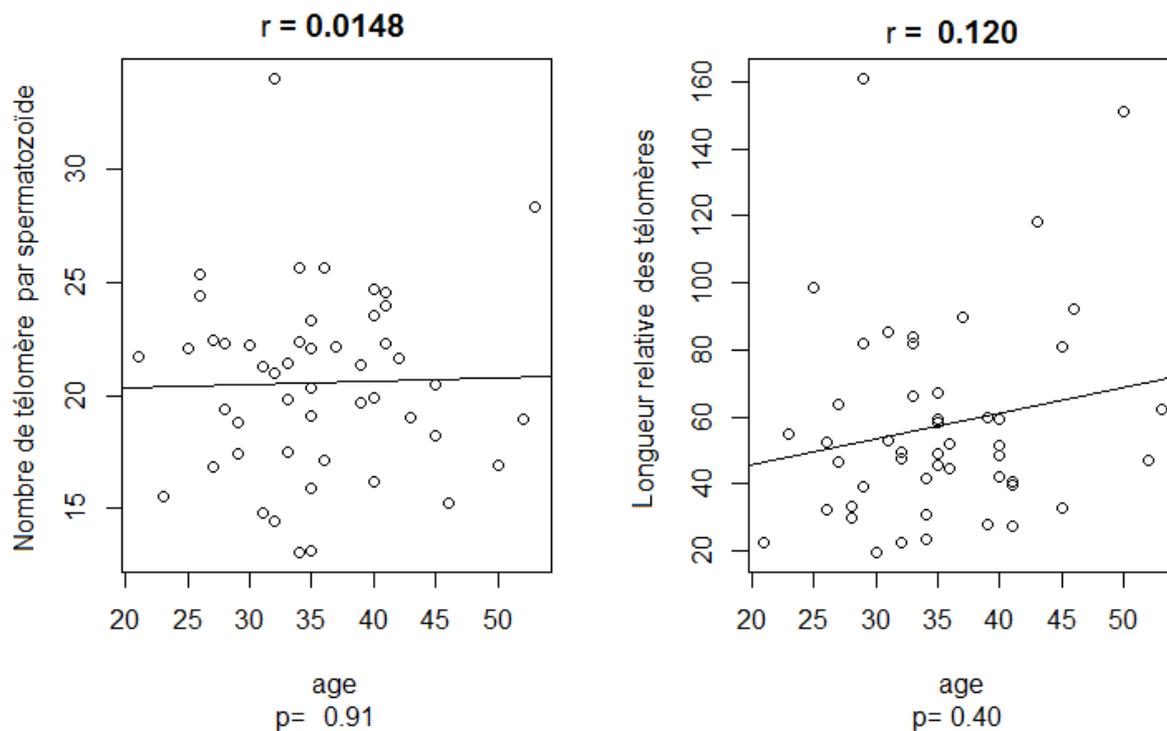


Figure 6 : Corrélation entre l'âge et les paramètres télomériques

On n'observe pas de corrélation significative entre l'âge et le nombre de télomères comptés par spermatozoïde ni avec la longueur relative des télomères spermatisques.

Résultats

1. Description de la population

Au total, 52 patients ont été inclus dans l'étude entre le 28 janvier 2016 et le 25 août 2016, 22 dans le groupe témoin avec un âge moyen de 35,1 ans (compris entre 21 et 53 ans) et 30 dans le groupe des cas avec un âge moyen de 35,2 ans (compris en 23 ans et 45 ans). Parmi les témoins, 12 hommes (60%) avaient une fertilité prouvée par au moins un enfant. Les paramètres spermatiques classiques de chacun des groupes sont présentés dans le Tableau I. Un seul des 22 témoins inclus ne présentait pas des paramètres spermatiques complètement normaux et avait une tératozoospermie isolée modérée (25% de formes typiques) ; 50% des patients du groupe cas présentaient une oligozoospermie isolée (15 patients sur 30), 16,67% une oligoasthénozoospermie (5 sur 30), 13,33% un oligotératozoospermie (4 sur 30) et 20% une oligoasthénotératozoospermie (6 sur 30). Le volume de l'éjaculat et la durée de l'abstinence sexuelle étaient semblables entre les deux groupes ainsi que la présence de cellules rondes. Le pH était légèrement plus basique dans le groupe des cas.

2. Analyse comparative des altérations du noyau spermatique

Les résultats concernant les altérations spermatiques sont présentées dans le Tableau II.

2.1. Altérations liées au stress oxydant.

Le pourcentage de spermatozoïdes présentant un marquage positif au CellROX[®] DeepRed, marqueur du stress oxydant d'origine cytosolique est significativement plus élevée chez les cas par comparaison aux témoins (24,3% \pm 20,69 *versus* 9,45% \pm 7,40 ; $p = 0,039$). Le pourcentage de spermatozoïdes présentant un marquage positif au CellROX[®] Green, marqueur du stress oxydant d'origine nucléaire n'est pas différent entre les cas et les témoins : (30,26% \pm 20,33 *versus* 26,41% \pm 13,32 ; $p = 0,66$) (Figure 7). De même, aucune différence n'a été observée concernant le marquage anti-8-OHdG, spécifique des dommages oxydatifs nucléaires, entre le groupe de cas et des témoins (Figure 8).

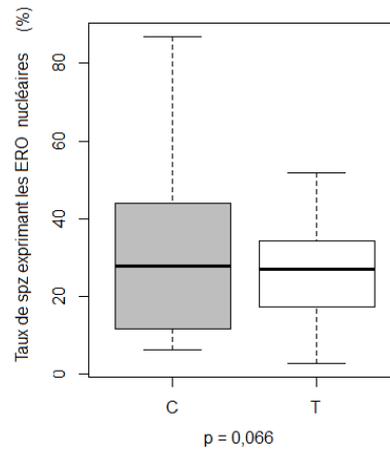
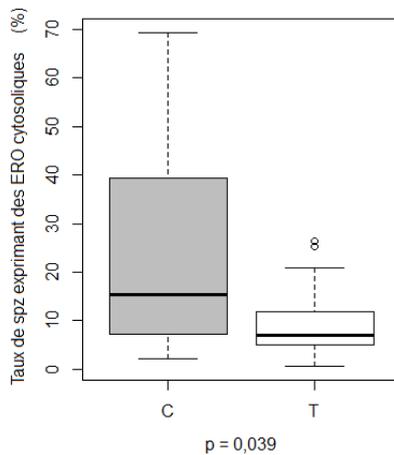
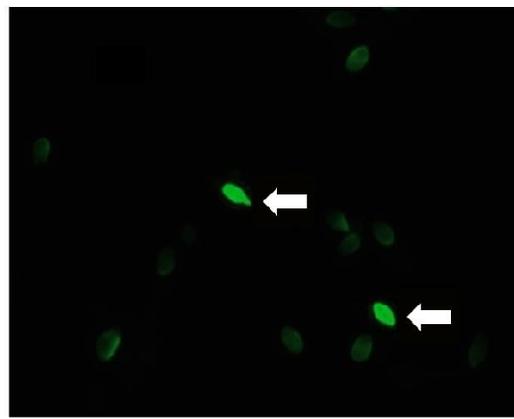
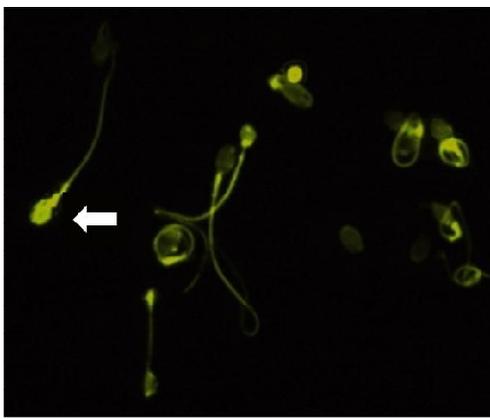


Figure 7 : Détection des espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans les spermatozoïdes

(A) Observation au microscope à fluorescence au grossissement x1000 de spermatozoïdes après marquage par les sondes CellROX® Green Reagent et contre-coloration au DAPI. Les spermatozoïdes positifs sont fluorescents en vert au niveau du noyau. (B) Observation au microscope à fluorescence au grossissement x1000 de spermatozoïdes après marquage par les sondes CellROX® DeepRed Reagent et contre-coloration au DAPI II. Les spermatozoïdes positifs sont fluorescents en jaune orangé au niveau de la tête et du flagelle du spermatozoïde. (C) Distribution des taux de spermatozoïdes présentant des ERO détectables où « C » correspond au groupe des cas et « T » au groupe des témoins. Les flèches blanches indiquent les spermatozoïdes positifs pour l'expression des ERO cytosoliques ou nucléaires.

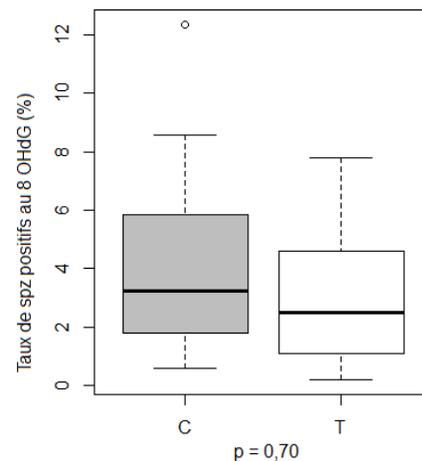
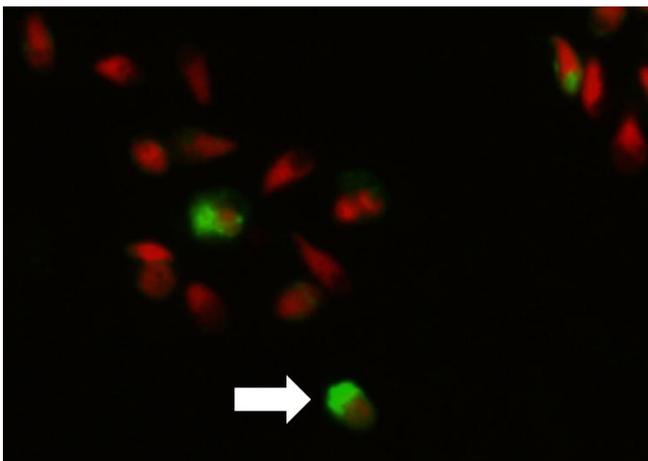


Figure 8 : Dommages spécifiques du stress oxydant à l'ADN spermatique

(A) Observation au microscope à fluorescence de spermatozoïdes au grossissement x1000 après marquage en immunofluorescence du 8-OHdG (8-hydroxy-désoxyguanosine) et contre-coloration à l'iodure de propidium. Les spermatozoïdes positifs sont fluorescents en vert dans le noyau. (B) Distribution des taux de spermatozoïdes exprimant le 8-OHdG dans chacun des groupes où « C » correspond aux cas et « T » aux témoins. Les flèches blanches indiquent les spermatozoïdes positifs pour l'expression du 8-OHdG.

2.2. Condensation de l'ADN spermatique

Le taux de spermatozoïdes présentant un défaut de condensation de l'ADN est significativement augmenté dans le groupes des cas $15,23\% \pm 8,16$ par comparaison avec le groupe des témoins ($9,31\% \pm 4,21$), $p = 0,006$ (Figure 9).

2.3. Fragmentation de l'ADN spermatique

Même si le taux de spermatozoïdes présentant une fragmentation de l'ADN évaluée par la méthode TUNEL est supérieure dans le groupe des cas par rapport au groupe des témoins ($9,77\% \pm 6,37$ *versus* $7,15\% \pm 5,34$), cette différence n'est pas significative ($p = 0,49$) (Figure 10).

2.4. Anomalies chromosomiques spermatiques

Les taux d'anomalies chromosomiques spermatiques observées entre les cas et les témoins ne diffèrent pas d'un point de vue statistique ($p = 0,70$).

2.5. Nombre et longueur relative des télomères

Sur l'ensemble des 9891 spermatozoïdes analysés, 5802 dans le groupe des cas, 4290 dans le groupe témoin, sans tenir compte du facteur individuel, le nombre de télomères par spermatozoïde est significativement augmenté chez les cas par comparaison aux témoins ($21,72$ *versus* $18,79$, $p = 2.10^{-16}$) (Figure 12). En prenant en compte la valeur moyenne par échantillon, le nombre de spots télomériques reste significativement augmenté dans le groupe des cas par rapport au groupe des témoins ($21,68 (\pm 4,27) [13,16 - 34,05]$ *versus* $18,82 (\pm 2,99) [13,05 - 23,98]$, $p=0,049$), après correction de Holm.

La longueur relative moyenne des télomères pour chaque patient au sein des groupes considérés comme entité unique ne différait pas significativement entre les cas et les témoins bien qu'une légère diminution soit observée chez les cas ($57,06 (\pm 34,79)$ *versus* $58,11 (\pm 22,11)$, $p=0,70$).

Nous n'avons pas trouvé de corrélation significative entre l'âge et le nombre des télomères spermatiques ($r=0,015$; $p=0,82$) ni entre l'âge et la longueur relative moyenne des télomères ($r = 0,12$; $p = 0,41$) (Figure 6).

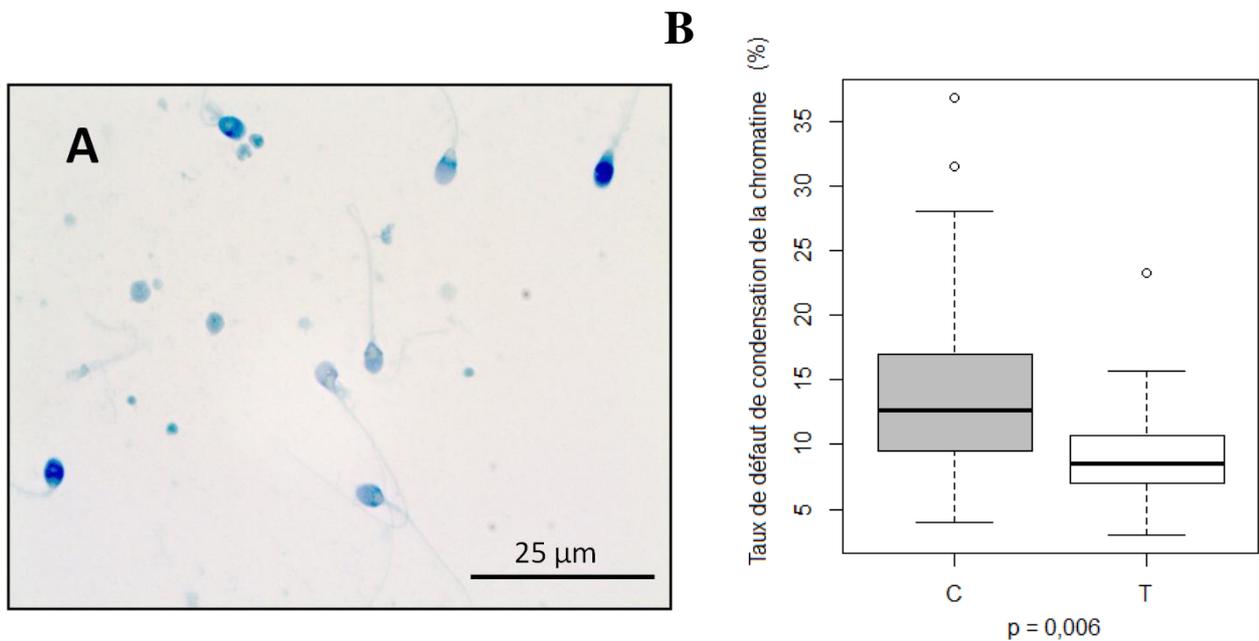


Figure 9 : Condensation de l'ADN spermatique

(A) Observation au microscope optique au grossissement x600 de spermatozoïdes après coloration au bleu d'aniline. Les spermatozoïdes présentant un défaut de condensation sont marqués en bleu foncé. (B) Distribution des taux de spermatozoïdes présentant un défaut de condensation dans chacun des groupes où « C » correspond au groupe des cas et « T » au groupe des témoins.

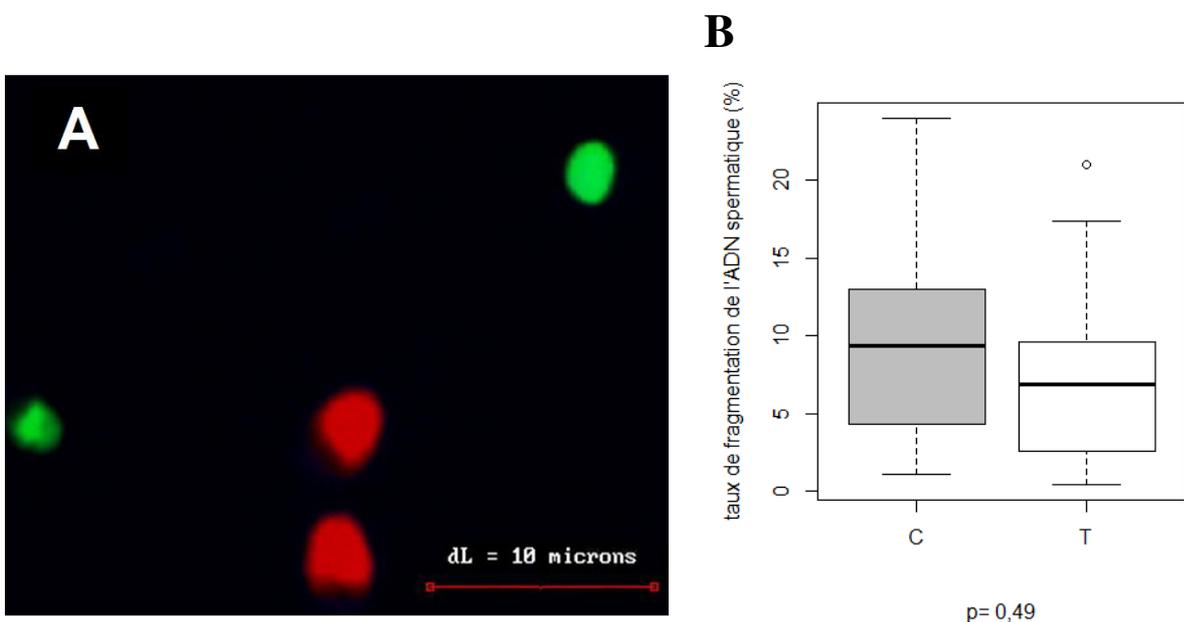


Figure 10 : Fragmentation de l'ADN spermatique

(A) Observation au microscope à fluorescence de spermatozoïdes au grossissement x1000 après marquage par la méthode TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling*). Les spermatozoïdes positifs sont fluorescents en vert. (B) Distribution des taux de spermatozoïdes fragmentés dans chacun des groupes où « C » correspond au groupe des cas et « T » au groupe des témoins.

	moy. (\pm e.t.)	nombre de spz (moy. \pm e.t.)	moy. (\pm e.t.)	nombre de spz (moy. \pm e.t.)	<i>p</i>
ERO cytosoliques (%)	24,33 (\pm 20,69)	507 (\pm 151)	9,45 (\pm 7,40)	540 (\pm 133)	0,0390 **
ERO nucléaires (%)	30,26 (\pm 20,33)	507 (\pm 151)	26,41 (\pm 13,32)	540 (\pm 133)	0,6600
8-OHdG (%)	3,93 (\pm 2,85)	536 (\pm 46)	2,98 (\pm 2,31)	542 (\pm 72)	0,7
BA (%)	15,23 (\pm 8,16)	542 (\pm 110)	9,31 (\pm 4,21)	624 (\pm 114)	0,006 ***
TUNEL (%)	9,77 (\pm 6,37)	569 (\pm 151)	7,15 (\pm 5,34)	591 (\pm 164)	0,49
Haploïdie (%)	99,20 (\pm 0,50)	5277 (\pm 74)	99,13 (\pm 0,43)	5249 (\pm 142)	
Hyperploïdie (%)	0,67 (\pm 0,34)	5277 (\pm 74)	0,78 (\pm 0,42)	5249 (\pm 142)	0,7
Nombre de télomères par spz (signaux par spz)	21,68 (\pm 4,27)	200 (\pm 18)	18,82 (\pm 2,99)	214 (\pm 15)	0,049 *
Longueur relative des télomères (FRU)	57,06 (\pm 34,79)	200 (\pm 18)	58,11 (\pm 22,11)	214 (\pm 15)	0,7

Tableau II : Altérations nucléaires spermatiques évaluées dans le groupe des cas et le groupe des témoins

Les valeurs de *p* indiquées sont calculées à partir d'un test de Mann-Whitney après correction de Holm. Moy = moyenne, e.t. = écart type, spz = spermatozoïde, TUNEL = *terminal deoxynucleotil transferase dUTP nick end labelling*, BA = bleu d'aniline, FRU = *fluorescence relative unit*, ERO = espèces réactives de l'oxygène.

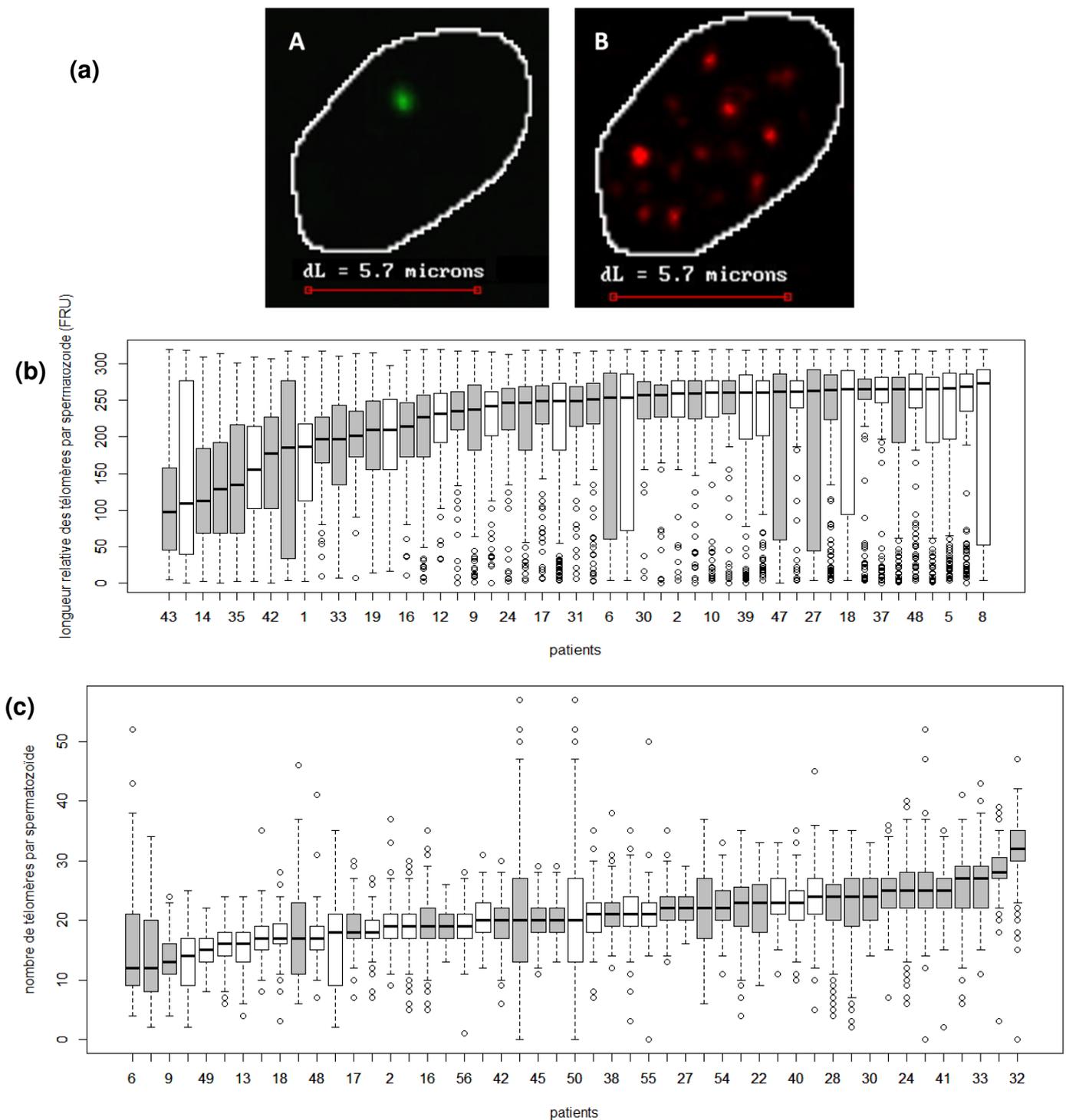


Figure 11 : Distribution de la longueur relative et du nombre des télomères dans les noyaux spermatozoïdes des cas et des témoins

Les échantillons figurés en gris appartiennent au groupe des cas, ceux figurés en blanc au groupe des témoins.

(a) Observation des spermatozoïdes par la technique PNA Q-FISH au microscope automatique à fluorescence (grossissement x600). La photographie A montre un signal fluorescent centromérique (vert) du chromosome 2 et la photographie B montre 18 signaux fluorescents télomériques (rouge). (b) Pour chaque échantillon, l'intensité de fluorescence des sondes télomériques enregistrée par le microscope et le logiciel est pondérée par l'intensité de fluorescence centromérique, le ratio étant exprimé en FRU, *fluorescence relative unit* sur une échelle logarithmique (base 10) (c) pour chaque échantillon, figure le nombre de télomères comptés manuellement sur chacun des spermatozoïdes. Pour les figures 11.b et 11.c, chaque boîte à moustache représente un échantillon issu des cas ou des témoins (n=28) classé par médiane croissante du paramètre étudié.

Par ailleurs, selon la méthode de Spearman, on retrouve un coefficient de corrélation linéaire $r=0,29$ statistiquement significatif ($p = 0,04$) entre le taux spermatozoïdes présentant un défaut de condensation de la chromatine et le nombre moyen de télomères comptés. On n'observe pas de corrélation significative entre le taux de marquage au CellROX[®] DeepRed et nombre de télomères observés ($r = 0,18$; $p = 0,21$). Enfin, l'association entre CellROX[®] DeepRed et marquage au bleu d'aniline est encore plus faible ($r = 0,16$) et non significative ($p = 0,27$).

3. Analyse du groupe des cas.

3.1. Corrélation entre défaut de condensation de la chromatine spermatique et nombre de signaux télomériques

Au sein du groupe des cas, nous avons recherché l'existence d'une corrélation entre les paramètres nucléaires significativement différents de ceux du groupe des témoins. Une méthode d'imputation simple a permis de tenir compte des valeurs manquantes. Ainsi, selon la méthode de Spearman, on retrouve un coefficient de corrélation linéaire $r = 0,38$ statistiquement significatif ($p = 0,04$) entre le taux de spermatozoïde à ADN mal condensé et le nombre moyen de télomères comptés (Figure 16). On n'observe pas de corrélation significative entre le taux de marquage au CellROX DeepRed et nombre de télomères observés ($r = 0,18$; $p = 0,19$). Enfin, l'association entre CellROX DeepRed et marquage au bleu d'aniline est encore plus faible ($r = 0,15$) et non significative ($p = 0,41$). Un corrélogramme selon la méthode des cercles pour les paramètres spermatiques classiques et des marqueurs d'altérations nucléaires du groupe des cas est proposé dans la figure 13. Seules les valeurs significatives sont montrées (Figure 13). On observe ainsi une tendance à l'évolution conjointe des taux des diverses altérations nucléaires détectées par coloration au bleu d'aniline et méthode TUNEL. La méthode TUNEL et le marquage du 8-OHdG semblent également être associés. Le nombre de télomères spermatiques paraît être inversement corrélé à la longueur relative des télomères. La numération semble être associée à de plus faible taux d'hyperploïdie et à une plus grande longueur relative des télomères spermatiques. Cependant, ces cinq derniers résultats sont à prendre avec précaution en raison de l'insignifiance des tests primaires.

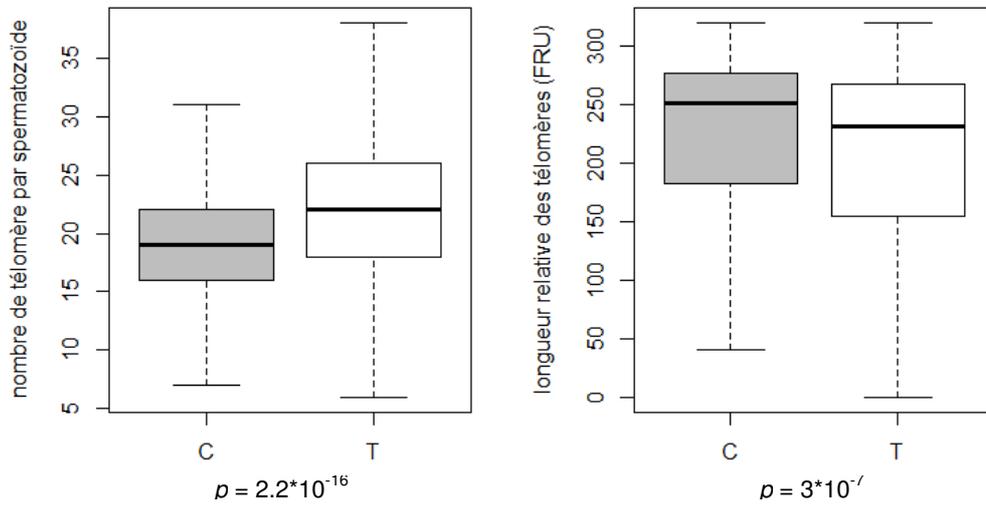


Figure 12 : Distribution de la longueur relative et du nombre des télomères spermatiques entre les groupes

Comparaison des valeurs moyennes de la longueur relative et du nombre des télomères entre le groupe des cas (C) et des témoins (T). Le nombre de télomère est exprimé en moyenne par spermatozoïde et la longueur relative en FRU : *fluorescence relative units*.

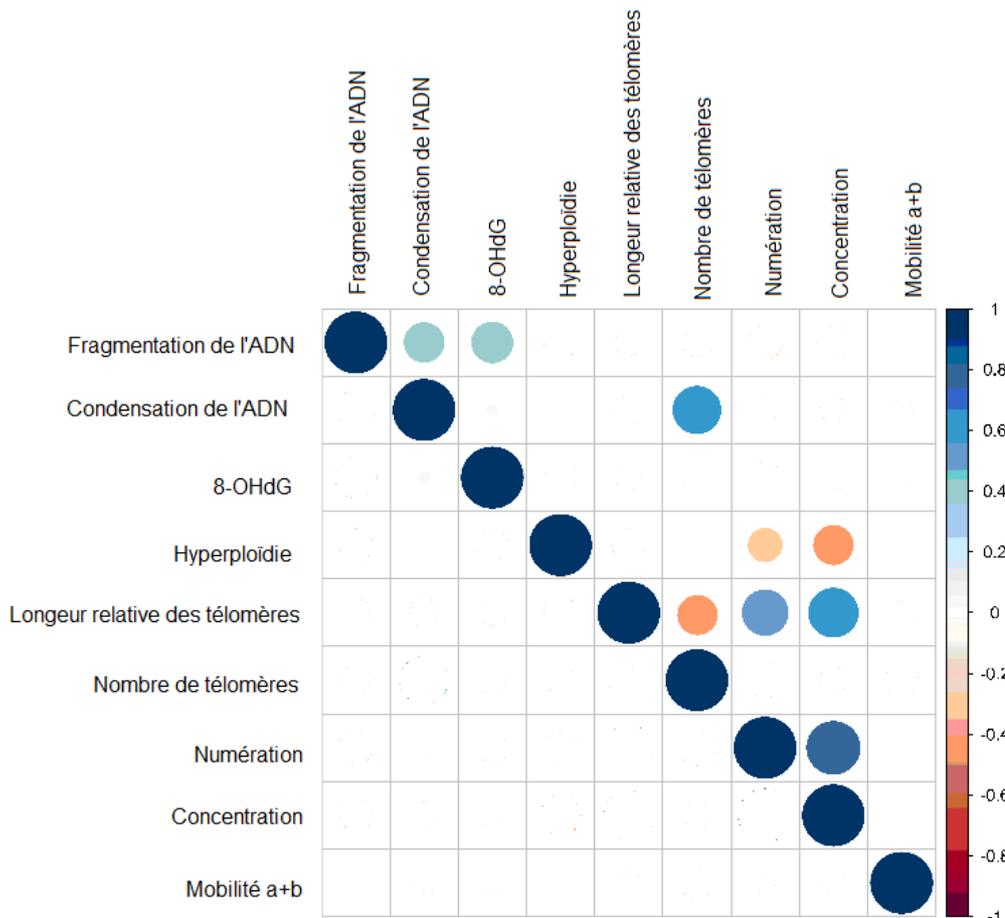


Figure 13 : Corrélogramme selon la méthode des cercles du groupe des cas.

Seules sont représentées les corrélations significatives ($p < 0.05$). Plus un cercle est grand, plus il s'éloigne de 0 et plus l'association est importante. Plus la couleur du cercle tend vers le rouge, plus le coefficient r tend vers 1 (association positive entre deux variables), plus il est bleu, plus le coefficient r tend vers -1 (association négative entre les deux variables).

3.2. Réalisation d'un diagramme de Venn et choix des seuils

La réalisation d'un diagramme de Venn nécessite de choisir des seuils pour chacun des paramètres. Après avis du biostatisticien, la réalisation d'une analyse multivariée n'étant pas l'option la plus adaptée, nous avons choisi de déterminer les seuils par étude graphique des distributions. Nous avons ainsi comparé la distribution des valeurs de chacun des trois marqueurs significativement différents entre les deux groupes. L'apposition des fonctions de densité obtenues pour chacun des groupes à celle obtenue pour le groupe entier a permis d'identifier les zones de séparation entre les modes des distributions.

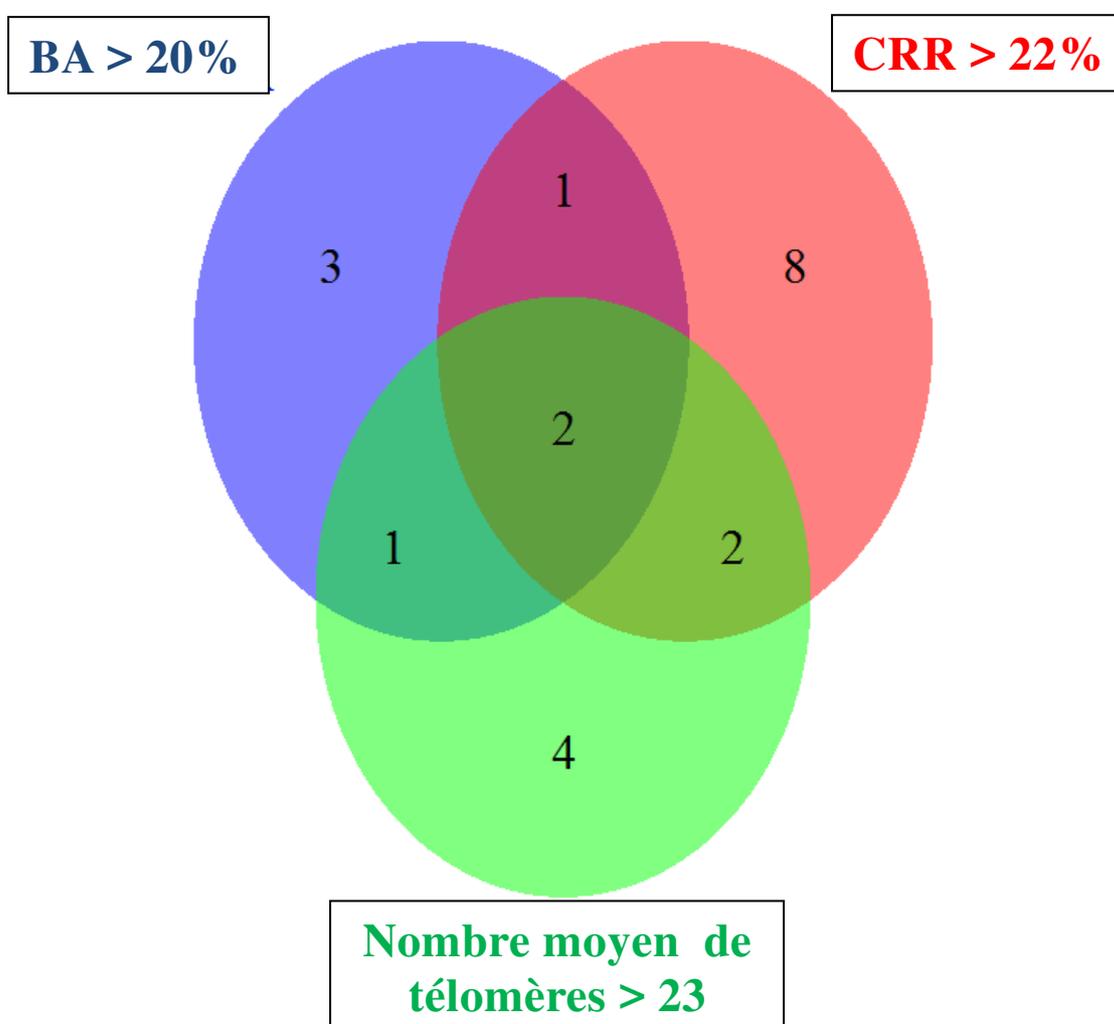


Figure 14 : Diagramme de Venn des altérations nucléaires spermatiques

Sont représentés les patients présentant des taux de marquage au bleu d'aniline (BA) > 20%, de marquage au CellROX[®] DeepRed (CRR) > 22%, et présentant un nombre moyen de télomères spermatiques > 23.

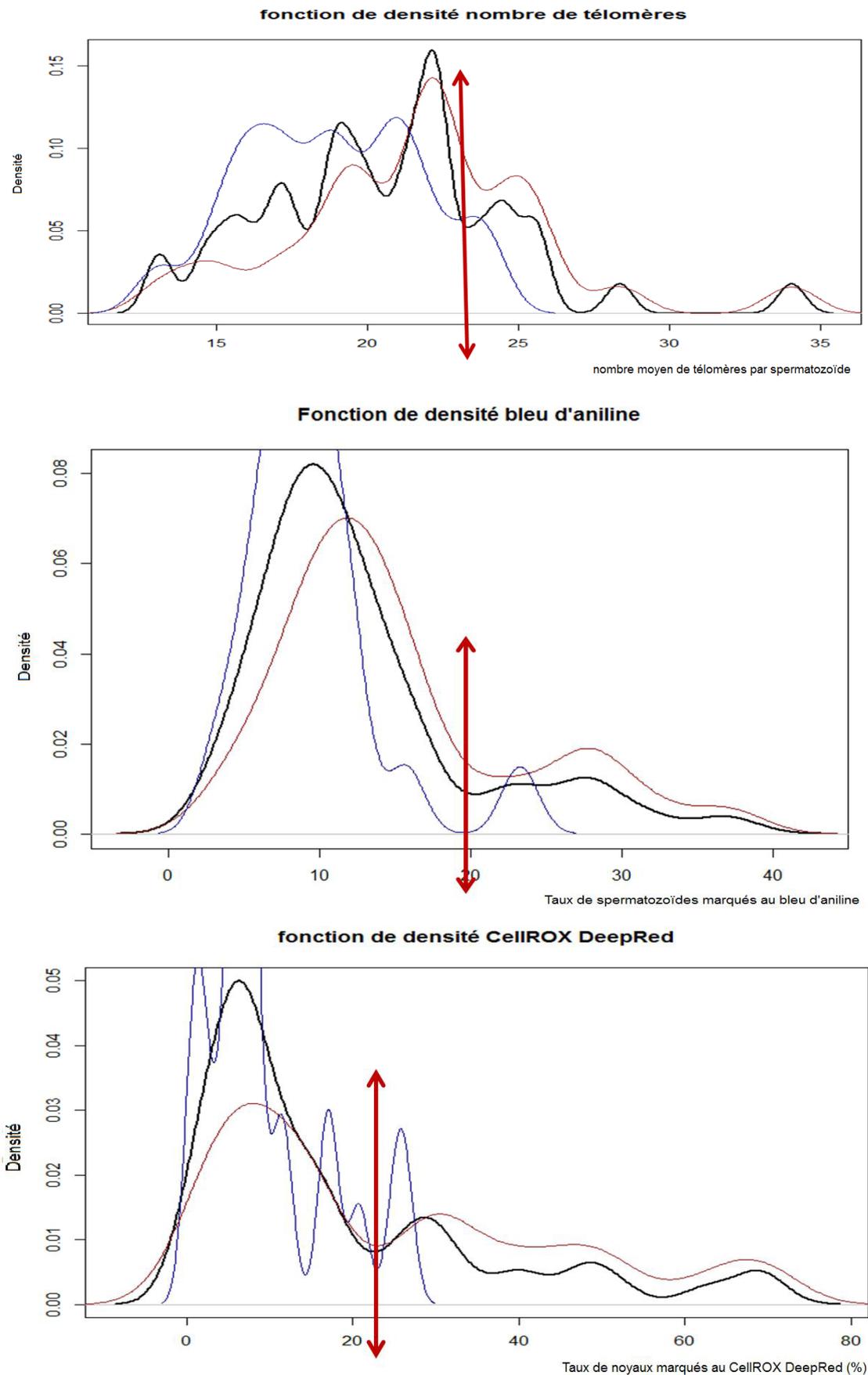


Figure 15 : Fonctions de densité des altérations nucléaires spermatiques

La fonction de densité globale de chacun des paramètres est exprimée par le trait noir. Le groupe des cas est représenté par la courbe rouge, le groupe des témoins par la courbe bleue. La double flèche bordeaux signale le seuil retenu.

Cette première analyse, combinée à l'exploitation d'une autre représentation des distributions (les diagrammes en pyramide, figure 16) pour confirmation nous a amené à établir les seuils / cutoffs suivants : 20% pour le bleu d'aniline, 23 pour le nombre moyen de télomères par spermatozoïde et 22% pour le marquage au CellROX® DeepRed. Le faible nombre de recouvrements ainsi que les corrélations à de faibles coefficients sont en faveur d'une indépendance relative de ces marqueurs, appuyant leur caractère informatif respectif propre.

3.3. Analyse du sous groupe des cas présentant de forts taux d'ERO d'origine cytosolique

Au sein du groupe des cas, nous avons séparé les sujets selon leur taux d'ERO d'origine cytosolique, en utilisant le seuil déterminé au paragraphe précédent. La comparaison des membres du groupe des cas présentant un taux d'ERO supérieur à 22% avec ceux présentant un taux inférieur ou égal à 22% ne montrait pas de différence significative concernant le nombre de télomères spermatiques : $22,46 \pm 5,33$ versus $21,12 \pm 3,40$; $p=0,84$, ni concernant le taux de spermatozoïdes à chromatine mal condensée : $16,60 \pm 9,66$ versus $14,19 \pm 6,92$; $p=0,45$. Parmi les autres altérations nucléaires spermatiques qui n'étaient pas significativement différentes lors de l'analyse initiale, aucune ne tendait à la différence entre les deux sous-groupes. Aucun paramètre spermatique classique ne différait significativement entre les deux groupes.

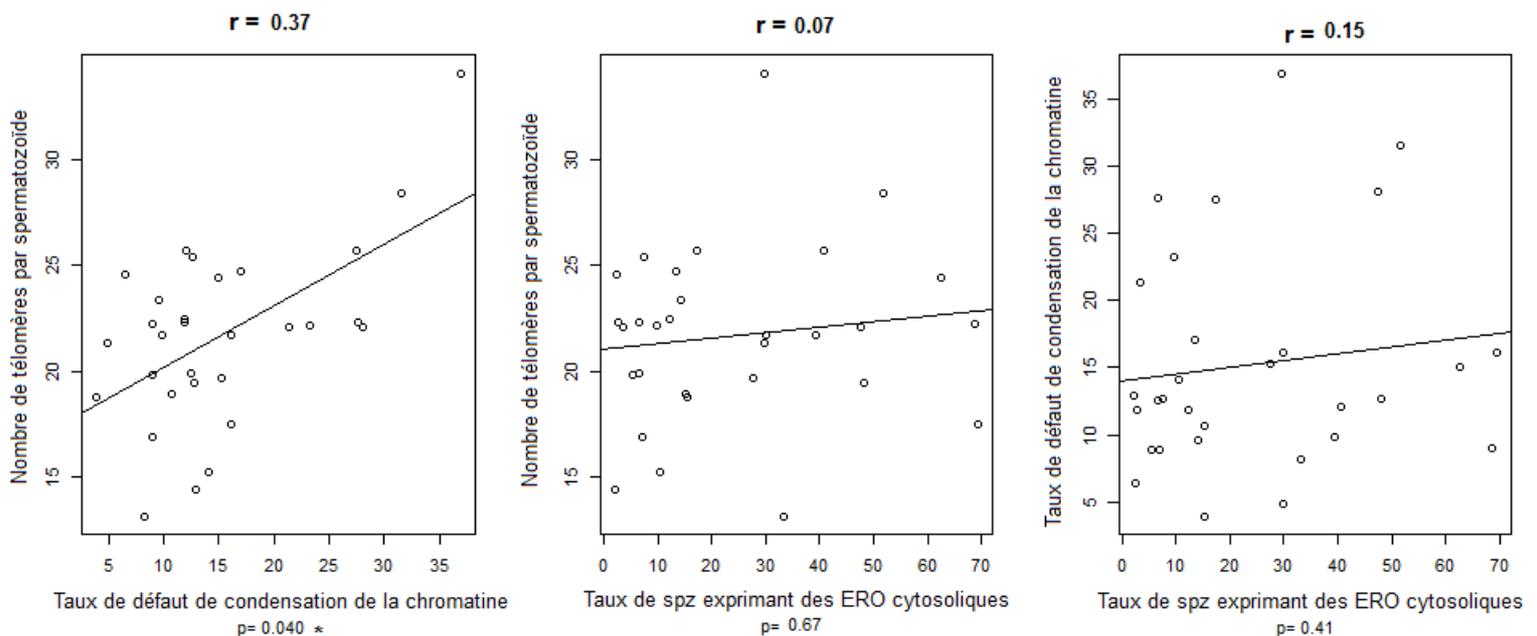


Figure 16 : Corrélation entre défaut de condensation de la chromatine, nombre de télomères et présence d'ERO cytosoliques au sein du groupe des cas

(a) nombre de télomère par spermatozoïde et défaut de condensation de la chromatine (b) nombre de télomère par spermatozoïde et taux d'ERO cytosoliques (c) défaut de condensation de la chromatine et taux d'ERO cytosoliques.

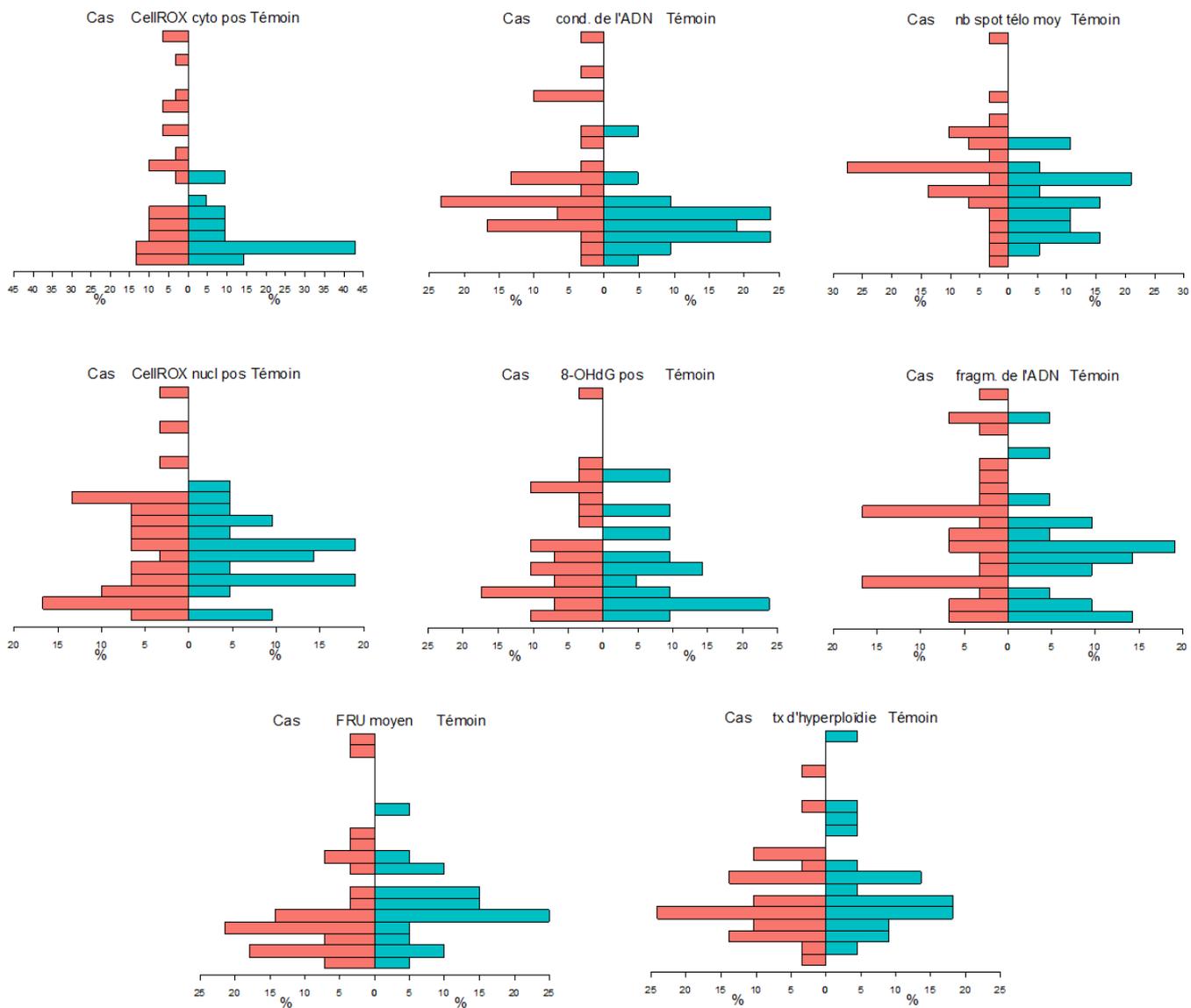


Figure 17 : Représentation des distributions des altérations spermatisques étudiées

CellROX cyto pos = taux de marquage positifs au CellROX[®] DeepRed. CellROX nucl pos = taux de marquage positifs au CellROX Green. Cond. = condensation, frag. = fragmentation, tx = taux, FRU = fluorescence relative unit, nb spot téló = nombre moyen de télomères par spermatozoïde.

Discussion

Notre étude, pilote par rapport au sujet abordé, a mis en évidence une augmentation significative de la présence d'ERO d'origine cytosolique et de défaut de condensation de l'ADN, reflet d'une mauvaise condensation chromatinienne, dans les noyaux des spermatozoïdes d'une population d'hommes présentant une diminution de la numération et de la concentration spermatique (oligozoospermie) éventuellement associée à d'autres altérations des paramètres spermatiques classiques. Nous avons également trouvé une diminution du nombre des télomères comptables dans les noyaux spermatiques au sein de cette population par comparaison à un groupe de témoins normozoospermiques, voire même féconds pour la majorité d'entre eux. Au sein du groupe des cas, nous avons une corrélation significative entre le taux de défauts de condensation de l'ADN spermatique (coloration au bleu d'aniline) et le nombre de télomères retrouvés.

On notera par ailleurs une plus grande dispersion dans la distribution des valeurs des altérations spermatiques statistiquement non significatives dans le groupe des cas par rapport au groupe des témoins, notamment de la fragmentation de l'ADN spermatique et du taux de dommages radicalaires à l'ADN. Lors d'une analyse intermédiaire nous avons montré des tendances intéressantes, à la limite de la significativité statistique concernant ces taux de marquage au 8-OHdG et la fragmentation évaluée par la méthode TUNEL. Ces tendances ne se sont pas confirmées avec l'inclusion de 20 sujets supplémentaires dans l'étude.

Les résultats obtenus dans notre étude concernant les télomères sont en adéquation avec les données de la littérature, néanmoins peu nombreuses concernant les spermatozoïdes d'hommes infertiles. La longueur des télomères spermatiques semble augmenter avec l'âge des hommes (Kimura *et al.*, 2008; Aston *et al.*, 2012). Cependant, les coefficients de corrélation de l'âge et de la longueur des télomères spermatiques rapportés dans les publications étaient faibles, oscillant entre $r=0,10$ (Yang *et al.*, 2015) et $r=0,32$ (Aston *et al.*, 2012), proches des valeurs obtenues lors de notre étude, bien qu'elles ne soient pas significatives, $r = 0,18$; $p = 0,20$ (Figure 6), probablement par manque de puissance et d'effectif. Certaines équipes ont établi un modèle

mathématique proposant une diminution de la longueur des télomères leucocytaires de 19 pb/an, et inversement, une élongation des télomères spermatiques augmente de 57 pb/an (Aston *et al.*, 2012). En nous focalisant sur des patients consultant dans un centre de traitement de l'infertilité, nous ciblons une part réduite de la population générale, ce qui n'est pas toujours le cas des études précédemment citées, l'équipe de Yang notamment ayant recruté des donneurs *a priori* sains et celle de Kimura s'intéressant à des études transversales en population réelle. L'équipe indienne qui s'était penchée spécifiquement sur le cas d'hommes infertiles n'avait pas retrouvé de corrélation significative entre l'âge et la longueur relative des télomères spermatiques (Thilagavathi *et al.*, 2013). Il existe une hypothèse alternative expliquant la plus grande longueur spermatique constatée chez les sujets plus âgés sans impliquer une élongation des télomères dans les spermatogonies (Stindl 2016). Cette hypothèse fait intervenir une érosion brutale de la longueur des télomères humains, principalement féminins débutant dans les années 1920 et s'accéléralant dernièrement. Ce phénomène serait associé avec l'augmentation de l'âge de la première grossesse. Les hommes âgés seraient alors descendants de populations nées de femmes jeunes, dans des ovocytes ayant de longs télomères et donc par reliquat eux-mêmes de plus longs télomères spermatiques que les nouvelles générations.

La majorité des études s'intéressant à la longueur des télomères spermatiques ont procédé à une quantification relative par qPCR (Rocca *et al.*, 2016 ; Mishra *et al.*, 2016 ; Yang *et al.*, 2015 ; Thilagavathi *et al.*, 2013 ; Ferlin *et al.*, 2013 ; Santiso *et al.*, 2010). Le paramètre obtenu est alors la moyenne de la longueur relative des télomères au sein de l'éjaculat, relative car rapportée à un gène de ménage. Cette technique permet l'étude de nombreux patients rapidement une fois la procédure maîtrisée. Elle est cependant sujette à une certaine variabilité, notamment au niveau de la phase d'extraction de l'ADN, ce qui rend la comparaison des valeurs obtenues difficiles si la procédure suivie n'est pas rigoureusement identique (Raschenberger *et al.*, 2016). C'est véritablement un outil permettant de mettre en évidence des tendances de variation. Une quantification absolue peut se réaliser par mesure de la longueur du TRF (terminal restriction fragment) en Southern-blot (Aston *et al.*, 2012), par flow-FISH (Kimura *et al.*, 2008) ou par Q-FISH si rapportée à une lignée de longueur télomérique connue et stable comme la lignée cellulaire issue de lymphome murin L-2178-S (Turner et Hartshorne 2013) - dans le cas contraire, cette

méthode d'évaluation reste relative (Kimura *et al.*, 2008; Moskovtsev *et al.*, 2010). Ces méthodes sont de rendement et de rapidité différents, entre des solutions à haut débit comme la flow-FISH et d'autres plus lentes comme le recours au Southern-blot. La méthode suivie dans notre étude permet de mesurer spermatozoïde par spermatozoïde la longueur relative des télomères au sein d'un éjaculat. Elle permet de plus de compter le nombre de télomères visibles dans chacun des spermatozoïdes. A notre connaissance, seules 2 études ont été publiées faisant usage d'une méthode similaire (Moskovtsev *et al.*, 2010 ; Turner et Hartshorne, 2013). La plus ancienne, en comparant le nombre des télomères visibles en PNA-FISH entre un groupe de patients à fort taux de fragmentation de l'ADN spermatique et un autre groupe à faible taux, a montré une augmentation du nombre de télomères dans le groupe hyperfragmenté (Moskovtsev *et al.* 2010). La plus récente ne montrait pas de différence entre le nombre de signaux télomériques relevés chez les patients ayant une fragmentation de l'ADN augmentée par rapport aux autres mais retrouvait une corrélation négative entre taux de fragmentation et nombre de signaux télomériques médian par spermatozoïde (Turner et Hartshorne, 2013). Cette observation de Turner et collaborateurs est dans le sens inverse de notre étude et de l'étude de Moskovtsev et collaborateurs. Aucun lien n'avait été retrouvé entre la taille des télomères mesurée selon cette méthode et la fragmentation de l'ADN spermatique (Turner and Hartshorne 2013). Comme dans les études en qPCR, cette dernière trouvait également un lien entre longueur des télomères et âge des sujets étudiés. Nous n'avons pas retrouvé ce lien. Les données concernant le nombre de télomères sont à approfondir : est-ce vraiment le nombre moyen qui importe ; une sous population très différente au sein de l'éjaculat ne pourrait-elle pas être le reflet d'altérations plus profondes et ainsi altérer profondément la fertilité ?

Le nombre moyen de télomères détectés par FISH est toujours inférieur au nombre théorique de 46 télomères présents dans un noyau spermatique, c'est à dire 2 télomères, un par extrémité de chacun des 23 chromosomes de son génome haploïde. Ceci s'explique par la formation de dimères ou de trimères entre les télomères réduisant ainsi le nombre de spots fluorescents. Le nombre moyen de télomères observés chez nos témoins est en accord (à une exception près) avec les résultats d'une étude réalisée chez des hommes fertiles qui met en évidence que le nombre moyen de télomères est toujours compris entre 12, ce qui correspond à la

formation de trimères de télomères et 23, ce qui correspond à la formation de dimères de télomères (Moskovtsev *et al.*, 2010). Dans notre étude, une augmentation du nombre de télomères a été mise en évidence dans les noyaux spermatiques du groupe des cas. Il a été démontré dans l'étude de Moskovtsev, qui compare deux groupes de patients (patients avec un taux élevé de spermatozoïdes à ADN fragmenté versus patients avec un taux faible de spermatozoïdes à ADN fragmenté) que le nombre moyen de télomères spermatiques était corrélé négativement au taux moyen de fragmentation de l'ADN spermatique. Ainsi, un nombre moyen de télomères spermatiques inférieur ou égal à $21,7 \pm 1,9$ correspondrait à un faible taux de fragmentation de l'ADN spermatique tandis qu'un nombre moyen de télomères supérieur ou égal à $26,5 \pm 3,4$ serait associé à un fort taux de fragmentation de l'ADN spermatique. Par comparaison à l'étude de Moskovtsev, le nombre moyen de télomères analysés chez nos patients reste le plus souvent inférieur à 21,7 et toujours inférieur à 26,5, en faveur d'un ADN spermatique faiblement fragmenté, résultat cohérent avec l'analyse de la fragmentation de l'ADN que nous avons effectuée par la technique TUNEL et qui s'est avérée non significativement augmentée chez les patients.

Cette augmentation du nombre de télomères observées chez nos cas peut donc être liée à une modification des interactions télomère-télomères au sein du noyau des spermatozoïdes des cas, aboutissant à une diminution de la formation des dimères et ou des tétramères. Ce défaut de formation de dimères ou de tétramères peut être généré par un défaut d'organisation de la chromatine spermatique et de la distribution des chromosomes au sein du noyau. Une augmentation significative de spermatozoïdes à ADN mal condensé a été observée chez nos patients présentant des altérations des paramètres spermatiques. De plus, le taux de spermatozoïdes présentant un défaut de compaction de la chromatine augmente avec la prévalence de la tératozoospermie, c'est-à-dire quand le nombre de spermatozoïdes de forme typique diminue. Cette donnée a été rapportée précédemment par notre laboratoire, à savoir que les spermatozoïdes présentant un défaut de condensation de la chromatine ont une plus grande propension à présenter une tératozoospermie caractérisée par la présence de larges vacuoles nucléaires en microscopie optique à haute résolution (MSOME : Motile Sperm Organelle Morphology Examination) (Perdrix *et al.*, 2011). Dans ce contexte, une modification de la

topographie intranucléaire des chromosomes X, Y et 18 a été mise en évidence (Perdrix *et al.*, 2011). L'augmentation du nombre des télomères observés dans les spermatozoïdes de nos cas serait peut-être à relier à ces observations, illustrant des défauts de compaction et de condensation à l'origine de défauts morphologiques ou fonctionnels des spermatozoïdes. Par ailleurs, un modèle de stabilisation de la chromatine spermatique a été proposé faisant intervenir le zinc moléculaire, qui est une des molécules antioxydantes les plus présentes dans le liquide séminal (Bjorndahl et Kvist 2010). Très récemment, la condensation de l'ADN (ou le taux de protamination) a été reliée de manière positive ($r=0,40$, $p= 0,002$) à la longueur des télomères spermatiques mesurée par qPCR au sein d'une population d'hommes normozoospermiques (Rocca *et al.*, 2016). De plus, cette dernière étude a montré une forte association entre fragmentation de l'ADN et raccourcissement télomérique ainsi qu'entre augmentation de la longueur télomérique relative et de la mobilité a+b. Ce dernier résultat a été confirmé dans une autre étude publiée cette année (Cariati *et al.*, 2016), qui montrait également que le taux de diploïdie spermatique était associé à des télomères plus courts. De manière intéressante, parmi les patients de cette étude dont l'issue de la prise en charge en assistance médicale à la procréation était connue, les patients avec les plus courts télomères n'avaient pas obtenu de grossesse mais aussi ceux avec les télomères spermatiques les plus longs tandis que les tailles intermédiaires rapportaient un taux de grossesse à 37,5%. Notre étude a montré un lien modéré significatif entre le nombre de télomères et taux de spermatozoïdes à chromatine mal condensée ($r= 0,29$; $p=0,04$). Nous avons également trouvé une tendance non significative à la diminution de la longueur relative des télomères associée avec l'augmentation du taux de spermatozoïdes au noyau mal condensé (coloration au bleu d'aniline) : $r= -0,22$; $p = 0,125$. Nous n'avons pas montré de lien entre les paramètres télomériques et le taux de fragmentation de l'ADN spermatique ni avec le taux d'anomalies chromosomiques dans notre population et avec nos méthodes.

Il existe plusieurs méthodes pour évaluer la présence des ERO dans un échantillon de sperme. La majorité des études évalue un ou plusieurs paramètres sur le plasma séminal après centrifugation et retrait de la fraction cellulaire (Ko, *et al.*, 2014). Nous n'avons pas retenu cette méthode en raison de notre hypothèse de départ : cette analyse sur plasma séminal mesure la présence moyenne d'ERO dans l'éjaculat. Elle ne permet pas d'obtenir d'information sur l'origine ni

le retentissement spermatique de l'éventuel stress oxydant. Comme nous le savons, il existe de multiples sources d'ERO dans les voies génito-urinaires masculines, qui peuvent se confronter aux spermatozoïdes de manière précoce (directement en intra testiculaire), ou plus tardive, que ce soit lors du stockage dans la queue épидидymaire ou lors du transit pré-éjaculatoire. Une mesure en point final de la concentration d'ERO séminale ne permet pas de différencier une source précoce, a priori plus délétère car présente lors d'étapes critiques de la spermatogenèse, d'une source très tardive, peut-être plus anodine car s'attaquant à un spermatozoïde différencié, compacté, plus « résistant ».

Pour pallier ces problèmes, il est possible de s'intéresser aux dommages radicalaires nucléaires, en mesurant par exemple le taux de marquage au 8-OHdG, forme oxydée de la guanine, comme nous l'avons fait. Cette altération de l'ADN est spécifique d'une atteinte oxydative de la chromatine (Aitken *et al.*, 2014). Une relation négative entre taux de 8-OHdG et paramètres spermatiques conventionnels tels que la numération, le pourcentage de spermatozoïdes de forme typique et la mobilité est connue (Kodama *et al.*, 1997 ; Cambi *et al.*, 2013). Les taux de 8-OHdG sont plus importants chez des hommes avec des altérations des paramètres spermatiques conventionnels. Une association forte existe entre 8-OHdG et fragmentation de l'ADN (Aitken *et al.*, 2014; Muratori *et al.*, 2015), menant à l'hypothèse que les dommages oxydatifs à l'ADN sont en grande partie responsables de la fragmentation de l'ADN. Nos travaux ne rapportent pas cette association de manière significative, soit en raison du faible effectif, soit en raison d'un choix différent de population, à savoir des patients présentant des oligozoospermies et plutôt que des infertilités quelque qu'en soit la cause. Ces mêmes travaux récents rapportent cependant que cette association est particulièrement retrouvée dans les spermatozoïdes vivants, faisant l'hypothèse que les marqueurs de fragmentation tels que le TUNEL ou le *sperm chromatin dispersion assay* (SCD) sont imparfaits puisqu'ils sont les reflets de la présence de cellules moribondes ou mortes. Il a été montré une association entre le niveau de dommages à l'ADN par la méthode TUNEL et la présence même minime d'une leucocytospermie (Agarwal *et al.*, 2014). Ce paramètre n'a pas été évalué dans notre étude mais mérite d'être pris en considération. Concernant les niveaux de marquage au 8-OHdG mesurés dans notre étude, s'ils sont inférieurs aux publications précédentes, ils sont cohérents avec une étude réalisée au sein du laboratoire avec le même clone

portant sur 200 patients (100 aux paramètres spermatiques normaux et 100 avec oligoasthénotérazoospermie) qui rapporte une moyenne à 4% et 95% des valeurs inférieures à 8%. Une corrélation négative avait été retrouvée entre numération spermatique et expression du 8-OHdG (données non publiées).

Seulement deux études à notre connaissance ont étudié les liens entre stress oxydant et longueur des télomères spermatiques (Mishra *et al.*, 2016 ; Thilagavathi *et al.*, 2013). Bien qu'usant d'une méthodologie qui n'est pas la nôtre et que nous critiquons pour des raisons exposées précédemment, ces résultats méritent l'attention. Lors de leur première étude, cette équipe indienne a comparé deux groupes, l'un constitué de donneurs fertiles recrutés au planning familial pour contraception après grossesse(s) (n=25) et l'autre constitué d'hommes issus de couples infertiles au sein duquel les causes féminines ont été écartées (n=32). La longueur relative des télomères mesurée par qPCR était diminuée chez les hommes infertiles par comparaison aux hommes féconds ($0,674 \pm 0,028$ versus $0,699 \pm 0,030$; $p < 0,005$). Aucune corrélation n'avait été mise en évidence entre la longueur relative des télomères et la quantité d'ERO présent dans l'éjaculat mesurée par chimioluminescence ($r=0,0855$; $p = 0,629$). Lors de la deuxième étude, les groupes ont été constitués de la même façon, bien que les effectifs soient plus importants (n=102 pour les contrôles et n=112 pour les cas infertiles). Ils ont alors montré une augmentation du taux d'ERO mesuré par chimioluminescence dans le groupe des cas ($66,61 \pm 28,32$ RLU/s/G vs $14,04 \pm 10,67$ RLU/s/G ; $p < 0,001$) ainsi qu'une plus faible longueur relative des télomères, mesurée par qPCR, dans le sperme des cas ($0,609 \pm 0,15$ vs $0,789 \pm 0,060$ ($p < 0,0001$), sans impact de l'âge.

Ils ont ensuite fait le choix de diviser les échantillons en trois sous-groupes, le premier présentant des niveaux faibles, le second des taux modérés et le dernier des taux élevés d'ERO. Ils ont observé dans le groupe des cas une plus grande longueur relative des télomères spermatiques dans les deux premiers groupes par comparaison au troisième : groupe I (taux faibles, n=17) : $0,663 \pm 0,14$, groupe II (modérés, n = 40) : $0,684 \pm 0,12$, groupe III (forts, n=55) : $0,595 \pm 0,15$. De manière très intéressante, notons la différence quant à la longueur relative des télomères entre les groupes présentant des taux faibles ou modérés d'ERO, en faveur des taux modérés. Cette différence se retrouvait dans le groupe contrôle : groupe I (n=79) : $0,73 \pm 0,04$ versus groupe II (n=23) : $0,79 \pm 0,03$; pas de sujets dans le groupe III au sein du groupe contrôle.

Sans apporter une preuve complètement satisfaisante, cette étude est un argument de plus en faveur de l'intérêt de la présence à taux modérés des ERO dans la maturation spermatique.

Notre étude est la première à faire un lien entre télomères et stress oxydant au niveau spermatique et non au niveau séminal. Les premiers résultats obtenus demandent à être confirmés mais sont encourageants. Le lien supposé entre atteintes oxydatives des télomères et altérations nucléaires spermatiques va peut être s'enrichir de la connaissance d'une de ses conséquences à savoir la décondensation de l'ADN par perturbation de l'homéostasie chromatinienne. Il est à espérer que la poursuite des travaux fasse émerger une significativité statistique du lien avec la fragmentation spermatique afin de confirmer les études antérieures et récentes. L'étude des télomères semble de plus en plus s'imposer comme potentiellement informative quant à la qualité spermatique. Ce marqueur est dans tous les cas prometteur en termes d'exploration et de segmentation des patients infertiles.

Comme perspective d'avenir pour le travail déjà effectué, outre l'élargissement de l'effectif recruté, concernant le lien entre les dommages nucléaires à l'ADN spermatique et le stress oxydatif, nous proposons d'élargir les marqueurs étudiés par l'évaluation d'un taux global de méthylation, par étude du marquage à la 5-méthyl-cytosine (5mC) sur des lames de spermatozoïdes fixés au méthanol que nous avons stockées en prévision. Pour des travaux futurs, il serait souhaitable de procéder à une analyse parallèle de plusieurs paramètres simultanément sur chaque échantillon à l'aide d'une autre méthodologie, par exemple grâce à la cytométrie en flux, ceci afin de déterminer d'éventuelles sous-populations au sein de l'éjaculat. Enfin, les paramètres d'inclusion pourraient être élargis, en se concentrant notamment sur les patients présentant une asthénozoospermie – soit une diminution de la mobilité, les ERO étant responsables d'atteintes multiples sur le spermatozoïde, de la tête sur laquelle notre étude s'est concentrée, à la membrane flagellaire *via* la peroxydation des lipides, en passant par la pièce intermédiaire contenant le manchon mitochondrial, source importante d'ERO.

Bibliographie

- Agarwal**, Ashok, Aditi Mulgund, Rakesh Sharma, and Edmund Sabanegh. 2014. "Mechanisms of Oligozoospermia: An Oxidative Stress Perspective." *Systems Biology in Reproductive Medicine* 60 (4): 206–16.
- Aitken**, R. John, Geoffry N. De Luliis, Jane M. Finnie, Andrew Hedges, and Robert I. McLachlan. 2010. "Analysis of the Relationships between Oxidative Stress, DNA Damage and Sperm Vitality in a Patient Population: Development of Diagnostic Criteria." *Human Reproduction* 25 (10): 2415–26.
- Aitken**, RobertJ, TeganB Smith, MatthewS Jobling, MarkA Baker, and GeoffryN De Luliis. 2014. "Oxidative Stress and Male Reproductive Health." *Asian Journal of Andrology* 16 (1): 31.
- Aston**, K. I., S. C. Hunt, E. Susser, M. Kimura, P. Factor-Litvak, D. Carrell, and A. Aviv. 2012. "Divergence of Sperm and Leukocyte Age-Dependent Telomere Dynamics: Implications for Male-Driven Evolution of Telomere Length in Humans." *Molecular Human Reproduction* 18 (11): 517–22.
- Bjorndahl**, L., and U. Kvist. 2010. "Human Sperm Chromatin Stabilization: A Proposed Model Including Zinc Bridges." *Molecular Human Reproduction* 16 (1): 23–29.
- Cambi**, M., L. Tamburrino, S. Marchiani, B. Olivito, C. Azzari, G. Forti, E. Baldi, and M. Muratori. 2013. "Development of a Specific Method to Evaluate 8-hydroxy,2-Deoxyguanosine in Sperm Nuclei: Relationship with Semen Quality in a Cohort of 94 Subjects." *Reproduction* 145 (3): 227–35.
- Cariati**, Federica, Souraya Jaroudi, Samer Alfarawati, Araz Raberi, Carlo Alviggi, Rosario Pivonello, and Dagan Wells. 2016. "Investigation of Sperm Telomere Length as a Potential Marker of Paternal Genome Integrity and Semen Quality." *Reproductive BioMedicine Online* 33 (3): 404–11.
- Ferlin**, A., E. Rampazzo, M. S. Rocca, S. Keppel, A. C. Frigo, A. De Rossi, and C. Foresta. 2013. "In Young Men Sperm Telomere Length Is Related to Sperm Number and Parental Age." *Human Reproduction* 28 (12): 3370–76.
- Jørgensen**, Pernille Bach, Jens Fedder, Steen Koelvraa, and Jesper Graakjaer. 2013. "Age-Dependence of Relative Telomere Length Profiles during Spermatogenesis in Man." *Maturitas* 75 (4): 380–85.
- Kalmbach**, Keri Horan, Danielle Mota Fontes Antunes, Roberta Caetano Dracxler, Taylor Warner Knier, Michelle Louise Seth-Smith, Fang Wang, Lin Liu, and David Lawrence Keefe. 2013. "Telomeres and Human Reproduction." *Fertility and Sterility* 99 (1): 23–29.
- Kim**, Seul Ki, Byung Chul Jee, and Seok Hyun Kim. 2015. "Histone Methylation and Acetylation in Ejaculated Human Sperm: Effects of Swim-up and Smoking." *Fertility and Sterility* 103 (6): 1425–31.
- Kimura**, Masayuki, Lynn F. Cherkas, Bernet S. Kato, Serkalem Demissie, Jacob B. Hjelmborg, Michael Brimacombe, Adrienne Cupples, et al. 2008. "Offspring's Leukocyte Telomere Length, Paternal Age, and Telomere Elongation in Sperm." *PLoS Genetics* 4 (2): e37.
- Ko**, Edmund Y., Edmund S. Sabanegh, and Ashok Agarwal. 2014. "Male Infertility Testing: Reactive Oxygen Species and Antioxidant Capacity." *Fertility and Sterility* 102 (6): 1518–27.
- Kodama**, Hideya, Raizo Yamaguchi, Jun Fukuda, Hiroshi Kasai, and Toshinobu Tanaka. 1997. "Increased Oxidative Deoxyribonucleic Acid Damage in the Spermatozoa of Infertile Male Patients." *Fertility and Sterility* 68 (3): 519–24.
- Migdal**, Camille, and Mireille Serres. 2011. "Espèces Réactives de L'oxygène et Stress Oxydant." *Médecine/sciences* 27 (4): 405–12.

- Mishra**, Swetasmita, Rajeev Kumar, Neena Malhotra, Neeta Singh, and Rima Dada. 2016. "Mild Oxidative Stress Is Beneficial for Sperm Telomere Length Maintenance." *World Journal of Methodology* 6 (2): 163.
- Moskovtsev**, Sergey I., Jennifer Willis, John White, and J. Brendan M. Mullen. 2010. "Disruption of Telomere–Telomere Interactions Associated with DNA Damage in Human Spermatozoa." *Systems Biology in Reproductive Medicine* 56 (6): 407–12.
- Muratori**, Monica, Lara Tamburrino, Sara Marchiani, Marta Cambi, Biagio Olivito, Chiara Azzari, Gianni Forti, and Elisabetta Baldi. 2015. "Investigation on the Origin of Sperm DNA Fragmentation: Role of Apoptosis, Immaturity and Oxidative Stress." *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 21: 109–22.
- Noblanc**, Anaïs, Ayhan Kocer, and Joël R. Drevet. 2012. "Protection Post-Testiculaire Des Gamètes Mâles Contre Les Dommages Radicalaires: Le Rôle de L'épididyme." *Médecine/sciences* 28 (5): 519–25.
- Ozturk**, S. 2015. "Telomerase Activity and Telomere Length in Male Germ Cells." *Biology of Reproduction* 92 (2): 53–53.
- Perdrix**, A., A. Travers, M. H. Chelli, D. Escalier, J. L. Do Rego, J. P. Milazzo, N. Mousset-Simeon, B. Mace, and N. Rives. 2011. "Assessment of Acrosome and Nuclear Abnormalities in Human Spermatozoa with Large Vacuoles." *Human Reproduction* 26 (1): 47–58.
- Raschenberger**, Julia, Claudia Lamina, Margot Haun, Barbara Kollerits, Stefan Coassin, Eva Boes, Ludmilla Kedenko, Anna Köttgen, and Florian Kronenberg. 2016. "Influence of DNA Extraction Methods on Relative Telomere Length Measurements and Its Impact on Epidemiological Studies." *Scientific Reports* 6 (May)
- Reig-Viader**, Rita, Laia Capilla, Marta Vila-Cejudo, Ferrán Garcia, Begoña Anguita, Montserrat Garcia-Caldés, and Aurora Ruiz-Herrera. 2014. "Telomere Homeostasis Is Compromised in Spermatozoa from Patients with Idiopathic Infertility." *Fertility and Sterility* 102 (3): 728–738.e1.
- Rocca**, M.S., E. Speltra, M. Menegazzo, A. Garolla, C. Foresta, and A. Ferlin. 2016. "Sperm Telomere Length as a Parameter of Sperm Quality in Normozoospermic Men." *Human Reproduction* 31 (6): 1158–63.
- Santiso**, Rebeca, María Tamayo, Jaime Gosálvez, Marcos Meseguer, Nicolás Garrido, and José Luis Fernández. 2010. "Swim-up Procedure Selects Spermatozoa with Longer Telomere Length." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 688 (1–2): 88–90.
- Siderakis**, Manos, and Madalena Tarsounas. 2007. "Telomere Regulation and Function during Meiosis." *Chromosome Research* 15 (5): 667–79.
- Solov'eva**, Lyudmila, Maria Svetlova, Dawn Bodinski, and Andrei O. Zalensky. 2004. "Nature of Telomere Dimers and Chromosome Looping in Human Spermatozoa." *Chromosome Research* 12 (8): 817–23.
- Stindl**, Reinhard. 2016. "The Paradox of Longer Sperm Telomeres in Older Men's Testes: A Birth-Cohort Effect Caused by Transgenerational Telomere Erosion in the Female Germline." *Molecular Cytogenetics* 9 (1).
- Thilagavathi**, J., M. Kumar, S. S. Mishra, S. Venkatesh, R. Kumar, and R. Dada. 2013. "Analysis of Sperm Telomere Length in Men with Idiopathic Infertility." *Archives of Gynecology and Obstetrics* 287 (4): 803–7.
- Turner**, S., and G. M. Hartshorne. 2013. "Telomere Lengths in Human Pronuclei, Oocytes and Spermatozoa." *Molecular Human Reproduction* 19 (8): 510–18.
- Yang**, Qingling, Feifei Zhao, Shanjun Dai, Nan Zhang, Wanli Zhao, Rui Bai, and Yingpu Sun. 2015. "Sperm Telomere Length Is Positively Associated with the Quality of Early Embryonic Development." *Human Reproduction* 30 (8): 1876–81.

Université de Rouen, IRIB Normandy Rouen
EA4308 Gaméto-genèse et qualité du gamète
Pr Nathalie RIVES

Benoît BERBY

Etude de l'impact du stress oxydant sur le noyau spermatique humain