



**HAL**  
open science

# Qualité nucléaire spermatique chez les hommes atteints d'un cancer avant traitement

Cynthia Bichara-Petit

► **To cite this version:**

Cynthia Bichara-Petit. Qualité nucléaire spermatique chez les hommes atteints d'un cancer avant traitement. Médecine humaine et pathologie. 2018. dumas-01760410

**HAL Id: dumas-01760410**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01760410>**

Submitted on 6 Apr 2018

**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.

## Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Rouen

### THESE

Pour obtenir le diplôme d'état de doctorat en médecine

Présentée et soutenue publiquement le 12 février 2018 par

**BICHARA - PETIT Cynthia**

Née le 01/05/1989 à Basse-Terre (Guadeloupe)

**Qualité nucléaire spermatique chez les hommes atteints d'un cancer avant traitement**

<b>Monsieur</b> <b>Le Professeur Bertrand MACE</b>	Professeur des Universités - Praticien Hospitalier Université Rouen Normandie	Président du jury
<b>Madame</b> <b>Le Professeur Valérie MITCHELL</b>	Maitre de Conférence Universitaire - Praticien Hospitalier Université Lille	Membre du jury
<b>Monsieur</b> <b>Le Docteur Louis SIBERT</b>	Praticien Hospitalier CHU de Rouen	Membre du jury
<b>Monsieur</b> <b>Le Docteur Philippe RUMINY</b>	Chercheur Unité INSERM 918 - CHB	Membre du jury
<b>Madame</b> <b>Le Professeur Nathalie RIVES</b>	Professeur des Universités - Praticien Hospitalier Université Rouen Normandie	Directeur de thèse

## ANNEE UNIVERSITAIRE 2017 - 2018

### 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 <b>ANSELME</b>	HCN	Cardiologie
Mme Gisèle <b>APTER</b>	Havre	Pédopsychiatrie
Mme Isabelle <b>AUQUIT AUCKBUR</b>	HCN	Chirurgie plastique
Mr Fabrice <b>BAUER</b>	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya <b>BEKRI</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal <b>BENHAMOU</b>	HCN	Médecine interne
Mr Jacques <b>BENICHOU</b>	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Olivier <b>BOYER</b>	UFR	Immunologie
Mme Sophie <b>CANDON</b>	HCN	Immunologie
Mr François <b>CARON</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe <b>CHASSAGNE</b> ( <i>détachement</i> )	HCN	Médecine interne (gériatrie) – Détachement
Mr Vincent <b>COMPERE</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas <b>CORNU</b>	HCN	Urologie
Mr Antoine <b>CUVELIER</b>	HB	Pneumologie
Mr Pierre <b>CZERNICHOW</b> ( <i>surnombre</i> )	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Nicolas <b>DACHER</b>	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan <b>DARMONI</b>	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre <b>DECHELOTTE</b>	HCN	Nutrition
Mr Stéphane <b>DERREY</b>	HCN	Neurochirurgie

Mr Frédéric <b>DI FIORE</b>	CB	Cancérologie
Mr Fabien <b>DOGUET</b>	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean <b>DOUCET</b>	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard <b>DUBRAY</b>	CB	Radiothérapie
Mr Philippe <b>DUCROTTE</b>	HCN	Hépto-gastro-entérologie
Mr Frank <b>DUJARDIN</b>	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice <b>DUPARC</b>	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric <b>DURAND</b>	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand <b>DUREUIL</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène <b>ELTCHANINOFF</b>	HCN	Cardiologie
Mr Manuel <b>ETIENNE</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Thierry <b>FREBOURG</b>	UFR	Génétique
Mr Pierre <b>FREGER</b>	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François <b>GEHANNO</b>	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel <b>GERARDIN</b>	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille <b>GERARDIN</b>	HCN	Pédopsychiatrie
M. Guillaume <b>GOURCEROL</b>	HCN	Physiologie
Mr Dominique <b>GUERROT</b>	HCN	Néphrologie
Mr Olivier <b>GUILLIN</b>	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Didier <b>HANNEQUIN</b>	HCN	Neurologie
Mr Fabrice <b>JARDIN</b>	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie <b>JOLY</b>	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal <b>JOLY</b>	HCN	Dermato – Vénérologie
Mme Bouchra <b>LAMIA</b>	Havre	Pneumologie
Mme Annie <b>LAQUERRIERE</b>	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent <b>LAUDENBACH</b>	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël <b>LECHEVALLIER</b>	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé <b>LEFEBVRE</b>	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry <b>LEQUERRE</b>	HB	Rhumatologie
Mme Anne-Marie <b>LEROI</b>	HCN	Physiologie
Mr Hervé <b>LEVESQUE</b>	HB	Médecine interne
Mme Agnès <b>LIARD-ZMUDA</b>	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves <b>LITZLER</b>	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand <b>MACE</b>	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David <b>MALTETE</b>	HCN	Neurologie
Mr Christophe <b>MARGUET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle <b>MARIE</b>	HB	Médecine interne

Mr Jean-Paul <b>MARIE</b>	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc <b>MARPEAU</b>	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane <b>MARRET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique <b>MERLE</b>	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre <b>MICHEL</b>	HCN	Hépatogastro-entérologie
M. Benoit <b>MISSET</b>	HCN	Réanimation Médicale
Mr Jean-François <b>MUIR</b> ( <i>surnombre</i> )	HB	Pneumologie
Mr Marc <b>MURAINÉ</b>	HCN	Ophthalmologie
Mr Philippe <b>MUSETTE</b>	HCN	Dermatologie - Vénérologie
Mr Christophe <b>PEILLON</b>	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian <b>PFISTER</b>	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe <b>PLANTIER</b>	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier <b>PLISSONNIER</b>	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan <b>PREVOST</b>	HCN	Endocrinologie
Mr Jean-Christophe <b>RICHARD</b> ( <i>détachement</i> )	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent <b>RICHARD</b>	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie <b>RIVES</b>	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace <b>ROMAN</b>	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe <b>SABOURIN</b>	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume <b>SAVOYE</b>	HCN	Hépatogastrologie
Mme Céline <b>SAVOYE-COLLET</b>	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale <b>SCHNEIDER</b>	HCN	Pédiatrie
Mr Michel <b>SCOTTE</b>	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne <b>TAMION</b>	HCN	Thérapeutique
Mr Luc <b>THIBERVILLE</b>	HCN	Pneumologie
Mr Christian <b>THUILLEZ</b> ( <i>surnombre</i> )	HB	Pharmacologie
Mr Hervé <b>TILLY</b>	CB	Hématologie et transfusion
M. Gilles <b>TOURNEL</b>	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier <b>TROST</b>	HCN	Chirurgie Maxillo-Faciale
Mr Jean-Jacques <b>TUECH</b>	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre <b>VANNIER</b> ( <i>surnombre</i> )	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît <b>VEBER</b>	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre <b>VERA</b>	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric <b>VERIN</b>	HB	Service Santé Réadaptation
Mr Eric <b>VERSPYCK</b>	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier <b>VITTECOQ</b>	HB	Rhumatologie
Mme Marie-Laure <b>WELTER</b>	HCN	Physiologie

## MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

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

## PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mr Thierry <b>WABLE</b>	UFR	Communication
Mme Mélanie <b>AUVRAY-HAMEL</b>	UFR	Anglais

## II - PHARMACIE

### PROFESSEURS

Mr Thierry <b>BESSON</b>	Chimie Thérapeutique
Mr Roland <b>CAPRON</b> (PU-PH)	Biophysique
Mr Jean <b>COSTENTIN</b> (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle <b>DUBUS</b>	Biochimie
Mr Loïc <b>FAVENNEC</b> (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre <b>GOULLE</b> (Professeur émérite)	Toxicologie
Mr Michel <b>GUERBET</b>	Toxicologie
Mme Isabelle <b>LEROUX - NICOLLET</b>	Physiologie
Mme Christelle <b>MONTEIL</b>	Toxicologie
Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b> (PU-PH)	Microbiologie
Mr Rémi <b>VARIN</b> (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie <b>VAUGEUIS</b>	Pharmacologie
Mr Philippe <b>VERITE</b>	Chimie analytique

### MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et Minérale
Mr Jérémy <b>BELLIEN</b> (MCU-PH)	Pharmacologie
Mr Frédéric <b>BOUNOURE</b>	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam <b>CHAGRAOUI</b>	Physiologie
Mme Camille <b>CHARBONNIER (LE CLEZIO)</b>	Statistiques
Mme Elizabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
Mme Marie Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b>	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Cécile <b>CORBIERE</b>	Biochimie
Mr Eric <b>DITTMAR</b>	Biophysique
Mme Nathalie <b>DOURMAP</b>	Pharmacologie
Mme Isabelle <b>DUBUC</b>	Pharmacologie
Mme Dominique <b>DUTERTE- BOUCHER</b>	Pharmacologie
Mr Abdelhakim <b>ELOMRI</b>	Pharmacognosie
Mr François <b>ESTOUR</b>	Chimie Organique
Mr Gilles <b>GARGALA</b> (MCU-PH)	Parasitologie

Mme Nejla EL <b>GHARBI-HAMZA</b>	Chimie analytique
Mme Marie-Laure <b>GROULT</b>	Botanique
Mr Hervé <b>HUE</b>	Biophysique et mathématiques
Mme Laetitia <b>LE GOFF</b>	Parasitologie – Immunologie
Mme Hong <b>LU</b>	Biologie
M. Jérémie <b>MARTINET</b> (MCU-PH)	Immunologie
Mme Marine <b>MALLETER</b>	Toxicologie
Mme Sabine <b>MENAGER</b>	Chimie organique
Mme Tiphaine <b>ROGEZ-FLORENT</b>	Chimie analytique
Mr Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mme Malika <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mme Christine <b>THARASSE</b>	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric <b>ZIEGLER</b>	Biochimie

### PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile <b>GUERARD-DETUNCQ</b>	Pharmacie officinale
Mr Jean-François <b>HOUIVET</b>	Pharmacie officinale

### PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde <b>GUERIN</b>	Anglais
----------------------------	---------

### ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mme Anne-Sophie <b>CHAMPY</b>	Pharmacognosie
M. Jonathan <b>HEDOUIN</b>	Chimie Organique
Mme Barbara <b>LAMY-PELLETER</b>	Pharmacie Galénique



## LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry <b>BESSON</b>	Chimie thérapeutique
Mr Roland <b>CAPRON</b>	Biophysique
Mme Marie-Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b>	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
Mme Isabelle <b>DUBUS</b>	Biochimie
Mr Abdelhakim <b>ELOMRI</b>	Pharmacognosie
Mr Loïc <b>FAVENNEC</b>	Parasitologie
Mr Michel <b>GUERBET</b>	Toxicologie
Mr François <b>ESTOUR</b>	Chimie organique
Mme Isabelle <b>LEROUX-NICOLLET</b>	Physiologie
Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b>	Microbiologie
Mr Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mr Rémi <b>VARIN</b>	Pharmacie clinique
Mr Philippe <b>VERITE</b>	Chimie analytique

### III – MEDECINE GENERALE

#### PROFESSEUR

Mr Jean-Loup **HERMIL** (PU-MG)                      UFR    Médecine générale

#### MAITRE DE CONFERENCE

Mr Matthieu **SCHUERS** (MCU-MG)                      UFR    Médecine générale

#### PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTE

Mr Emmanuel **LEFEBVRE**                                      UFR    Médecine Générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD**                                      UFR    Médecine générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH**                                      UFR    Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX**                                      UFR    Médecine générale

#### MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTES

Mr Pascal **BOULET**    UFR    Médecine générale

Mr Emmanuel **HAZARD**    UFR    Médecine Générale

Mme Marianne **LAINÉ**    UFR    Médecine Générale

Mme Lucile **PELLERIN**    UFR    Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN**    UFR    Médecine générale

## ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

### PROFESSEURS

Mr Serguei <b>FETISSOV</b> (med)	Physiologie (ADEN)
Mr Paul <b>MULDER</b> (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su <b>RUAN</b> (med)	Génie Informatique

### MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil <b>ADRIOUCH</b> (med)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle <b>BOUGEARD-DENOYELLE</b> (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine <b>CLEREN</b> (med)	Neurosciences (Néovasc)
M. Sylvain <b>FRAINEAU</b> (med)	Physiologie (Inserm U 1096)
Mme Pascaline <b>GAILDRAT</b> (med)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas <b>GUEROUT</b> (med)	Chirurgie Expérimentale
Mme Rachel <b>LETELLIER</b> (med)	Physiologie
Mme Christine <b>RONDANINO</b> (med)	Physiologie de la reproduction
Mr Antoine <b>OUVRARD-PASCAUD</b> (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric <b>PASQUET</b>	Sciences du langage, orthophonie
Mme Isabelle <b>TOURNIER</b> (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 seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.***

Au président de jury,

**À Monsieur le Professeur Bertrand MACE**

Merci de me faire l'honneur d'accepter de présider mon jury et de juger ce travail.

Merci d'avoir toujours été aussi gentil et avenant envers moi.

Je vous exprime ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

**À Madame le Professeur Valérie MITCHELL**

Merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury et de juger ce travail.

Merci pour l'aide diagnostic que vous nous apportez en réalisant la microscopie électronique chez nos patients présentant des dyskinésies flagellaires.

Je vous exprime ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

## **À Monsieur le Docteur Louis SIBERT**

Merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury et de juger ce travail.

Merci pour ces après midi de consultations d'urologie durant lesquelles j'ai beaucoup  
appris à vos côtés.

Je vous exprime ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

**À Monsieur le Docteur Philippe RUMINY**

Merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury et de juger ce travail.  
Merci pour votre accueil et toute l'aide que vous m'avez apportée pour le  
pyroséquençage.

Je vous exprime ma sincère reconnaissance et mon profond respect.



## **À Madame le Professeur Nathalie RIVES**

Merci de m'avoir accueillie dans votre service et de m'enseigner la biologie de la reproduction avec autant de passion.

Merci pour votre rigueur, votre attention et votre soutien qui me permettent de donner tous les jours au sein du laboratoire

(tout du moins je l'espère)

le meilleur de moi-même.

Votre parcours professionnel est un exemple à suivre.

Soyez assurée de ma sincère reconnaissance et de mon plus profond respect.

Merci,

À mes parents, Claudine et Alain, pour leur soutien sans faille durant ses nombreuses années d'étude, leur amour, leur disponibilité et surtout pour avoir fait l'effort de venir à ma soutenance en plein hiver!

À Saviya, ma sista adorée qui a toujours voulu le meilleur pour moi et a toujours répondu présente quand j'en avais besoin!

À ma mémé, Luciana, qui a toujours pris soin de moi et avec qui je trinquais à chaque réveillon.

À mes grands-parents et tatie Marie-Claire qui sont partis trop tôt.

À mes beaux-parents Nelly et Olivier pour leur accueil si chaleureux, et surtout pour me donner l'impression que je suis plus une fille qu'une belle-fille.

À Christophe, mon beau-frère pour tous les moments partagés ensemble, et surtout pour m'avoir servi de chauffeur de taxi sur Rouen! Je suis ravie d'avoir un grand frère!

À mes sœurs de cœur (Laurie, Emilie et Aurélie), mon frère de cœur (Randdy) et amies de longue date (Estelle et Sandrine) qui sans vous ma vie n'aurait pas été aussi pleine de joie et de fous rires.

À mes cousins, cousines, oncles, tantes, parrain, marraine et amis de la famille.

À l'anti-QG, Christelle, Michelle et Noémie pour ces bons moments partagés en votre compagnie.

À mes collègues de l'équipe de recherche EA 4308 qui m'ont supporté une année entière : Christine (*merci pour ton aide si précieuse tout au long de mon année recherche*), Antoine (*pour ton « optimisme » à toute épreuve, ton « sens critique médical » et d'avoir su répondre à toutes mes interrogations*), Ludovic (*pour ton sens didactique et ton perfectionnisme*), Véronique (*pour ta patience et l'apprentissage des différentes techniques réalisées sur lame*), Amandine (*pour nos discussions et ton soutien moral surtout face à mes échecs de PCR...*), Justine (*pour ta joie de vivre*) et Marion (*pour ton naturel*).

À mes collègues du laboratoire de Biologie De la Reproduction : France (*pour m'avoir tout appris et pour tes conseils*), Fanny (*pour ta bonne humeur et le réconfort durant les moments difficiles*), Claire-Hélène (*pour ta blague du pingouin qui respire par les fesses...*), Pierre (*pour tes anecdotes indétrônables lors du déjeuner...*), Benoit (*pour ton imitation antillaise...*), Céline (*pour nos fou rires*), Solmaz (*pour ton soutien sans faille*), Elodie, Julie, Sophie, Romain, Aurélie et Lydie (*pour le temps que vous avez passé à me former à chacun des postes et pour vos conseils*), Isabelle et Mélinda (*pour les nombreux courriers tapés au son de ma voix*).

À mes amis co-internes qui me supportent depuis le début de l'internat : Bénédicte alias "Montac" (*pour tes blagues qui me manquent cruellement...*), Charline (*pour ton talent de déménageuse et ta sincérité*), Isabelle (*pour nos discussions toujours très animées...*), Kévin (*pour les « kévinades »...*), Julien (*pour nos tête à tête en biochimie où je me retrouvais au final souvent la seule éveillée...*), les Aurélie(s) (*pour les bons moments passés à Rouen...*).

Aux internes de Rouen pour ces moments de convivialité à l'internat : Ismael, Cédric, Wassim, Victor, Simon, Céline, Jennifer, Aurélien, Gaétan, Aurélie, Thomas, Maud, François, Marion(s), Guillaume, Khadija, Rangolie, Abdulaziz, Pauline, Emilie, Auriane, Clément, Mustapha, Louis, Albane, Benoit, Ferdi, Fiston et les nouveaux (Charles, Pierre, Elia, Tanguy, Anaïs, Vincent, Tania, Louise et Maria-Alexandra).

Au service de cytogénétique (techniciens et biologistes) pour leur disponibilité et leur accueil chaleureux.

Au service de gynécologie pour m'avoir permis d'approfondir mes connaissances (surtout sur l'endométriase et les protocoles de stimulation).

À l'unité Inserm 918, au Centre Henri Becquerel, pour votre accueil et votre aide, notamment Vinciane qui devait me céder son ordinateur à chacune de mes venues!

Aux différents services de l'IBC (techniciens et biologistes de Biochimie, Bactériologie, Parasitologie et Hématologie) pour ce niveau 1 riche en souvenirs.

À mes poulettes de Toulouse qui m'ont supporté durant tout l'externat : Virginie, Carole, Caroline, Amandine, Chloé, Carole, Manon, Marie-Anne avec qui j'ai partagé de si bons moments.

À mes trois complices de la faculté de médecine des Antilles sans qui je n'aurai pas eu autant de moments inoubliables : Christelle (*nos moments à la résidence...*), Ophélie (*nos soirées à danser...*) et Olga (*notre séjour en Suisse qui avait commencé d'une drôle de façon...*).

À mes amis de la faculté de médecine des Antilles : Jean-Marie (*nos sorties découvertes "du papillon de la Caraïbe"*), Meylora (*nos discussions sur les hommes...*), Lisa (*ta joie de vivre*), Vaynom (*tes apparitions furtives...*), Stacy (*ta bonne humeur*), Lyvia (*ta gentillesse et ta douceur*), Matthieu et Georges (*nos délires sur le campus...*).

Au corps enseignant du collège Joseph-Pitat (971), du lycée Gerville-Réache (971), de la faculté de médecine des Antilles (971) et particulièrement à ma maitresse d'école, Mme Ferro, pour m'avoir toujours poussé à me dépasser.

Et surtout

À mon cher et tendre mari, Jean-Paul, qui fait tout son possible pour me rendre heureuse chaque jour que Dieu fait... Mwen enmé-w!

## Table des matières

---

Remerciements.....	12
Liste des abréviations.....	20
Liste des figures.....	22
Liste des tableaux.....	23
<b>I. Introduction.....</b>	<b>25</b>
I.1 Noyau du spermatozoïde.....	25
I.2 Impact des cancers sur les paramètres spermatiques conventionnels.....	31
I.3 Impact des cancers sur l'ADN spermatique.....	32
I.4 Objectif du travail.....	34
<b>II. Matériels et méthodes.....</b>	<b>36</b>
II.1 Population étudiée et échantillons biologiques.....	36
II.2 Analyse de la qualité nucléaire spermatique.....	38
II.2.1 Technique FISH.....	38
II.2.2 Technique PNA Q-FISH.....	40
II.2.3 Technique TUNEL.....	42
II.2.4 Coloration au Bleu d'aniline.....	44
II.2.5 Marquage au 8 OHdG.....	44
II.2.6 Pyroséquençage.....	46
II.3 Analyses statistiques.....	48
<b>III. Résultats.....</b>	<b>50</b>
III.1 Description de la population.....	50
III.2 Analyses comparatives entre la population étudiée d'hommes atteints d'un cancer (Patients) et le groupe contrôle (Témoins).....	50
III.2.1 Comparaison des paramètres spermatiques conventionnels.....	50
III.2.2 Comparaison des altérations nucléaires spermatiques.....	52
III.2.3 Analyse des patients présentant des altérations nucléaires spermatiques.....	52
III.3 Analyse comparative des altérations du noyau spermatique entre la population étudiée en fonction du type de cancer et par comparaison aux témoins.....	56
III.4 Analyse comparative des altérations du noyau spermatique entre la population étudiée en fonction du spermogramme et le groupe contrôle.....	64
III.5 Corrélations entre les différents paramètres spermatiques conventionnels et nucléaires chez les patients atteints d'un cancer.....	64
<b>IV. Discussion et conclusion.....</b>	<b>67</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>76</b>
<b>Résumé.....</b>	<b>80</b>

## Liste des abréviations

---

8 OHdG	8 hydroxy-désoxyguanosine
A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMP	Assistance médicale à la procréation
As	Asthénozoospermie
AT	Asthéno-tératozoospermie
ATP	Adénosine triphosphate
BA	Coloration au bleu d'aniline
C	Cytosine
CECOS	Centre de conservation des œufs et du sperme
CpG	Dinucléotide cytosine-guanine
CS	Cancer solide
CT	Cancer du testicule
CTCF	<i>CCCTC-binding factor</i>
D	Diacinèse
DAPI	Coloration 4',6-diamidino-2-phenylindole
DMR	Régions différenciellement méthylées
DNMT	DNA méthyltransférases
DS	Déviation standard
dUTP	Complexe biotine-désoxyuridine
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
FITC	Fluorescéine iso thio cyanate
FIV	Fécondation <i>in vitro</i>
FRU	<i>Fluorescence relative units</i>
G	Guanine
GSE	Gène soumis à empreinte
ICR	<i>Imprinting Control Region</i>
ICSI	<i>Intra cytoplasmic sperm injection</i>
Igf2	<i>Insulin like growth factor 2</i>
INCa	Institut national du cancer
KO	<i>Knock out</i>
L	Leptotène
LA	Leucémie aigüe
LH	Lymphome Hodgkinien
LNH	Lymphome non Hodgkinien
MEST	<i>Mesoderm specific transcript</i>
n	Effectif de la population
O	Oligozoospermie
OA	Oligo-asthénozoospermie
OAT	Oligo-astheno-tératozoospermie
OMS	Organisation mondiale de la santé
OT	Oligo-tératozoospermie
P	Pachytène
pb	Paire de base
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldéhyde
PGC	Cellules germinales primordiales
PL	Pré-leptotène
PNA	<i>Peptid nucleic acid</i>

## Liste des abréviations (suite)

---

PNA Q-FISH	Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence avec des sondes d'acides nucléiques peptidiques
Pol II	Polymérase II
POT1	<i>Protection of telomeres 1</i>
PPi	Pyrophosphate
r	Coefficient de corrélation
RAP1	<i>Repressor/activator protein 1</i>
RS	Spermatide ronde
Séq	Amorce de séquençage
Sp	Spermatogonies adultes
Spz	Spermatozoïde
T	Thymine
Té	Tératozoospermie
TERC	<i>Telomere RNA template enzyme</i>
TERT	<i>Telomere reverse transcriptase enzyme</i>
TIN2	<i>Interacting nuclear factor 2</i>
TPP1	<i>Tripeptidyl-peptidase 1</i>
TRF1 et TRF2	<i>Telomeric repeat binding factor 1 and 2</i>
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling</i>
Z	Zygotène

## Liste des figures

---

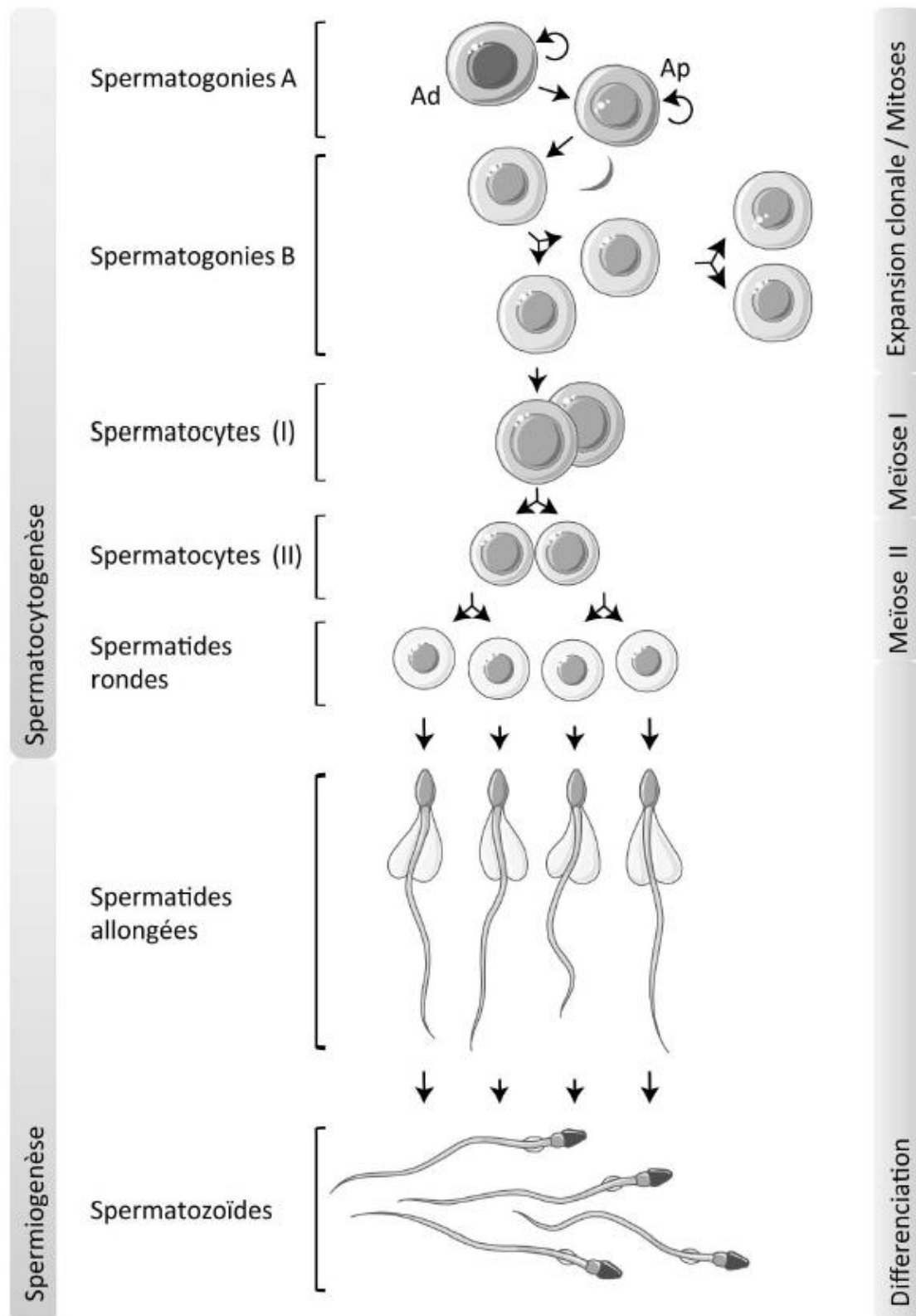
Figure 1 : Spermatogenèse humaine.....	24
Figure 2 : Composition et condensation de la chromatine des spermatides au cours de la spermatogenèse .....	26
Figure 3 : Structure du complexe « <i>Shelterin</i> » et de la télomérase au niveau des télomères .....	26
Figure 4 : Exemple de la régulation de l'expression mono-allélique du gène <i>H19</i> soumis à empreinte paternelle.....	28
Figure 5 : Reprogrammation épigénétique dans la lignée germinale.....	30
Figure 6 : Schéma expérimental de l'étude.....	35
Figure 7 : Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence sur noyaux spermatiques (900x).....	37
Figure 8 : Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence quantitative à l'aide de sondes PNA ( <i>Peptide Nucleic Acid</i> ) sur un noyau spermatique (900x).....	39
Figure 9 : Détection de la fragmentation de l'ADN par la technique TUNEL (1000x).....	41
Figure 10 : Exploration de la condensation de l'ADN spermatique par la coloration au Bleu d'aniline (1000x) .....	43
Figure 11 : Exploration des dommages spécifiques de l'ADN spermatique par le stress oxydant (1000x) .....	43
Figure 12 : Illustration schématique de la réaction de pyroséquençage et du pyrogramme obtenu pour déterminer le taux de méthylation.....	47
Figure 13 : Répartition des anomalies spermatiques de la population masculine étudiée.....	49
Figure 14 : Altérations du noyau spermatique observées chez les patients et les témoins .....	51
Figure 15 : Corrélation entre la longueur relative des télomères des patients et des témoins en fonction de leur âge (A) et de leur année de naissance (B) .....	55
Figure 16 : Représentation graphique de la distribution des patients présentant des altérations nucléaires spermatiques.....	55
Figure 17 : Comparaison des altérations du noyau spermatique des patients en fonction du type de cancer et par rapport aux témoins .....	57
Figure 18 : Comparaison des altérations du noyau spermatique des patients en fonction du spermogramme et par rapport aux témoins.....	65
Figure 19 : Corrélogramme des différents paramètres spermatiques.....	65

## Liste des tableaux

---

Tableau 1 : Régions différentiellement méthylées des GSE parentale <i>H19</i> et <i>MEST</i> et couples d'amorces oligonucléotidiques utilisés en PCR et en pyroséquençage .....	45
Tableau 2 : Comparaison de l'âge et des paramètres spermatiques conventionnels des patients et des témoins .....	49
Tableau 3 : Comparaison des taux de méthylation de chaque CpG étudié du GSE <i>H19</i> en fonction du type de cancer chez les patients.....	61
Tableau 4 : Comparaison des taux de méthylation de chaque CpG étudié du GSE <i>MEST</i> en fonction du type de cancer chez les patients.....	61
Tableau 5 : Comparaison de l'âge et des paramètres spermatiques conventionnels des patients en fonction du spermogramme et des témoins.....	63





**Figure 1 : Spermatogenèse humaine**

(d'après Saint-Dizier M et Chastant-Maillard S, « La reproduction animale et humaine », 2014)

La spermatogenèse est un processus qui dure 74 jours dans l'espèce humaine, incluant des phases de prolifération cellulaire, la méiose et la spermiogenèse, pour aboutir au gamète mâle haploïde qu'est le spermatozoïde.

## I. Introduction

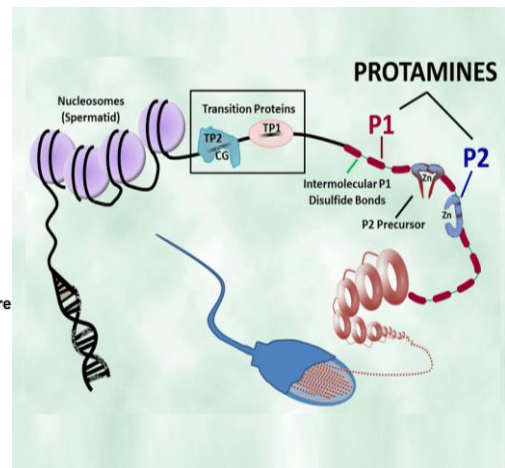
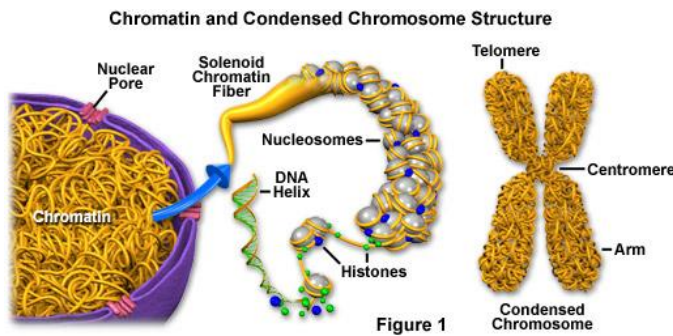
---

En 2015, l'Institut National du Cancer estime à 385 000 nouveaux cas de cancers tout type confondu en France métropolitaine (INCa, 2016). La préservation de la fertilité est devenue une étape incontournable dans la prise en charge des patients en âge de procréer et atteints d'un cancer. Celle-ci doit être effectuée avant tout traitement gonadotoxique (chimiothérapie, radiothérapie, chirurgie). L'amélioration des protocoles thérapeutiques rend cette préservation de la fertilité indispensable notamment pour des cancers avec des taux de survie élevés tels que le cancer du testicule (CT), les lymphomes Hodgkiniens (LH) ou non Hodgkiniens (LNH), avec plus de 80% de ces patients en rémission 5 ans après l'arrêt du traitement (Smit *et al.*, 2010 ; Paoli *et al.*, 2016).

La congélation des spermatozoïdes associée à la fécondation *in vitro* avec micro-injection d'un spermatozoïde dans le cytoplasme ovocytaire (ICSI) permet à ces hommes de maintenir un projet parental même en présence d'un faible nombre de spermatozoïdes (Caponcchia *et al.*, 2016). Des altérations des paramètres spermatiques ont été décrites au moment du diagnostic du cancer avec un pourcentage non négligeable d'azoospermies variant entre 13 et 30% chez des patients sans facteur de risque d'infertilité (Meseguer *et al.*, 2008). Ainsi, l'utilisation ultérieure des spermatozoïdes conservés au moment du diagnostic du cancer questionne sur leur qualité et sur les chances d'obtention d'une grossesse (Ribeiro *et al.*, 2008 ; Spermon *et al.*, 2006). Par conséquent, la problématique de l'impact des cancers sur la spermatogenèse, et en particulier sur la qualité nucléaire spermatique, doit être envisagée.

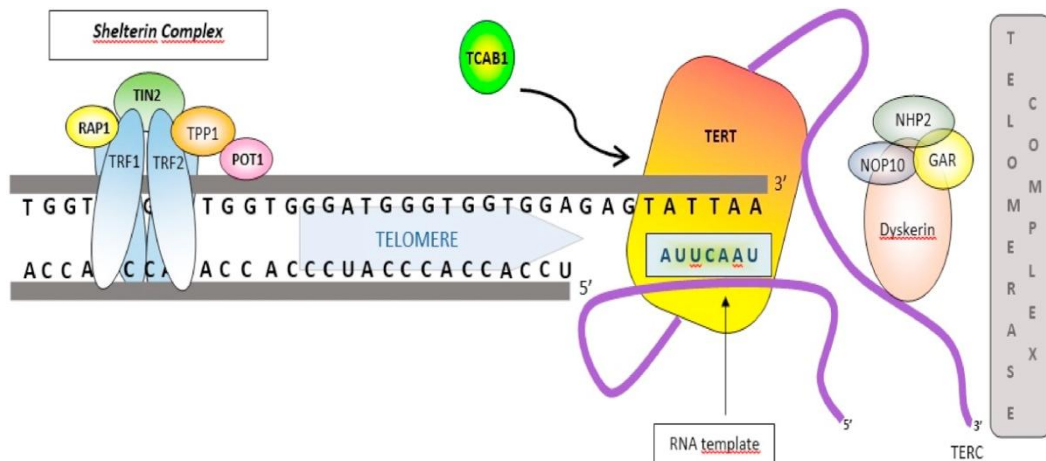
### I.1 Noyau du spermatozoïde

Le spermatozoïde est l'aboutissement d'un processus biologique complexe appelé spermatogenèse qui comporte trois étapes essentielles : **(i)** la prolifération et la différenciation des spermatogonies, **(ii)** la méiose et **(iii)** la spermiogenèse qui correspond à la différenciation des spermatides rondes en spermatozoïdes (Figure 1). Au cours de la spermatogenèse, un ensemble d'évènements se produit au niveau du noyau des cellules germinales afin de protéger l'ADN spermatique et d'optimiser la transmission de l'information génétique et épigénétique (Schulte *et al.*, 2010) : le remplacement de 90% des histones en protamines durant la



**Figure 2 : Composition et condensation de la chromatine des spermatides au cours de la spermatogénèse**  
(d'après Noblanc *et al.*, 2012)

Le noyau des spermatides rondes est constitué de 23 chromosomes dont la chromatine comporte des nucléosomes qui eux même sont constitués d'histones où s'enroule la double hélice d'ADN. La condensation de la chromatine spermatique est un processus complexe qui s'opère lors de la spermatogénèse à partir du stade de spermatocyte, pour aboutir à un remplacement de 90% des histones par des protéines de transition puis des protamines du stade de spermatide ronde jusqu'au stade de spermatozoïde. Ce remplacement entraîne une modification majeure de l'organisation de la chromatine qui passe d'une organisation en solénoïdes à une organisation en tores qui lui confère une forte compaction.



**Figure 3 : Structure du complexe « Shelterin » et de la télomérase au niveau des télomères**  
(Allegra *et al.*, 2017)

Les télomères sont des séquences répétées situées à l'extrémité des chromosomes coiffés par le « complexe shelterin » (ensemble de protéines chaperonnes à visée stabilisatrice et protectrice). La télomérase est une enzyme TERT utilisant une matrice d'ARN TERC et des protéines stabilisantes, pour l'élongation des télomères.

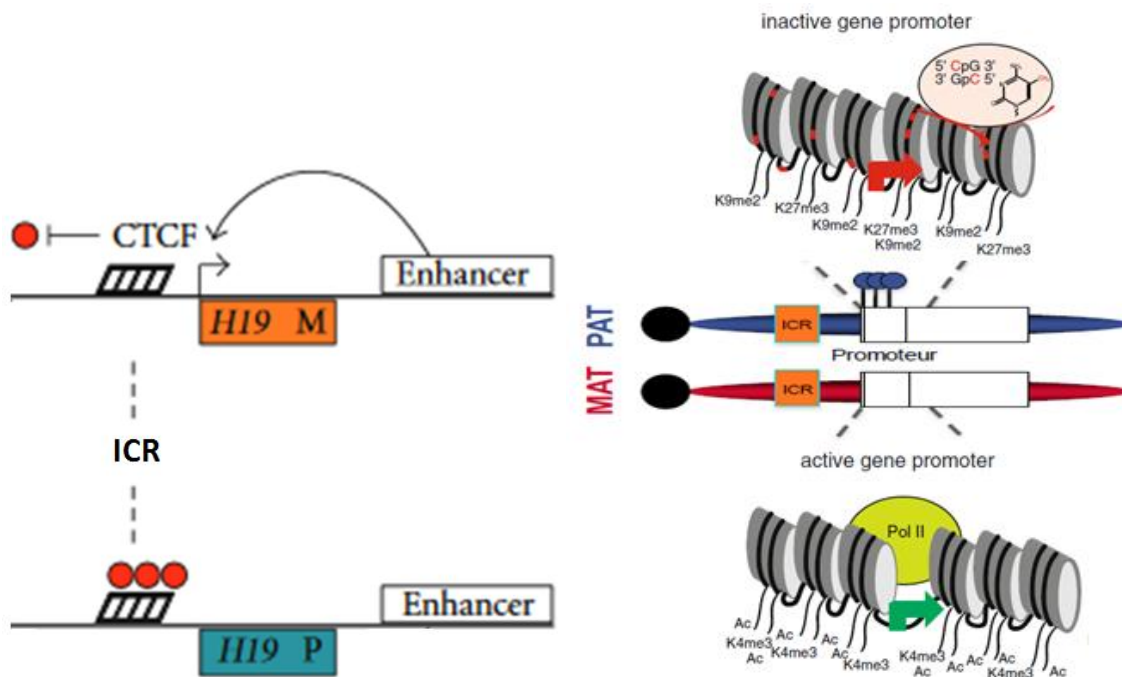
POT1 : protection of telomeres 1 ; RAP1 : repressor/activator protein 1 ; TERT : telomere reverse transcriptase enzyme ; TCAB1 et Dyskerine : protéines stabilisantes ; TIN2 : TRF1 and TRF2 interacting nuclear factor 2 ; TPP1 : tripeptidyl-peptidase 1 ; TERC : telomere RNA template enzyme ; TRF1 et TRF2 : telomeric repeat binding factor 1 and 2

spermiogenèse entraînant une forte compaction de la chromatine (Figure 2) (Nobla *et al.*, 2012) ; la méiose qui confère au spermatozoïde un génome haploïde ; l'élongation des télomères du stade de spermatogonie au stade de spermatocyte I (Jorgensen *et al.*, 2013) qui maintient l'intégrité des chromosomes (Figures 2 et 3) (Allegra *et al.*, 2017) et l'établissement de la méthylation de l'ADN spermatique afin d'éviter une double expression des gènes soumis à empreinte (GSE) parentale néfaste pour le développement embryonnaire (Figure 5) (Kerjean *et al.*, 2000).

La condensation de la chromatine facilite le transport du génome paternel à travers les tractus génitaux masculin et féminin et évite une augmentation de la fragmentation de l'ADN spermatique causée par le stress oxydant (Schulte *et al.*, 2010 ; Sakkas et Alvarez, 2010 ; Bisht et Dada, 2017).

La méiose est un processus de division cellulaire qui se déroule du stade de spermatocyte I au stade de spermatide ronde (Figure 1) et qui peut aboutir, lors d'une anomalie de ségrégation chromosomique, à la production de spermatozoïdes aneuploïdes.

Les télomères sont des structures situées aux extrémités des chromosomes, constitués par des séquences d'ADN chromosomiques riches en guanine de type (5'-TTAGGG-3')<sub>n</sub>, répétés en tandem sur 5 à 15 kb et recouverts d'un ensemble de six protéines (TRF1, TRF2, TIN2, TPP1, RAP1, POT1) constituant le « télosome » ou « shelterin » qui participe au rôle protecteur des chromosomes. En effet, les télomères empêchent la reconnaissance de l'extrémité de la molécule d'ADN comme une cassure double brin par les mécanismes de réparation cellulaire (Figures 2 et 3) (Allegra *et al.*, 2017). Les télomères sont répliqués par une enzyme spécifique appelée « télomérase » au cours de la phase S du cycle cellulaire au sein des cellules souches somatiques, des cellules de la lignée germinale (spermatogonies) et des cellules cancéreuses (Allegra *et al.*, 2017). Les cellules qui n'expriment plus la télomérase vont, au fur et à mesure des divisions cellulaires en raison d'une combinaison d'endoréplication incomplète et de dégradation nucléotidique, présenter une diminution de la longueur des télomères jusqu'à arriver au point critique où leur fonction de protection ne sera plus assurée ce qui entraînera l'apoptose cellulaire (Allegra *et al.*, 2017). Les télomères sont impliqués dans l'appariement des chromosomes homologues lors de la première division méiotique mais aussi dans la gamétogenèse et la fécondation (Siderakis et Tarsounas, 2007). Après la fécondation, les télomères sont les premiers constituants du génome spermatique à répondre aux signaux de l'ovocyte pour la formation du pronoyau et le mouvement



**Figure 4 : Exemple de la régulation de l'expression mono-allélique du gène *H19* soumis à empreinte paternelle**

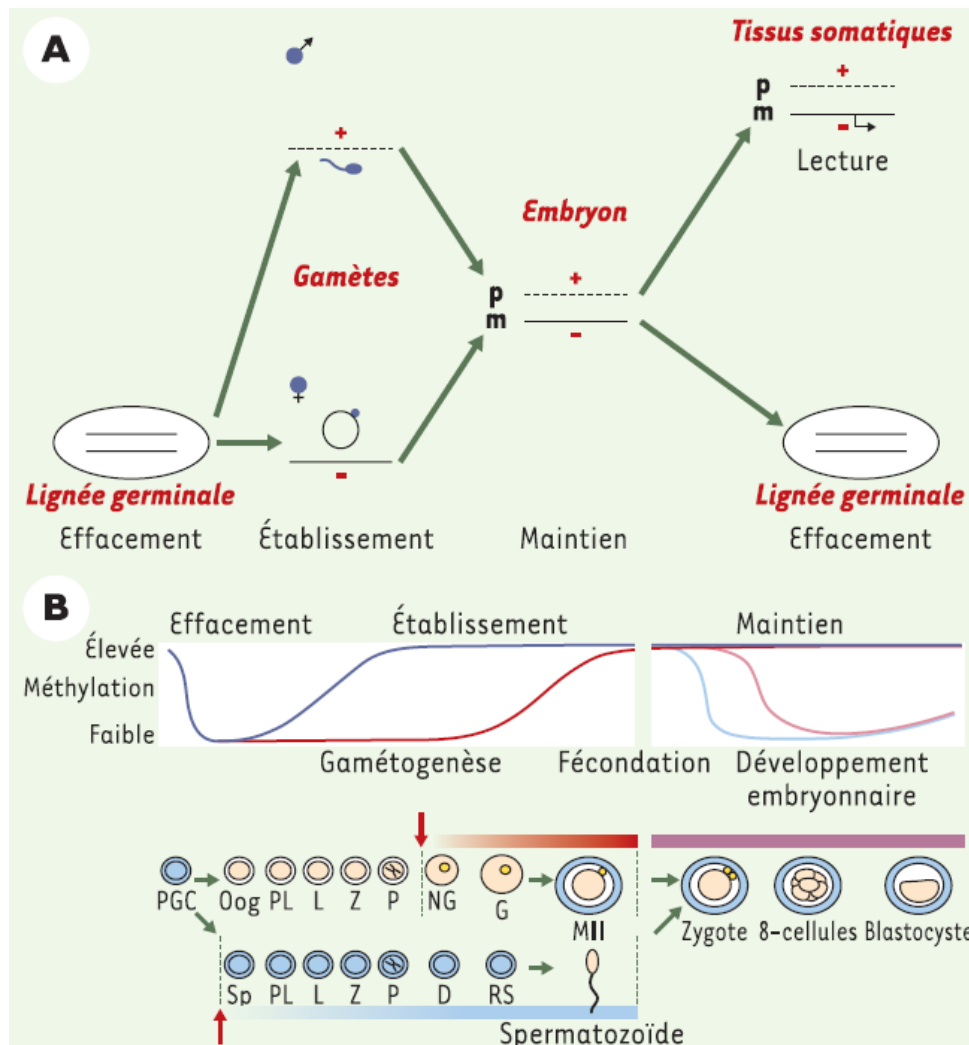
(d'après Hutter *et al.*, 2010 et MacDonald, 2012)

L'ICR *H19* possède un site de liaison pour le facteur CTCF. Sur l'allèle maternel, CTCF se fixe à l'ICR *H19* non méthylé et permet l'initiation de la transcription de *H19* via l'activation d'un *enhancer*. Sur l'allèle paternel, la méthylation présente sur l'ICR de *H19* empêche la fixation de CTCF ce qui conduit à une conformation spatiale de la chromatine fermée et à une absence d'expression du gène *H19*.

CpG : dinucléotide cytosine-guanine ; CTCF : *CCCTC-binding factor* ; *Enhancer* : séquence activatrice de la transcription du gène *H19* ; *H19 M* : allèle maternel du gène *H19* ; *H19 P* : allèle paternel du gène *H19* ; ICR : *Imprinting Control Region* ; Pol II : polymérase II

des chromosomes *via* les microtubules (Siderakis et Tarsounas, 2007). La longueur relative des télomères augmente du stade de spermatogonies au stade de spermatocytes I puis diminue légèrement dans les spermatozoïdes où on ne retrouve plus l'expression de la télomérase (Jorgensen *et al.*, 2013). De plus, Allsopp *et al.* (1992) ont démontré que la longueur des télomères spermatiques augmentait avec l'âge, résultat retrouvé dans plusieurs études (Baird *et al.*, 2006 ; Aston *et al.*, 2012). Une diminution de la longueur relative des télomères spermatiques retrouvée chez des hommes présentant une infertilité inexplicée avec une perturbation de l'homéostasie de la télomérase (Reig-Viader *et al.*, 2014) induit potentiellement une altération de la qualité des spermatozoïdes avec un retentissement sur la fécondation et le développement embryonnaire.

Le développement embryonnaire des mammifères notamment l'Homme, requière la contribution d'un génome maternel et paternel. Cette condition indispensable est expliquée notamment par la présence de GSE parentale (Kerjean *et al.*, 2000). Un GSE parentale est un gène dont l'expression est mono-allélique, en fonction de l'origine parentale, *via* les marques épigénétiques telles que la méthylation des cytosines (C) faisant partie d'un dinucléotide cytosine-guanine (CpG) de l'ADN (Kerjean *et al.*, 2000). Des éléments de contrôle de ces marques épigénétiques appelés ICR (*Imprinting Control Region*), qui sont des régions différenciellement méthylées (DMR) primaires, c'est-à-dire que la méthylation a lieu dans les gamètes par opposition aux DMR secondaires où la méthylation se produit après la fécondation, ont été identifiés au niveau de la plupart des GSE (Kerjean *et al.*, 2000). Cette méthylation de l'ADN entre en jeu dans les mécanismes de régulation d'expression génique et donne le plus souvent une conformation spatiale fermée de la chromatine empêchant la transcription de l'allèle méthylé (Kerjean *et al.*, 2000). C'est le cas pour le GSE paternelle *H19* situé sur le chromosome 11 dont l'allèle paternel est méthylé dans le spermatozoïde (Figure 4). En effet, au sein des cellules germinales primordiales (PGC) fœtales, la méthylation des GSE paternelle, héritée des parents, subit un effacement dans la lignée germinale masculine au début du développement foetal et est rétablie lors de la spermatogenèse dans les testicules adultes (Figure 5) (Kerjean *et al.*, 2000). A la suite de la fécondation, la méthylation de l'allèle paternel de *H19* est maintenue dans les cellules somatiques embryonnaires qui auront ainsi une expression mono-allélique maternelle de *H19* (Figures 4 et 5) jouant un rôle dans la régulation pondérale et la prolifération cellulaire embryonnaire (Kerjean *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2016). Les GSE maternelle



**Figure 5 : Reprogrammation épigénétique dans la lignée germinale**

(d'après Reik *et al.*, 2001)

Chez le fœtus masculin, on observe l'effacement de l'empreinte parentale sur les deux chromosomes parentaux dans la nouvelle lignée germinale fœtale (PGC), l'établissement d'une nouvelle empreinte dès la naissance dans les spermatogonies et qui s'accroît à la puberté au cours de la spermatogenèse (l'établissement de la méthylation est complète au stade pachytène). Après la fécondation, la méthylation des GSE héritée se maintient au cours des divisions cellulaires embryonnaires et l'expression mono-allélique est retrouvée dans les tissus somatiques mais s'efface dans la lignée germinale du nouvel individu.

D : diacinèse ; GSE : gènes soumis à empreinte ; L : leptotène ; P : pachytène ; PGC : cellules germinales primordiales ; PL : pré-leptotène ; RS : spermatide ronde ; Sp : spermatogonies adultes ; Z : zygotène

tels que *MEST* (*Mesoderm specific transcript*) situé sur le chromosome 7, codant une protéine qui jouerait un rôle dans le développement embryonnaire, sont hypométhylés du stade de cellules germinales primordiales au stade de spermatozoïdes (Kerjean *et al.*, 2000). Dans l'état actuel de nos connaissances, des altérations de la méthylation globale de l'ADN spermatique et des gènes soumis à empreinte sont retrouvées chez les hommes présentant une infertilité idiopathique (Laurentino *et al.*, 2015 ; Cui *et al.*, 2016) mais cette exploration n'a pas été initiée au niveau des spermatozoïdes de patients atteints d'un cancer et avant toute prise en charge thérapeutique.

Peu d'études se sont intéressées à essayer d'évaluer l'impact du cancer sur la spermatogenèse au moment de la conservation des spermatozoïdes.

## **I.2 Impact des cancers sur les paramètres spermatiques conventionnels**

Les données de la littérature concernant l'impact des cancers sur les paramètres spermatiques conventionnels (concentration, mobilité et morphologie) sont rares, concernent majoritairement deux types de cancers (le CT et le lymphome) et soulèvent certaines controverses.

Chez les patients atteints d'un CT, une diminution de la concentration en spermatozoïdes (Caponecchia *et al.*, 2016), de la mobilité (Bujan *et al.*, 2013), et du pourcentage de spermatozoïdes à morphologie normale (Bussen *et al.*, 2004) a été rapportée. Pourtant, 37% (O'Flaherty *et al.*, 2008) à 60% (Rives *et al.*, 2017) de ces patients présentaient des paramètres spermatiques normaux. Ces différences observées peuvent être expliquées par le type histologique de la tumeur. En effet, le séminome altère plus significativement la production de spermatozoïdes par comparaison aux tumeurs germinales non séminomateuses (Rives *et al.*, 2012). Physiologiquement, l'effet du CT sur la spermatogenèse pourrait être expliqué d'une part, par des effets loco-régionaux néfastes tels qu'une compression pouvant altérer les cellules de Leydig et provoquer une diminution du niveau des androgènes, mais également par la mise en place d'un micro-environnement inflammatoire au sein des tubes séminifères non envahis par les cellules tumorales, provoquant la fibrose du tissu interstitiel (O'Donovan *et al.*, 2005), et d'autre part, par la survenue d'un dysfonctionnement de la spermatogenèse au sein du testicule sain controlatéral.



Chez les patients atteints d'un lymphome Hodgkinien (LH), de multiples altérations du spermogramme ont été rapportées (Rueffer *et al.*, 2001) dont une diminution de la concentration en spermatozoïdes (Caponecchia *et al.*, 2016) mais sans relation significative avec les différents stades de la maladie (Fait *et al.*, 2001). Ces résultats ne sont pas retrouvés dans toutes les études : entre 75% (Paoli *et al.*, 2016) et 81% (O'Flaherty *et al.*, 2008) des patients atteints d'un LH sont normozoospermiques. Le dysfonctionnement gonadique observé dans le lymphome est probablement la conséquence soit d'un stress entraînant une altération du taux des catécholamines et une hyperprolactinémie (Ribeiro *et al.*, 2008), soit d'un effet systémique de la maladie *via* l'augmentation d'acteurs pro-inflammatoires tels que les cytokines qui peuvent provoquer une hyalinisation des tubes séminifères (O'Donovan *et al.*, 2005). Un taux élevé d'interleukines (IL-1, IL-6) et de cytokines (TNF $\alpha$ ) dans le liquide séminal et dans le sérum, a été retrouvé chez des patients ayant une spermatogenèse sévèrement altérée (Rueffer *et al.*, 2001 ; Stahl *et al.*, 2009).

En revanche, l'étude de O'Donovan *et al.* (2005), examinant plusieurs types de cancers, n'a montré aucune altération de la numération ou de la mobilité spermatique chez les patients atteints d'un CT, d'un LH, d'un LNH, d'une leucémie et d'un cancer solide (CS) non urologique par rapport aux hommes issus d'une population contrôle fertile.

Ces données contradictoires peuvent s'expliquer par une hétérogénéité des méthodes, des pathologies, des patients étudiés ainsi que de la population contrôle qui est soit une population d'hommes en bonne santé, soit des hommes infertiles ou des donneurs de spermatozoïdes fertiles. Par ailleurs, les effectifs restent souvent faibles.

### **I.3 Impact des cancers sur l'ADN spermatique**

L'évaluation des altérations de l'ADN spermatique dans le contexte du cancer s'effectue généralement par la quantification des cassures de l'ADN simple ou double brin, l'analyse du niveau de condensation de la chromatine et du taux d'aneuploïdie des spermatozoïdes. Ces études se sont intéressées à différents types de cancers, et soulèvent d'importantes controverses notamment dû à l'utilisation de différentes méthodes d'analyse.

Chez les patients atteints d'un CT, le taux de fragmentation de l'ADN spermatique ou de cassures de l'ADN simple brin est soit normal (Ribeiro *et al.*,

2008 ; Smit *et al.*, 2010 ; McDowell *et al.*, 2013) soit augmenté (O'Donovan *et al.*, 2005 ; Spermon *et al.*, 2006 ; Meseguer *et al.*, 2008 ; O'Flaherty *et al.*, 2008 ; Stahl *et al.*, 2009). Par ailleurs, les anomalies de condensation de la chromatine spermatique sont augmentées chez les patients atteints d'un CT (Spermon *et al.*, 2006). Enfin, l'aneuploïdie spermatique n'est pas modifiée dans le CT par comparaison à une population contrôle (Tempest *et al.*, 2008). Cependant, une étude récente révèle une augmentation des disomies X et Y dans le même contexte (Rives *et al.*, 2017).

Chez les patients atteints d'un LH, plusieurs études montrent une réelle augmentation de la fragmentation de l'ADN spermatique (O'Donovan *et al.*, 2005 ; Meseguer *et al.*, 2008 ; O'Flaherty *et al.*, 2008) et des taux de cassures de l'ADN simple brin normaux (Smit *et al.*, 2010 ; McDowell *et al.*, 2013) ou augmentés (Stahl *et al.*, 2009 ; O'Flaherty *et al.*, 2008). Par ailleurs, les anomalies de condensation de la chromatine spermatique sont augmentées chez les patients atteints d'un LH (O'Flaherty *et al.*, 2008). Enfin, l'aneuploïdie spermatique est augmentée dans le LH par comparaison à une population contrôle (Fait *et al.*, 2001 ; Frias *et al.*, 2003 ; Tempest *et al.*, 2008).

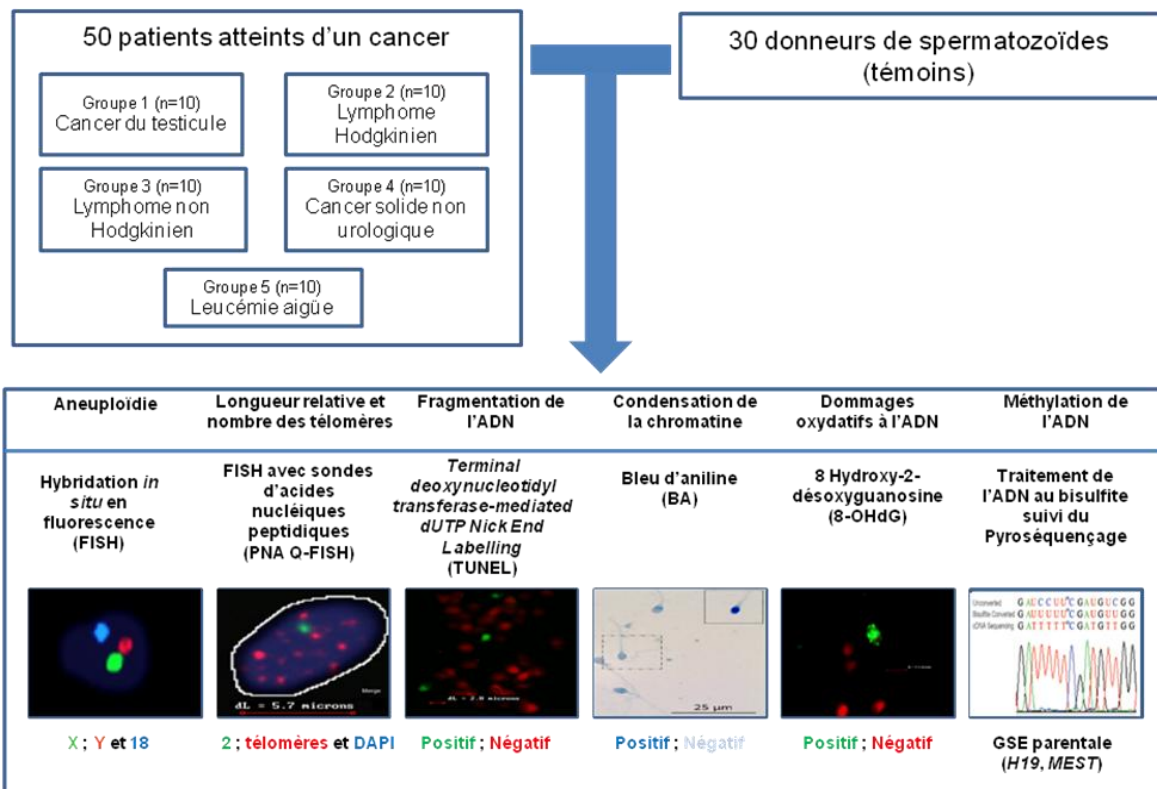
Le taux de fragmentation de l'ADN spermatique ne varie pas entre différents types de cancers (CT, leucémie, LH, LNH) (O'Donovan *et al.*, 2005 ; Meseguer *et al.*, 2008) même si le taux de cassures de l'ADN simple brin semble être augmenté dans le LNH (Smit *et al.*, 2010), tandis qu'il semble normal chez les patients atteints d'une leucémie (Smit *et al.*, 2010 ; McDowell *et al.*, 2013) ou d'un CS non urologique (McDowell *et al.*, 2013). Par ailleurs, les anomalies de condensation de la chromatine spermatique sont augmentées chez les patients tout type de cancer confondu (leucémie, LH, LNH et CT) (O'Donovan *et al.*, 2005).

Les études ayant envisagé une exploration simultanée de différentes altérations du noyau spermatique dans ce contexte restent peu nombreuses (O'Flaherty *et al.*, 2008). De plus, les données de la littérature restent très controversées et ne permettent pas d'évaluer précisément l'impact du cancer sur la spermatogenèse. Par ailleurs, aucune étude n'a, à ce jour, évalué l'impact du type histologique du cancer, au moment de la conservation des spermatozoïdes et avant toute prise en charge thérapeutique, sur le nombre et la longueur des télomères ainsi que sur l'épigénome du spermatozoïde.

#### I.4 Objectif du travail

Les dommages à l'ADN spermatique peuvent avoir un effet négatif sur le taux de fécondation *in vitro*, entraver le développement embryonnaire et également être pro-mutagènes (Kopeika *et al.*, 2015). Ces altérations peuvent conduire à une fausse couche, une mort fœtale *in utero*, une mort subite du nourrisson, des malformations infantiles, la transmission de maladies génétiques incluant les cancers et la transmission de maladies épigénétiques (Frias *et al.*, 2003 ; Marchetti *et al.*, 2005 ; Siderakis et Tarsounas, 2007 ; Reig-Viader *et al.*, 2014 ; Kopeika *et al.*, 2015). Ainsi, l'intégrité de l'ADN spermatique joue un rôle fondamental dans les chances de paternité. C'est pour cela qu'une amélioration des connaissances sur les dommages spécifiques de l'ADN spermatique induits par le cancer semble indispensable pour identifier des facteurs prédictifs de chance de succès des techniques d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) par utilisation de ces spermatozoïdes conservés au moment du diagnostic de la maladie.

**Les objectifs de ce projet de recherche** ont été **(i)** d'explorer le noyau spermatique dans le champ du cancer en appréhendant par différentes approches méthodologiques les dommages à l'ADN spermatique et **(ii)** de caractériser ces anomalies en fonction du type de cancer [CT, LH, LNH, CS, leucémie aigüe (LA)].



**Figure 6 : Schéma expérimental de l'étude**

Dans notre étude, l'évaluation des altérations nucléaires spermatiques a été réalisée chez 50 patients et 30 témoins, par l'analyse de l'aneuploïdie (FISH), le nombre et la longueur relative des télomères (PNA Q-FISH), la fragmentation de l'ADN (TUNEL), la condensation de la chromatine (Bleu d'aniline), les dommages oxydatifs à l'ADN (8 OHdG) et l'évaluation de la méthylation de deux gènes soumis à empreinte parentale, *H19* paternelle et *MEST* maternelle (Pyroséquençage précédé d'un traitement de l'ADN au bisulfite).

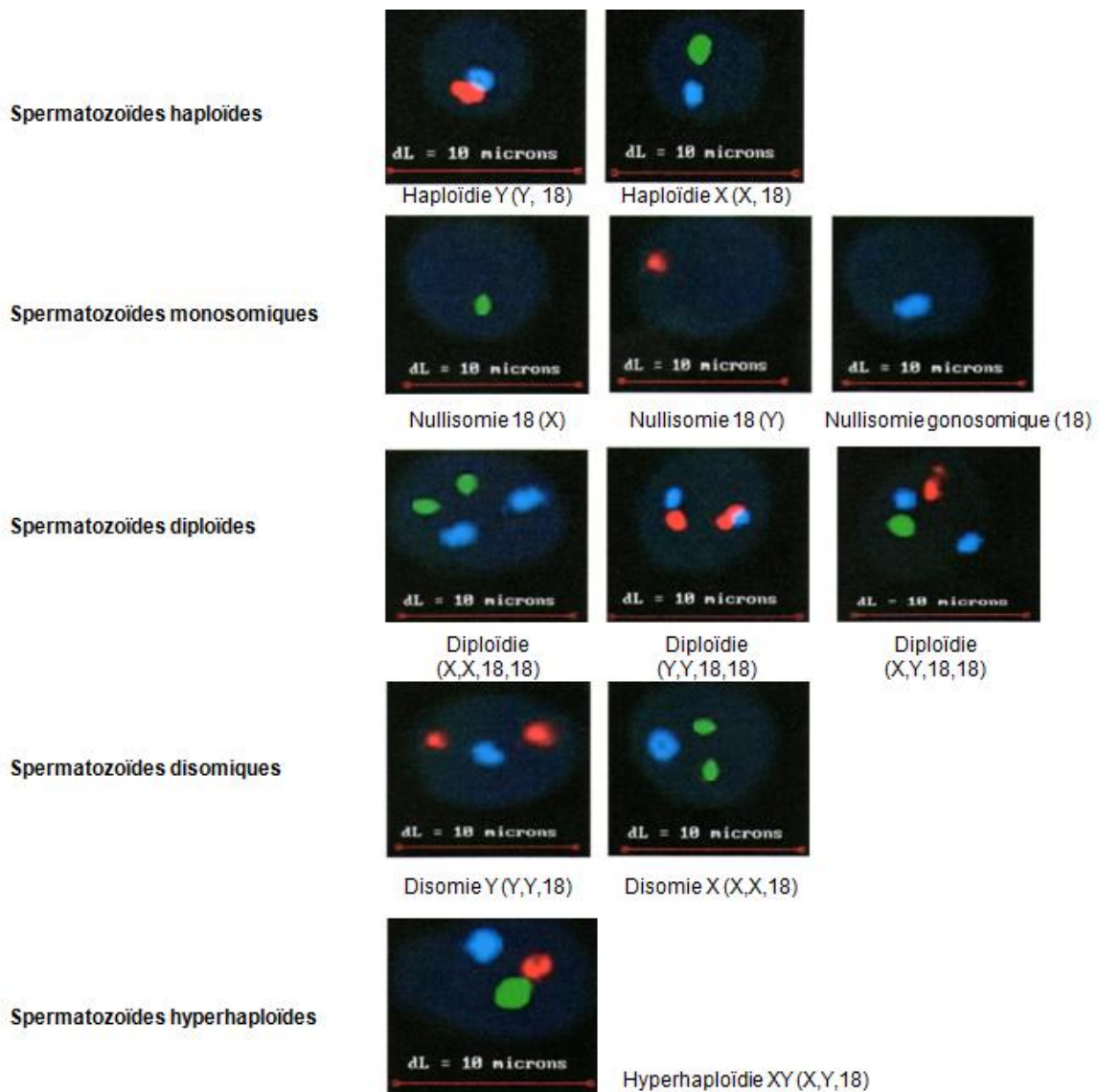
8 OHdG : 8 Hydroxy-2-désoxyguanosine ; BA : coloration au bleu d'aniline ; FISH : Hybridation *in situ* en fluorescence ; GSE : gène soumis à empreinte ; *H19* : gène soumis à empreinte paternelle ; *MEST* : gène soumis à empreinte maternelle ; n : effectif de la population étudiée ; PNA Q-FISH : Hybridation *in situ* en fluorescence avec des sondes d'acides nucléiques peptidiques ; TUNEL : *Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick end labelling*

## II. Matériels et méthodes

---

### II.1 Population étudiée et échantillons biologiques

Cette étude a été conduite dans une population de 50 hommes, âgés entre 17 et 48 ans, ayant consulté dans 5 laboratoires français de Biologie de la Reproduction-CECOS [Rouen (n=42), Lille (n=1), Caen (n=1), Cochin (n=4) et Tenon (n=2)] pour une conservation de spermatozoïdes avant la prise en charge thérapeutique d'un cancer, entre le 1<sup>er</sup> Janvier 1986 et le 31 Décembre 2013. Aucun patient n'avait reçu de traitement gonadotoxique préalablement à la préservation de leur fertilité. Ces patients ont décidé d'arrêter la conservation de leurs spermatozoïdes et de faire don de ceux-ci pour la recherche après signature d'un consentement éclairé. Les échantillons de sperme ont été collectés par masturbation après un délai d'abstinence sexuelle de 2 à 7 jours mais face à l'urgence thérapeutique pour certains cancers, 8 patients ont présenté un délai d'abstinence sexuelle supérieur à 7 jours. Les paramètres spermatiques conventionnels ont été interprétés selon les critères de l'Organisation Mondiale de la Santé définis en 2011 (OMS, 2011), après liquéfaction du sperme (20 à 30 minutes à température ambiante). Les paramètres spermatiques conventionnels étudiés comprenaient le volume de l'éjaculat (mL), la concentration spermatique (millions/mL), la numération spermatique (millions/éjaculat), la mobilité progressive (a+b, %), la vitalité spermatique (%) et la morphologie qui a été interprétée selon les critères de David modifiés (Auger *et al.*, 2001). Le sperme a été, par la suite, dilué avec le cryoprotecteur, conditionné dans des paillettes et congelé *via* un appareil de congélation automatisé. Le stockage des paillettes était effectué dans l'azote liquide à -196°C. Un test de décongélation a été réalisé avant l'exploration nucléaire spermatique, en utilisant une paillette (250 µL) de sperme réchauffée pendant 5 minutes à 37°C afin d'estimer la mobilité progressive (a+b, %) post-décongélation. Ces spermatozoïdes congelés destinés à la recherche sont conservés dans le Centre de Ressources Biologiques certifié « Germéthèque » (ISO 9001, 091031/1020F). Nous avons défini 5 groupes de patients selon le type de cancer : (i) **groupe 1**, CT (n=10) ; (ii) **groupe 2**, LH (n=10) ; (iii) **groupe 3**, LNH (n=10), (iv) **groupe 4**, CS non urologique (n=10) ; (v) **groupe 5**, LA myéloïde ou lymphoïde (n=10). Une exploration des altérations nucléaires spermatiques sur spermatozoïdes congelés a été réalisée et incluait une analyse du taux d'anomalies chromosomiques



**Figure 7 : Hybridation *in situ* en fluorescence sur noyaux spermatiques (900x)**

(Laboratoire de Biologie de la Reproduction-CECOS, CHU-Hôpitaux de Rouen)

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

par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), une analyse du nombre et de la longueur relative des télomères par hybridation *in situ* en fluorescence quantitative à l'aide de sondes d'acides nucléiques peptidiques (PNA *Peptide Nucleic Acid*) et couplées à un fluorochrome (PNA Q-FISH), une détection de la fragmentation de l'ADN par la technique *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labelling* (TUNEL), de la condensation de l'ADN par la coloration au bleu d'aniline (BA), de l'oxydation de l'ADN par la détection du 8 hydroxy-2-désoxyguanosine (8 OHdG) et d'une analyse de la méthylation de deux GSE parentale (*H19* paternelle et *MEST* maternelle) par la technique du pyrosequençage précédé d'un traitement de l'ADN au bisulfite.

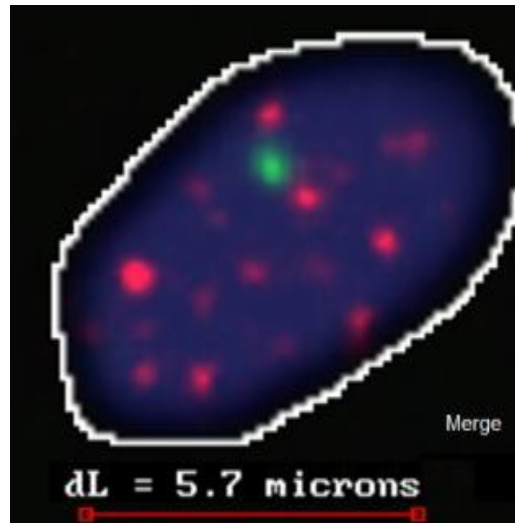
Une population de 30 hommes fertiles, en bonne santé, âgés entre 24 et 46 ans, donateurs de spermatozoïdes, aux paramètres spermatiques normaux selon les critères de l'OMS (2011) et avec un caryotype constitutionnel normal a été utilisée comme témoins.

## **II.2 Analyse de la qualité nucléaire spermatique**

### **II.2.1 Technique FISH**

La FISH en triple marquage est une technique moléculaire de cytogénétique qui évaluait le taux d'aneuploïdie spermatique des chromosomes sexuels (X et Y) et d'un autosome (18).

Les spermatozoïdes, après 3 lavages avec du *Phosphate-Buffered Saline* (PBS, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) 1X pendant 10 minutes à 2000 tours/minute, étaient fixés sur des lames Superfrost (Polylysine Slides<sup>®</sup>, Menzel Gläser, Braunschweig, Allemagne) avec du méthanol pur (Méthanol RPE, Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, France) durant 30 minutes à -20°C. Les noyaux spermatiques étaient décondensés à l'aide d'une solution de NaOH 1M pendant 3 minutes après avoir été rincés dans du PBS pendant 2 minutes. La décondensation des noyaux était stoppée par immersion des lames dans deux bains de 2 minutes successifs dans du tampon SSC 2X. La FISH en triple marquage utilisait des sondes centromériques couplées au fluorochrome rouge (CEP Y Sat III Spectrum Orange<sup>™</sup>, Abbott, Rungis, France) pour identifier le chromosome Y, au fluorochrome vert (CEP X Spectrum Green<sup>™</sup>, Abbott, Rungis, France) pour le chromosome X et au fluorochrome bleu (CEP 18 Spectrum Blue, Abbott, Rungis, France) pour le



**Figure 8 : Hybridation *in situ* en fluorescence quantitative à l'aide de sondes PNA (*Peptide Nucleic Acid*) sur un noyau spermatique (900x)**

(Laboratoire de Biologie de la Reproduction-CECOS, CHU-Hôpitaux de Rouen)

Hybridation *in situ* en fluorescence quantitative (Q-FISH) utilisant des sondes PNA en double marquage pour le centromère du chromosome 2 (en vert) et les télomères (en rouge) permettant d'évaluer le nombre et la longueur relative des télomères.

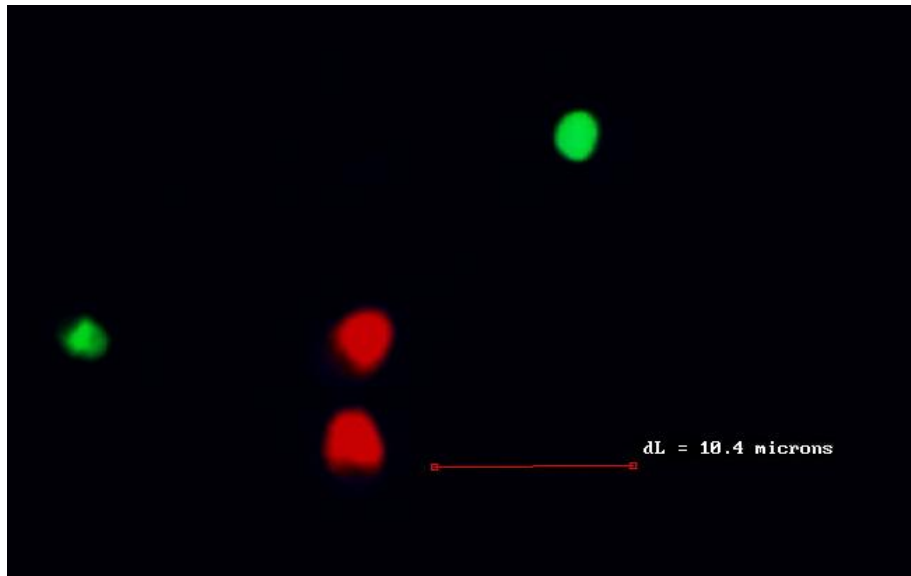


chromosome 18. Le mélange des sondes diluées au 1/3 dans le tampon d'hybridation (CEP Hybridization Buffer<sup>®</sup>, Abbott, Rungis, France) était déposé entre lame et lamelle. L'ADN spermatique et les sondes étaient dénaturés à 73°C pendant 2 minutes et hybridés à 37°C toute une nuit dans un appareil d'hybridation (Hybaid<sup>®</sup>, Omnigene, Teddington, Royaume-Uni). Après lavage post-hybridation dans deux bains successifs, l'un contenant du SSC 0,4X / NP40 0,3% (Igepal<sup>®</sup>, Sigma, Chemical Co, St Louis, MO) (73°C, 2 minutes) et l'autre contenant du SSC 2X / NP40 0,1% (température ambiante, 1 minute) et déshydratation dans des bains d'alcool (70°, 90° et 100° ; 1 minute chacun), les noyaux étaient contre-colorés au 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Counterstain 1<sup>®</sup>, Adgenix, Voisin le Bretonneux, France). L'observation des lames s'effectuait à l'aide d'un microscope à fluorescence automatisé (Olympus BX61, Tokyo, Japon) associé à un analyseur d'image (Bioview Duet ver. 2.3<sup>®</sup>, Nes Ziona, Israël) au grossissement 900× (Figure 7). Un minimum de 5000 spermatozoïdes était étudié.

### II.2.2 Technique PNA Q-FISH

L'évaluation du nombre et de la longueur relative des télomères spermatiques était effectuée *via* la FISH quantitative (Q-FISH) à l'aide de sondes PNA (*Peptide Nucleic Acid*) couplées à un fluorochrome.

Les spermatozoïdes, après 3 lavages avec du PBS pendant 10 minutes à 2000 tours/minute, étaient fixés sur des lames Superfrost avec du méthanol pur durant 30 minutes à -20°C. Les noyaux spermatiques étaient décondensés par la solution de NaOH 1M pendant 3 minutes. Après 2 minutes de rinçage dans du SSC 2X à deux reprises et 2 minutes dans du *Tris-buffered saline* 1X (TBS, Dako, Les Ulis, France), les spermatozoïdes étaient fixés dans du formaldéhyde à 3,7% pendant 2 minutes. Puis, ils étaient à nouveau lavés à deux reprises dans du TBS pendant 5 min. Selon les instructions du fournisseur, les sondes PNA pan-téломériques conjuguées à un fluorochrome CY3 et celles du centromère du chromosome 2 conjuguées au fluorochrome CEP2 (K5326 par DakoCytomation, Copenhague, Danemark) étaient déposées entre lame et lamelle. Les noyaux spermatiques et les sondes étaient simultanément dénaturés pendant 5 minutes à 80°C avant une hybridation pendant 2 heures à 22°C. L'hybridation était arrêtée par la solution de rinçage VIAL3 (VIAL3, K5326, DakoCytomation) pendant 1 minute à température ambiante. Les noyaux spermatiques étaient ensuite lavés avec la solution de lavage VIAL4 (VIAL4, K5326,



**Figure 9 : Détection de la fragmentation de l'ADN par la technique TUNEL  
(1000x)**

(Laboratoire de Biologie de la Reproduction-CECOS, CHU-Hôpitaux de Rouen)

Les noyaux spermatiques à ADN fragmenté émettent une fluorescence verte. La contre-coloration au iodure de propidium émet une fluorescence rouge.

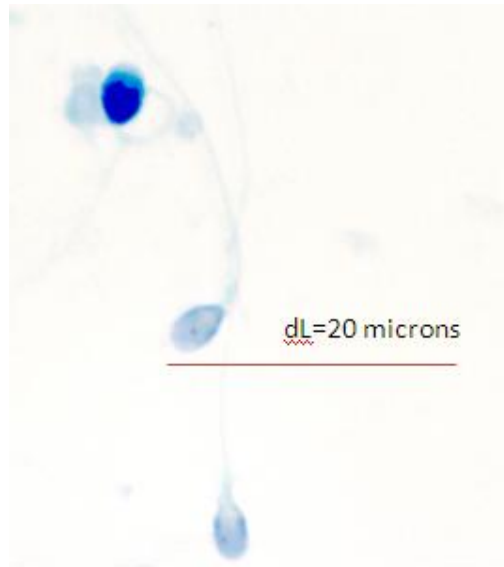
TUNEL : *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*

DakoCytomation) pendant 5 minutes au bain-marie à 65°C avant déshydratation dans des bains d'alcool (70°, 90°, 100°, 2 minutes chacun). Les noyaux spermatiques étaient contre-colorés par le DAPI. Les lames étaient observées au grossissement 900x à immersion à l'aide d'un microscope automatique à épifluorescence (Olympus BX61) associé à un analyseur d'image (Bioview Duet® version 2.3). 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. L'intensité de fluorescence intégrée du centromère du chromosome 2 et des télomères a été déterminée automatiquement pour chacun des noyaux spermatiques et calculée après soustraction de l'intensité de fluorescence de fond (autofluorescence) et correction pour les temps d'exposition d'image et d'acquisition. La longueur des télomères évaluée par la technique Q-FISH correspondait à une longueur relative exprimée en *Fluorescence Relative Units* (FRU) et calculée selon la formule suivante :  $FRU = (\text{Intensité de fluorescence des télomères} / \text{Intensité de fluorescence du centromère du chromosome 2}) \times 100$ . Au total, 200 noyaux spermatiques étaient analysés (Figure 8).

### II.2.3 Technique TUNEL

La technique TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labelling*) permettait d'observer *in situ* la fragmentation de l'ADN spermatique.

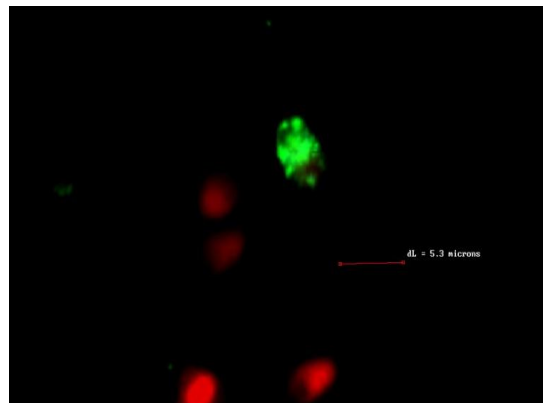
Les spermatozoïdes, après 3 lavages dans du PBS pendant 10 minutes à 2000 tours/minute, étaient fixés sur des lames Superfrost avec du méthanol pur durant 30 minutes à -20°C et devenaient perméables *via* la solution d'acétone (Carlo Erba Réactifs, Val de Reuil, France) pendant 2 minutes. Puis, les lames étaient incubées pendant 1 heure en chambre humide à 37°C avec le réactif composé de l'enzyme et de son substrat (nucléotides marqués au FITC), conformément aux recommandations du fournisseur (*In Situ Cell Death Kit Detection POD*®, Roche, Mannheim, Allemagne). Chaque lame était rincée deux fois dans du PBS 1X (10 minutes par rinçage) puis déshydratée dans des bains d'alcool (70°, 90° et 100°, 1 minute chacun). Le témoin négatif était obtenu *via* l'incubation de lames avec le substrat mais sans l'enzyme. L'obtention d'un témoin positif était faite *via* l'incubation de lames avec de la DNase I (1mg/mL, 15 minutes, en chambre humide, à 37°C).



**Figure 10 : Exploration de la condensation de l'ADN spermatique par la coloration au Bleu d'aniline (1000x)**

(Laboratoire de Biologie de la Reproduction-CECOS, CHU-Hôpitaux de Rouen)

Les spermatozoïdes présentant des anomalies de condensation de l'ADN spermatique sont colorés au minimum à 50% en bleu foncé.



**Figure 11 : Exploration des dommages spécifiques de l'ADN spermatique par le stress oxydant (1000x)**

(Laboratoire de Biologie de la Reproduction-CECOS, CHU-Hôpitaux de Rouen)

Les spermatozoïdes présentant des groupes 8 OHdG (8 hydroxy-désoxyguanosine) émettent une fluorescence verte.

Les spermatozoïdes étaient contre-colorés par du iodure de propidium (Star\*FISH<sup>®</sup> Kit Components, Cambio, Cambridge, UK) dilué au 1/1000<sup>ème</sup> dans de l'antifade (Antifade<sup>®</sup>, MP-QBio-Gene, Illkirch, France). Les lames étaient observées à l'aide d'un microscope à fluorescence au grossissement 1000x à immersion (DMRB<sup>®</sup>, LEICA, Solms, Allemagne) couplé à un analyseur d'image (MacProbe<sup>®</sup> version 3.3, Perspective Scientific International LTD, Chester, Angleterre). Au total, 500 spermatozoïdes étaient analysés pour chaque patient (Figure 9).

#### **II.2.4 Coloration au Bleu d'aniline**

La coloration au bleu d'aniline (BA) permettait de définir le degré de condensation du noyau spermatique et ainsi, le niveau de maturité nucléaire du spermatozoïde.

Les spermatozoïdes, après 3 lavages dans du PBS pendant 10 minutes à 2000 tours/minute, étaient fixés sur des lames Superfrost avec de la glutaraldéhyde 3% (30 minutes, température ambiante) (Glutaraldéhyde<sup>®</sup>, Sigma, St Louis, MO, Etats-Unis). Les lames étaient rincées deux fois à l'eau distillée puis colorées par un bain de bleu d'aniline à 5%, pH 3,5, pendant 5 minutes (Gurr<sup>®</sup>, BDH Laboratory Supplies, Angleterre). Elles étaient ensuite rapidement rincées deux fois à l'eau distillée puis déshydratées dans des bains d'alcool (70°, 90°, 100°, 1 minute chacun) avant d'être montées en Eukitt (Eukitt<sup>®</sup>, EUK 100, CML, Nemours, France). La lecture était faite sur 500 spermatozoïdes sous lumière blanche au grossissement 1000x et en immersion (Leitz DMRD<sup>®</sup>, Leica, Solms, Allemagne) (Figure 10).

#### **II.2.5 Marquage au 8 OHdG**

L'immunofluorescence par un anticorps dirigé contre le 8 hydroxy-2-désoxyguanosine (8 OHdG) permettait de mettre en évidence l'ADN spermatique oxydé.

Les spermatozoïdes, après 3 lavages dans du PBS pendant 10 minutes à 2000 tours/minute, étaient fixés sur des lames Superfrost avec du paraformaldéhyde 4% (PFA, Sigma-Aldrich) pendant 15 minutes à 4°C. Après une réhydratation en PBST (PBS, BioMérieux et Tween 20<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich), les noyaux spermatiques subissaient une décondensation par NaOH 1M pendant 2 minutes. Après 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

**Tableau 1 : Régions différenciellement méthylées des GSE parentale *H19* et *MEST* et couples d'amorces oligonucléotidiques utilisés en PCR et en pyroséquençage**

(d'après Boissonnas *et al.*, 2010 ; Berthaut *et al.*, 2013)

Gènes	Séquences étudiées	Séquences des amorces	Taille du produit amplifié
<i>H19</i> 15 CpG	<b>1:</b> CA <u>CG</u> GAATTGGTTGTAGTTGTGGAAT <u>CG</u> GAAGTGGC <u>CGCGCGGCG</u> GCAAGT <b>2:</b> CCC <u>GAGCCCG</u> CCCCAACTGGGGTT <u>CGCCCGT</u> TGGAA <u>ACG</u> <b>3:</b> <u>CGCGT</u> <u>CG</u> CAGGGTTC <u>CG</u> GGGG	Sens : 5'- TGGGTATTTTTGGAGGTTTTTTTT -3'	216 pb
		Anti-sens : 5'- Biotine-ATAAATATCCTATTCCCAAATAA -3'	
		Séq 1 : 5'- TTTATYGTTTGGATGG -3'	
		Séq 2 : 5'- GTAGGTTTATATATTATAG -3'	
		Séq 3 : 5'- GTTYGGGTTATTTAAGTTA -3'	
<i>MEST</i> 5 CpG	<u>CGCAGGCGAGCGG</u> GAGGACTGTGTGCC <u>CGTGTCCG</u>	Sens : 5'-TGTGGTTGGAGGTTTTGGGATTA -3'	78 pb
		Anti-sens :5'- Biotine-CCAAAACAACCCCAACT -3'	
		Séq : 5'- GGTTTTGGGATTAGGG -3'	

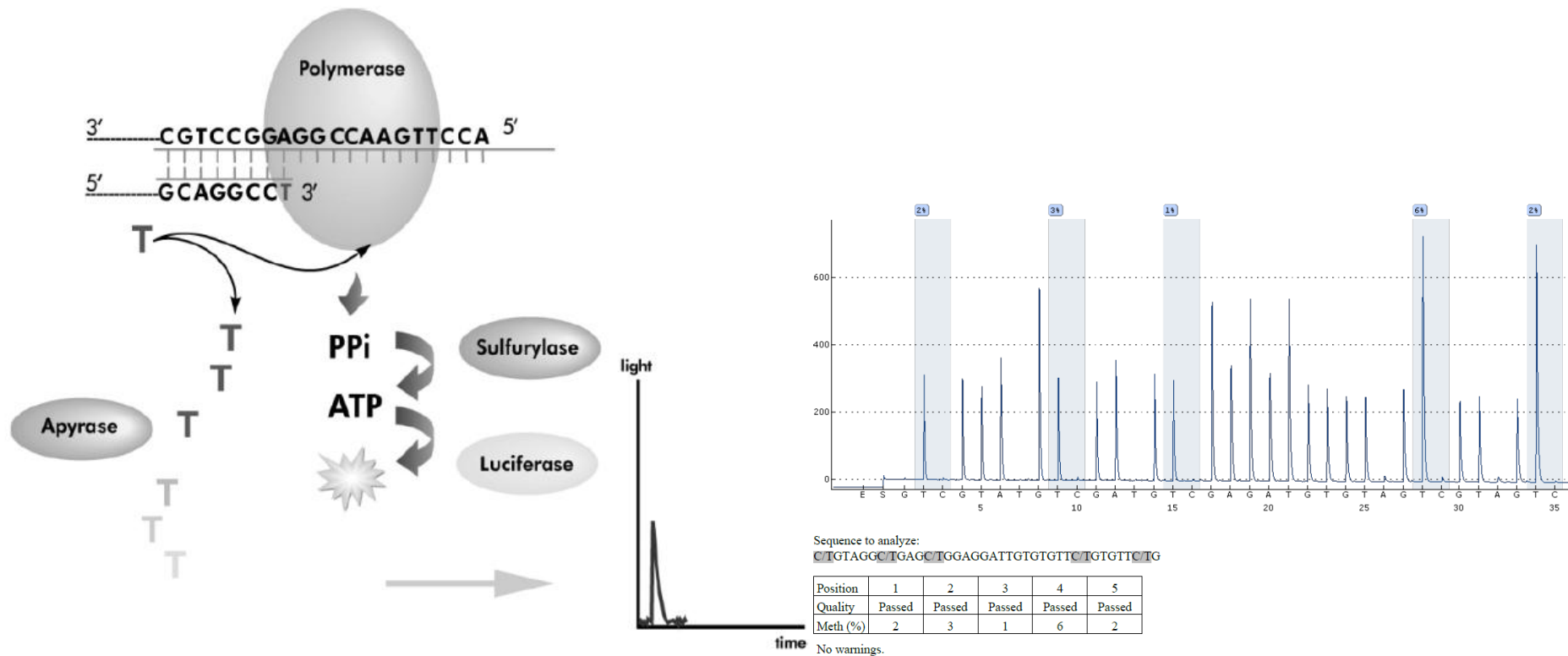
CpG : dinucléotide cytosine-guanine ; pb : paire de bases ; GSE : gène soumis à empreinte ; PCR : *Polymerase Chain Reaction* ; Séq : amorce de séquençage ; Sens et anti-sens : amorces de PCR

les lames étaient incubées toute une nuit à 4°C avec l'anticorps monoclonal murin anti-8 OHdG IgG (clone 15A3, NB110-96878, Novus Biologicals, Littleton, CO) dilué dans du BSA au 1/500<sup>ème</sup>. L'étape de révélation intervenait après trois rinçages au PBST et le dépôt d'un anticorps anti-Fc IgG couplé au fluorochrome Alexa 488 sur les lames qui étaient à nouveau incubées en chambre humide pendant 1 heure à température ambiante. Après trois rinçages successifs au PBST, les noyaux spermatiques étaient contre-colorés au iodure de propidium (Star\*FISH<sup>®</sup> Kit Components, Cambio, Cambridge, UK) dilué au 1/1000<sup>ème</sup> dans de l'antifade. Au total, 500 spermatozoïdes étaient analysés à l'aide d'un microscope à fluorescence au grossissement 1000x à immersion (DMRB<sup>®</sup>, LEICA, Solms, Allemagne) couplé à un analyseur d'image (MacProbe<sup>®</sup> version 3.3, Perspective Scientific International LTD, Chester, Angleterre) (Figure 11).

## II.2.6 Pyroséquençage

Le pyroséquençage était réalisé après le traitement de l'ADN spermatique au bisulfite, pour déterminer le taux de méthylation des sites CpG situés au niveau des régions différentiellement méthylées (DMR) de deux GSE parentale (*H19* soumis à empreinte paternelle et *MEST* soumis à empreinte maternelle).

Après centrifugation des échantillons de sperme (400 à 600 µl) sur un gradient de densité (PureSperm, JCD, Lyon, France) à 1400 tours par minute pendant 20 minutes, les spermatozoïdes mobiles étaient sélectionnés par la technique de *swim-up* (migration ascendante des spermatozoïdes mobiles pendant 1 heure à 37°C). L'absence de cellules rondes était confirmée par une analyse microscopique en contraste de phase systématique. L'ADN spermatique (10<sup>3</sup>/µl) était alors extrait à l'aide du kit EpiTect<sup>®</sup>LyseAll Lysis (Qiagen, Hilden, Allemagne) puis était traité au bisulfite avec le kit EpiTect<sup>®</sup>Fast DNA Bisulfite, selon les recommandations du fournisseur. Les régions d'intérêt étaient amplifiées par réaction de polymérisation en chaîne (PCR *Polymerase Chain Reaction*) à l'aide du kit PyroMark PCR (Qiagen), dans un volume final de 25 µl, contenant 4 µl d'ADN spermatique, 0,2 µM de chaque amorce (sens et antisens), 1X de PyroMark PCR Master Mix et de CoralLoad Concentrate chacun. Les couples d'amorces sont présentés dans le Tableau 1. Le thermocycleur StepOnePlus<sup>™</sup> (Applied Biosystems<sup>®</sup>, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Etats-Unis) a été programmé de la façon suivante : un premier cycle de dénaturation de l'ADN (15 minutes à 95°C) suivi de 45 cycles d'amplification avec



**Figure 12 : Illustration schématique de la réaction de pyroséquençage et du pyrogramme obtenu pour déterminer le taux de méthylation**

(Laboratoire de Biologie de la Reproduction-CECOS, CHU-Hôpitaux de Rouen)

Lorsque les nucléotides sont incorporés dans le brin d'ADN analysé, le pyrophosphate libéré est converti en ATP par la sulfurylase. L'ATP généré est utilisé par la luciférase en présence de luciférine permettant une réaction de luminescence détectée sous la forme d'un pic sur le pyrogramme. L'apyrase dégrade tous les nucléotides non incorporés avant chaque distribution

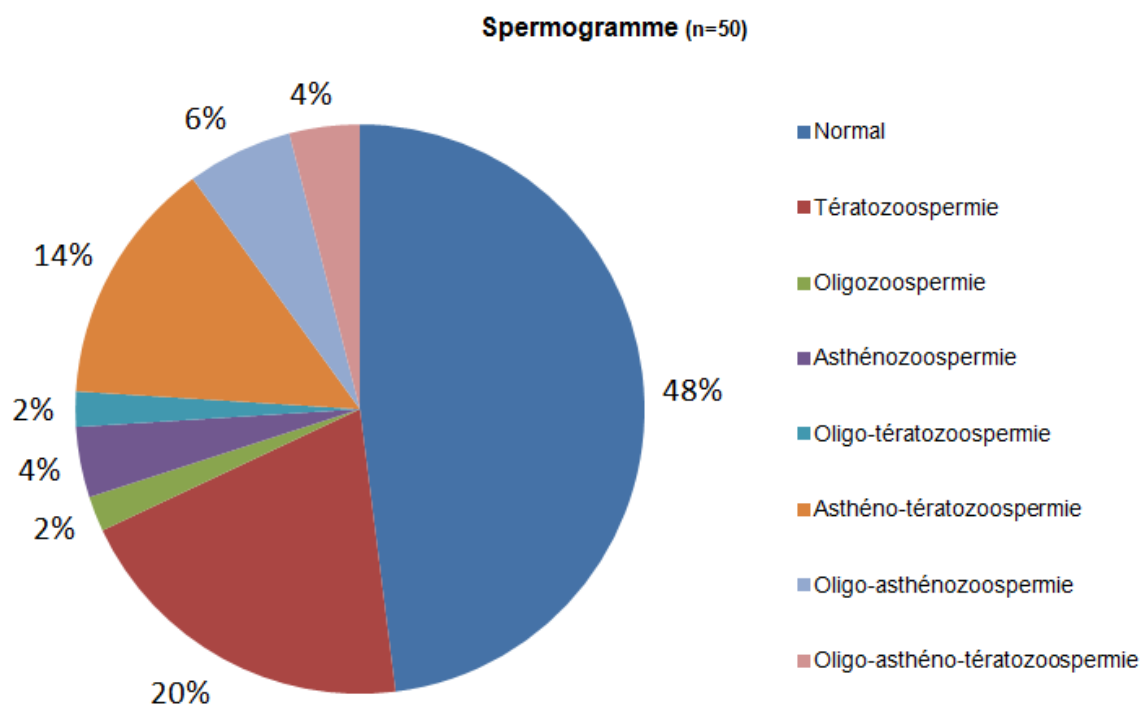
A : adénine ; ATP : adénosine triphosphate ; C : cytosine ; G : guanine ; PPi : pyrophosphate ; T : thymine



à chaque cycle une dénaturation de 30 secondes à 94°C puis une étape d'hybridation des amorces de 30 secondes à 56°C et d'élongation de 30 secondes à 72°C. La taille des amplicons a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 4% (E-gel<sup>®</sup>, Life Technologies, Californie, Etats-Unis). Les produits de PCR biotinylés ont été ensuite immobilisés sur des billes de streptavidine (PyroMark Q24, Qiagen) avant d'être dénaturés dans 40 mL d'une solution de NaOH. Les brins d'ADN biotinylés ont alors été déposés dans une plaque 24 puits et incubés à 80°C pendant 2 minutes avec 0,3 µM d'amorce de séquençage (Tableau 1). Le séquençage des brins d'ADN a été réalisé avec le pyroséquenceur PyroMark Gold Q24 (Qiagen). Brièvement, 4,8 µl d'un mélange d'enzymes (ADN polymérase, sulfurylase, luciférase, apyrase), 4,8 µl de luciférine et 3,3 µl de nucléotides (distribués l'un après l'autre) ont été ajoutés dans chaque puit (Figure 12). La détection de la lumière émise suite à l'incorporation des nucléotides donnait un pyrogramme en temps réel dont la hauteur du pic indiquait le nombre et le type du nucléotide incorporé (Figure 12). Le taux de méthylation de chaque site CpG a été déterminé avec le logiciel Pyromark Q24 (Qiagen) qui mesurait la hauteur des pics de luminescence émis par l'incorporation de C ou T et les comparait à un pic non CpG (référence).

### **II.3 Analyses statistiques**

Les données ont été colligées dans un fichier Excel et l'analyse statistique a été effectuée par le biais du logiciel GraphPad Prism v4.02 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Dans un premier temps, les patients ont été comparés aux témoins en utilisant le test de Mann-Whitney. Dans un second temps, les patients ont été comparés entre eux et avec les témoins selon le type de cancer mais aussi selon le spermogramme, en utilisant le test de Kruskal-Wallis. Les données ont été décrites en utilisant les paramètres descriptifs habituels : moyenne, médiane, quartiles, déviation standard pour les variables quantitatives ; fréquence pour les variables qualitatives. Une valeur de  $p$  inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative. La recherche de corrélation entre les paramètres spermatiques a été effectuée selon la méthode de Spearman. Une valeur de  $p$  inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative.



**Figure 13 : Répartition des anomalies spermatiques de la population masculine étudiée**

(n) : effectif de la population étudiée

**Tableau 2 : Comparaison de l'âge et des paramètres spermatiques conventionnels des patients et des témoins**

Variables	Patients	Témoins	p
	(m ± DS) n=50	(m ± DS) n=30	
Age (années)	<b>30,1 ± 7,7</b>	<b>34,8 ± 6,1</b>	<b>0,0055*</b>
Délai d'abstinence (jours)	5,3 ± 12,6	3,3 ± 0,9	>0,9999
Volume (mL)	3,2 ± 1,3	3,5 ± 1,6	0,5479
Concentration (Millions/mL)	48,9 ± 36,5	57,3 ± 27	0,0714
Numération (Millions/éjaculat)	<b>150,1 ± 141,2</b>	<b>188,7 ± 113,8</b>	<b>0,0287*</b>
Mobilité progressive (a+b %) avant congélation	34,4 ± 11,2	38,3 ± 6,2	0,2013
Morphologie (% de formes typiques)	33,3 ± 21	38,7 ± 14,2	0,1027
Mobilité progressive (a+b %) post-décongélation	19,1 ± 8,6	21 ± 7	0,5212
Vitalité (%)	43,5 ± 14,4	37,6 ± 13,2	0,0637

DS : déviation standard ; m : moyenne ; n : effectif de la population ;  $p < 0,05$  est significatif

## III. Résultats

---

### III.1 Description de la population

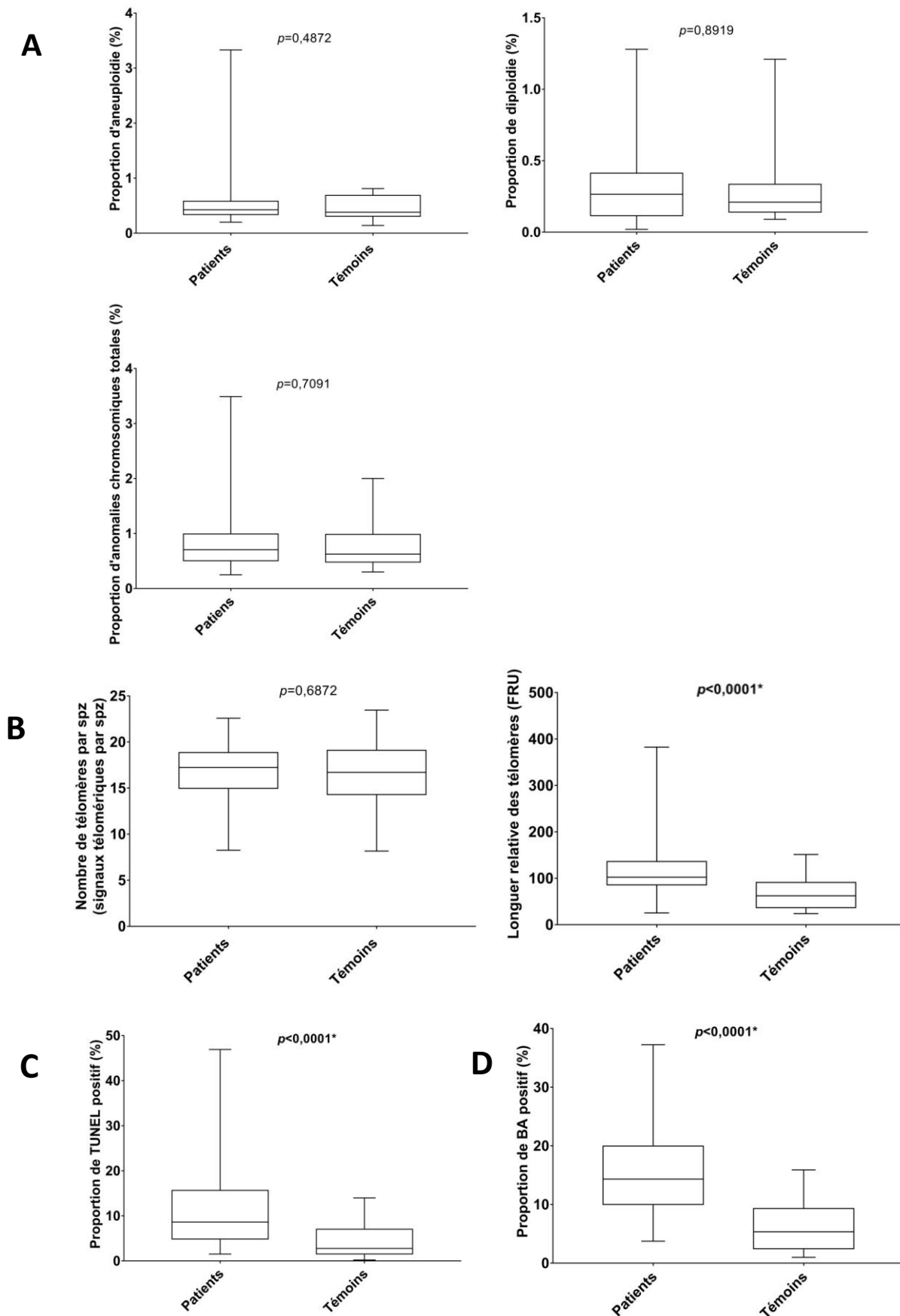
Au total, 50 patients atteints d'un cancer ont été inclus dans cette étude parmi lesquels 46% présentaient une fertilité antérieure au diagnostic. Les caractéristiques générales de la population masculine sont représentées dans la figure 13 et le tableau 2. La figure 13 montre la répartition des anomalies spermatiques de la population masculine étudiée. Vingt-quatre patients (48%) inclus dans cette étude présentaient des paramètres spermatiques normaux (OMS, 2010). Neuf patients (35%) parmi les vingt-six patients qui présentaient un spermogramme altéré étaient fertiles. Dix hommes (20%) présentaient une térazozoospermie isolée (Té), un homme (2%) une oligozoospermie isolée (O), deux hommes (4%) une asthénozoospermie isolée (As), un homme (2%) une oligo-térazozoospermie (OT), sept hommes (14%) une asthéno-térazozoospermie (AT), trois hommes (6%) une oligo-asthénozoospermie (OA) et deux hommes (4%) une oligo-asthéno-térazozoospermie (OAT).

Les témoins étaient tous fertiles, présentaient des paramètres spermatiques normaux et avaient un caryotype sanguin normal.

### III.2 Analyses comparatives entre la population étudiée d'hommes atteints d'un cancer (Patients) et le groupe contrôle (Témoins)

#### III.2.1 Comparaison des paramètres spermatiques conventionnels

Le tableau 2 résume les données comparatives entre les patients et les témoins. Les patients atteints d'un cancer sont plus jeunes ( $30,1 \pm 7,7$  vs  $34,8 \pm 6,1$ ,  $p=0,0055$ ) et ont une numération spermatique plus faible ( $150,1 \pm 141,2$  vs  $188,7 \pm 113,8$ ,  $p=0,0287$ ) que les témoins. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes, concernant le délai d'abstinence, le volume de l'éjaculat, la concentration spermatique, la morphologie, la mobilité progressive (a+b) évaluée avant congélation et après décongélation et la vitalité spermatique.



**Figure 14 : Altérations du noyau spermatique observées chez les patients et les témoins**  
**(A)** Fréquence des anomalies chromosomiques des spermatozoïdes. **(B)** Nombre et longueur relative des télomères. **(C)** Fragmentation de l'ADN spermatique. **(D)** Anomalies de condensation de la chromatine spermatique.  $p<0,05$  est significatif

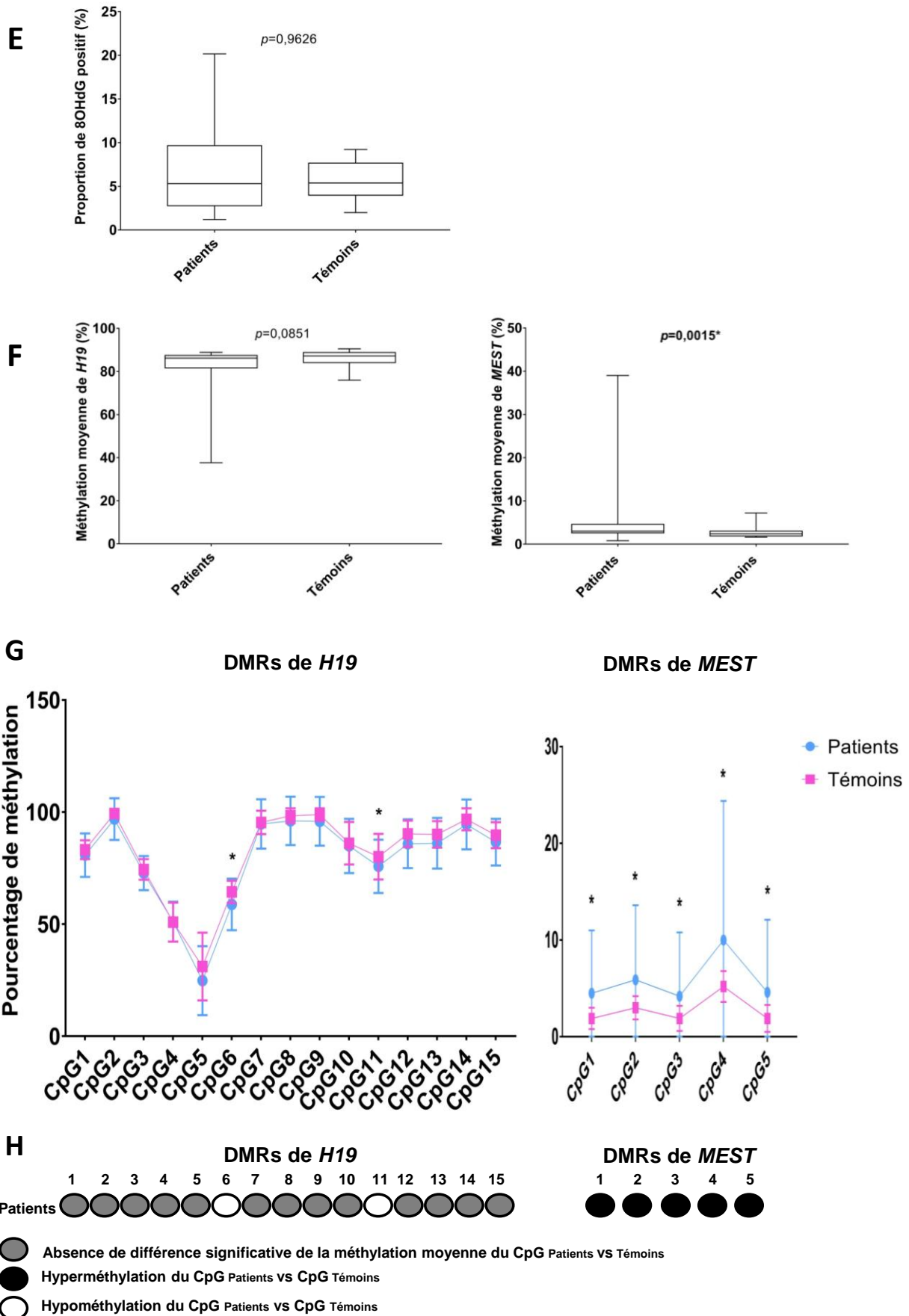
Aneuploïdie : 24,XY ; 24,XX ; 24,YY ; 24,X+18 ; 24,Y+18 ; Anomalies chromosomiques totales : Aneuploïdie + Diploïdie ; BA : bleu d'aniline ; Diploïdie : 46,XX ; 46,YY ; 46,XY ; FRU : Unité de fluorescence relative ; spz : spermatozoïde ; TUNEL : *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labelling*

### III.2.2 Comparaison des altérations nucléaires spermatiques

La figure 14 présente les données comparatives de l'exploration du noyau spermatique entre les deux groupes. Les patients présentent une longueur relative des télomères ( $115,7 \pm 61,6$  vs  $68,1 \pm 35,6$ ,  $p < 0,0001$  ; Figure 14 B), une fragmentation de l'ADN spermatique ( $11,7 \pm 9,5$  vs  $4,4 \pm 4$ ,  $p < 0,0001$  ; Figure 14 C), des anomalies de condensation de la chromatine ( $15,4 \pm 6,7$  vs  $6,2 \pm 4,2$ ,  $p < 0,0001$  ; Figure 14 D) et une méthylation moyenne du GSE maternelle *MEST* ( $5,8 \pm 8,2$  vs  $2,8 \pm 1,3$ ,  $p = 0,0015$  ; Figure 14 F) significativement plus élevés que les témoins. Néanmoins, aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes concernant les anomalies chromosomiques ( $p = 0,7091$  ; Figure 14 A), le nombre moyen de télomères par spermatozoïde ( $p = 0,6872$  ; Figure 14 B), les dommages oxydatifs de l'ADN spermatique ( $p = 0,9626$  ; Figure 14 E) et la méthylation moyenne du GSE paternelle *H19* ( $p = 0,0851$  ; Figure 14 F). Pourtant, en analysant la méthylation moyenne de chaque CpG du GSE *H19* entre ces deux groupes, nous remarquons que deux d'entre eux sont significativement différents (Figures 14 G et 14 H). En effet, les patients ont une hypométhylation significative du CpG 6 ( $58,8 \pm 11,5$  vs  $64,4 \pm 5$ ,  $p = 0,0403$ ) et du CpG 11 ( $75,8 \pm 11,9$  vs  $80,1 \pm 10,2$ ,  $p = 0,0374$ ) par rapport à la population contrôle. Quant au GSE maternelle *MEST*, les patients présentent une hyperméthylation sur tous les CpG étudiés par rapport aux témoins (Figures 14 G et 14 H) : CpG 1 ( $4,5 \pm 6,5$  vs  $1,9 \pm 1,1$ ,  $p = 0,0026$ ), CpG 2 ( $5,9 \pm 7,7$  vs  $3 \pm 1,2$ ,  $p = 0,008$ ), CpG 3 ( $4,2 \pm 6,6$  vs  $1,9 \pm 1,3$ ,  $p = 0,0298$ ), CpG 4 ( $10 \pm 14,4$  vs  $5,2 \pm 1,6$ ,  $p = 0,0061$ ), CpG 5 ( $4,6 \pm 7,5$  vs  $1,9 \pm 1,4$ ,  $p = 0,0039$ ). De plus, nous n'observons aucune corrélation significative entre la longueur relative des télomères et l'âge ( $r_p = 0,0004$ ,  $p = 0,92$  ;  $r_T = 0,105$ ,  $p = 0,22$ ) ni entre la longueur relative des télomères et l'année de naissance ( $r_p = 0,005$ ,  $p = 0,73$  ;  $r_T = 0,07$ ,  $p = 0,30$ ) des patients et des témoins (Figures 15 A et 15 B).

### III.2.3 Analyse des patients présentant des altérations nucléaires spermatiques

En prenant pour repère le 3<sup>ème</sup> quartile (25% des valeurs les plus élevées), nous avons sélectionné 34 patients (soit 68% de la population étudiée) dont l'exploration du noyau spermatique présentait au moins une altération sévère parmi les quatre altérations retrouvées statistiquement significative entre les patients et les



**Figure 14 : Altérations du noyau spermatique observées chez les patients et les témoins**  
 (E) Fréquence des dommages oxydatifs à l'ADN par la détection du 8 OHdG. (F) Méthylation moyenne globale des DMRs des GSE *H19* et *MEST*. (G) Méthylation moyenne de chaque CpG étudié des GSE *H19* et *MEST*. (H) Représentation de la comparaison des taux de méthylation de chaque CpG étudié des GSE *H19* et *MEST*.  $p < 0,05$  est significatif

8 OHdG : 8 hydroxy-désoxyguanosine ; CpG : dinucléotide cytosine-guanine ; DMR: régions différenciellement méthylées

témoins : la longueur relative des télomères supérieure à 136,1 FRU, le taux de fragmentation de l'ADN spermatique supérieur à 15,7%, le taux d'anomalies de condensation de la chromatine supérieur à 20% et la méthylation globale du GSE *MEST* supérieure à 4,6% (Figure 16).

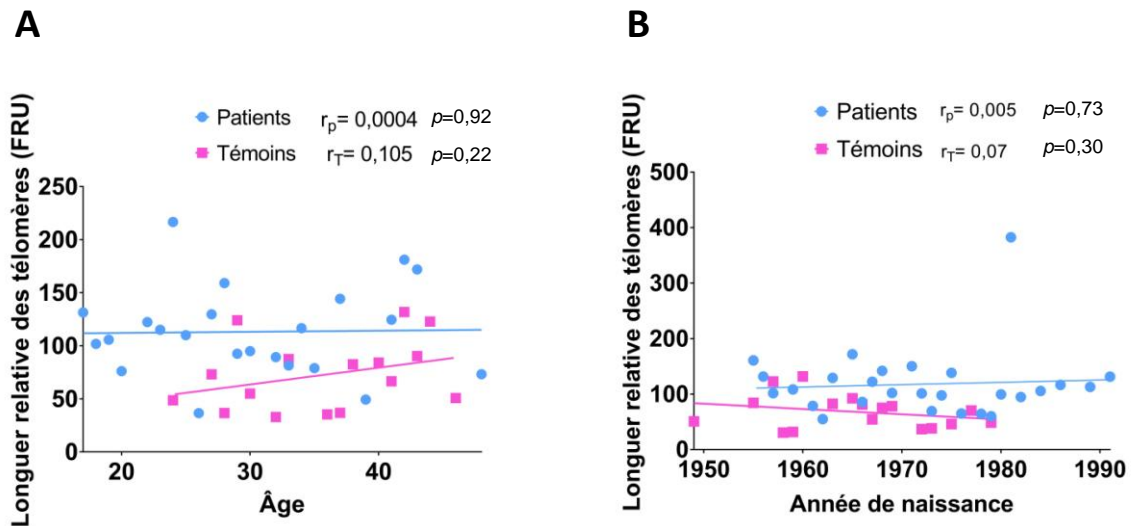
Six patients présentaient une longueur relative des télomères située dans le 3<sup>ème</sup> quartile. Parmi ces 6 patients, nous retrouvons 1 patient (16,7%) atteint d'une LA, 3 (50%) atteints d'un LH dont 1 présentait une Té, 1 patient (16,7%) atteint d'un CT et 1 (16,7%) d'un CS (ostéosarcome). Ainsi, 5 patients (83%) avaient un spermogramme normal.

Quatre patients présentaient un ADN spermatique fragmenté situé dans le 3<sup>ème</sup> quartile. Parmi ces 4 patients, nous retrouvons 1 patient (25%) atteint d'une LA avec une OA, 1 patient (25%) atteint d'un LNH avec une OA, 1 patient (25%) fertile atteint d'un LH avec une As et 1 patient (25%) atteint d'un CS (sarcome d'Ewing) avec une OAT. Aucun patient ne présentait donc un spermogramme normal.

Quatre patients présentaient des anomalies de condensation de la chromatine situées dans le 3<sup>ème</sup> quartile. Parmi ces 4 patients, nous retrouvons 1 patient (25%) fertile atteint d'une LA avec une AT, 2 patients (50%) atteints d'un LNH dont 1 fertile qui présentait une Té et 1 patient (25%) atteint d'un LH avec une Té. Ainsi, 1 patient (25%) avait un spermogramme normal.

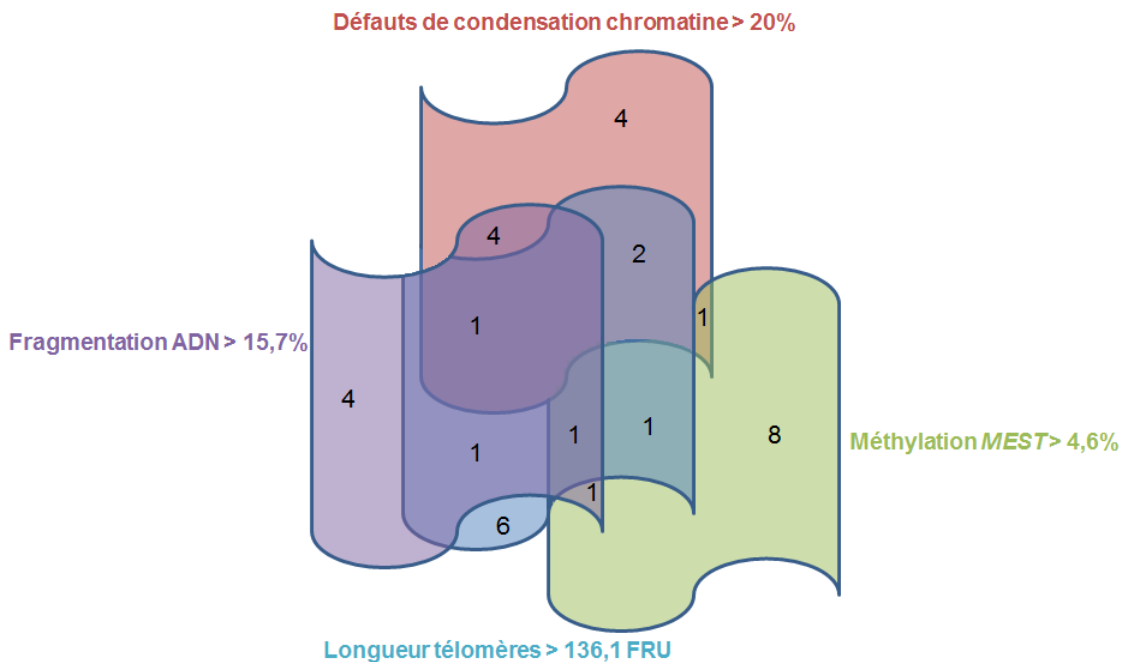
Huit patients présentaient une méthylation du GSE *MEST* située dans le 3<sup>ème</sup> quartile. Parmi ces 8 patients, nous retrouvons 1 patient (12,5%) atteint d'une LA, 2 (25%) atteints d'un LNH dont 1 présentait une AT, 2 (25%) atteints d'un LH dont 1 présentait une OAT, 2 (25%) atteints d'un CT et 1 (12,5%) d'un CS (oligodendrogliome). Six patients (75%) possédaient donc un spermogramme normal dont 4 patients avec une fertilité antérieure.

Parmi les 12 patients qui présentaient des anomalies nucléaires associées, nous retrouvons 1 patient (8,3%) fertile atteint d'un CS (oligodendrogliome) associant une méthylation du GSE *MEST* > 4,6% et une longueur relative des télomères > 136,1 FRU ; 1 patient (8,3%) atteint d'un CS (angiosarcome) associant une méthylation du GSE *MEST* > 4,6% et une fragmentation de l'ADN > 15,7% ; 1 patient (8,3%) fertile atteint d'une LA présentant une OT et associant une méthylation du GSE *MEST* > 4,6% et des anomalies de condensation de la chromatine > 20% ; 1 patient (8,3%) atteint d'une LA présentant une AT et associant une fragmentation de l'ADN > 15,7% et une longueur relative des télomères > 136,1 FRU ; 2 patients



**Figure 15 : Corrélation entre la longueur relative des télomères des patients et des témoins en fonction de leur âge (A) et de leur année de naissance (B)**  
 $p < 0,05$  est significatif

FRU : Unité de fluorescence relative ;  $r_p$  : coefficient de corrélation patients ;  $r_T$  : coefficient de corrélation témoins



**Figure 16 : Représentation graphique de la distribution des patients présentant des altérations nucléaires spermatiques**

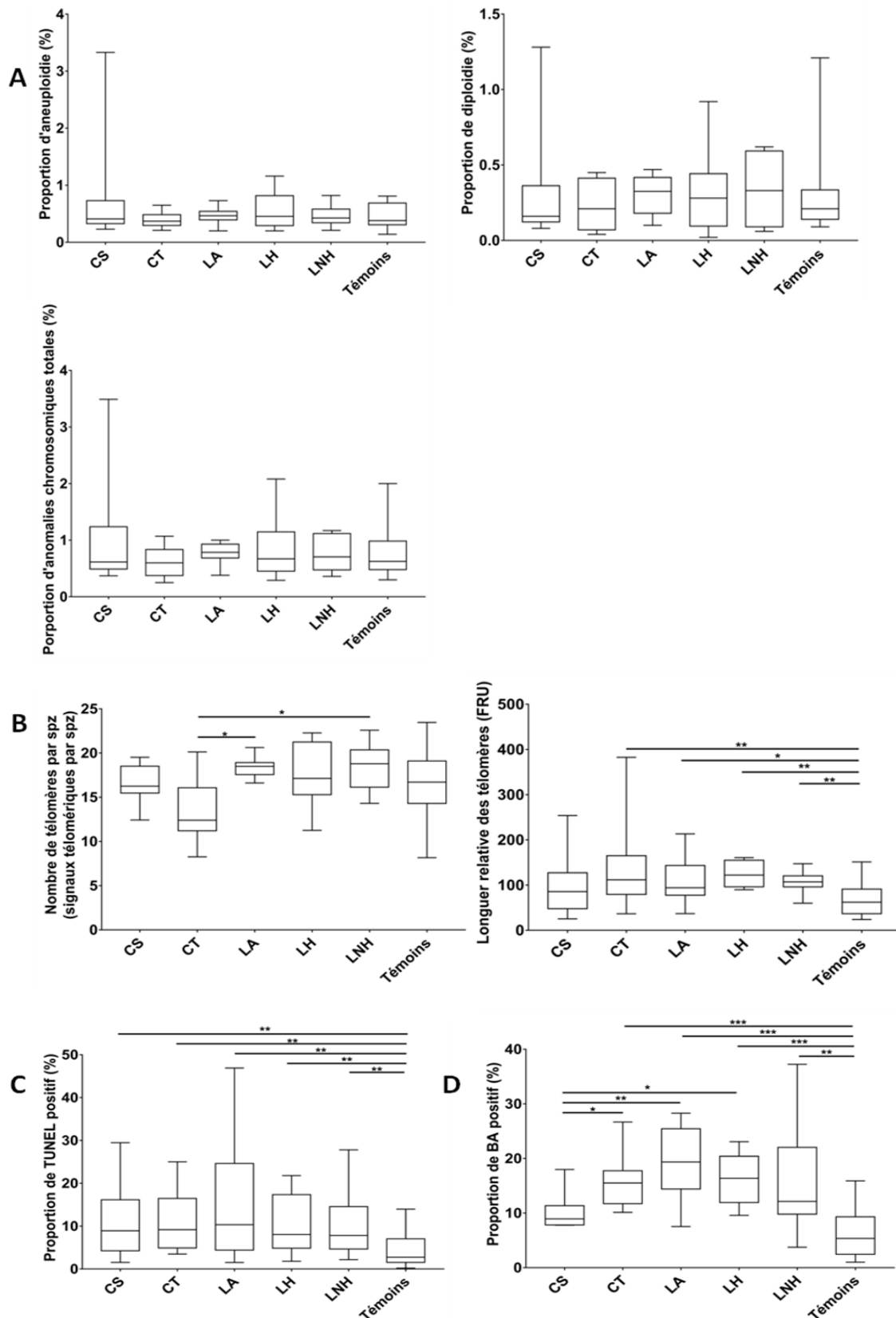


(16,7%) dont 1 atteint d'une LA avec une Té et 1 fertile atteint d'un LNH avec une AT associant une longueur relative des télomères  $> 136,1$  FRU et des anomalies de condensation de la chromatine  $> 20\%$  ; 4 patients (33,3%) dont 2 atteints d'une LA avec 1 patient avec une AT, 1 fertile atteint d'un LH avec une AT et 1 atteint d'un CT avec une O associant une fragmentation de l'ADN  $> 15,7\%$  et des anomalies de condensation de la chromatine  $> 20\%$  ; 1 patient (8,3%) atteint d'un CT avec OA associant une méthylation du GSE *MEST*  $> 4,6\%$  + une longueur relative des télomères  $> 136,1$  FRU + une fragmentation de l'ADN  $> 15,7\%$  ; et 1 patient (8,3%) fertile atteint d'un LH avec une Té associant une longueur relative des télomères  $> 136,1$  FRU + une fragmentation de l'ADN  $> 15,7\%$  + des anomalies de condensation de la chromatine  $> 20\%$ . Ainsi, 3 patients (25%) dont 2 fertiles, avaient un spermogramme normal.

### **III.3 Analyse comparative des altérations du noyau spermatique entre la population étudiée en fonction du type de cancer et par comparaison aux témoins**

La figure 17 résume les données comparatives des tests explorant le noyau spermatique chez les patients en fonction du type de cancer et par comparaison aux témoins.

D'une part, les patients atteints d'un CT ont une longueur relative des télomères plus élevée (140,5 vs 68,1,  $p=0,0078$  ; Figure 17 B), l'ADN spermatique plus fragmenté (11,4 vs 4,4,  $p=0,0026$  ; Figure 17 C), des anomalies de condensation de la chromatine plus élevées (15,8 vs 6,2,  $p<0,0001$  ; Figure 17 D), et une hyperméthylation globale du GSE *MEST* (5 vs 2,8,  $p=0,0214$  ; Figure 17 F) avec une hyperméthylation des CpG 1 (4 vs 1,9,  $p=0,0178$ ), 2 (5,2 vs 3,  $p=0,0304$ ) et 5 (4,1 vs 1,9,  $p=0,0272$ ) (Figures 17 G et 17 H) par rapport aux témoins. Quant au GSE *H19*, malgré l'absence de différence portant sur la méthylation globale (Figure 17 F), les patients atteints d'un CT présentent une hypométhylation du CpG 11 (72,4 vs 80,1,  $p=0,0212$  ; Figures 17 G et 17 H) par rapport aux témoins. Aucune différence significative n'a été observée concernant les anomalies chromosomiques spermatiques (Figure 17 A), le nombre de télomères par spermatozoïde (Figure 17 B), les dommages oxydatifs de l'ADN spermatique (Figure 17 E) et la méthylation globale du GSE *H19* (Figure 17 F) entre ce groupe de patients et les témoins. D'autre part, les patients atteints d'un CT ont des anomalies de condensation de la



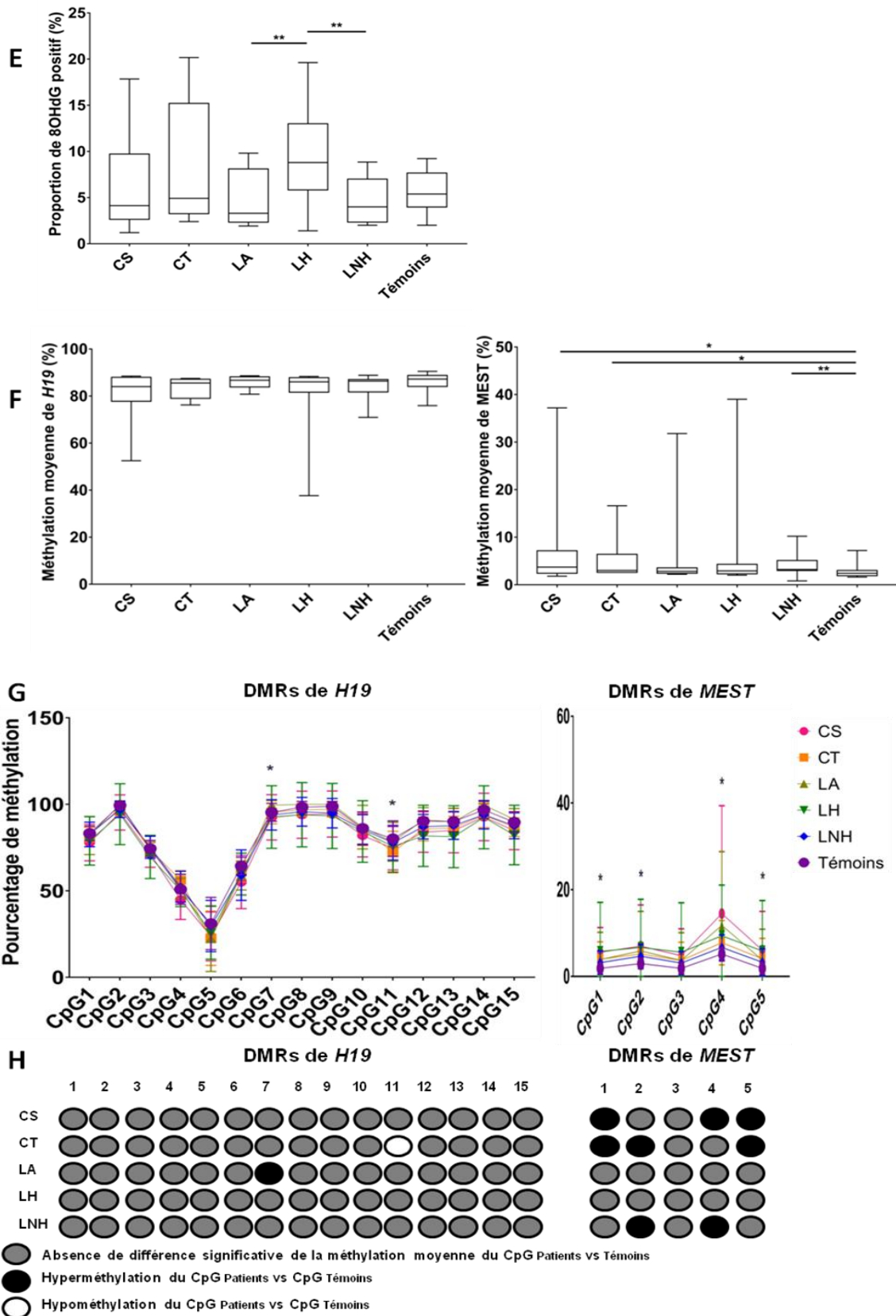
**Figure 17 : Comparaison des altérations du noyau spermatique des patients en fonction du type de cancer et par rapport aux témoins**

**(A)** Fréquence des anomalies chromosomiques des spermatozoïdes. **(B)** Nombre et longueur relative des télomères. **(C)** Fragmentation de l'ADN spermatique. **(D)** Anomalies de condensation de la chromatine spermatique. (\*):  $p < 0,05$ . (\*\*):  $p < 0,02$ . (\*\*\*) :  $p < 0,0001$

Aneuploïdie : 24,XY ; 24,XX ; 24YY ; 24,X+18 ; 24,Y+18 ; Anomalies chromosomiques totales : Aneuploïdie + Diploïdie ; BA : bleu d'aniline ; CS : cancer solide ; CT : cancer du testicule ; Diploïdie : 46,XX ; 46,YY ; 46,XY ; FRU : Unité de fluorescence relative ; LA : leucémie aigüe ; LH : lymphome Hodgkinien ; LNH : lymphome non Hodgkinien ; spz : spermatozoïde ; TUNEL : *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labelling*

chromatine plus élevées que les patients atteints d'un CS (15,8 vs 10,3,  $p=0,0372$  ; Figure 17 D) et présentent une hypométhylation des CpG 8 (96,9 vs 100,  $p=0,0182$ ), 9 (97 vs 100,  $p=0,0167$ ), 14 (93,7 vs 99,6,  $p=0,0238$ ) et 15 (86,8 vs 91,3,  $p=0,0311$ ) par rapport aux patients atteints d'une LA (Tableau 3). Aucune différence significative n'a été observée concernant les anomalies chromosomiques spermatiques (Figure 17 A), la longueur relative des télomères (Figure 17 B), la fragmentation de l'ADN spermatique (Figure 17 C), les dommages oxydatifs de l'ADN spermatique (Figure 17 E), la méthylation globale des GSE *H19* et *MEST* (Figure 17 F) et la méthylation de chaque CpG du GSE *MEST* (Tableau 4) entre ce groupe de patients et les autres groupes de cancers.

D'une part, les patients atteints d'une LA ont une longueur relative des télomères plus élevée (108,3 vs 68,1,  $p=0,0218$  ; Figure 17 B), une fragmentation de l'ADN spermatique plus élevée (15,7 vs 4,4,  $p=0,0018$  ; Figure 17 C) et des anomalies de condensation de l'ADN spermatique plus élevées (19 vs 6,2,  $p<0,0001$  ; Figure 17 D) que les témoins. De plus, malgré l'absence de différence portant sur la méthylation globale du GSE *H19* (Figure 17 F), les patients atteints d'une LA présentent une hyperméthylation du CpG 7 par rapport aux témoins (99,5 vs 95,4,  $p=0,0035$  ; Figures 17 G et 17 H). Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les patients atteints d'une LA et les témoins concernant les anomalies chromosomiques (Figure 17 A), le nombre de télomères par spermatozoïde (Figure 17 B), les dommages oxydatifs de l'ADN spermatique (Figure 17 E), la méthylation globale des GSE *H19* et *MEST* (Figure 17 F) et la méthylation de chaque CpG du GSE *MEST* (Figures 17 G et 17 H). D'autre part, les patients atteints d'une LA ont plus de signaux télomériques par spermatozoïde que les patients atteints d'un CT (18,4 vs 13,5,  $p=0,0265$  ; Figure 17 B) et plus d'anomalies de condensation de l'ADN spermatique que les patients atteints d'un CS (19 vs 10,3,  $p=0,0109$  ; Figure 17 D). De plus, malgré l'absence de différence portant sur la méthylation globale du GSE *H19* (Figure 17 F), les patients atteints d'une LA présentent une hyperméthylation des CpG 2, 7, 8, 9, 14 et 15 par rapport aux autres groupes de cancers (Tableau 3). Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les patients atteints d'une LA et les autres groupes de cancers étudiés concernant les anomalies chromosomiques (Figure 17 A), la longueur relative des télomères (Figure 17 B), la fragmentation de l'ADN spermatique (Figure 17 C) et la méthylation globale des GSE *H19* et *MEST* (Figure 17 F).



**Figure 17 : Comparaison des altérations du noyau spermatique des patients en fonction du type de cancer et par rapport aux témoins**

(E) Fréquence des dommages oxydatifs à l'ADN par la détection du 8 OHdG. (F) Méthylation moyenne globale des DMRs des GSE *H19* et *MEST*. (G) Méthylation moyenne de chaque CpG étudié des GSE *H19* et *MEST*. (H) Représentation de la comparaison des taux de méthylation de chaque CpG étudié des GSE *H19* et *MEST* par rapport aux témoins. (\*):  $p < 0,05$ . (\*\*):  $p < 0,02$ . (\*\*\*):  $p < 0,0001$

8 OHdG : 8 hydroxy-désoxyguanosine ; CpG : dinucléotide cytosine-guanine ; CS : cancer solide ; CT : cancer du testicule ; DMR: régions différemment méthylées ; LA : leucémie aigüe ; LH : lymphome Hodgkinien ; LNH : lymphome non Hodgkinien

D'une part, les patients atteints d'un LH présentent une longueur relative des télomères plus élevée (125,2 vs 68,1,  $p=0,0002$  ; Figure 17 B), une fragmentation de l'ADN spermatique plus élevée (10,1 vs 4,4,  $p=0,0078$  ; Figure 17 C) et plus d'anomalies de condensation de la chromatine spermatique (16,2 vs 6,2,  $p<0,0001$  ; Figure 17 D) par rapport aux témoins. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les patients atteints d'un LH et les témoins concernant les anomalies chromosomiques (Figure 17 A), le nombre de télomères par spermatozoïde (Figure 17 B), les dommages oxydatifs de l'ADN spermatique (Figure 17 E), la méthylation globale (Figure 17 F) et la méthylation de chaque CpG (Figures 17 G et 17 H) des GSE *H19* et *MEST*. D'autre part, les patients atteints d'un LH ont plus d'anomalies de condensation de la chromatine spermatique que les patients atteints d'un CS (16,2 vs 10,3,  $p=0,0246$  ; Figure 17 D), plus de dommages oxydatifs de l'ADN spermatique que les patients atteints d'une LA (9,6 vs 4,8,  $p=0,0168$  ; Figure 17 E) et d'un LNH (9,6 vs 4,7,  $p=0,0184$  ; Figure 17 E). De plus, malgré l'absence de différence significative portant sur la méthylation globale du GSE *H19* (Figure 17 F), les patients atteints d'un LH présentent une hypométhylation du CpG 7 par rapport aux patients atteints d'une LA (92,7 vs 99,5,  $p=0,0327$  ; Tableau 3). Nous n'observons aucune différence statistiquement significative entre ce groupe de patients atteints d'un LH et les autres groupes de cancers étudiés concernant les anomalies chromosomiques (Figure 17 A), le nombre et la longueur relative des télomères (Figure 17 B), la fragmentation de l'ADN spermatique (Figure 17 C), la méthylation globale des GSE *H19* et *MEST* (Figure 17 F), et la méthylation de chaque CpG du GSE *MEST* (Tableau 4).

D'une part, les patients atteints d'un LNH présentent une longueur relative des télomères plus élevée (106,9 vs 68,1,  $p=0,0061$  ; Figure 17 B), un ADN spermatique plus fragmenté (10,3 vs 4,4,  $p=0,0086$  ; Figure 17 C), des anomalies de condensation de la chromatine spermatique plus élevées (15,6 vs 6,2,  $p=0,0006$  ; Figure 17 D), une hyperméthylation globale du GSE *MEST* (4,2 vs 2,8,  $p=0,0087$  ; Figure 17 F), et des CpG 2 (4,7 vs 3,  $p=0,0091$ ) et 4 (6,7 vs 5,2,  $p=0,0492$ ) par rapport aux témoins (Figures 17 G et 17 H). Nous n'observons aucune différence statistiquement significative entre les patients atteints d'un LNH et les témoins concernant les anomalies chromosomiques (Figure 17 A), le nombre de télomères par spermatozoïde (Figure 17 B), les dommages oxydatifs de l'ADN spermatique (Figure 17 E), la méthylation globale (Figure 17 F) et la méthylation de chaque CpG (Figures 17 G et 17 H) du GSE *H19*. D'autre part, les patients atteints d'un LNH

**Tableau 3 : Comparaison des taux de méthylation de chaque CpG étudié du GSE *H19* en fonction du type de cancer chez les patients**

CpG <i>H19</i>	CS (m ± DS) n=10	CT (m ± DS) n=10	LA (m ± DS) n=10	LH (m ± DS) n=10	LNH (m ± DS) n=10	<i>P</i>
CpG 1	77,9 ± 10,5	82,5 ± 4,2	82 ± 11	78,9 ± 14	82,6 ± 7,1	ns
CpG 2	<b>95,3 ± 10,2</b>	97,6 ± 4,1	<b>100 ± 0</b>	94,3 ± 17,7	97,2 ± 4,8	<b>LA vs CS : 0,0268</b>
CpG 3	71,4 ± 7,9	73,8 ± 4,2	74,1 ± 4,1	69,6 ± 12,6	75,2 ± 6,4	ns
CpG 4	<b>44,9 ± 11,4</b>	<b>56,2 ± 5,5</b>	51,5 ± 5,7	50,3 ± 9,4	52,4 ± 9	<b>CT vs CS : 0,0149</b>
CpG 5	23,7 ± 14,1	22,6 ± 15,7	22,4 ± 19,1	25,8 ± 15,3	29,7 ± 14,8	ns
CpG 6	55,1 ± 15,4	61 ± 5,9	58,9 ± 8,5	59,7 ± 12,2	59,1 ± 14,6	ns
CpG 7	<b>92,5 ± 13,2</b>	95,4 ± 6,6	<b>99,5 ± 1,3</b>	<b>92,7 ± 18,2</b>	<b>93,9 ± 8,9</b>	<b>LA vs LNH : 0,0344</b> <b>LA vs LH : 0,0327</b> <b>LA vs CS : 0,0171</b>
CpG 8	94 ± 13,6	<b>96,9 ± 3,9</b>	<b>100 ± 0</b>	94 ± 18,6	<b>95,7 ± 8,3</b>	<b>LA vs LNH : 0,0204</b> <b>LA vs CT : 0,0182</b>
CpG 9	94,4 ± 13,3	<b>97 ± 4,4</b>	<b>100 ± 0</b>	93,3 ± 18,8	<b>94,9 ± 8,6</b>	<b>LA vs LNH : 0,0336</b> <b>LA vs CT : 0,0167</b>
CpG 10	82 ± 12,4	85,7 ± 9,6	86,8 ± 12,6	84,3 ± 17,8	85,5 ± 8,5	ns
CpG 11	74,6 ± 12,6	72,4 ± 12	78,3 ± 11,3	75,7 ± 14,8	77,8 ± 10	ns
CpG 12	84 ± 11,7	85,8 ± 7	91 ± 7,1	81,8 ± 17,7	87,1 ± 7,1	ns
CpG 13	84,9 ± 13	86,4 ± 6,7	90 ± 7,6	81,3 ± 18	87,7 ± 7,9	ns
CpG 14	92,7 ± 13,7	<b>93,7 ± 7,2</b>	<b>99,6 ± 0,7</b>	92,5 ± 18,3	<b>94 ± 8,2</b>	<b>LA vs LNH : 0,0261</b> <b>LA vs CT : 0,0238</b>
CpG 15	84,8 ± 11	<b>86,8 ± 5,4</b>	<b>91,3 ± 6,2</b>	82,3 ± 17,2	87,6 ± 7,5	<b>LA vs CT : 0,0311</b>

$p < 0,05$  est significatif

DS : déviation standard ; m : moyenne ; n : effectif de la population ; CS : cancer solide ; CT : cancer du testicule ; LA : leucémie aigüe ; LH : lymphome Hodgkinien ; LNH : lymphome non Hodgkinien

**Tableau 4 : Comparaison des taux de méthylation de chaque CpG étudié du GSE *MEST* en fonction du type de cancer chez les patients**

CpG <i>MEST</i>	CS (m ± DS) n=10	CT (m ± DS) n=10	LA (m ± DS) n=10	LH (m ± DS) n=10	LNH (m ± DS) n=10	<i>P</i>
CpG 1	5,6 ± 5,7	4 ± 4,1	3,9 ± 6,4	5,8 ± 11,3	3,2 ± 2,7	ns
CpG 2	7 ± 9,6	5,2 ± 4,1	5,9 ± 9,2	6,7 ± 11,1	4,7 ± 2,7	ns
CpG 3	4,8 ± 6,2	3,7 ± 4,2	3,7 ± 6,4	5,6 ± 11,4	3,1 ± 2,7	ns
CpG 4	14,5 ± 24,9	7,8 ± 5,2	11,8 ± 17	9,4 ± 11,8	6,7 ± 3	ns
CpG 5	<b>6,1 ± 8,9</b>	4,1 ± 4,8	<b>3,8 ± 7,1</b>	5,9 ± 11,7	3,3 ± 3,1	<b>LA vs CS : 0,0388</b>

$p < 0,05$  est significatif

DS : déviation standard ; m : moyenne ; n : effectif de la population ; CS : cancer solide ; CT : cancer du testicule ; LA : leucémie aigüe ; LH : lymphome Hodgkinien ; LNH : lymphome non Hodgkinien

présentent plus de signaux télomériques par spermatozoïde que les patients atteints d'un CT (18,4 vs 13,5,  $p=0,0360$  ; Figure 17 B) et une hypométhylation des CpG 7 (93,9 vs 99,5,  $p=0,0344$ ), 8 (95,7 vs 100,  $p=0,0204$ ), 9 (94,9 vs 100,  $p=0,0336$ ) et 14 (94 vs 99,6,  $p=0,0261$ ) du GSE *H19* par rapport aux patients atteints d'une LA (Tableau 3). Nous n'observons aucune différence statistiquement significative entre ce groupe de patients atteints d'un LNH et les autres groupes de cancers étudiés concernant les anomalies chromosomiques (Figure 17 A), la longueur relative des télomères (Figure 17 B), la fragmentation de l'ADN spermatique (Figure 17 C), les anomalies de condensation de la chromatine spermatique (Figure 17 D), la méthylation globale des GSE *H19* et *MEST* (Figure 17 F), et la méthylation de chaque CpG du GSE *MEST* (Tableau 4).

D'une part, les patients atteints d'un CS non urologique (un angiosarcome, trois oligodendrogliomes, un adénocarcinome rectal, deux sarcomes d'Ewing, une tumeur vésicale, un ostéosarcome, un séminome cérébral), présentent une fragmentation de l'ADN spermatique plus importante (11,1 vs 4,4,  $p=0,0045$  ; Figure 17 C) et une hyperméthylation globale du GSE *MEST* (7,6 vs 2,8,  $p=0,0231$  ; Figure 17 F) avec une hyperméthylation des CpG 1 (5,6 vs 1,9,  $p=0,0107$ ), 4 (14,5 vs 5,2,  $p=0,0320$ ) et 5 (6,1 vs 1,9,  $p=0,0049$ ) par rapport aux témoins (Figures 17 G et 17 H). Aucune différence significative entre ce groupe de patients atteints d'un CS et les témoins n'a été observée pour les anomalies chromosomiques (Figure 17 A), le nombre et la longueur des télomères (Figure 17 B), les anomalies de condensation de la chromatine spermatique (Figure 17 D), les dommages oxydatifs à l'ADN spermatique (Figure 17 E), la méthylation globale (Figure 17 F) et la méthylation de chaque CpG (Figures 17 G et 17 H) du GSE *H19*. D'autre part, les patients atteints d'un CS non urologique ont une hypométhylation des CpG 2 (95,3 vs 100,  $p=0,0268$ ) et 7 (92,5 vs 99,5,  $p=0,0171$ ) du GSE *H19* par rapport aux patients atteints d'une LA (Tableau 3), une hypométhylation du CpG 4 (44,9 vs 56,2,  $p=0,0149$ ) du GSE *H19* par rapport aux patients atteints d'un CT (Tableau 3) et une hyperméthylation du CpG 5 (6,1 vs 3,8,  $p=0,0388$ ) du GSE *MEST* par rapport aux patients atteints d'une LA (Tableau 4). Aucune différence significative entre ce groupe de patients atteints d'un CS et les autres groupes de cancers étudiés n'a été observée pour les anomalies chromosomiques (Figure 17 A), le nombre et la longueur des télomères (Figure 17 B), la fragmentation de l'ADN spermatique (Figure 17 C), les dommages oxydatifs à l'ADN spermatique (Figure 17 E), et la méthylation globale des GSE *H19* et *MEST* (Figure 17 F).

**Tableau 5 : Comparaison de l'âge et des paramètres spermatiques conventionnels des patients en fonction du spermogramme et des témoins**

Variables	Patients avec spermogramme altéré (SA)	Patients avec spermogramme normal (SN)	Témoins (T)	p
	(m ± DS) n=26	(m ± DS) n=24	(m ± DS) n=30	
Age (années)	<b>30,3 ± 8,2</b>	<b>29,9 ± 7,4</b>	<b>34,8 ± 6,1</b>	<b>SA vs T : 0,0207</b> <b>SN vs T : 0,0170</b>
Délai d'abstinence (jours)	6,9 ± 17,4	3,5 ± 2,3	3,3 ± 0,9	ns
Volume (mL)	3,4 ± 1,3	2,9 ± 1,2	3,5 ± 1,6	ns
Concentration (Millions/mL)	<b>33,1 ± 33,4</b>	<b>66 ± 32,3</b>	<b>57,3 ± 27</b>	<b>SA vs SN : &lt;0,0001</b> <b>SA vs T : 0,0002</b>
Numération (Millions/éjaculat)	<b>98,8 ± 82,4</b>	<b>205,6 ± 170</b>	<b>188,7 ± 113,8</b>	<b>SA vs SN : 0,0011</b> <b>SA vs T : 0,0004</b>
Mobilité progressive (a+b %) avant congélation	<b>28,6 ± 11,7</b>	<b>41 ± 5,5</b>	<b>38,3 ± 6,2</b>	<b>SA vs SN : &lt;0,0001</b> <b>SA vs T : 0,0013</b>
Morphologie (% de formes typiques)	<b>18 ± 9,5</b>	<b>51,4 ± 17,3</b>	<b>38,7 ± 14,2</b>	<b>SA vs SN : &lt;0,0001</b> <b>SA vs T : &lt;0,0001</b> <b>SN vs T : 0,0369</b>
Mobilité progressive (a+b %) post-décongélation	<b>15,4 ± 8,6</b>	<b>23,1 ± 6,7</b>	<b>21 ± 7</b>	<b>SA vs SN : 0,0011</b> <b>SA vs T : 0,0273</b>
Vitalité (%)	<b>38,4 ± 13,4</b>	<b>49,1 ± 13,6</b>	<b>37,6 ± 13,2</b>	<b>SA vs SN : 0,0116</b> <b>SN vs T : 0,0035</b>

p<0,05 est significatif

DS : déviation standard ; m : moyenne ; n : effectif de la population ; SA : spermogramme altéré ; SN : spermogramme normal ; T : témoins



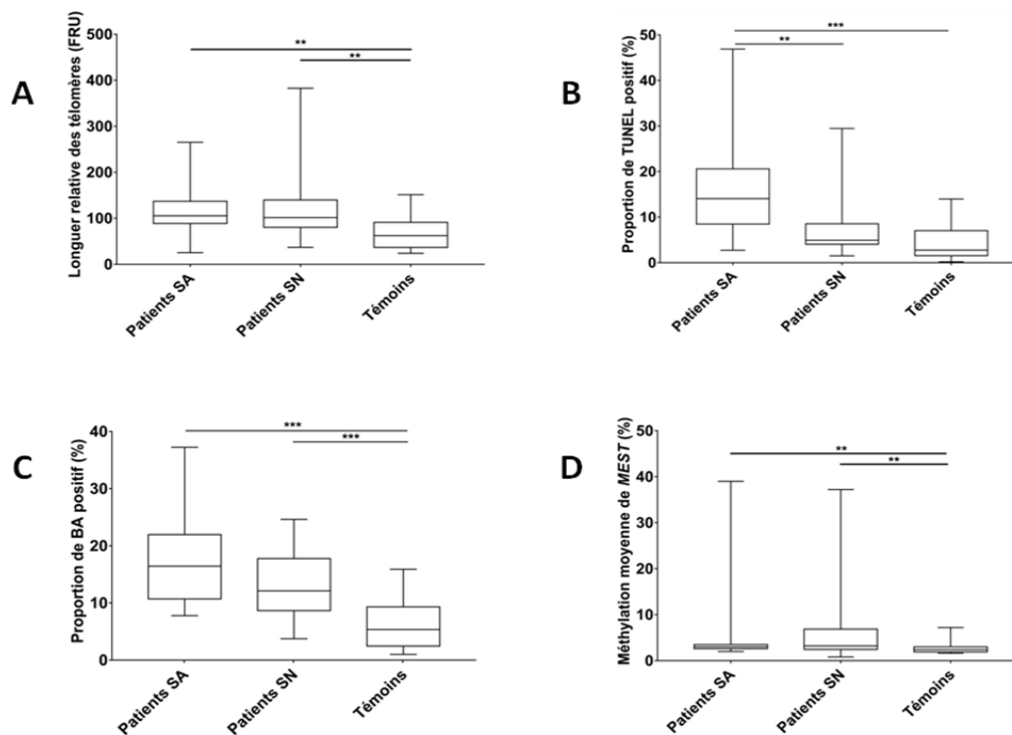
### **III.4 Analyse comparative des altérations du noyau spermatique entre la population étudiée en fonction du spermogramme et le groupe contrôle**

Le tableau 5 résume les données comparatives entre les patients avec un spermogramme altéré (SA), ceux avec un spermogramme normal (SN) et les témoins (T). Nous confirmons ainsi chez les patients SA une diminution de la concentration spermatique ( $33,1 \pm 33,4$  vs  $66 \pm 32,3$ ,  $p < 0,0001$ ), de la numération spermatique ( $98,8 \pm 82,4$  vs  $205,6 \pm 170$ ,  $p = 0,0011$ ), de la mobilité progressive avant congélation ( $28,6 \pm 11,7$  vs  $41 \pm 5,5$ ,  $p < 0,0001$ ) et après décongélation ( $15,4 \pm 8,6$  vs  $23,1 \pm 6,7$ ,  $p = 0,0011$ ) associé à une diminution de la vitalité ( $38,4 \pm 13,4$  vs  $49,1 \pm 13,6$ ,  $p = 0,0116$ ), et la diminution de formes typiques des spermatozoïdes ( $18 \pm 9,5$  vs  $51,4 \pm 17,3$ ,  $p < 0,0001$ ) par rapport aux patients SN. Aucune différence significative n'a été observée concernant l'âge, le délai d'abstinence et le volume spermatique entre ces deux groupes (Tableau 5).

Précédemment, nous avons observé que les patients atteints d'un cancer présentaient une augmentation de la longueur relative des télomères, de la fragmentation de l'ADN spermatique et des anomalies de condensation de la chromatine spermatique, avec une hyperméthylation du GSE *MEST* par rapport aux témoins (Figure 14). Ainsi, la figure 18 résume les données comparatives de ces quatre tests explorant le noyau spermatique chez les patients en fonction du spermogramme et par rapport aux témoins. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les deux groupes de patients concernant la longueur relative des télomères (Figure 18 A), les anomalies de condensation de la chromatine (Figure 18 C) et la méthylation du GSE *MEST* (Figure 18 D). Par contre, les patients SA présentaient un taux de spermatozoïdes à ADN fragmenté plus élevé que les patients SN ( $15,9$  vs  $7,1$ ,  $p = 0,003$  ; Figure 18 B).

### **III.5 Corrélations entre les différents paramètres spermatiques conventionnels et nucléaires chez les patients atteints d'un cancer**

Au sein de notre population étudiée, nous avons recherché l'existence d'une corrélation entre les différents paramètres spermatiques (Figure 19). Globalement, les paramètres spermatiques conventionnels (concentration, numération, volume,



**Figure 18 : Comparaison des altérations du noyau spermatique des patients en fonction du spermogramme et par rapport aux témoins**

(A) Longueur relative des télomères. (B) Fragmentation de l'ADN spermatique. (C) Anomalies de condensation de la chromatine spermatique. (D) Méthylation moyenne globale des DMRs du GSE *MEST*. (\*):  $p < 0,05$ . (\*\*):  $p < 0,02$ . (\*\*\*):  $p < 0,0001$

BA : bleu d'aniline ; DMR: régions différemment méthylées ; FRU : Unité de fluorescence relative ; SA : spermogramme altéré ; SN : spermogramme normal ; TUNEL : *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labelling*



**Figure 19 : Corrélogramme des différents paramètres spermatiques**

Plus la couleur tend vers le rouge, plus le coefficient de corrélation  $r$  tend vers 1 (association positive entre les deux variables). Inversement, plus elle tend vers le bleu, plus le coefficient de corrélation  $r$  tend vers -1 (association négative entre les deux variables). Seules les corrélations statistiquement significatives ( $p < 0,05$ ) sont représentées.

DMR : régions différemment méthylées ;  $r$  : coefficient de corrélation

mobilité progressive, morphologie) évoluent ensemble ou indépendamment. Ces paramètres spermatiques conventionnels ne présentent pas de fortes corrélations avec les altérations du noyau spermatique (fragmentation, anomalies de condensation, aneuploïdie, diploïdie, nombre et longueur relative des télomères, ADN oxydé et méthylation des GSE *H19* et *MEST*). Néanmoins, nous retrouvons de faibles corrélations statistiquement significatives entre eux, telles que l'augmentation des anomalies de condensation de la chromatine spermatique qui est associée à la diminution de la morphologie spermatique ( $r=-0,4$ ,  $p=0,002$ ) ; l'augmentation de la fragmentation de l'ADN spermatique associée à la diminution de la concentration spermatique ( $r=-0,3$ ,  $p=0,013$ ), à la diminution de la mobilité progressive spermatique ( $r=-0,4$ ,  $p=0,005$ ) et à la diminution de la morphologie spermatique ( $r=-0,4$ ,  $p=0,002$ ). Ceci confirme l'intérêt d'explorer le noyau spermatique dans cette population quelque soit le résultat du spermogramme. Concernant les altérations du noyau spermatique, les différents paramètres ont de faibles coefficients de corrélation ce qui note une relative indépendance entre eux. Ceci confirme l'intérêt de réaliser ces différents paramètres en association lors d'une exploration de l'ADN spermatique.

## IV. Discussion et conclusion

---

Notre étude a permis, d'une part, de mettre en évidence la présence de quatre altérations nucléaires spermatiques chez les patients atteints d'un cancer, avant tout traitement, par rapport aux témoins, et d'autre part, d'identifier pour les anomalies de la condensation de la chromatine spermatique, trois types de cancers « plus à risque ».

Les patients présentaient plus fréquemment des anomalies de condensation de la chromatine spermatique par comparaison aux témoins quelque soit leur spermogramme. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature de patients atteints d'un CT (Spermon *et al.*, 2006), d'un LH (O'Flaherty *et al.*, 2008), ou d'un groupe de patients tout cancer confondu (O'Donovan *et al.*, 2005) et ce, malgré les méthodologies différentes utilisées pour analyser la condensation de la chromatine. La comparaison faite entre les groupes de patients en fonction du type de cancer et les témoins, a permis, d'une part de confirmer le résultat obtenu précédemment (LNH, LH, LA et CT ont plus d'anomalies de condensation de la chromatine que les témoins), d'autre part de mettre en évidence trois types de cancers (CT, LA et LH) qui présentent plus fréquemment des anomalies de condensation de la chromatine spermatique par comparaison aux patients atteints d'un CS. Parmi ces trois cancers, les patients atteints d'une LA avaient le taux le plus élevé d'anomalies de condensation de la chromatine spermatique et la moitié de sa population (n=5, 50%) présentait un taux supérieur à 20% (Figure 17 D). Or, avoir un taux d'anomalies de condensation de la chromatine élevé (supérieur à 20%) est un facteur prédictif négatif de survenue de grossesse en ICSI (RR=0,32 [0,81 - 0,13] ;  $p=0,02$ ) selon les données d'une étude interne (en cours de publication) réalisée chez 132 hommes infertiles. De plus, un taux d'anomalies de condensation de l'ADN spermatique supérieur à 30% rend la grossesse spontanée impossible (Evenson *et al.*, 1999). Ainsi, il serait intéressant de réaliser une étude portant sur l'issue des tentatives d'AMP utilisant les spermatozoïdes congelés des patients atteints d'une LA.

De plus, les patients présentaient une augmentation de la fragmentation de l'ADN spermatique par comparaison aux témoins. Ce résultat est cohérent avec l'hypothèse selon laquelle tout processus inflammatoire, probablement présent chez

les patients atteints d'un cancer en réponse à la prolifération de cellules néoplasiques, puisse entraîner une activation de l'apoptose dans les spermatozoïdes induisant la fragmentation de l'ADN spermatique (Muratori *et al.*, 2015). Cette augmentation de la fragmentation de l'ADN spermatique a été également observée, en utilisant la même technique d'évaluation (TUNEL), chez 22 patients atteints d'un cancer du testicule (dont 68% avec un spermogramme altéré) par comparaison à 13 patients infertiles normozoospermiques (Spermon *et al.*, 2006). La comparaison menée entre les patients en fonction de leur spermogramme a permis de mettre en évidence que les patients avec un spermogramme altéré présentaient un taux de fragmentation de l'ADN spermatique plus élevé par rapport aux patients avec un spermogramme normal et qu'aucune différence significative n'était retrouvée entre les patients atteints d'un cancer avec un spermogramme normal et les témoins fertiles, en bonne santé et normozoospermiques. Ainsi, la présence de paramètres spermatiques altérés est probablement un biais de confusion retrouvé également au sein de d'autres études (Spermon *et al.*, 2006). Pourtant, au sein de notre étude, nous n'observons pas de forte corrélation entre les paramètres spermatiques conventionnels et la fragmentation de l'ADN spermatique. Néanmoins, trois corrélations statistiquement significatives mais faibles sont observées : l'augmentation de la fragmentation de l'ADN spermatique est associée à la diminution de la concentration spermatique ( $r=-0,3$ ,  $p=0,013$ ), à la diminution de la mobilité progressive spermatique ( $r=-0,4$ ,  $p=0,005$ ) et à la diminution de la morphologie spermatique ( $r=-0,4$ ,  $p=0,002$ ). Ainsi, cette observation devra être confirmée au sein d'une étude avec un effectif plus important et en introduisant un groupe de témoins en bonne santé présentant une ou plusieurs altérations du spermogramme. La comparaison réalisée en fonction des types de cancers confirme le taux de fragmentation de l'ADN spermatique plus important chez tous les groupes de patients par rapport aux témoins mais ne révèle aucune différence entre les différents types de cancers, résultat en accord avec la littérature quelque soit la technique d'exploration utilisée (O'Donovan *et al.*, 2005 ; Meseguer *et al.*, 2008).

Notre étude est la première à montrer une augmentation de la longueur relative des télomères spermatiques chez des patients atteints d'un cancer (CT, LA, LH, LNH) quelque soit leur spermogramme par rapport à notre population contrôle. Sachant que nos patients étaient plus jeunes que nos témoins, et que la longueur relative des télomères spermatiques augmente avec l'âge (Allsopp *et al.*, 1992 ;

Baird *et al.*, 2006 ; Aston *et al.*, 2012), ce résultat observé n'est donc pas lié à l'âge des patients. De plus, nous n'observons, chez nos patients, aucune corrélation significative entre la longueur relative des télomères et l'âge ou l'année de naissance ( $p=0,92$  et  $p=0,73$ , respectivement). L'étude de Nowak *et al.* (2000) a montré une augmentation de l'activité de la télomérase au sein de 16 (89%) tumeurs du testicule. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse d'une éventuelle augmentation de l'activité de la télomérase dans les spermatogonies et/ou une inhibition du mécanisme de « *telomere trimming* » aboutissant à une élongation des télomères dans les spermatozoïdes de patients atteints d'un cancer. En effet, le « *telomere trimming* », qui se trouve être un mécanisme responsable du raccourcissement des télomères trop allongés chez les mammifères, participe à l'homéostasie de la longueur des télomères au sein des cellules cancéreuses et des cellules germinales (spermatogonies) humaines (Pickett *et al.*, 2009 ; Pickett *et al.*, 2011). Afin de confirmer ou non notre hypothèse de l'impact du cancer sur la longueur des télomères spermatiques, une étude fondamentale pourrait être initiée en mesurant l'activité de la télomérase et du « *telomere trimming* » au sein des spermatogonies en présence ou non de facteurs pro-inflammatoires.

Au sein de la littérature, nous retrouvons plusieurs corrélations significatives mais faibles entre la longueur relative des télomères et certains paramètres spermatiques. En effet, la longueur des télomères augmente lorsque la mobilité progressive spermatique ( $r=0,46$ ,  $p=0,004$ ), la vitalité spermatique ( $r=0,34$ ,  $p=0,007$ ) et la condensation de la chromatine spermatique ( $r=0,4$ ,  $p=0,002$ ) augmentent, et la longueur des télomères diminue lorsque la fragmentation de l'ADN spermatique augmente ( $r=-0,44$ ,  $p=0,001$ ) au sein d'une population d'hommes normozoospermiques (Rocca *et al.*, 2016). L'étude de Cariati *et al.* (2016) réalisée chez des hommes infertiles normo et oligozoospermiques, a montré que l'élongation des télomères était liée à l'augmentation de la concentration spermatique ( $r=0,32$ ,  $p=0,0064$ ) et que leur raccourcissement était lié à l'augmentation de la diploïdie ( $r=-0,25$ ,  $p=0,0367$ ). Cette étude a également révélé que les patients infertiles avec les télomères les plus courts et les plus longs, qui représentaient chacun 6% de la population étudiée, n'avaient obtenu aucune grossesse en AMP tandis que ceux avec des télomères de taille intermédiaire présentaient un taux de grossesse à 37,5%. Au sein de notre population atteinte d'un cancer, nous n'avons retrouvé aucune corrélation statistiquement significative entre la longueur relative des télomères et les autres paramètres spermatiques. Toutefois, il serait intéressant,

chez ces patients, de mener une étude sur la survenue d'une grossesse clinique en AMP en fonction de la longueur relative des télomères spermatiques et de déterminer, si possible, une limite supérieure de « non survenue d'une grossesse » en fonction de la technique d'AMP utilisée.

Les études ayant montré une augmentation de la longueur des télomères spermatiques avec l'âge, ont estimé leur élongation allant de 57 pb/an à 135 pb/an chez des donneurs de spermatozoïdes en bonne santé (Allsopp *et al.*, 1992 ; Baird *et al.*, 2006 ; Aston *et al.*, 2012). Afin d'expliquer cette augmentation de la longueur des télomères spermatiques chez les hommes plus âgés, Stindl en 2016 évoque une hypothèse trans-générationnelle basée, non pas sur l'activité de la télomérase, mais sur une érosion brutale de la longueur des télomères humains dans la lignée germinale féminine à partir de 1920 et qui s'accélère d'année en année. Cette érosion dans la lignée germinale féminine serait liée au recul de l'âge de la première grossesse. Ainsi, les hommes plus âgés, descendants de femmes plus jeunes, auraient hérité de télomères ovocytaires plus longs que les nouvelles générations, ce qui expliquerait cette différence. Au sein de notre étude, nos témoins ne présentaient ni d'augmentation significative de la longueur relative des télomères en fonction de l'âge ( $p=0,22$ ) ni de diminution significative de la longueur relative des télomères en fonction de l'année de naissance ( $p=0,30$ ), ce qui réfute l'hypothèse de Stindl.

Notre étude est également la première à montrer une hyperméthylation du GSE *MEST* chez des patients atteints d'un cancer, quelque soit leur spermogramme. Ce profil de méthylation est similaire à celui retrouvé chez des hommes infertiles oligozoospermiques (Cui *et al.*, 2016). La comparaison en fonction des types de cancers permet de mettre en évidence trois groupes de cancers (CS, CT et LNH) qui présentent une hyperméthylation de deux ou trois CpG du GSE *MEST* par rapport aux témoins, sans qu'il ne soit observé de différence significative entre eux. La méthylation *de novo* apparaît dès la naissance dans les spermatogonies et s'accroît au cours de la spermatogenèse. Ainsi, nos résultats suggèrent une augmentation de la méthylation probablement dû à une altération des DNA méthyltransférases (DNMT) en particulier de DNMT3 qui est en charge de la méthylation *de novo* durant la spermatogenèse (Boissonnas *et al.*, 2010 ; Cui *et al.*, 2016). En effet chez la souris, le Knock out (KO) conditionnel de DNMT3L et 3a provoque une azoospermie non obstructive alors que le KO isolé de DNMT3a perturbe uniquement la mise en place de l'empreinte dans les cellules germinales

(Kaneda *et al.*, 2004). Dans l'état actuel des connaissances scientifiques, les anomalies de la méthylation du gène *MEST*, au sein d'hommes infertiles, sont associées à l'oligozoospermie, la diminution de la mobilité progressive spermatique, la morphologie anormale des spermatozoïdes et des paramètres cliniques tels que l'augmentation de la FSH (Hormone folliculo-stimulante) sérique et la diminution du volume testiculaire (Poplinski *et al.*, 2010 ; Klaver *et al.*, 2013). Au sein de notre population atteinte d'un cancer, nous ne retrouvons aucune corrélation significative entre les paramètres spermatiques conventionnels et la méthylation de *MEST*. Bien que les anomalies épigénétiques du GSE *H19* soient connues pour être responsables de deux maladies chez l'Homme, les syndromes de Silver-Russell (SRS) et Beckwith-Wiedemann (BWS) (Jurkiewicz *et al.*, 2017 ; Abi Habib *et al.*, 2017), l'impact des anomalies épigénétiques du GSE *MEST* reste jusqu'à présent inconnu. Néanmoins, une étude récente a montré chez des souris KO *MEST* que ce gène s'exprimait dès les stades précoces du développement embryonnaire et était indispensable au développement cérébral notamment aux neurones dopaminergiques (Mesman *et al.*, 2017). Nos patients présentant une hyperméthylation spermatique du GSE *MEST* vont donc probablement donner des embryons qui auront, au sein de leurs cellules somatiques, une diminution de l'expression paternelle de ce gène et avoir un potentiel impact néfaste sur le développement des neurones dopaminergiques avec pour conséquence l'apparition tardive d'une maladie de Parkinson. Cette hypothèse reste bien entendu à être confirmée chez l'Homme. Concernant le gène *H19*, malgré l'absence de différence statistiquement significative concernant la méthylation globale, nous avons observé une différence significative du niveau de méthylation pour les CpG 7 et 11. En effet, les patients atteints d'une LA présentent une hyperméthylation du CpG 7 de *H19* par rapport aux témoins et une hyperméthylation des CpG 2, 7, 8, 9, 14 et 15 par rapport aux autres groupes de cancers (CS, CT, LH, LNH). Or, les patients atteints du syndrome de BWS présentent une hyperméthylation de *H19* empêchant la fixation de CTCF sur l'ICR et provoquant la surexpression d'un gène situé en amont de *H19* : *Igf2* (*Insulin like growth factor 2*) impliqué dans le développement et la croissance (Jurkiewicz *et al.*, 2017). Ainsi, une étude de l'expression de *Igf2* serait à envisager en cas d'augmentation de la prévalence du syndrome de BWS chez les descendants des patients atteints de LA. En plus des maladies au sein de la descendance, les défauts d'empreinte du génome du spermatozoïde entraînent une diminution du taux de fécondation en ICSI, des arrêts de développement embryonnaire, une diminution



du taux de grossesse et une augmentation des fausses couches (Cui *et al.*, 2016). De plus, une méthylation aberrante peut contribuer au développement d'un cancer telle que la surexpression de *H19* retrouvée à l'âge adulte dans certains types de cancers : le gène *H19* code pour un microARN dont la cible est un gène suppresseur de tumeur ; ainsi, *H19* joue un rôle oncogène lorsqu'il est exprimé en dehors du cœur et des muscles squelettiques à l'âge adulte (Li *et al.*, 2016). Les maladies épigénétiques restent à ce jour un domaine très complexe où des anomalies génétiques peuvent s'ajouter aux anomalies épigénétiques. En effet, plusieurs études ont montré des anomalies génétiques (duplications) au sein de l'ICR paternel de *H19* chez des patients atteints de BWS (Jurkiewicz *et al.*, 2017). Se basant sur la littérature, l'équipe de Jurkiewicz *et al.* (2017) propose une hypothèse reliant l'anomalie génétique retrouvée chez les parents et le phénotype d'enfants atteints de SRS : une duplication de l'ICR maternel *H19* entrainerait la surexpression maternelle de *H19* (double copie de *H19*) impliquant une double production de microARN de *H19* ayant un impact sur l'organisation de la chromatine et la diminution de l'expression paternelle de *Igf2* aboutissant ainsi au phénotype de SRS marqué par un retard de croissance intra-utérin et néonatal.

Néanmoins, notre étude possède quelques limites. En effet, les altérations nucléaires spermatiques observées peuvent être induites par le cancer, par une altération de la spermatogenèse préexistante au cancer ou induite par le cancer, par des antécédents urologiques ou des expositions toxiques, ou par les conditions de conservation des échantillons, dans la mesure où nous avons utilisé des spermatozoïdes congelés.

En effet, les altérations nucléaires spermatiques sont plus fréquemment observées chez les hommes infertiles présentant des altérations des paramètres spermatiques conventionnels, mais cette corrélation entre paramètres nucléaires et paramètres conventionnels spermatiques reste très controversée au sein de la littérature, probablement dû à des populations différentes de patients étudiés, à des méthodes différentes utilisées pour l'exploration du noyau spermatique et à l'absence de standardisation du spermogramme notamment pour la morphologie spermatique (Evgeni *et al.*, 2015). De plus, la plupart des études affirmant cette corrélation, présente des coefficients  $r$  faibles ( $|r| < 0,7$ ) et met en évidence des altérations nucléaires chez des hommes normozoospermiques et inversement (Evgeni *et al.*, 2015), ce qui est également retrouvé dans notre étude. Concernant les études

réalisées sur des populations de patients atteints d'un cancer, seule une étude, celle de O'Flaherty *et al.* (2008) montre une corrélation négative faible ( $r=-0,39$ ) significative entre la fragmentation de l'ADN et la mobilité progressive, similaire à celle retrouvée au sein de notre étude. Ainsi, ce probable facteur de biais, notamment pour la fragmentation de l'ADN spermatique, doit être exploré au sein d'études ultérieures.

Les antécédents urologiques tels que la cryptorchidie, la varicocèle, les infections génitales, la torsion testiculaire, l'hernie inguinale, l'infection ourlienne avec atteinte testiculaire, mais aussi l'exposition aux toxiques (alcool, tabac, cannabis, autres stupéfiants) peuvent entraîner des altérations nucléaires spermatiques (Agarwal *et al.*, 2014) et être un biais de confusion. Malheureusement, nous n'avons pas pu récupérer ces informations pour les patients inclus dans notre étude.

Des anomalies de condensation de la chromatine, une fragmentation et des dommages oxydatifs à l'ADN spermatique peuvent être induits par la congélation (Zribi *et al.*, 2012 ; Kopeika *et al.*, 2015). En revanche, la congélation ne semble avoir aucun effet sur la méthylation de l'ADN spermatique (Klaver *et al.*, 2012). Dans notre étude, ce facteur de confusion n'est pas considéré comme pertinent puisque les spermatozoïdes des patients et des témoins ont été congelés de façon similaire.

En conclusion, cette étude, bien qu'avec un effectif réduit, démontre un probable effet néfaste du cancer sur l'intégrité de l'ADN spermatique. Ces résultats questionnent sur l'utilisation de ces spermatozoïdes congelés par comparaison à l'utilisation des spermatozoïdes présents dans l'éjaculat à distance des traitements du cancer. Dans la première situation, les altérations sont induites par un micro-environnement testiculaire défavorable lié à la maladie ; dans la deuxième situation, les spermatozoïdes peuvent également présenter des altérations du génome induites par des agents mutagènes. Il est indéniable que l'utilisation de spermatozoïdes frais donne de meilleure chance de succès en terme de capacité de procréation par rapport aux spermatozoïdes congelés (O'Donovan *et al.*, 2005). De plus, l'étude française multicentrique « Gamatox » (Paris, Caen, Rouen, Marseille, Toulouse, Clermont-Ferrand et Grenoble), réalisée chez des patients atteints d'un CT, LH et LNH, et ayant analysé la qualité nucléaire spermatique (FISH pour les anomalies chromosomiques, TUNEL pour la fragmentation de l'ADN spermatique, Acridine orange par Cytométrie en flux ou « SCSA » pour l'ADN simple brin) avant et après chimio/radiothérapie, a révélé qu'à partir de 24 mois post traitement, la qualité

nucléaire redevenait similaire voire était améliorée par rapport à la qualité retrouvée au moment du diagnostic du cancer avant le traitement (Bujan *et al.*, 2013 ; Martinez *et al.*, 2017 ; Rives *et al.*, 2017). Par conséquent, en cas de reprise de la spermatogenèse post traitement, nous proposons de réitérer les explorations nucléaires spermatiques et à partir des résultats du spermogramme et de la qualité nucléaire d'utiliser pour les tentatives d'AMP soit les spermatozoïdes congelés au moment du diagnostic soit les spermatozoïdes provenant d'un éjaculat frais 24 mois post traitement.

Nous avons plusieurs perspectives pour cette étude : **(i)** augmenter l'effectif de la population étudiée, **(ii)** étendre notre analyse épigénétique à d'autres gènes, **(iii)** établir un lien de causalité entre le cancer et les altérations nucléaires spermatiques et **(iv)** initier une étude sur l'impact de l'utilisation de ces spermatozoïdes sur les issues des tentatives d'AMP afin d'induire des recommandations sur leur utilisation. La revue de Pacey *et al.* (2007) relate plusieurs constats concernant ces hommes ayant conservé leurs spermatozoïdes dans le cadre d'une prise en charge thérapeutique d'un cancer : d'une part, un faible pourcentage de patients (7 à 27%) revient en moyenne 10 ans post traitement vers les centres d'AMP pour un projet parental, d'autre part, leur fertilité spontanée post traitement est plus faible que la population générale avec 37% de patients présentant une azoospermie permanente 48 mois post traitement (essentiellement les patients atteints de lymphome ou de leucémie). Cependant, en fonction du type de cancer et du traitement, une grossesse spontanée reste possible, par exemple, pour les patients atteints d'un CT, 65% des couples ont une grossesse spontanée sur une période de 10 ans. Cette revue, par manque de registres en 2007, n'avait pas assez de données sur les grossesses en AMP. Mais concernant la descendance, une augmentation de risque d'anomalies à la naissance et d'incidence de cancer (grossesse *via* AMP ou spontanée) serait observée. Une étude multicentrique (13 pays européens dont la France) de Van der Kaaij *et al.* (2014) montre chez 334 hommes atteints d'un LH, 206 (62%) ont eu une grossesse spontanée, 78 (21%) ont utilisé leurs spermatozoïdes congelés en AMP ce qui a abouti à 3 (4%) grossesses spontanées, 48 (62%) grossesses en AMP et 27 (35%) échecs. Aucune donnée sur la qualité du conceptus ou sur les grossesses obtenues en fonction de la technique d'AMP utilisée n'a été rapportée. Récemment, une étude rétrospective monocentrique (CECOS de Marseille), présentée lors d'un congrès national, a été conduite sur les tentatives d'AMP à partir de spermatozoïdes

conservés dans le champ du cancer [72 inséminations intra-utérines, 21 cycles de fécondation *in vitro* (FIV) et 117 cycles d'ICSI] par rapport à celles réalisées à partir de spermatozoïdes conservés dans un contexte de don (1521 inséminations intra-utérines, 362 cycles de FIV, 37 cycles d'ICSI) entre 1995 et 2015. Cette étude a montré une diminution significative du taux de grossesses cliniques et du taux de naissance à partir des spermatozoïdes congelés du groupe cancer en insémination intra-utérine, et une diminution de la qualité embryonnaire en FIV. Aucune différence n'a été observée concernant les taux de grossesse clinique, de naissance ou de la qualité embryonnaire pour les tentatives d'ICSI. Pourtant, l'utilisation de l'ICSI a toujours été une méthode considérée comme invasive en AMP puisqu'elle passe outre la sélection naturelle spermatique et pourrait faciliter la transmission d'anomalies chromosomiques et épigénétiques à la descendance, ce qui doit nous pousser, dans ce type d'étude, à évaluer systématiquement le taux de fausses couches et la qualité du conceptus. A notre connaissance, aucune étude n'a, à ce jour, évalué et comparé la descendance obtenue à partir de spermatozoïdes conservés avant les traitements du cancer de celle obtenue à partir de spermatozoïdes obtenus à distance de l'exposition aux traitements du cancer (chimiothérapie/radiothérapie) en fonction des types de cancers.

## Bibliographie

---

- Abi Habib W**, Brioude F, Azzi S, Salem J, Das Neves C, Personnier C, Chantot-Bastaraud S, Keren B, Le Bouc Y, Harbison MD, Netchine I. 11p15 ICR1 Partial Deletions Associated with IGF2/H19 DMR Hypomethylation and Silver-Russell Syndrome. *Hum Mutat.* 2017 Jan ; 38 (1) : 105-111.
- Agarwal A**, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health.* 2014 Apr;32 (1) : 1-17. Review.
- Allegra A**, Innao V, Penna G, Gerace D, Allegra AG, Musolino C. Telomerase and telomere biology in hematological diseases: A new therapeutic target. *Leuk Res.* 2017 Feb 7 ; 56 : 60-74.
- Allsopp RC**, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Nov 1 ; 89 (21) : 10114-8.
- Aston KI**, Hunt SC, Susser E, Kimura M, Factor-Litvak P, Carrell D, Aviv A. Divergence of sperm and leukocyte age-dependent telomere dynamics: implications for male-driven evolution of telomere length in humans. *Mol Hum Reprod.* 2012 Nov ; 18 (11) : 517-22.
- Auger J**, Eustache F, Andersen AG, Irvine DS, Jørgensen N, Skakkebaek NE, Suominen J, Toppari J, Vierula M, Jouannet P. Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Hum Reprod.* 2001 Dec ; 16 (12) : 2710-7.
- Baird DM**, Britt-Compton B, Rowson J, Amso NN, Gregory L, Kipling D. Telomere instability in the male germline. *Hum Mol Genet.* 2006 Jan 1 ; 15 (1) : 45-51.
- Bisht S**, Dada R. Oxidative stress: Major executioner in disease pathology, role in sperm DNA damage and preventive strategies. *Front Biosci (Schol Ed).* 2017 Jun 1 ; 9 : 420-447. Review.
- Boissonnas CC**, Abdalaoui HE, Haelewyn V, Fauque P, Dupont JM, Gut I, Vaiman D, Jouannet P, Tost J, Jammes H. Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men. *Eur J Hum Genet.* 2010 Jan ; 18 (1) : 73-80.
- Bujan L**, Walschaerts M, Moinard N, Hennebicq S, Saias J, Brugnol F, Auger J, Berthaut I, Szerman E, Daudin M, Rives N. Impact of chemotherapy and radiotherapy for testicular germ cell tumors on spermatogenesis and sperm DNA: a multicenter prospective study from the CECOS network. *Fertil Steril.* 2013 Sep ; 100 (3) : 673-80.
- Bussen S**, Sütterlin M, Steck T, Dietl J. Semen parameters in patients with unilateral testicular cancer compared to patients with other malignancies. *Arch Gynecol Obstet.* 2004 ; 269 (3) : 196-8.
- Caponecchia L**, Cimino G, Sacchetto R, Fiori C, Sebastianelli A, Salacone P, Marcucci I, Tomassini S, Rago R. Do malignant diseases affect semen quality? Sperm parameters of men with cancers. *Andrologia.* 2016 ; 48 (3) : 333-40.
- Cariati F**, Jaroudi S, Alfarawati S, Raberi A, Alviggi C, Pivonello R, Wells D. Investigation of sperm telomere length as a potential marker of paternal genome integrity and semen quality. *Reprod Biomed Online.* 2016 Sep ; 33 (3) : 404-11.
- Cui X**, Jing X, Wu X, Yan M, Li Q, Shen Y, Wang Z. DNA methylation in spermatogenesis and male infertility. *Exp Ther Med.* 2016 Oct ; 12 (4) : 1973-1979.
- Evenson DP**, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod.* 1999 Apr ; 14 (4) : 1039-49.

- Evgeni E**, Lymberopoulos G, Touloupidis S, Asimakopoulos B. Sperm nuclear DNA fragmentation and its association with semen quality in Greek men. *Andrologia*. 2015 Dec ; 47 (10) : 1166-74.
- Fait G**, Yogev L, Botchan A, Paz G, Lessing JB, Yavetz H. Sex chromosome aneuploidy in sperm cells obtained from Hodgkin's lymphoma patients before therapy. *Fertil Steril*. 2001 ; 75 (4) : 828-9.
- Frias S**, Van Hummelen P, Meistrich ML, Lowe XR, Hagemester FB, Shelby MD, Bishop JB, Wyrobek AJ. NOVP chemotherapy for Hodgkin's disease transiently induces sperm aneuploidies associated with the major clinical aneuploidy syndromes involving chromosomes X, Y, 18, and 21. *Cancer Res*. 2003 ; 63 (1) : 44-51.
- Jørgensen PB**, Fedder J, Koelvraa S, Graakjaer J. Age-dependence of relative telomere length profiles during spermatogenesis in man. *Maturitas*. 2013 Aug ; 75 (4) : 380-5.
- Jurkiewicz D**, Kugauto M, Skórka A, Śmigiel R, Smyk M, Ciara E, Chrzanowska K, Krajewska-Walasek M. A novel IGF2/H19 domain triplication in the 11p15.5 imprinting region causing either Beckwith-Wiedemann or Silver-Russell syndrome in a single family. *Am J Med Genet A*. 2017 Jan ; 173 (1) : 72-78.
- Kaneda M**, Okano M, Hata K, Sado T, Tsujimoto N, Li E, Sasaki H. Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature*. 2004 Jun 24 ; 429 (6994) : 900-3.
- Kerjean A**, Dupont JM, Vasseur C, Le Tessier D, Cuisset L, Paldi A, Jouannet P, Jeanpierre M. Establishment of the paternal methylation imprint of the human H19 and MEST/PEG1 genes during spermatogenesis. *Hum Mol Genet*. 2000 Sep 1 ; 9 (14) : 2183-7.
- Kläver R**, Tüttelmann F, Bleiziffer A, Haaf T, Kliesch S, Gromoll J. DNA methylation in spermatozoa as a prospective marker in andrology. *Andrology*. 2013 Sep ; 1 (5) : 731-40.
- Kläver R**, Bleiziffer A, Redmann K, Mallidis C, Kliesch S, Gromoll J. Routine cryopreservation of spermatozoa is safe-evidence from the DNA methylation pattern of nine spermatozoa genes. *J Assist Reprod Genet*. 2012 Sep ; 29 (9) : 943-50.
- Kopeika J**, Thornhill A, Khalaf Y. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Hum Reprod Update*. 2015 Mar-Apr ; 21 (2) : 209-27. Review.
- Laurentino S**, Beygo J, Nordhoff V, Kliesch S, Wistuba J, Borgmann J, Buiting K, Horsthemke B, Gromoll J. Epigenetic germline mosaicism in infertile men. *Hum Mol Genet*. 2015 Mar 1 ; 24 (5) : 1295-304.
- Li XP**, Hao CL, Wang Q, Yi XM, Jiang ZS. H19 gene methylation status is associated with male infertility. *Exp Ther Med*. 2016 Jul ; 12 (1) : 451-456.
- Marchetti F**, Wyrobek AJ. Mechanisms and consequences of paternally-transmitted chromosomal abnormalities. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2005 ; 75 (2) : 112-29.
- Martinez G**, Walschaerts M, Le Mitouard M, Borye R, Thomas C, Auger J, Berthaut I, Brugnon F, Daudin M, Moinard N, Ravel C, Saias J, Szerman E, Rives N, Hennebicq S, Bujan L. Impact of Hodgkin or non-Hodgkin lymphoma and their treatments on sperm aneuploidy: a prospective study by the French CECOS network. *Fertil Steril*. 2017 Feb ; 107 (2) : 341-350.e5.
- McDowell S**, Harrison K, Kroon B, Ford E, Yazdani A. Sperm DNA fragmentation in men with malignancy. *Fertil Steril*. 2013 ; 99 (7) : 1862-6.
- Meseguer M**, Santiso R, Garrido N, Fernandez JL. The effect of cancer on sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril*. 2008 Jul ; 90 (1) : 225-7.

- Mesman S**, van Hooft JA, Smidt MP. Mest/Peg1 Is Essential for the Development and Maintenance of a SNc Neuronal Subset. *Front Mol Neurosci*. 2017 Jan 13 ; 9 : 166. eCollection 2016.
- Muratori M**, Tamburrino L, Marchiani S, Cambi M, Olivito B, Azzari C, Forti G, Baldi E. Investigation on the Origin of Sperm DNA Fragmentation: Role of Apoptosis, Immaturity and Oxidative Stress. *Mol Med*. 2015 Jan 30 ; 21 : 109-22.
- Noblanc A**, Kocer A, Drevet JR. [Post-testicular protection of male gametes from oxidative damage. The role of the epididymis]. *Med Sci (Paris)*. 2012 May ; 28 (5) : 519-25. Review. French.
- Nowak R**, Sikora K, Pietas A, Skoneczna I, Chrapusta SJ. Germ cell-like telomeric length homeostasis in nonseminomatous testicular germ cell tumors. *Oncogene*. 2000 Aug 17 ; 19 (35) : 4075-8.
- O'Donovan M**. An evaluation of chromatin condensation and DNA integrity in the spermatozoa of men with cancer before and after therapy. *Andrologia*. 2005 ; 37 (2-3) : 83-90.
- O'Flaherty C**, Vaisheva F, Hales BF, Chan P, Robaire B. Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy. *Hum Reprod*. 2008 ; 23 (5) : 1044-52.
- Pacey AA**. Fertility issues in survivors from adolescent cancers. *Cancer Treat Rev*. 2007 Nov ; 33 (7) : 646-55. Review.
- Paoli D**, Rizzo F, Fiore G, Pallotti F, Pulsoni A, Annechini G, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L. Spermatogenesis in Hodgkin's lymphoma patients: a retrospective study of semen quality before and after different chemotherapy regimens. *Hum Reprod*. 2016 Feb ; 31 (2) : 263-72.
- Pickett HA**, Henson JD, Au AY, Neumann AA, Reddel RR. Normal mammalian cells negatively regulate telomere length by telomere trimming. *Hum Mol Genet*. 2011 Dec 1 ; 20 (23) : 4684-92.
- Pickett HA**, Cesare AJ, Johnston RL, Neumann AA, Reddel RR. Control of telomere length by a trimming mechanism that involves generation of t-circles. *EMBO J*. 2009 Apr 8 ; 28 (7) : 799-809.
- Poplinski A**, Tüttelmann F, Kanber D, Horsthemke B, Gromoll J. Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant methylation of MEST and IGF2/H19 ICR1. *Int J Androl*. 2010 Aug 1 ; 33 (4) : 642-9.
- Reig-Viader R**, Capilla L, Vila-Cejudo M, Garcia F, Anguita B, Garcia-Caldés M, Ruiz-Herrera A. Telomere homeostasis is compromised in spermatocytes from patients with idiopathic infertility. *Fertil Steril*. 2014 Sep ; 102 (3) : 728-738.e1.
- Ribeiro TM**, Bertolla RP, Spaine DM, Fraietta R, Ortiz V, Cedenho AP. Sperm nuclear apoptotic DNA fragmentation in men with testicular cancer. *Fertil Steril*. 2008 ; 90 (5) : 1782-6.
- Rives N**, Walschaerts M, Setif V, Hennebicq S, Saias J, Brugnion F, Auger J, Berthaut I, Szerman E, Daudin M, Bujan L. Sperm aneuploidy after testicular cancer treatment: data from a prospective multicenter study performed within the French Centre d'Étude et de Conservation des Oeufs et du Sperme network. *Fertil Steril*. 2017 Mar ; 107 (3) : 580-588.e1.
- Rives N**, Perdrix A, Hennebicq S, Saias-Magnan J, Melin MC, Berthaut I, Barthélémy C, Daudin M, Szerman E, Bresson JL, Brugnion F, Bujan L. The semen quality of 1158 men with testicular cancer at the time of cryopreservation: results of the French National CECOS Network. *J Androl*. 2012 Nov-Dec ; 33 (6) : 1394-401.
- Rocca MS**, Speltra E, Menegazzo M, Garolla A, Foresta C, Ferlin A. Sperm telomere length as a parameter of sperm quality in normozoospermic men. *Hum Reprod*. 2016 Jun ; 31 (6) : 1158-63.

- Rueffer U**, Breuer K, Josting A, Lathan B, Sieber M, Manzke O, Grotenhermen FJ, Tesch H, Bredenfeld H, Koch P, Nisters-Backes H, Wolf J, Engert A, Diehl V. Male gonadal dysfunction in patients with Hodgkin's disease prior to treatment. *Ann Oncol.* 2001 ; 12 (9) : 1307-11.
- Sakkas D**, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril.* 2010 Mar 1 ; 93 (4) : 1027-36. Review.
- Schulte RT**, Ohi DA, Sigman M, Smith GD. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *J Assist Reprod Genet.* 2010 Jan ; 27 (1) : 3-12. Review.
- Siderakis M**, Tarsounas M. Telomere regulation and function during meiosis. *Chromosome Res.* 2007 ; 15 (5) : 667-79. Review.
- Smit M**, van Casteren NJ, Wildhagen MF, Romijn JC, Dohle GR. Sperm DNA integrity in cancer patients before and after cytotoxic treatment. *Hum Reprod.* 2010 Aug ; 25 (8) : 1877-83.
- Spermon JR**, Ramos L, Wetzels AM, Sweep CG, Braat DD, Kiemeneij LA, Witjes JA. Sperm integrity pre- and post-chemotherapy in men with testicular germ cell cancer. *Hum Reprod.* 2006 ; 21 (7) : 1781-6.
- Stahl O**, Eberhard J, Cavallin-Ståhl E, Jepson K, Friberg B, Tingsmark C, Spanò M, Giwercman A. Sperm DNA integrity in cancer patients: the effect of disease and treatment. *Int J Androl.* 2009 ; 32 (6) : 695-703.
- Stindl R**, The paradox of longer sperm telomeres in older men's testes: a birth-cohort effect caused by transgenerational telomere erosion in the female germline. *Mol Cytogenet.* 2016 ; 9 : 12.
- Tempest HG**, Ko E, Chan P, Robaire B, Rademaker A, Martin RH. Sperm aneuploidy frequencies analysed before and after chemotherapy in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients. *Hum Reprod.* 2008 ; 23 (2) : 251-8.
- Van der Kaaij MA**, van Echten-Arends J, Heutte N, Meijnders P, Abeillard-Lemoisson E, Spina M, Moser EC, Allgeier A, Meulemans B, Lugtenburg PJ, Aleman BM, Noordijk EM, Fermé C, Thomas J, Stamatoullas A, Fruchart C, Eghbali H, Brice P, Smit WG, Sebban C, Doorduijn JK, Roesink JM, Gaillard I, Coiffier B, Lybeert ML, Casasnovas O, André M, Raemaekers JM, Henry-Amar M, Kluin-Nelemans JC; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Lymphoma Group and the Groupe d'Étude des Lymphomes de l'Adulte. Cryopreservation, semen use and the likelihood of fatherhood in male Hodgkin lymphoma survivors: an EORTC-GELA Lymphoma Group cohort study. *Hum Reprod.* 2014 Mar ; 29 (3) : 525-33.
- Zribi N**, Chakroun NF, Ben Abdallah F, Elleuch H, Sellami A, Gargouri J, Rebai T, Fakhfakh F, Keskes LA. Effect of freezing-thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity. *Cryobiology.* 2012 Dec ; 65 (3) : 326-31.



## Qualité nucléaire spermatique chez les hommes atteints d'un cancer avant traitement

**Introduction.** Face aux multiples conséquences que peut provoquer l'utilisation en ICSI de spermatozoïdes présentant des altérations nucléaires, l'amélioration des connaissances concernant les dommages spécifiques de l'ADN spermatique induits par le cancer semble indispensable. Les objectifs de cette étude ont été d'explorer le noyau spermatique dans le champ du cancer et de caractériser les anomalies en fonction du type de cancer.

**Matériels et méthodes.** Les 50 hommes inclus dans cette étude, ont eu une conservation de spermatozoïdes avant toute prise en charge thérapeutique du cancer. Une exploration des altérations nucléaires spermatiques a été réalisée : les anomalies chromosomiques (FISH), le nombre et la longueur relative des télomères (PNA Q-FISH), la fragmentation de l'ADN (TUNEL), la condensation de la chromatine (bleu d'aniline), l'oxydation de l'ADN (8 OHdG) et la méthylation de deux gènes soumis à empreinte *H19* et *MEST* (pyroséquençage après traitement au bisulfite). Les patients ont été comparés à un groupe contrôle (n=30) puis répartis en 2 groupes selon leur spermogramme et en 5 groupes selon le type de cancer : cancer du testicule (CT) (n=10) ; lymphome Hodgkinien (LH) (n=10) ; lymphome non Hodgkinien (LNH) (n=10), cancer solide (CS) non urologique (n=10) et leucémie aigüe (LA) (n=10).

**Résultats.** Les patients atteints d'un cancer ont présenté quatre altérations nucléaires spermatiques par rapport au groupe contrôle : l'augmentation de la longueur relative des télomères spermatiques ( $115,7 \pm 61,6$  vs  $68,1 \pm 35,6$ ,  $p < 0,0001$ ), l'augmentation de la fragmentation de l'ADN spermatique ( $11,7 \pm 9,5$  vs  $4,4 \pm 4$ ,  $p < 0,0001$ ), l'augmentation des anomalies de condensation de la chromatine spermatique ( $15,4 \pm 6,7$  vs  $6,2 \pm 4,2$ ,  $p < 0,0001$ ) et une hyperméthylation du gène *MEST* ( $5,8 \pm 8,2$  vs  $2,8 \pm 1,3$ ,  $p = 0,0015$ ). Parmi les quatre altérations retrouvées, seule l'augmentation de la fragmentation de l'ADN spermatique semble être liée aux anomalies du spermogramme. Aucune différence significative entre les différents types de cancers n'a été observée sauf pour les anomalies de condensation de la chromatine spermatique où nous avons pu identifier trois types de cancers « plus à risque » : LA, LH et CT.

**Conclusion.** Cette étude suggère un impact néfaste du cancer sur l'intégrité de l'ADN spermatique, et nous incite à nous questionner sur l'utilisation de ces spermatozoïdes congelés par comparaison à l'utilisation des spermatozoïdes présents dans l'éjaculat à distance des traitements du cancer.

### Mots-clés :

Spermatozoïde, Cancer, Condensation de la chromatine, Fragmentation de l'ADN, Méthylation *MEST*, Télomères.