

UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE
FACULTÉ DE MÉDECINE DE BREST

Année 2017

N°

THÈSE DE DOCTORAT EN MÉDECINE
DIPLOME D'ÉTAT

PAR

Élodie CAIRE-TETAURU
née le 29 juin 1987

THÈSE PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 23 OCTOBRE 2017

**Les apports du tri de spermatozoïdes chez des
hommes porteurs d'une anomalie
chromosomique de structure.**

Président

M. le Professeur Philippe MERVIEL

Membres du jury

M. le Professeur Claude FEREC

M. le Professeur Denis SARROUILHE

Mme le Docteur Aurore PERRIN

M. le Docteur Frédéric MOREL



UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE
FACULTE DE MEDECINE ET
DES SCIENCES DE LA SANTE DE BREST

-
LISTE DES ENSEIGNANTS

Doyens honoraires

Professeur **FLOCH** Hervé
Professeur **LE MENN** Gabriel (†)
Professeur **SENECAIL** Bernard
Professeur **BOLES** Jean-Michel
Professeur **BIZAIS** Yves (†)
Professeur **DE BRAEKELEER** Marc (†)

Doyen

Professeur **BERTHOU** Christian

Professeurs émérites

CENAC Arnaud, Médecine interne
COLLET Michel, Gynécologie obstétrique
LEHN Pierre, Biologie cellulaire
YOUINOU Pierre, Immunologie

Professeurs des Universités – Praticiens Hospitaliers en surnombre

LEFEVRE Christian, Anatomie
MOTTIER Dominique, Thérapeutique
RICHE Christian, Pharmacologie fondamentale

Professeurs des Universités – Praticiens Hospitaliers de Classe Exceptionnelle

BOLES Jean-Michel, Réanimation
COCHENER-LAMARD Béatrice, Ophtalmologie
DEWITTE Jean-Dominique, Médecine et santé au travail
FEREC Claude, Génétique
GILARD Martine, Cardiologie
JOUQUAN Jean, Médecine interne

OZIER Yves, Anesthésiologie-réanimation
ROBASZKIEWICZ Michel, Gastroentérologie

Professeurs des Universités – Praticiens Hospitaliers de 1^{ère} Classe

BAIL Jean-Pierre, Chirurgie digestive
BERTHOU Christian, Hématologie
BLONDEL Marc, Biologie cellulaire
BOTBOL Michel, Pédiopsychiatrie
BRESSOLLETTE Luc, Chirurgie vasculaire
CARRE Jean-Luc, Biochimie et biologie moléculaire
DE PARSCAU DU PLESSIX Loïc, Pédiatrie
DELARUE Jacques, Nutrition
DEVAUCHELLE-PENSEC Valérie, Rhumatologie
DUBRANA Frédéric, Chirurgie orthopédique et traumatologique
FENOLL Bertrand, Chirurgie infantile
FOURNIER Georges, Urologie
GENTRIC Armelle, Gériatrie et biologie du vieillissement
GOUNY Pierre, Chirurgie vasculaire
HU Weiguo, Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique
KERLAN Véronique, Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
LACUT Karine, Thérapeutique
LE MEUR Yannick, Néphrologie
LE NEN Dominique, Chirurgie orthopédique et traumatologique
LEROYER Christophe, Pneumologie
LOZAC'H Patrick, Chirurgie digestive
MANSOURATI Jacques, Cardiologie
MARIANOWSKI Rémi, Oto-rhino-laryngologie
MERVIEL Philippe, Gynécologie obstétrique
MISERY Laurent, Dermato-vénérologie
NEVEZ Gilles, Parasitologie et mycologie
NONENT Michel, Radiologie et imagerie médicale
PAYAN Christopher, Bactériologie-virologie
REMY-NERIS Olivier, Médecine physique et réadaptation
SALAUN Pierre-Yves, Biophysique et médecine nucléaire
SARAUX Alain, Rhumatologie
SIZUN Jacques, Pédiatrie
STINDEL Éric, Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
TIMSIT Serge, Neurologie
VALERI Antoine, Urologie
WALTER Michel, Psychiatrie d'adultes

Professeurs des Universités – Praticiens Hospitaliers de 2^{ème} Classe

ANSART Séverine, Maladies infectieuses
AUBRON Cécile, Réanimation
BEN SALEM Douraied, Radiologie et imagerie médicale
BERNARD-MARCORELLES Pascale, Anatomie et cytologie pathologiques
BEZON Eric, Chirurgie thoracique et cardiovasculaire

BROCHARD Sylvain, Médecine physique et réadaptation
COUTURAUD Francis, Pneumologie
DAM HIEU Phong, Neurochirurgie
DELLUC Aurélien, Médecine interne
GIROUX-METGES Marie-Agnès, Physiologie
HERY-ARNAUD Geneviève, Bactériologie-virologie
HUET Olivier, Anesthésiologie-réanimation
LE MARECHAL Cédric, Génétique
LE ROUX Pierre-Yves, Biophysique et médecine nucléaire
L'HER Erwan, Réanimation
LIPPERT Éric, Hématologie
MONTIER Tristan, Biologie cellulaire
NOUSBAUM Jean-Baptiste, Gastroentérologie
PRADIER Olivier, Cancérologie
RENAUDINEAU Yves, Immunologie
SEIZEUR Romuald, Anatomie

Professeurs des Universités de Médecine Générale

LE RESTE Jean-Yves
LE FLOC'H Bernard

Professeur Associé des Universités de Médecine Générale (à mi-temps)

BARRAINE Pierre

Professeur des Universités contrat LRU

BORDRON Anne, Biologie cellulaire

Maîtres de Conférences des Universités – Praticiens Hospitaliers Hors Classe

JAMIN Christophe, Immunologie
MOREL Frédéric, Biologie et médecine du développement et de la reproduction
PERSON Hervé, Anatomie

Maîtres de Conférences des Universités – Praticiens Hospitaliers de 1^{ère} Classe

ABGRAL Ronan, Biophysique et médecine nucléaire
CORNEC Divi, Rhumatologie
DE VRIES Philine, Chirurgie infantile
DOUET-GUILBERT Nathalie, Génétique
HILLION Sophie, Immunologie
LE BERRE Rozenn, Maladies infectieuses
LE GAC Gérald, Génétique
LE GAL Solène, Parasitologie et mycologie
LODDE Brice, Médecine et santé au travail
MIALON Philippe, Physiologie
PLEE-GAUTIER Emmanuelle, Biochimie et biologie moléculaire
QUERELLOU Solène, Biophysique et médecine nucléaire
TALAGAS Matthieu, Histologie, embryologie et cytogénétique
VALLET Sophie, Bactériologie-virologie

Maîtres de Conférences des Universités – Praticiens Hospitaliers de 2^{ème} Classe

BRENAUT Emilie, Dermato-vénérologie
CORNEC-LE GALL Emilie, Néphrologie
LE VEN Florent, Cardiologie
MAGRO Elsa, Neurochirurgie
PERRIN Aurore, Biologie et médecine du développement et de la reproduction
SALIOU Philippe, Epidémiologie, économie de la santé et prévention
SCHICK Ulrike, Cancérologie
UGUEN Arnaud, Anatomie et cytologie pathologiques

Maîtres de Conférences de Médecine Générale

NABBE Patrice

Maîtres de Conférences Associés de Médecine Générale (à mi-temps)

BARAIS Marie
CHIRON Benoît
DERRIENNIC Jérémy

Maîtres de Conférences des Universités de Classe Normale

BERNARD Delphine, Biochimie et biologie moléculaire
DERBEZ Benjamin, Sociologie démographie
KARCHER Brigitte, Psychologie clinique
LANCIEN Frédéric, Physiologie
LE CORRE Rozenn, Biologie cellulaire
MIGNEN Olivier, Physiologie
MORIN Vincent, Electronique et informatique

Maître de Conférences Associé des Universités (à temps complet)

MERCADIE Lolita, Rhumatologie

Maître de Conférences des Universités contrat LRU

DANY Antoine, Epidémiologie et santé publique
GILLES Marlène, Génie informatique, automatique et traitement du signal

Professeurs certifiés / agrégés du second degré

MONOT Alain, Français
RIOU Morgan, Anglais

Remerciements

À Monsieur le Professeur Philippe MERVIEL,

Vous me faites le grand honneur de présider ce jury et je vous en remercie.
Recevez ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

À Monsieur le Docteur Frédéric MOREL,

Vos nombreux conseils et votre aide tout au long de ce travail m'ont été très précieux.
Je vous remercie pour votre disponibilité et vos enseignements, qui m'ont fait découvrir et apprécier le grand univers de la cytogénétique.
Soyez assuré de ma profonde gratitude et de mon grand respect.

À Madame le Docteur Aurore PERRIN,

Vous m'avez suivie depuis mes débuts dans le domaine de la Biologie de la Reproduction.
Je vous remercie pour votre disponibilité et vos enseignements, votre bonne humeur et vos conseils toujours avisés.
Soyez assurée de mon sincère respect.

À Monsieur le Professeur FEREC,

Vous me faites l'honneur de participer à ce jury et de juger mon travail,
Recevez ici le témoignage de ma grande reconnaissance.

À Monsieur le Professeur Denis SARROUILHE,

De Poitiers vous n'avez pas hésité un seul instant pour accepter de juger ce travail que je suis très heureuse de vous présenter aujourd'hui.
Recevez ici le témoignage de ma profonde gratitude.

À mon grand-père,

Papi, tu as toujours veillé sur moi et tu m'as toujours encouragée. Nos longues discussions me manqueront terriblement, mais je les garde toutes vivantes au fond de mon cœur. Merci pour ta bienveillance et pour ton amour...

J'espère que tu es fier de moi... Je te dédie cette thèse.

À mes parents,

Maman, tu as été le soutien sans faille pendant ces douze années d'étude de médecine loin de Tahiti. Merci pour ta force incroyable, tes sacrifices, ta sagesse et ta philosophie que je tente d'appliquer chaque jour dans ma vie.

Tu m'as appris l'amour inconditionnel, je t'aime si fort.

Papa, chaque jour de labeur que tu as donné de ta vie, ta droiture, ton courage et ta détermination en toute circonstance, on fait de toi le modèle qui m'a inspiré la force de me battre pour arriver où je suis aujourd'hui.

Tu m'as donné la passion du métier. Merci papa, je t'aime si fort.

Na tōu papa rū'au e mama rū'au no Tupuai,

E'ore to ōrua pa'era'a i'oa e moe hia ia'u. Mai ta ōrua i poroi ia'u :

« *Haa manao to mou'a, to āia eihaa ia moe hia no hea mai oe* »

À mes sœurs,

Stéphanie, toujours disponible dans les moments où j'en avais besoin. Tu m'as accompagnée dans le périple de mes études et de mes déménagements, tu as su mettre du soleil dans les jours les plus difficiles. Merci pour ta relecture, et d'avoir toujours été là pour moi.

Déborah, ensemble nous avons fait de 2017 notre dernière année d'étude, nous nous sommes soutenues sans faille dans les instants pénibles, et ce, peu importe la distance. Merci pour ton soutien, tes onguents magiques et tous les rêves de voyage que tu fais naître en moi.

À Thibaud,

Compagnon des épreuves que j'ai traversées cette année, tu as toujours été présent par ton aide précieuse, tes paroles rassurantes et ta détermination à me motiver au travail sans concession ! Merci d'être présent dans ma vie et de la colorer si fort ! D'ailleurs ok... *le fez, c'est cool.*

À toute ma famille et à tous mes amis,

De Tahiti, Bordeaux et Brest, à tous ceux qui ont partagé les bancs de la fac de médecine avec moi, les gardes, les stages à l'hôpital et au laboratoire, merci pour cette aventure et votre compagnonnage ! À tous ceux que j'ai rencontrés, et qui ont rendu mes soirées festives et joyeuses, merci pour votre belle amitié !

Pour leur aimable participation, merci aux partenaires de ce projet,

Le Pr BRUGNON Florence, du laboratoire de biologie de la reproduction du CHU de Clermont Ferrand – CECOS Auvergne Clermont Ferrand.

Le Pr BUJAN Louis, du groupe de recherche en fertilité humaine du CHU de Toulouse – CECOS Midi-Pyrénées-Toulouse.

Le CRB Germethèque CECOS Midi-Pyrénées.



À l'équipe de recherche INSERM U1078 de l'Université de Bretagne Occidentale,
Merci pour votre aide, votre compétence et le savoir-faire que vous m'avez transmis.

Au laboratoire de cytogénétique du CHRU de Brest,
Le Professeur Marc DE BRAEKELEER, le Docteur DOUET-GUILBERT Nathalie, ainsi que
tous les autres biologistes, techniciens de laboratoire, secrétaires et aides laborantines,
Pour votre bonne humeur et gentillesse à tous, un grand merci !

Au laboratoire de Biologie de la reproduction du CHRU de Brest,
Le Docteur Véronique AMICE, le Docteur Damien BEAUVILLARD, Edith, Jocelyne,
Murielle, à vous qui m'avez suivie depuis mes débuts en Biologie de la Reproduction, ainsi
qu'à l'ensemble de l'équipe de gynécologie et du secrétariat d'AMP, un chaleureux merci !

Au centre d'AMP-CECOS du CHRU de Rennes,
Pour votre sympathie et gentillesse, vous qui avez su me donner du temps pour la rédaction de
cette thèse lorsque j'en avais besoin, et m'avez accompagnée dans ce dernier semestre de mon
internat, merci de tout cœur !

Cette étude a été financée par l'ABM (Agence de la Biomédecine).



Table des matières

Tableaux	1
Figures	2
Abréviations	4
Introduction	6
Notions générales : du spermatozoïde humain à l'infertilité masculine	9
<i>I - Le spermatozoïde humain : origine et fonctions</i>	10
1 - Embryologie de l'appareil de reproduction masculin	10
2 - Anatomie de l'appareil génital masculin	12
3 - La spermatogenèse.....	16
<i>II - L'infertilité masculine</i>	22
1 - Définition	22
2 - Les principales étiologies.....	22
3 - Les techniques d'exploration	23
4 - Prise en charge de l'infertilité masculine en AMP	25
Anomalie chromosomique de structure et infertilité masculine	27
<i>I - Anomalies chromosomiques et infertilité masculine</i>	28
1 - Anomalies chromosomiques de nombre	28
2 - Anomalies chromosomiques de structure	30
<i>II - Ségrégation méiotique et risque pour la descendance</i>	34
1 - Translocation robertsonienne.....	34
2 - Translocation réciproque équilibrée	37
<i>III - Techniques d'analyse de la ségrégation méiotique</i>	40
1 - Fécondation inter-spécifique homme – hamster	40
2 - Hybridation in situ en fluorescence (FISH)	40
<i>IV - Quelles solutions actuellement ?</i>	41
1 - Le diagnostic prénatal (DPN)	42
2 - Le diagnostic préimplantatoire (DPI)	43
3 - Preimplantation Genetic Screening (PGS).....	44
Marqueurs de l'apoptose dans l'infertilité masculine	45
<i>I - Présence de marqueurs apoptotiques dans le sperme de patients infertiles</i>	46
<i>II - La fragmentation de l'ADN spermatique</i>	48
1 - Organisation de la chromatine spermatique.....	48
2 - Origines de la fragmentation de l'ADN spermatique	49
3 - Techniques d'évaluation de la fragmentation de l'ADN spermatique.....	53
4 - Conséquences et risques en AMP	54
<i>III - Marqueurs des altérations membranaires</i>	55
1 - Externalisation membranaire de phosphatidylsérine	55
2 - Perte de l'intégrité membranaire.....	56

<i>IV - Altération du potentiel de membrane mitochondriale</i>	56
<i>V - Activation des caspases</i>	56
Techniques de sélection des spermatozoïdes en AMP	58
<i>I - Techniques classiques de séparation des spermatozoïdes en vue d'ICSI</i>	59
1 - Gradient de densité (GD)	60
2 - Migration ascendante ou Swim-Up (SU).....	60
<i>II - Nouvelles techniques de sélection des spermatozoïdes</i>	62
1 - Potentiel Zeta	62
2 - MSOME.....	63
3 - Liaison à l'acide hyaluronique.....	64
4 - La biréfringence des spermatozoïdes.....	65
5 - Technologie microfluidique.....	65
6 - L'Hypo-Osmotic Swelling Test (HOS-test)	66
7 - Magnetic activated cell sorting (MACS)	66
Objectifs de l'étude	68
Patients et méthodes	70
<i>I - Patients</i>	71
<i>II - Déroulement de l'étude</i>	71
<i>III - Préparation des échantillons de sperme</i>	72
<i>IV - Concentration totale en spermatozoïdes</i>	73
<i>V - Séparation par la technique MACS</i>	73
<i>VI - Technique FISH sur sperme</i>	75
1 - Méthode de préparation des BACs	75
2 - Réalisation de la technique FISH.....	77
<i>VII - La technique TUNEL</i>	78
<i>VIII - Analyse de l'apoptose spermatique par l'annexine V-FITC</i>	79
<i>VII - Analyse statistique</i>	80
Résultats	81
<i>I - Patients</i>	82
<i>II - Paramètres spermatiques de base</i>	82
<i>III - Evolution de la concentration en spermatozoïdes à chaque étape de l'étude</i>	82
<i>IV - Analyse de la ségrégation méiotique par FISH</i>	84
<i>V - Analyse de la fragmentation de l'ADN spermatique par TUNEL</i>	89
<i>VI - Evaluation de l'apoptose avec la liaison annexine V-FITC</i>	91

Discussion	93
<i>I - Techniques de sélection des spermatozoïdes : le lien entre apoptose et contenu chromosomique</i>	94
<i>II - Apports de l'analyse de la ségrégation méiotique</i>	100
<i>III - Apports de l'analyse des marqueurs apoptotiques</i>	102
<i>IV - Effet sur la concentration des spermatozoïdes</i>	105
<i>V - Comment optimiser la technique MACS ?</i>	106
<i>VI - Application en AMP : les premières naissances humaines</i>	107
Conclusion	108
Bibliographie	110
Serment d'Hippocrate	130
Autorisation d'imprimer	131

Tableaux

Tableau 1 : Classification des spermatozoïdes observés en MSOME	63
Tableau 2 : Caryotype de quatre hommes porteurs d'une translocation robertsonienne ou réciproque équilibrée.....	71
Tableau 3 : Mélange des sondes utilisées pour effectuer la FISH	75
Tableau 4 : Composition des mélanges correspondant aux étapes de marquage et de précipitation des BACs.....	77
Tableau 5 : Compositions des différentes solutions utilisées pour réaliser une FISH	78
Tableau 6 : Compositions des différentes solutions utilisées pour la technique TUNEL.....	79
Tableau 7 : Paramètres spermatiques de base pour chaque patient sur sperme frais.	82
Tableau 8 : Concentration totale en spermatozoïdes dans l'échantillon de sperme décongelé, après l'incubation avec les microbilles magnétiques et le BB, et dans les fractions d'annexine V- et d'annexine V+.....	83
Tableau 9 : Données des ségrégations méiotiques par FISH	88
Tableau 10 : Taux de fragmentation de l'ADN spermatique dans l'échantillon de sperme décongelé, après incubation avec les microbilles magnétiques et le BB, dans la fraction d'annexine V- et d'annexine V+	89
Tableau 11 : Pourcentage de spermatozoïdes annexine V-FITC+ dans le sperme après décongelation et les fractions d'annexine V- et V+	91
Tableau 12 : FISH sur spermatozoïdes sélectionnés chez des hommes 46,XY infertiles.....	96
Tableau 13 : FISH sur spermatozoïdes sélectionnés chez des hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure.....	98

Figures

Figure 1 : Cinquième semaine de développement embryonnaire	11
Figure 2 : Anatomie générale de l'appareil génital masculin.....	13
Figure 3 : Structure du testicule	14
Figure 4 : Coupe d'un tube séminifère normal	14
Figure 5 : La spermatogenèse, durée et rendement	17
Figure 6 : La spermiogenèse	19
Figure 7 : Structure d'un spermatozoïde	20
Figure 8 : La régulation hormonale de la spermatogenèse.....	21
Figure 9 : Arbre diagnostique des différentes étiologies des infertilités masculines	25
Figure 10 : Exemple d'une translocation robertsonienne consistant en la perte des bras courts puis la fusion des grands bras restants de deux chromosomes acrocentriques au niveau de leur centromère	31
Figure 11 : Exemple d'une translocation réciproque équilibrée	32
Figure 12 : Ségrégation méiotique gamétique de patients porteurs d'une translocation robertsonienne	36
Figure 13 : Ségrégation méiotique gamétique de patient porteur d'une translocation réciproque équilibrée.....	39
Figure 14 : Biopsie des cellules du trophoctoderme à J5	44
Figure 15 : Voies apoptotiques hypothétiques dans le sperme de patients infertiles.....	47
Figure 16 : Le nucléosome	48
Figure 17 : Les différentes étapes du remodelage de la chromatine lors de la spermiogenèse	49
Figure 18 : Le rôle de la protéine Fas au cours de la spermatogenèse	50
Figure 19 : Balance entre oxydants et antioxydants, et ses conséquences sur la qualité spermatique	52
Figure 20 : Schéma de réalisation d'un gradient de densité (GD)	61
Figure 21 : Schéma de réalisation d'une migration ascendante ou Swim-Up (SU).....	61
Figure 22 : Principe de la technique de sélection des spermatozoïdes par Zeta-potentiel	62
Figure 23 : Différents types de spermatozoïdes observés en MSOME.....	63
Figure 24 : Sélection de spermatozoïdes par liaison à l'acide hyaluronique	64
Figure 25 : Technique de sélection par biréfringence	65

Figure 26 : Représentation schématique des changements morphologiques typiques des spermatozoïdes induits par un stress hypo-osmotique	66
Figure 27 : Diagramme de flux de l'étude	72
Figure 28 : Schéma explicatif de la technique MACS	74
Figure 29 : Concentration totale en spermatozoïdes dans l'échantillon de sperme décongelé, après l'incubation avec les microbilles magnétiques et le BB, et dans les fractions d'annexine V- et d'annexine V+	83
Figure 30 : Capture au microscope à épifluorescence de la FISH sur spermatozoïdes	84
Figure 31 : Taux de spermatozoïdes déséquilibrés et normaux ou équilibrés dans l'échantillon de sperme décongelé, la fraction d'annexine V- et la fraction d'annexine V+	85
Figure 32 : Variation des pourcentages des différents modes de ségrégation méiotique de la population de spermatozoïdes déséquilibrés dans l'échantillon de sperme après décongélation et dans les fractions d'annexine V- et V+	87
Figure 33 : Capture au microscope à épifluorescence de spermatozoïdes après la technique TUNEL	90
Figure 34 : Evolution du taux de fragmentation de l'ADN spermatique aux différentes étapes de l'étude chez les 4 patients	90
Figure 35 : Capture au microscope à épifluorescence de spermatozoïdes après marquage avec de l'annexine V-FITC	92
Figure 36 : Population de spermatozoïde apoptotiques dans les échantillons de sperme après décongélation, et dans les fractions d'annexine V- et d'annexine V+ chez les 4 patients	92

Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AMH	Hormone Anti-Müllérienne
AMP	Aide Médicale à la Procréation
AO	Acridine orange
AZF	AZoospermia Factor
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BB	Binding Buffer
CCR	Réarrangements Chromosomiques Complexes
CEP	Chromosome Enumeration Probe
DAPI	4',6-DiAmidino-2-Phenyl-Indole
DPN	Diagnostic Prénatal
DPNI	Diagnostic Prénatal Non Invasif
DTT	Dithiothreitol
dUTP	DéoxyUridine TriPhosphate
DFI	DNA fragmentation index
DPI	Diagnostic Pré-Implantatoire
FISH	Hybridation <i>in situ</i> Fluorescente
FITC	Fluorescein IsoThioCyanate
FIV	Fécondation <i>in vitro</i>
FSH	Hormone folliculo-stimulante
GD	Gradient de Densité
GnRH	Gonadotrophin-Releasing Hormone
GTE	Glucose Tris EDTA
HA-binding	Liaison à l'acide hyaluronique
HAS	Haute Autorité de Santé
HOS-test	Hypo-Osmotic Swelling Test
IAD	Insémination Artificielle avec sperme de Donneur
ICSI	Intra-Cytoplasmic Sperm Injection
IU	Insémination Intra-Utérine
IMSI	Intracytoplasmic Morphologically Selected sperm Injection
IP	Iodure de Propidium

LB	Luria Bertani
LH	Luteinizing Hormone
LSI	Locus Specific Identifier
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MCS	Marqueur Chromosomique Surnuméraire
MSOME	Motile Sperm Organelle Morphology Examination
OAT	OligoAsthénoTératozoospermie
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	Phosphate Buffered Saline
PGS	Preimplantation Genetic Screening
PICSI	Picked spermatozoa for ICSI
PS	Phosphatidylsérine
ROS	Substances Oxygénées Réactives
SCSA	Sperm Chromatin Structure Assay
SCD test	Sperm Chromatin Dispersion
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SO	Stress Oxydatif
SRY	Sex-determining Region Y chromosome
SU	Migration ascendante ou Swim-Up
TdT	Terminal désoxynucléotidyl Transférase
TE	Tris-HCl-EDTA
TESA	TEsticular Sperm Aspiration
TESE	TEsticular Sperm Extraction
TNF	Tumor Necrosis Factor
TUNEL	TdT-mediated-dUTP nick-end labeling

Introduction

L'infertilité du couple n'est plus attribuée uniquement à la femme, l'homme se retrouve impliqué dans la moitié des cas. L'infertilité masculine serait liée à un trouble génétique dans 30% des étiologies. Parmi les causes liées à un trouble génétique, la translocation robertsonienne est la plus fréquente des anomalies chromosomiques de structure observée avec une incidence de 1/1085 nouveau-nés, et la translocation réciproque équilibrée est la deuxième anomalie la plus fréquente avec une incidence de 1/1175 naissances (De Braekeleer and Dao 1991). Ces hommes ont un risque élevé de produire des gamètes chromosomiquement déséquilibrés, à l'origine d'un risque augmenté de fausses couches à répétition et de naissances d'enfants avec anomalie chromosomique (Stern et al. 1999; Munné et al. 2000). Ils peuvent avoir des paramètres spermatiques perturbés telle qu'une oligospermie (Vincent et al. 2002) qui les mènent à une prise en charge en Aide Médicale à la Procréation (AMP) pour avoir recours à la fécondation *in vitro* (FIV) avec ICSI (Intra-Cytoplasmic Sperm Injection). L'ICSI a profondément modifié le pronostic de l'infertilité masculine, en permettant à des individus auparavant considérés comme stériles de concevoir. Mais alors que les critères de mobilité et de morphologie utilisés en ICSI pour sélectionner un spermatozoïde ne sont pas prédictifs de la qualité de l'équipement chromosomique (Nicolopoulos et al. 2008), une question reste au centre des préoccupations des professionnels de l'AMP : comment sélectionner les spermatozoïdes dont le caryotype a toutes les chances d'être chromosomiquement normal ou équilibré ?

Il existe de nombreuses techniques de séparation des spermatozoïdes. Le tri magnétique à l'aide de microbilles magnétiques (MACS, Magnetic Activated Cell Sorting) est devenu une technique intéressante, ses succès ont été attribués au fait qu'elle réduit le pourcentage de fragmentation d'ADN spermatique (Rawe et al. 2009; Herrero et al. 2012), et qu'elle peut séparer les spermatozoïdes apoptotiques des non apoptotiques (Huang et al. 2009; Buzzi et al. 2010). Son principe est basé sur l'utilisation de l'annexine V, une protéine qui possède une forte affinité pour la phosphatidylsérine (PS), conjuguée à des microbilles magnétiques. Or, durant le processus d'apoptose, un des signes les plus précoces est l'externalisation, à la surface membranaire, de la PS. Cette technique permet de capturer les spermatozoïdes apoptotiques et/ou morts lors de leurs passages à travers une colonne soumise à l'application d'un champ magnétique externe. Ainsi, elle permet de séparer les spermatozoïdes en 2 populations : une fraction annexine V négative (spermatozoïdes sans externalisation de la PS, et donc non apoptotiques) et une fraction annexine V positive (spermatozoïdes avec une externalisation de la PS, et donc apoptotiques).

Dans de précédentes publications, nous avons émis l'hypothèse qu'une apoptose abortive initiée dans le testicule pourrait expliquer la présence de spermatozoïdes avec un déséquilibre chromosomique et une fragmentation de l'ADN dans l'éjaculat d'hommes ayant une anomalie chromosomique (Perrin et al. 2011, 2013). Par conséquent, la technique MACS devrait nous permettre de séparer les spermatozoïdes ayant débuté une apoptose abortive des spermatozoïdes non apoptotiques. Ainsi nous nous attendrions à voir le taux de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés décroître dans la fraction d'annexine V négative et augmenter dans la fraction d'annexine V positive.

Nous commencerons cette thèse par une première partie de rappel concernant les spermatozoïdes, de l'origine embryologique des cellules dont ils sont issus, en passant par toutes les étapes de différenciation et de maturation qu'ils doivent subir pour acquérir leurs principales fonctions de cellule apte à la fécondation. Nous y introduirons aussi l'infertilité masculine, ses principales étiologies et stratégies de prise en charge actuelle.

Pour bien comprendre les objectifs de notre travail, nous détaillerons les anomalies chromosomiques en lien avec l'infertilité masculine, en s'intéressant plus particulièrement aux mécanismes de ségrégation méiotique. Cette partie est importante pour comprendre les résultats de FISH que nous exploiterons par la suite. Nous ferons également le point sur l'expression des marqueurs apoptotiques présents dans le sperme de patients infertiles, ce qui apportera la base nécessaire pour comprendre le lien entre présence de ces marqueurs et gamètes chromosomiquement déséquilibrés.

Les techniques de sélection des spermatozoïdes actuels seront présentées. Cette partie permettra aux lecteurs d'avoir des références concernant l'ensemble des techniques existantes en AMP et des critères de sélectivité sur lesquelles elles se basent.

Enfin, nous exposerons les patients et méthodes utilisés dans cette étude, ainsi que nos résultats, que nous discuterons et conclurons.

Notions générales :
Du spermatozoïde humain à
l'infertilité masculine

Le spermatozoïde est la cellule reproductrice masculine destinée à féconder l'ovocyte. De la cellule souche vers la création de cellules hautement différenciées, le spermatozoïde subit de nombreuses transformations biologiques pour devenir mature et fécondant. Dans un premier temps nous commencerons par rappeler le développement de l'appareil de reproduction masculin lors de l'embryogenèse, puis nous détaillerons l'anatomie des voies spermatiques chez l'adulte. Nous aborderons les différentes étapes de la spermatogenèse et sa régulation, aboutissant à la formation d'un spermatozoïde fonctionnel. Dans un second temps, nous définirons l'infertilité masculine, ses principales étiologies et les moyens de l'explorer en première intention.

I - Le spermatozoïde humain : origine et fonctions

1 - Embryologie de l'appareil de reproduction masculin

Le tout premier stade de développement de l'appareil reproducteur chez l'être humain, est celui des gonades indifférenciées en ovaire ou en testicule, correspondant au déterminisme sexuel. Le chromosome Y joue un rôle majeur dans la formation des testicules et la spermatogenèse, plus particulièrement le gène SRY (Sex-determining Region Y chromosome) situé sur son bras court, qui est à l'origine du déterminisme testiculaire. Chez l'homme, il permet l'engagement du développement des gonades en testicules. Sous le contrôle des hormones produites par le testicule que sont l'AMH (Hormone Anti-Müllérienne) et la testostérone, se développent les organes génitaux internes et externes de type masculin.

Lors de la 4^{ème} semaine de développement embryonnaire, apparaissent les cellules germinales primordiales dans la paroi de la vésicule ombilicale. Elles sont situées dans une région extra-embryonnaire, entre l'allantoïde et la vésicule ombilicale. Ces grosses cellules à cytoplasme clair et au noyau vésiculeux, vont migrer à l'intérieur de l'embryon par le mésentère dorsal de l'intestin postérieur, pour venir coloniser les crêtes génitales à la 6^{ème} semaine de développement embryonnaire, pour donner les spermatogonies chez l'homme, les ovogonies chez la femme. Ce sont les crêtes génitales qui sont à l'origine des gonades. Les crêtes génitales se forment entre la 4^{ème} et la 6^{ème} semaine du développement embryonnaire (Figure 1).

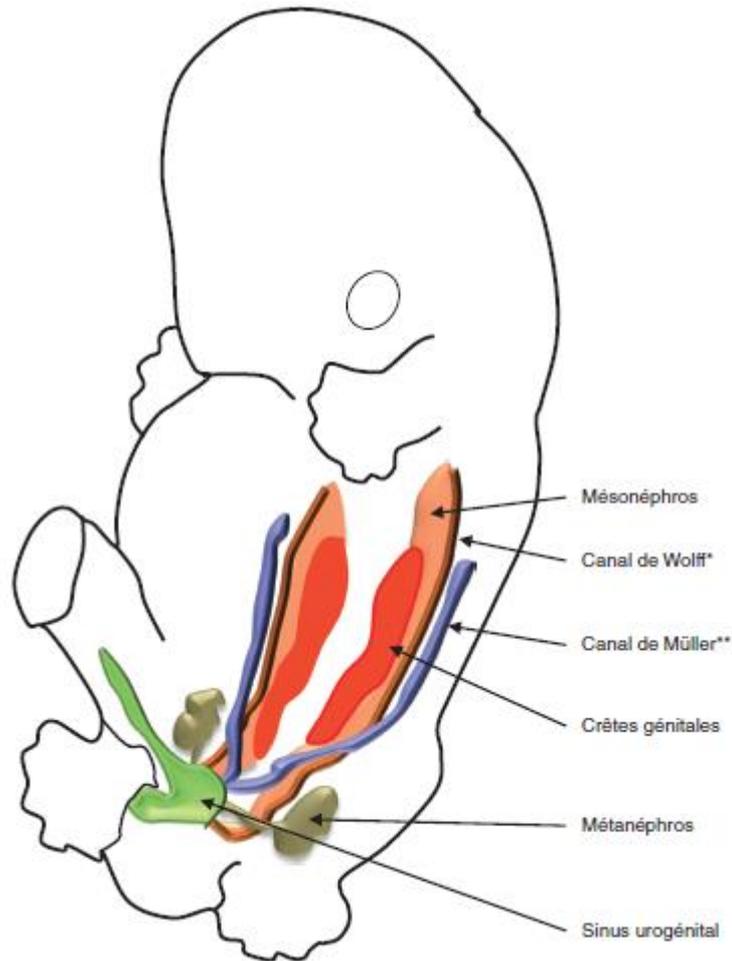


Figure 1 : Cinquième semaine de développement embryonnaire
(d'après Tachdjian et al. 2016)

Les gonades restent indifférenciées jusqu'à la 7^{ème} semaine de développement embryonnaire, elles sont toutes deux formées de l'épithélium cœlomique et du mésenchyme sous-jacent associés aux cellules germinales dénommées alors gonocytes.

À partir de la 7^{ème} semaine de développement embryonnaire, les gonades se différencient en testicules : les cellules germinales primordiales se localisent dans les cordons cellulaires et deviennent spermatogonies. Les cordons cellulaires forment les tubes séminifères. À l'intérieur de ceux-ci se trouvent les spermatogonies et les cellules de Sertoli qui sécrètent l'AMH, à l'extérieur correspond le tissu interstitiel où se forment les cellules de Leydig sécrétant la testostérone à partir de la 8^{ème} semaine de développement.

Alors que leur développement débute dans la cavité abdominale, les testicules vont migrer en position extra-abdominale, vers leur localisation définitive dans le scrotum.

C'est à partir des canaux de Wolff et de Müller que se forment les voies génitales. L'AMH sécrétée par les cellules de Sertoli entraîne l'involution des canaux de Müller chez l'embryon masculin au cours de la 8^{ème} et 9^{ème} semaine de développement embryonnaire. La testostérone sécrétée par les cellules de Leydig entraîne le développement des canaux de Wolff chez l'embryon masculin qui est à l'origine de la formation des épидидymes, des canaux déférents et des vésicules séminales. C'est au niveau du *rete testis* que se connectent les tubes séminifères aux tubules mésonéphrotiques.

Concernant la formation des organes génitaux externes, le cloaque se cloisonne entre la 4^{ème} et 6^{ème} semaine de développement embryonnaire en sinus urogénital et en canal anorectal. Sous l'action des androgènes, les organes génitaux externes vont se développer : le pénis se forme à partir de l'allongement du tubercule génital et les bourrelets génitaux se différencient pour donner les bourrelets scrotaux à l'origine du scrotum.

2 - Anatomie de l'appareil génital masculin

L'appareil de reproduction masculin est composé des organes génitaux externes que sont le pénis et les deux testicules situés dans le scrotum, et des organes génitaux internes. Il permet la production de spermatozoïdes, leur maturation et leur stockage. La Figure 2 présente une hémicoupe de la structure générale de l'appareil génital masculin dont nous allons décrire les différentes parties depuis leur lieu de formation jusqu'au trajet des spermatozoïdes lors de leur émission.

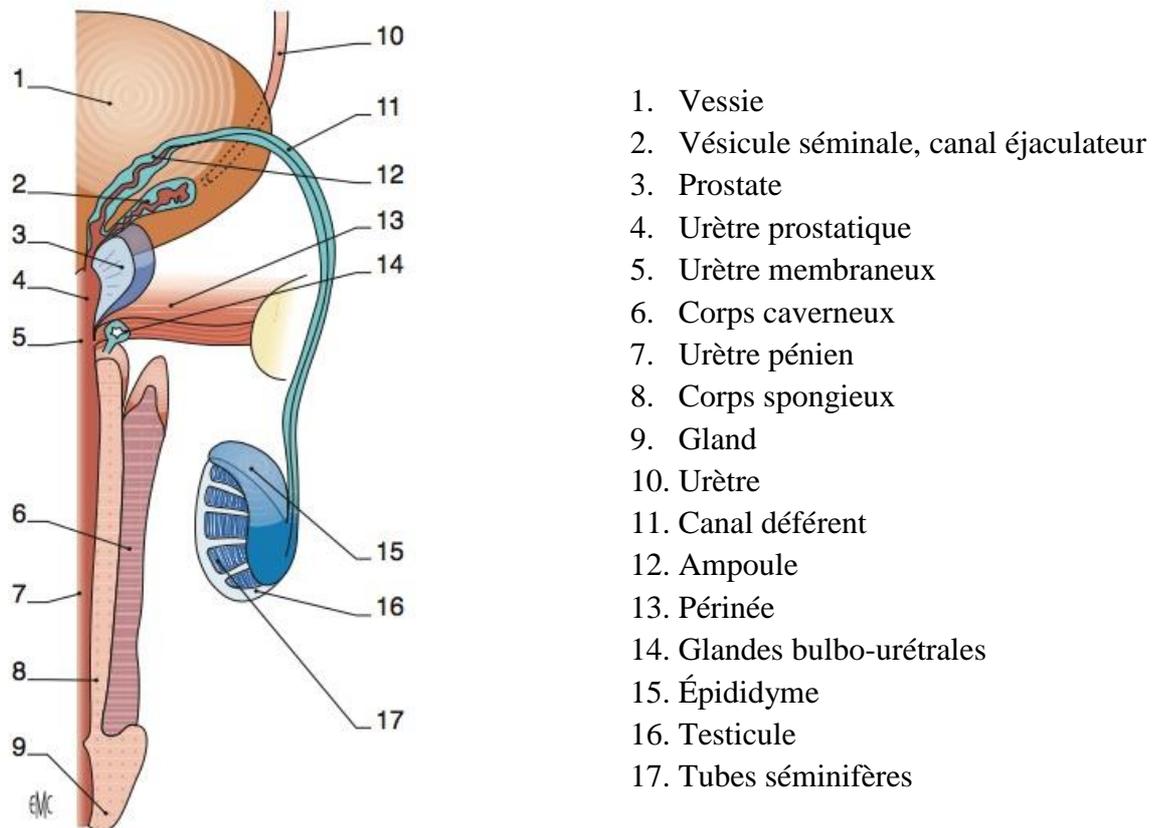


Figure 2 : Anatomie générale de l'appareil génital masculin (d'après Ravel et al. 2009)

2.1 Les testicules

Les deux testicules assurent à la fois une fonction exocrine correspondant à la spermatogenèse et une fonction endocrine correspondant à la production d'hormones androgènes, notamment la testostérone. Situés dans le scrotum en position extra-abdominale, ils sont reliés à l'épididyme par le *rete testis*, auquel fait suite la partie initiale du canal déférent. Le testicule est entouré de structures fibreuses : l'albuginée, composée de fibres de collagène et de cellules musculaires lisses. De cette enveloppe partent des cloisons remontant vers la tête de l'épididyme, qui délimitent les lobules testiculaires. On dénombre environ 300 lobules par testicule (Figure 3). Le corps de Highmore, est, quant à lui, une structure fibreuse correspondant au lieu de convergence des sommets des lobules testiculaires.

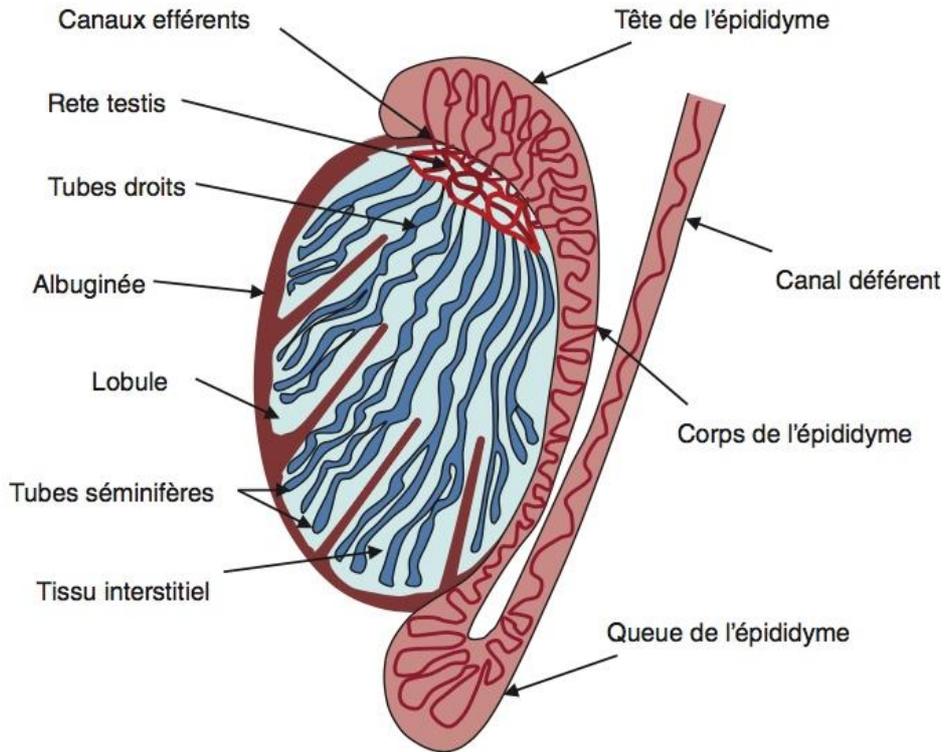


Figure 3 : Structure du testicule (d'après Tachdjian et al. 2016)

À l'intérieur des lobules se trouvent deux types de structures : les tubes séminifères et le tissu ou espace interstitiel. L'espace interstitiel est composé de cellules de Leydig interstitielles en amas, péri tubulaires (contre la paroi du tube séminifère) et intra murales. Les cellules de Leydig ont pour fonction la production de la testostérone. Les tubes séminifères sont constitués d'un épithélium séminifère, bordant une lumière centrale et limitée à l'extérieur par une gaine péri tubulaire (Figure 4).

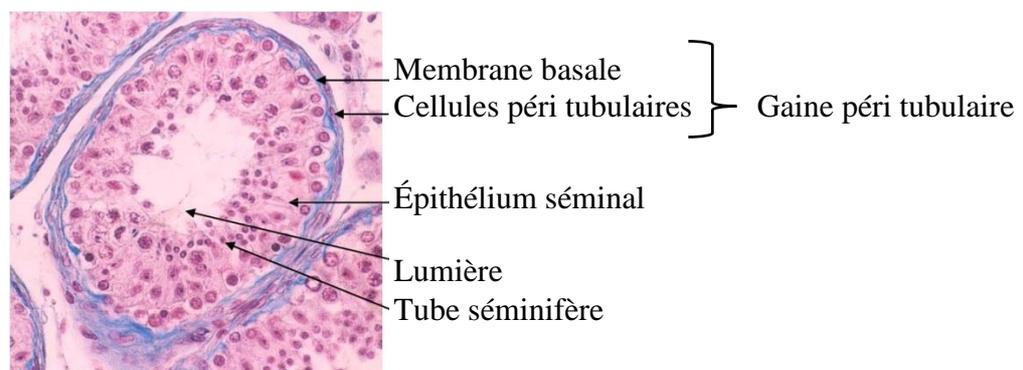


Figure 4 : Coupe d'un tube séminifère normal

Cette paroi péri tubulaire est constituée d'une membrane basale, de fibres de collagène et de cellules myoïdes. L'épithélium séminifère correspond au lieu de la spermatogenèse. Elle comprend des cellules de Sertoli et des cellules germinales. Les cellules de Sertoli, en plus de leur fonction de maintien de l'architecture de l'épithélium séminifère, jouent un rôle important dans la spermatogenèse : la nutrition des cellules germinales et la production d'hormones. De par leur présence sur toute la hauteur de l'épithélium séminifère, elles compartimentent ce dernier en deux parties par l'intermédiaire de jonctions serrées : un compartiment basal et ad-luminal. Elles contrôlent ainsi le passage des cellules germinales d'un compartiment à l'autre, en régulant leur prolifération et leur métabolisme.

2.2 L'épididyme, lieu de maturation et de stockage des spermatozoïdes

L'épididyme correspond au lieu de maturation et de stockage des spermatozoïdes. Il permet l'acquisition de la mobilité, l'achèvement de la compaction de la chromatine nucléaire, l'aptitude à reconnaître la zone pellucide et à fusionner avec la membrane ovocytaire. Il s'agit notamment de la mise en place de protéines membranaires, qui inhibent le phénomène de capacitation avant leur passage dans les voies génitales féminines.

L'épididyme assure des fonctions de transport et de maturation des spermatozoïdes, il est composé de trois parties que sont la tête, le corps et la queue. C'est au niveau de la queue de l'épididyme que sont stockés les spermatozoïdes. Le transit des spermatozoïdes dans l'épididyme varie selon la fréquence éjaculatoire, de 2 à plus de 8 jours. La carnitine libre, l'alpha 1-4 glucosidase, la glycérophosphorylcholine sont les marqueurs biochimiques spécifiques de l'épididyme.

2.3 Les voies excrétrices des spermatozoïdes

À partir des tubes séminifères, les spermatozoïdes transitent dans les tubes droits, puis le *rete testis*, les canaux efférents, jusqu'à l'épididyme. Le canal déférent fait suite à l'épididyme, il devient le canal éjaculateur lorsqu'il chemine dans l'épaisseur de la glande prostatique, pour s'aboucher à la face postérieure de l'urètre. L'urètre se compose de trois parties que sont l'urètre prostatique, membraneux et spongieux.

2.4 Les glandes annexes de l'appareil reproducteur masculin

Les vésicules séminales sont des organes pairs, et correspondent à des glandes exocrines. Ses sécrétions représentent 60% du volume de l'éjaculat, de pH alcalin (7,5 à 8) et sont constituées de fructose, glucose, prostaglandines, peptides, enzymes (anhydrase carbonique), protéines, etc.

La prostate, organe impair sous vésical, est une glande tubulo-alvéolaire à l'origine d'une sécrétion riche en acides organiques (citrate), albumine, phosphatases acides, et ions (Mg, Zn, Ca), qui représentent 30% du volume de l'éjaculat qu'elle déverse au niveau de l'urètre prostatique. Ses sécrétions sont basiques et possèdent des propriétés antibactériennes et antioxydantes.

Les glandes de Cowper ou glandes bulbo-urétrales, sont responsables d'une sécrétion mucoïde qui a un rôle lubrificateur au niveau du segment initial de l'urètre spongieux.

3 - La spermatogenèse

La spermatogenèse correspond à l'ensemble des phénomènes qui ont lieu depuis les spermatogonies jusqu'aux spermatozoïdes. Elle se déroule physiologiquement à une température de 32 à 35°C, dans la paroi des tubes séminifères, eux-mêmes contenus dans des lobules à l'intérieur des testicules. Elle débute dès la puberté chez l'homme, puis reste un phénomène physiologique continu tout au long de la vie de l'individu. Elle englobe un cycle qui dure 74 jours. Elle débute par un processus de mitoses goniales, puis de divisions cellulaires ou méiose et se termine par la spermiogenèse, le tout de façon centripète (Figure 5).

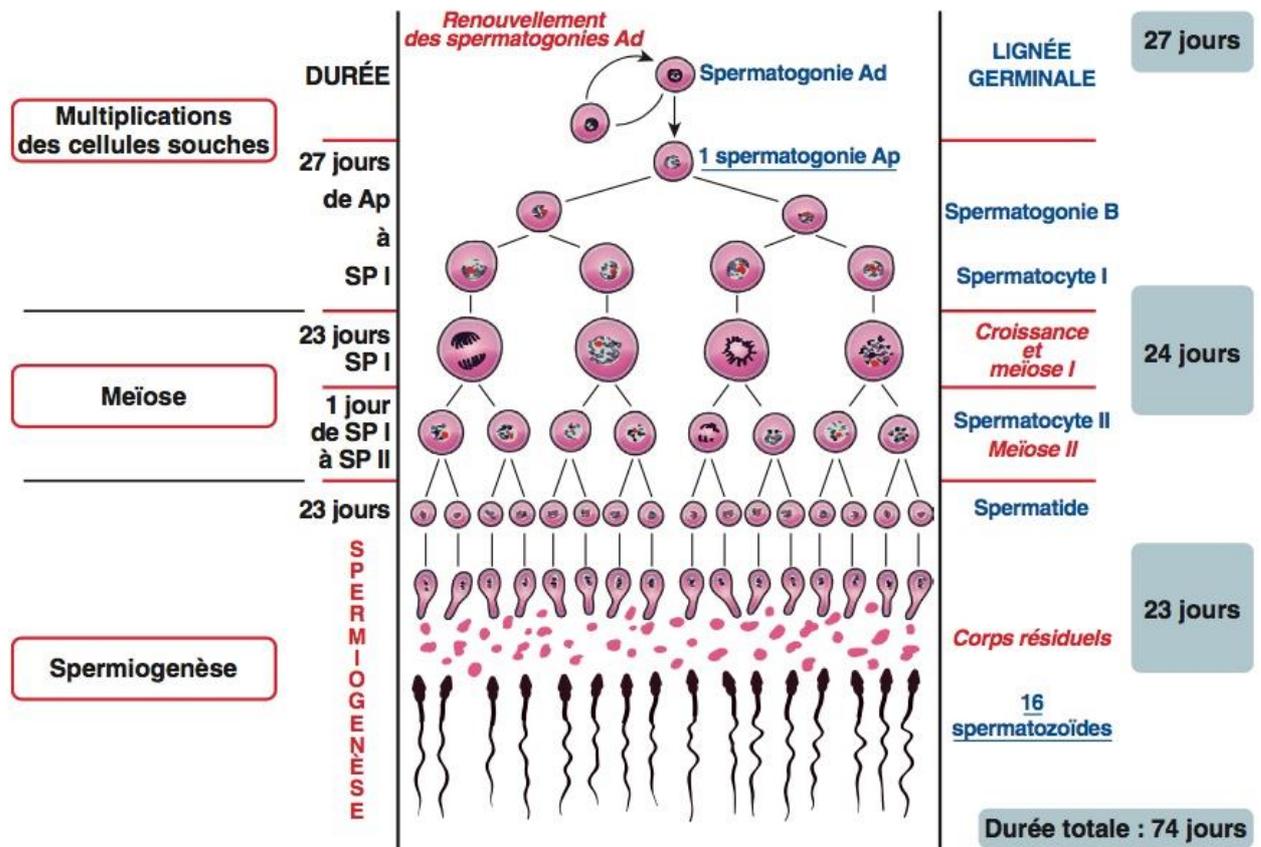


Figure 5 : La spermatogenèse, durée et rendement (d'après R. Frydman 2016)

3.1 La multiplication des cellules souches

Les spermatogonies sont des cellules souches diploïdes, situées en périphérie de la paroi des tubes séminifères. Elles se multiplient par mitose et il faut compter 27 jours pour compléter une multiplication goniale. Trois types sont à différencier en fonction des caractéristiques de leur noyau en microscopie photonique ou électronique. Les spermatogonies Ad (d pour dark) assurent l'auto-renouvellement des spermatogonies par divisions mitotiques. En se divisant par mitose elles donnent deux spermatogonies filles : une spermatogonie Ad contribuant à renouveler le stock de cellules souches et une spermatogonie Ap (p pour pâle). Une spermatogonie Ap donnera par division mitotique deux spermatogonies B (à chromatine mottée et irrégulière). Ces spermatogonies B ont une activité transcriptionnelle intense, elles donneront par division mitotique les spermatocytes I (ou spermatocytes de premier ordre).

3.2 La méiose

La méiose dure 24 jours, et comprend deux divisions : la méiose I dite réductionnelle et la méiose II dite équationnelle.

Les spermatocytes I débutent leur première division méiotique, en entamant directement la phase S (phase pré-leptotène de la méiose, où ils dédoublent leur contenu en ADN). Puis ils entament la prophase I répartie en 5 stades : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacynèse. Les chromosomes homologues s'apparient puis, au stade pachytène, ils échangent, par crossing-over, du matériel génétique entre chromosomes homologues. Lors de la métaphase I, ils restent liés au niveau des chiasmas et les chromosomes homologues se disposent de part et d'autre de la plaque équatoriale. Lors de l'anaphase I, les chromosomes homologues migrent vers les pôles. À l'issue de cette division méiotique réductionnelle, le spermatocyte I donne deux spermatocytes II (ou spermatocytes de deuxième ordre) qui contiennent alors 23 chromosomes avec deux chromatides (n chromosomes, 2n ADN). Ceux-ci vont entrer en deuxième division méiotique.

La deuxième division de méiose survient après une interphase courte. La durée de la prophase étant plus courte que lors de la méiose I, la méiose II est plus rapide. Les spermatocytes II ont donc une existence très brève (24h). Lors de la métaphase II, les chromosomes s'alignent sur la plaque équatoriale, puis lors de l'anaphase II, il y a séparation des chromatides sœurs de façon aléatoire à chacun des pôles. En conséquence de la cytotélerèse, deux spermatides sont obtenues, contenant chacune 23 chromosomes avec une seule chromatide (n chromosomes, n ADN).

3.3 La spermiogenèse

À partir du stade spermatide c'est l'étape de la spermiogenèse durant 23 jours, qui va compléter la fin de la spermatogenèse. Il s'agit de la différenciation des spermatides en spermatozoïdes ; elle ne comporte pas de division cellulaire. Les spermatides passent par plusieurs étapes de modifications morphologiques (Figure 6) :

- La condensation de la chromatine : elle est progressive tout au long de la spermiogenèse. La majorité des histones est remplacée par des nucléoprotéines de transition puis par des protamines (cf « 1 - Organisation de la chromatine spermatique » p48).

- La formation de l'acrosome : les vésicules de l'appareil de Golgi vont confluer et fusionner ensemble afin de former la vésicule pro-acrosomique à l'origine de l'acrosome, qui recouvre les deux tiers antérieurs du noyau. Il contient des enzymes (hyaluronidase, acrosine, etc.) qui sont relarguées entre la membrane cellulaire et la membrane acrosomique externe lors de la liaison à la zone pellucide de l'ovocyte qui déclenche la réaction acrosomiale.
- La formation du flagelle : c'est à partir du centriole distal que se formera l'axonème, ensemble de doublets de microtubules, autour duquel s'organisent des structures péri-axonémales. En même temps que celui-ci s'allonge, la membrane cellulaire glisse en direction du flagelle naissant en entraînant cytoplasme et mitochondries qui vont former un manchon autour du flagelle du spermatozoïde. Les mitochondries vont se regrouper dans la pièce intermédiaire.
- L'élimination du cytoplasme résiduel : celui-ci étant phagocyté par la cellule de Sertoli.

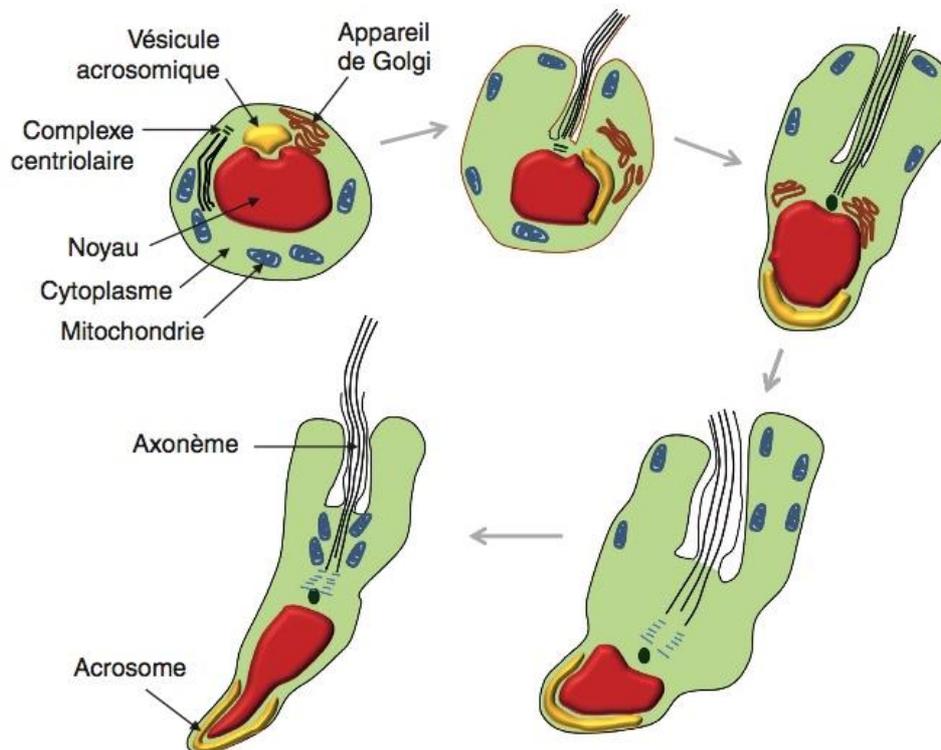


Figure 6 : La spermiogenèse (d'après Tachdjian et al. 2016)

La spermiation correspond à l'étape où ils sont libérés dans la lumière du tube séminifère, la spermatogenèse est ainsi achevée.

3.4 Les spermatozoïdes

Ce sont les cellules obtenues à la fin de la spermiogenèse, ils mesurent environ 50-60 μm de long. La tête du spermatozoïde est pyriforme (4-5 μm de long sur 2-3 μm de large), elle contient le noyau qui est coiffé de l'acrosome. Le col la sépare du flagelle qui est constitué de la pièce intermédiaire (4-5 μm), puis de la pièce principale (45 μm) et de la pièce terminale (1-2 μm) (Figure 7). Même s'il a acquis sa morphologie définitive à cette étape, sa maturation n'est pas encore achevée. Ce n'est qu'après un transit dans l'épididyme de 2 à plus de 8 jours qu'il aura acquis une mobilité progressive et la capacité de reconnaître et se lier à la zone pellucide.

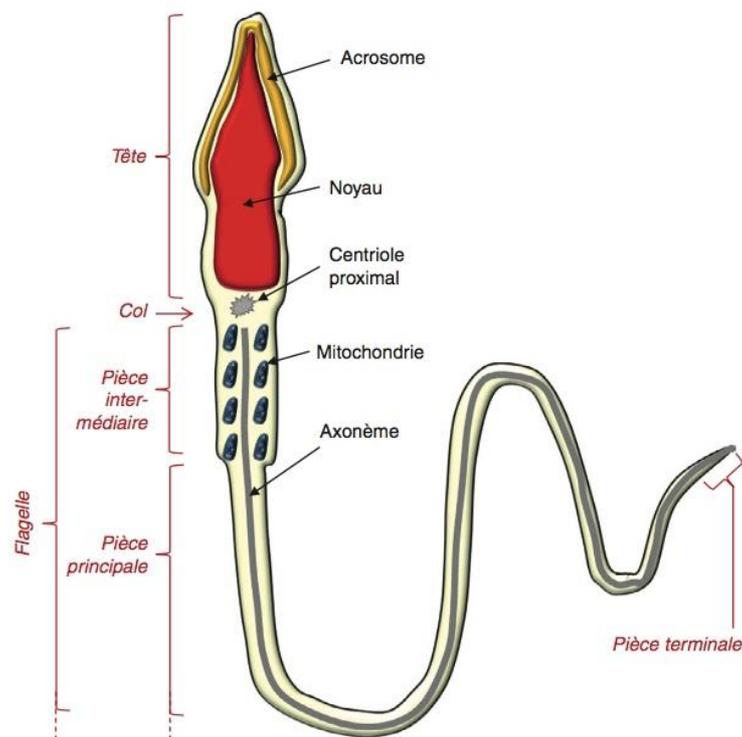


Figure 7 : Structure d'un spermatozoïde (d'après Tachdjian et al. 2016)

3.5 La cinétique et régulation de la spermatogenèse

Dès la puberté, la production de spermatozoïdes est continue. Elle induit l'arrêt des mitoses des cellules de Sertoli, la formation de la barrière hémato-testiculaire sous l'action des androgènes. Les cellules souches germinales sont programmées pour entrer en division par un phénomène de « vagues spermatogénétiques » tous les 16 jours chez l'homme. Du compartiment basal du tube séminifère jusqu'à sa lumière, se forment des associations

cellulaires traduisant ce phénomène de division, où différentes générations de cellules germinales sont disposées dans les tubes selon des hélices concentriques.

Les différents types cellulaires au sein du testicule sont sous la dépendance des hormones hypophysaires FSH, LH et prolactine. La sécrétion pulsatile de GnRH (Gonadotrophin-releasing hormone) au niveau hypothalamique induit la sécrétion de FSH et de LH. La LH est indispensable au démarrage de la spermatogenèse lors de la puberté, alors que la FSH renforce son action. Puis chez l'adulte, la testostérone joue un rôle important dans le maintien de la spermatogenèse. La prolactine joue un rôle d'amélioration de la spermatogenèse, elle permet d'augmenter le nombre de récepteurs à la LH au niveau des cellules de Leydig, ainsi que la fixation de la LH à ses récepteurs, augmentant la synthèse de la testostérone. La sécrétion de FSH et de la LH subit un rétrocontrôle au niveau hypothalamo hypophysaire par des hormones testiculaires (principalement les stéroïdes sexuels et l'inhibine B). L'inhibine B réduit la synthèse et la libération de la FSH. Ainsi les stéroïdes produits par les cellules de Leydig exercent un rétrocontrôle de la LH, mais aussi de la FSH avec l'inhibine (Figure 8). La FSH stimule la division des spermatogonies alors que les androgènes intratesticulaires agissent lors de la méiose et de la spermiogenèse par l'intermédiaire des cellules de Sertoli.

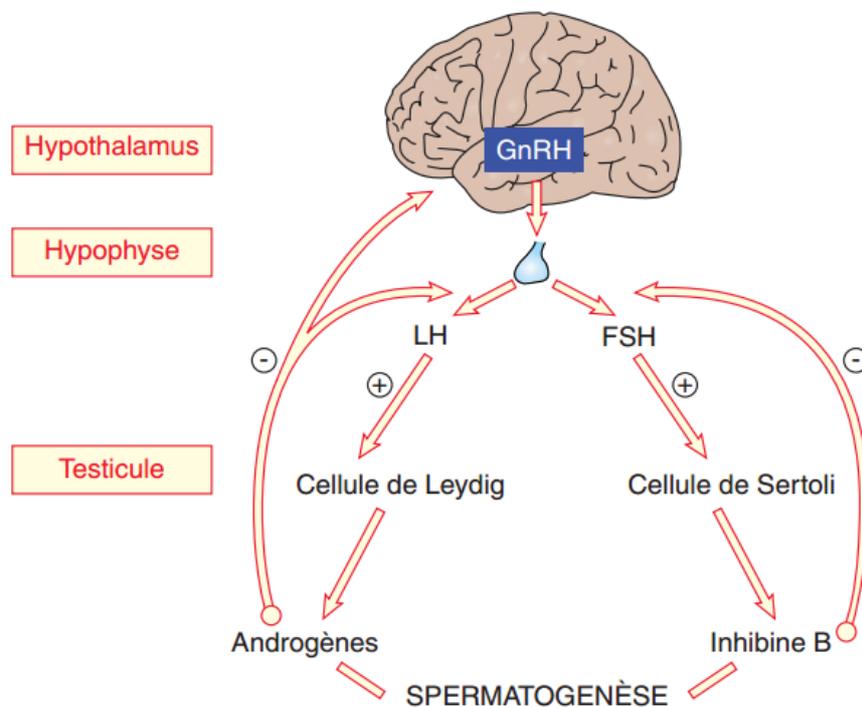


Figure 8 : La régulation hormonale de la spermatogenèse (d'après Ravel et al. 2009)

II - L'infertilité masculine

Dans cette partie nous définirons l'infertilité masculine, ses principales étiologies, les moyens pour les explorer et les techniques actuelles de prise en charge en Aide Médicale à la Procréation (AMP).

1 - Définition

En touchant environ un couple sur six en France, l'infertilité est un motif fréquent de consultation. Ses étiologies sont multiples et touchent autant la femme que l'homme. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit l'infertilité par l'absence de conception après au moins douze mois de rapports non protégés (Zegers-Hochschild et al. 2009). Cette définition est à adapter en fonction de l'âge de la femme et des antécédents des deux membres du couple. Concernant la population masculine, environ 30 millions d'entre eux à travers le monde seraient infertiles. Un facteur purement masculin est responsable de l'infertilité du couple dans 20-30% des cas (Agarwal et al. 2015).

2 - Les principales étiologies

Les causes d'infertilité masculine sont variées et souvent multifactorielles. Dans 61% des cas elles se traduisent par une anomalie quantitative et/ou qualitative du sperme (Thonneau et al. 1991).

Il se distingue de façon générale les pathologies dites sécrétoires (ou non obstructives) des pathologies excrétoires (ou obstructives), en tenant compte du fait que ces deux origines pathologiques peuvent s'associer pour donner une forme dite mixte. Cinq grands mécanismes peuvent être distingués : les troubles érectiles, éjaculatoires et sexuels, les causes endocriniennes, testiculaires, obstructives séminales et les altérations fonctionnelles des spermatozoïdes (Schlosser et al. 2007).

L'absence d'éjaculation intravaginale ne permet pas la fécondation en période périovulatoire de la femme, l'incapacité à mener un rapport sexuel peut être conséquent d'une insuffisance érectile, d'une anéjaculation, une éjaculation rétrograde ou bien de troubles balistiques dus à une malformation pénienne. Elle peut aussi correspondre à un trouble d'ordre psychologique.

Parmi les causes endocriniennes, il s'agit des pathologies responsables d'un hypogonadisme hypogonadotrophique, par atteinte congénitale génétique, anatomique tumorale, traumatique, ischémique (drépanocytose) ou toxique (drépanocytose, hémochromatose, β -thalassémie). L'axe hypothalamohypophysaire est sensible à l'effet freinateur de nombreux médicaments tels que les estrogènes (élevés en cas d'hyperthyroïdie, obésité et éthyliste chronique), androgènes (origine tumorale, hyperplasie congénitale des surrénales, hypothyroïdie) et la prolactine (origine tumorale).

Au niveau testiculaire, toute lésion traumatique et ischémique (torsion du cordon spermatique, chirurgie, varicocèle), hyperthermie, exposition aux rayonnements ionisants ou aux toxiques environnementaux ou médicamenteux, peut altérer sa fonction exocrine. Il en est de même pour les causes génétiques, parmi les hommes infertiles, où une anomalie chromosomique explicative est retrouvée dans 5,8% des cas. Cette anomalie concerne les chromosomes sexuels ou gonosomes dans 4,2% des cas et les autosomes dans 1,5% des cas (Johnson et al. 1998). Nous développerons les origines génétiques des infertilités masculines dans la partie «*Anomalie chromosomique de structure et infertilité masculine* » (p27).

Les obstructions des voies génitales se retrouvent dans la forme congénitale de la mucoviscidose qu'est l'agénésie vésiculodéférentielle congénitale bilatérale, par des mutations du gène CFTR. L'obstruction acquise peut être la conséquence d'un processus tumorale, infectieux ou iatrogène, par chirurgie loco-régionale.

Enfin, les spermatozoïdes peuvent présenter des anomalies congénitales structurales tels que les dyskynésies ciliaires primitives et le syndrome de Young, ou bien des anomalies congénitales acquises (auto-immunisation, toxiques médicamenteux) pouvant limiter leur mobilité et leur pouvoir fécondant.

3 - Les techniques d'exploration

Dans l'exploration d'une infertilité chez un couple, l'homme et la femme sont associés à égalité dans la recherche du diagnostic. Dans cette partie, nous nous consacrerons plus particulièrement à l'exploration masculine.

L'anamnèse est le premier temps exploratoire. Il s'agit d'interroger le patient sur la présence de facteurs de risques d'infertilité, afin de mieux orienter le temps dédié à l'examen clinique et à la prescription d'examen complémentaires qui suivra. Ainsi, il faut s'informer du mode de vie et de la profession (exposition à la chaleur, aux produits toxiques), d'une exposition au

tabac, d'une consommation d'alcool ou de drogue. Il sera recherché aussi l'existence d'un traitement médicamenteux qui pourrait avoir un effet néfaste sur le sperme. Les antécédents familiaux, médicaux, chirurgicaux et plus particulièrement au niveau génital et urinaire (infection génitale ou urinaire, cryptorchidie ou hernie inguinale dans l'enfance, traumatisme ou torsion testiculaire, etc.) seront explorés.

S'en suit un examen clinique orienté en fonction de l'anamnèse. De base, il comprend la recherche d'une gynécomastie et de signes d'hypogonadisme (telle qu'une pilosité insuffisante par exemple). Les organes génitaux externes sont examinés : la verge (taille et abouchement de l'urètre à la recherche d'un hypospadias), les testicules (mesure du volume à l'orchidomètre, évaluation de leur consistance), la palpation des épididymes et des canaux déférents, la recherche d'une varicocèle.

Puis, l'analyse de première intention pour évaluer la fertilité masculine correspond en la prescription d'un spermogramme. En fonction de l'anamnèse et de l'examen clinique, d'autres examens complémentaires pourront l'accompagner. Si une anomalie ressort de l'analyse spermatique, celle-ci devra être confirmée par un second prélèvement.

Parmi les examens complémentaires, se trouvent des dosages hormonaux (FSH, testostérone, inhibine B) et des dosages de marqueurs du liquide séminal, des examens d'imagerie telle qu'une échographie scrotale et intra-rectale pour mettre en évidence le carrefour vésiculo-déférentiel. D'autres examens complémentaires plus approfondis pourront venir compléter ce bilan, tel qu'un bilan génétique (caryotype lymphocytaire, recherche de microdélétion du chromosome Y, etc.)

L'exploration méthodique de l'infertilité chez l'homme permet souvent d'arriver au diagnostic d'une des différentes étiologies (Figure 9), même si à l'issue de cette exploration elle reste idiopathique dans 30 à 45% des cas (Jungwirth et al. 2012).

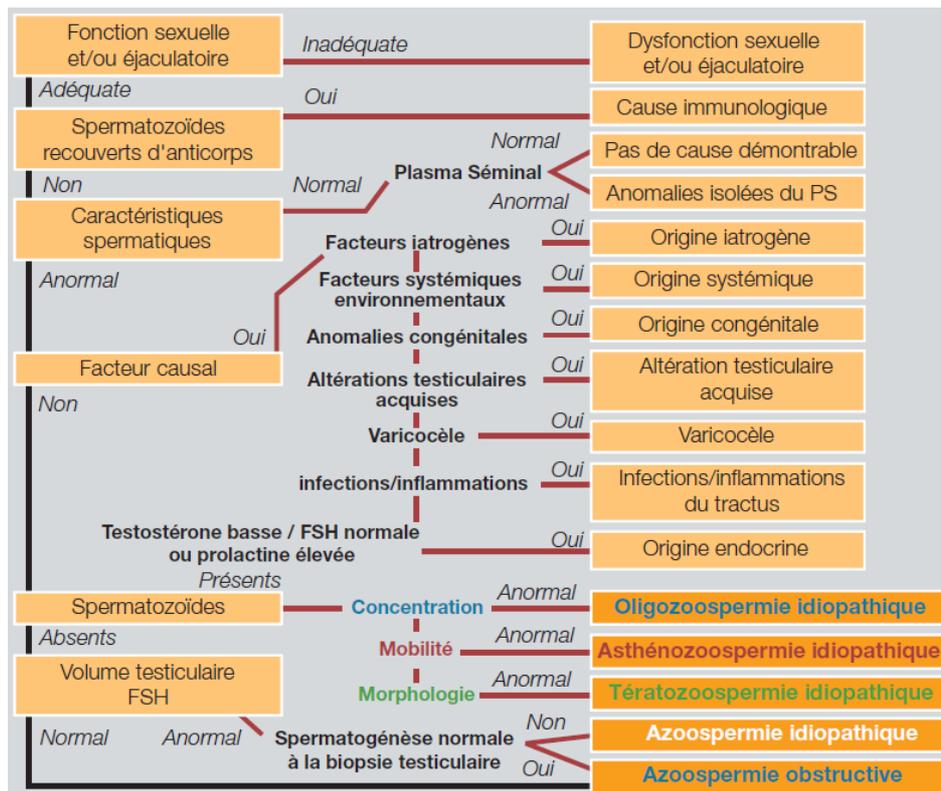


Figure 9 : Arbre diagnostique des différentes étiologies des infertilités masculines (d'après Bioforma, 2009)

4 - Prise en charge de l'infertilité masculine en AMP

Une fois le bilan d'infertilité du couple établi, une orientation vers une technique d'Aide Médicale à la Procréation (AMP) est envisageable. Plusieurs techniques existent, telles que l'induction simple de l'ovulation de la femme, l'insémination intra-utérine (IIU), les techniques de fécondation *in vitro* (FIV).

Les inductions simples de l'ovulation sont indiquées dans certains troubles de l'ovulation.

Les IIU avec sperme du conjoint sont souvent indiquées dans le cadre d'infertilité cervicale, d'hypofertilité masculine, de troubles empêchant un rapport sexuel complet, d'infertilité inexpliquée, etc.

Les techniques de FIV consistent à reproduire en laboratoire spécialisé en AMP le déroulement du développement embryonnaire dans la première semaine ayant lieu

normalement dans les trompes de la femme. Il s'agit de la fécondation (fusion d'un ovocyte et d'un spermatozoïde) et du développement embryonnaire pré-implantatoire. Deux techniques de FIV existent : la fécondation *in vitro* classique (FIVc) et la fécondation *in vitro* avec micro-injection de spermatozoïde (FIV-ICSI). Le bilan d'infertilité du couple, les paramètres spermatiques initiaux et la qualité de la préparation spermatique finale orienteront le choix entre ces deux techniques.

Parallèlement à la ponction ovarienne réalisée au bloc opératoire, le recueil de sperme est effectué au laboratoire par masturbation. Plusieurs techniques de préparation afin de sélectionner les spermatozoïdes progressifs existent et seront abordés dans la partie «*Techniques de sélection des spermatozoïdes en AMP*» (p57).

➤ **La fécondation *in vitro* classique (FIVc) :**

Quelques heures après la ponction, les complexes cumulo-ovocytaires recueillis sont mis à inséminer avec une préparation de spermatozoïdes.

➤ **La fécondation *in vitro* avec micro-injection de spermatozoïde (FIV-ICSI) :**

Les complexes cumulo-ovocytaires sont décoronisés par exposition à une enzyme (la hyaluronidase), puis mécaniquement par refoulement-aspiration via une micropipette de 200µl. Les ovocytes sont dénudés et leurs degrés de maturation peuvent ainsi être évalués au microscope inversé : seuls les ovocytes en métaphase II sont microinjectés (présence du premier globule polaire) avec un microscope inversé équipé de micromanipulateurs permettant un grossissement à x 400. Un spermatozoïde est sélectionné selon des critères de morphologie typique et de mobilité progressive, et sera microinjecté dans le cytoplasme ovocytaire.

De façon générale, une FIV-ICSI sera indiquée lorsque qu'il sera récupéré moins de 500 000 spermatozoïdes mobiles après préparation du sperme (Barrière, 2008), si des anticorps anti-spermatozoïdes sont présents, dans un contexte d'échec de FIVc, l'utilisation de spermatozoïdes testiculaires ou épидидymaires ou bien de sperme cryocongelé.

Anomalie chromosomique de structure et infertilité masculine

En raison de leur possible transmission à la descendance, il apparaît important de bien connaître les mécanismes des infertilités d'origine chromosomique, d'autant plus lors d'une prise en charge en AMP, pour permettre au couple de réaliser leur projet parental au meilleur des connaissances actuelles. Les hommes porteurs d'un réarrangement chromosomique présentent souvent des troubles de la spermatogenèse qui les mènent à consulter en AMP. La première question qui se pose chez ces patients est l'évaluation du risque chromosomique pour leur descendance. Une évaluation de ce risque est possible en effectuant une FISH sur noyaux spermatiques (Spriggs and Martin 1994; Rousseaux et al. 1995). Ainsi le pourcentage de spermatozoïdes normaux ou équilibrés évalué en plus d'un conseil génétique personnalisé permettra de mieux adapter la conduite à suivre.

I - Anomalies chromosomiques et infertilité masculine

Chez l'homme, les anomalies chromosomiques correspondent aux anomalies d'origine génétique les plus fréquemment retrouvées avec des troubles de la spermatogenèse. Deux principaux groupes peuvent ainsi être définis : les anomalies de nombre des chromosomes (ou aneuploïdies) et les anomalies de structure des chromosomes. L'expression de ces anomalies est très variable. Parfois elles peuvent être associées à un syndrome clinique, ou elles peuvent se traduire par un phénotype d'infertilité uniquement.

1 - Anomalies chromosomiques de nombre

Le syndrome de Klinefelter

Le syndrome de Klinefelter touche en moyenne 1/660 hommes (Bojesen and Gravholt 2007). Il se traduit par la mise en évidence au caryotype d'une formule à 47,XXY homogène dans la plupart des cas, qui peut être aussi en mosaïque 47,XXY/46,XY dans environ 10% des cas (Ravel et al. 2011). Deux origines de ce syndrome sont mises en avant : une non disjonction d'origine maternelle ou paternelle le plus souvent, ou bien une erreur mitotique post-zygotique plus rarement (3% des cas) (Smyth and Bremner 1998). Les spermatogonies sont présentes à des taux normaux pendant la première année de vie puis diminuent pendant l'enfance jusqu'à pratiquement disparaître à la puberté (Aksglaede et al. 2006). Les premiers signes histologiques pathologiques au niveau testiculaire sont la fibrose et la hyalinisation des

tubules séminifères, ayant pour conséquence l'instauration d'une oligospermie souvent sévère et plus souvent une azoospermie. Parmi les patients azoospermiques, le syndrome de Klinefelter à une prévalence de 11%, et parmi les patients oligoasthénotérazoospermiques (OAT) il a une prévalence de 0,7%. Dans les formes mosaïques, l'atteinte de la spermatogenèse est partielle, des foyers de spermatogenèse peuvent être conservés à l'origine le plus souvent d'oligospermie. Alors qu'au début de l'AMP, il était recommandé des inséminations artificielles avec sperme de donneur (IAD) ou l'adoption à ces hommes, l'arrivée de l'ICSI dans les années 1990 a bouleversé leur prise en charge en offrant une possibilité de paternité biologique : celle-ci peut s'appliquer dans les rares cas d'oligospermie, et plus généralement par la procédure de TESE-ICSI (TEsticular Sperm Extraction) en cas d'azoospermie. En effet, dans 50% des azoospermies par trouble de la spermatogenèse, une spermatogenèse focale subsiste, et des spermatozoïdes testiculaires peuvent être extraits par biopsie testiculaire. Des patients atteints du syndrome de Klinefelter ont des gamètes souvent chromosomiquement normaux et face aux nombreux enfants nés de père Klinefelter les professionnels de l'AMP sont plus rassurants. La procédure de TESE-ICSI a permis d'obtenir des naissances d'enfants en bonne santé (Tournaye et al. 1996). Il est retrouvé 1,6% d'anomalies chromosomiques *de novo* pour les conceptus obtenus en ICSI, par rapport au 0,5% d'anomalies dans la population générale (Bonduelle et al. 2002). Cependant les patients doivent être informés que leur spermatogenèse ne se déroule pas dans un environnement hormonal favorable et que cela peut favoriser des erreurs de ségrégation méiotique (Mroz et al. 1999; Hennebicq et al. 2001; Vialard et al. 2012).

Le syndrome 47,XYY

Ce syndrome concerne en moyenne 1-4/1000 hommes. La plupart sont fertiles, quelques études suggérant que le chromosome Y supplémentaire serait perdu avant la méiose (Rives et al. 2005; Moretti et al. 2007). Cependant des lésions histologiques ont été décrites au niveau de la gonade pouvant altérer la spermatogenèse (Ushijima et al. 2000). De même, plusieurs études ont montré une association entre syndrome 47,XYY et infertilité, et dans ces cas, une incidence élevée de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés dans l'éjaculat de ces hommes est mise en évidence (Chevret et al. 1997; Wong et al. 2008; Stochholm et al. 2010). Il n'y a pas de manifestations cliniques spécifiques à ce syndrome, et son diagnostic est souvent tardif. Environ 15% de patients sont diagnostiqués vers l'âge médian de 17,1 ans (Stochholm et al. 2010).

Le syndrome 46,XX

Ce syndrome très rare concerne 1/20 000 hommes en moyenne. À l'origine, il s'agit, dans plus de 90% des cas, d'une recombinaison méiotique entre les chromosomes X et Y paternels avec un passage du gène SRY (Sex determining Region Y chromosome) sur le chromosome X. Le tableau clinique de ces hommes varie d'une complète masculinisation à des ambiguïtés génitales correspondant le plus souvent à un testicule non descendu, un micropénis ou un hypospadias (Vorona et al. 2007).

2 - Anomalies chromosomiques de structure

Les translocations

Une translocation chromosomique se définit par un échange de matériel chromosomique entre deux chromosomes non homologues suite à des cassures sur chacun des chromosomes impliqués. Une translocation équilibrée correspond à un réarrangement qui est sans conséquence sur le plan génique, et une translocation déséquilibrée correspond à un déséquilibre quantitatif du matériel génétique. La translocation robertsonienne et la translocation réciproque équilibrée sont les translocations les plus fréquentes. Alors que ces patients ont un phénotype tout à fait normal, ils peuvent avoir des paramètres spermatiques perturbés, par exemple une oligozoospermie (Vincent et al. 2002).

➤ Translocation robertsonienne

Les translocations robertsonienne correspondent à une fusion de deux chromosomes acrocentriques, que sont les chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22. Le caryotype d'un homme porteur d'une translocation robertsonienne comprend donc 45 chromosomes. Cette fusion se fait au niveau centromérique avec une perte des bras courts et une fusion des bras longs pour former un chromosome dérivé (Figure 10). La perte des bras courts est sans conséquence pour le porteur de l'anomalie car il s'agit d'une région riche en séquences répétées correspondant à des gènes codant des ARN ribosomiques. Il s'agit de l'anomalie chromosomique de structure la plus fréquente, elle concerne environ 1% des hommes infertiles et est souvent associée à une oligozoospermie ou une azoospermie (De Braekeleer and Dao 1991). Les translocations

(13;14) et (15;21) sont plus souvent observées, avec une fréquence de 73% et 10% respectivement (Therman et al. 1989).

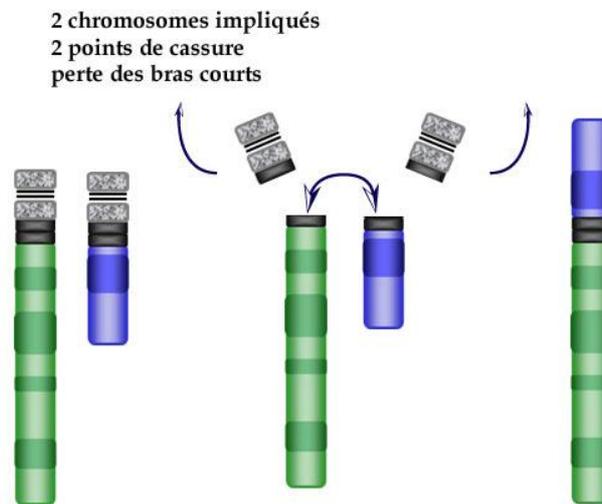


Figure 10 : Exemple d'une translocation robertsonienne consistant en la perte des bras courts puis la fusion des grands bras restants de deux chromosomes acrocentriques au niveau de leur centromère

Les hommes porteurs d'une translocation robertsonienne ont un phénotype normal (Egozcue et al. 2000). Une fécondation obtenue à partir d'un spermatozoïde chromosomiquement déséquilibré peut mener à un échec d'implantation, une fausse-couche, des malformations congénitales ou la naissance d'un enfant atteint de trisomie 21 ($46,XY,rob(14;21)(q10;q10),+21$) ou d'une trisomie 13 ($46,XY,+13,rob(13;14)(q10;q10)$) (Neri et al. 1983; Lindenbaum et al. 1985).

➤ **Translocation réciproque équilibrée**

Les translocations réciproques correspondent en l'échange de segments terminaux entre deux chromosomes non homologues par cassure sur chacun des chromosomes impliqués. Elle est dite équilibrée car il n'y a ni perte ni gain de matériel chromosomique lors de cet échange (Figure 11).

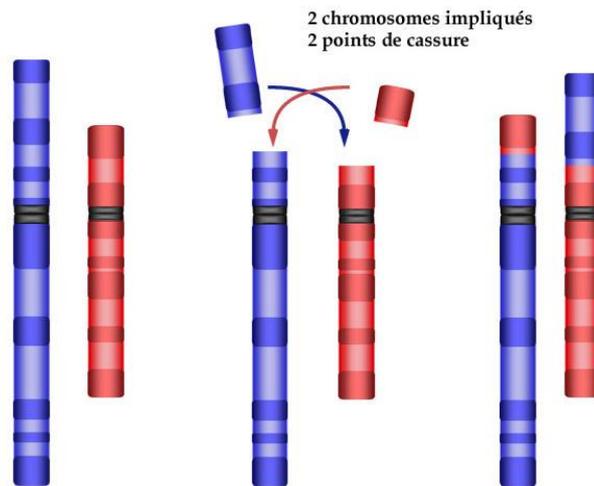


Figure 11 : Exemple d'une translocation réciproque équilibrée

Il s'agit de la seconde anomalie chromosomique de structure la plus fréquente, elle concerne environ 1/1175 naissances (De Braekeleer and Dao 1991). Plusieurs études ont montré que le taux de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés chez les porteurs de translocation réciproque équilibrée varie de 19% à plus de 80% (Morel et al. 2004; Anton et al. 2007; Cassuto et al. 2011). C'est en fonction du type de chromosomes impliqués et plus particulièrement de la taille des segments transloqués, la position du centromère, ainsi que la localisation des points de cassure qui peuvent expliquer l'éventail de ces variations (Morel et al. 2004).

Inversion

Il s'agit d'un réarrangement qui ne concerne qu'un seul chromosome : suite à deux cassures chromosomiques, la partie médiane du chromosome s'inverse pour se réinsérer à la même place. Il existe deux types d'inversion que sont l'inversion paracentrique (deux cassures sur le même bras chromosomique) et péricentrique (deux cassures avec une de chaque côté du centromère, aboutissant à une modification de l'indice centromérique le plus souvent).

Le nombre de gènes n'est pas affecté et le phénotype du porteur est normal. Cependant, lors de la méiose, le chromosome ayant une inversion doit créer une boucle d'inversion pour pouvoir s'apparier correctement avec son chromosome homologue, pouvant aboutir à la formation de gamètes chromosomiquement déséquilibrés.

Marqueur chromosomique surnuméraire (MCS)

Les marqueurs chromosomiques surnuméraires correspondent à des chromosomes additionnels de structure anormale. Son origine ne peut être déterminée par les techniques de cytogénétique conventionnelle. Sa fréquence est estimée entre 0,028% et 0,15% avec une origine parentale dans 30% des cas. Ils peuvent dériver d'un gonosome, autosome, mais le plus souvent d'un chromosome acrocentrique. Certains MCS sont sans conséquence phénotypique alors que d'autres peuvent appartenir à un syndrome bien défini (syndrome de Pallister-Killian, tétrasomie 18p) (Douet-Guilbert et al. 2008; Samri et al. 2013).

Réarrangements chromosomiques complexes (CCR)

Un réarrangement chromosomique complexe correspond à au moins trois points de cassure et trois chromosomes impliqués. Il en existe une grande variété, ce qui rend difficile l'élaboration d'une classification. Le phénotype est normal chez 70% des sujets présentant un CCR, 20-25% présentent des atteintes congénitales (syndrome polymalformatif et/ou retard mental) et dans 5-10% des cas, le diagnostic est établi en période anténatale. Environ 30% de CCR sont familiaux, et la transmission est d'origine maternelle en majorité. Une apparition *de novo* survient dans 70% des cas, et dans ces situations c'est l'origine paternelle qui est le plus souvent incriminée (Gatinois et al. 2014).

Autres anomalies de structure concernant les gonosomes

Les patients porteurs d'isochromosome Y : ils présentent des phénotypes variables d'infertilité, avec un tableau clinique allant d'un phénotype féminin de type Turner à un phénotype masculin avec azoospermie et ambiguïté sexuelle. Ils sont la conséquence de recombinaisons inter-chromatidiennes, probablement dues à des séquences d'orientation inverse sur le chromosome Y. Il en existe plusieurs types en fonction du point de cassure : un isochromosome dicentrique correspond à une cassure survenant au niveau du bras court ou long, alors que si la cassure intervient au niveau du centromère, le chromosome reste monocentrique.

Les patients porteurs d'un chromosome Y en anneau : ils ont un phénotype normal mais sont azoospermes, on retrouve une cassure au niveau du chromosome Y dans 90% des cas proche de la région AZF (AZoospermia Factor). Le chromosome Y est refermé sur lui-même par ses

bras courts et longs suite à une cassure chromosomique. Du fait des différentes tailles des anneaux de l'Y possibles, et de l'association à une mosaïque plus ou moins importante, le phénotype de ces patients peut être très variable, surtout lorsqu'il s'agit d'hommes : il peut alors se traduire par une petite taille avec infertilité, une taille normale et une atteinte testiculaire modérée, voire une fertilité normale.

II - Ségrégation méiotique et risque pour la descendance

Au cours de la méiose, les chromosomes s'apparient pour former des bivalents, des échanges par crossing-over ont alors lieu, puis les bivalents se séparent pour que chaque homologue migre dans une cellule fille différente. Cette étape de recombinaison et de séparation peut être perturbée par la présence d'une anomalie chromosomique, à l'origine d'une mal ségrégation des chromosomes homologues. Dans cette partie nous nous intéresserons plus particulièrement au mécanisme de ségrégation méiotique des deux translocations les plus fréquentes : la translocation robertsonienne et la translocation réciproque équilibrée.

1 - Translocation robertsonienne

Au cours de la prophase de la première division méiotique (méiose I), le chromosome portant la translocation (chromosome dérivé) et les deux autres chromosomes homologues normaux vont former un trivalent. Ce trivalent peut théoriquement être en configuration *cis* ou *trans*, mais seul la configuration *cis* est observée (Vidal et al. 1982; Templado et al. 1984).

À partir de ce trivalent, les chromosomes homologues vont se séparer soit via le mode de ségrégation alterne, adjacent ou 3:0 (Figure 12).

- **Le mode de ségrégation alterne** est à l'origine de spermatozoïdes chromosomiquement normaux (les deux chromosomes acrocentriques normaux migrent dans un spermatocyte II), et de spermatozoïdes chromosomiquement équilibrés (le chromosome dérivé migre dans l'autre spermatocyte II). Plusieurs études ont montré que le mode alterne est le mode de ségrégation méiotique prédominant. Il représente 70 à 91,2% des spermatozoïdes d'un éjaculat (Ogur et al. 2006; Perrin et al. 2010; Cassuto et al. 2011). La prédominance de ce mode peut être expliqué par le fait

que lors de la première division méiotique, la configuration en mode *cis* est observée (Luciani et al. 1984).

Les autres modes de ségrégation méiotique (adjacent et 3:0) forment des spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés (Morel et al. 2004). Plusieurs études ont montrées que la proportion de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés, chez les porteurs d'une translocation robertsonienne, varie de 7% à 40% (Morel et al. 2004; Anton et al. 2007; Perrin et al. 2009).

- **Le mode de ségrégation adjacent** donne quatre combinaisons possibles : le chromosome dérivé part dans un spermatocyte II avec un chromosome acrocentrique normal appartenant à une des paires incluses dans la translocation, aboutissant à un spermatozoïde à 23 chromosomes. Dans l'autre spermatocyte II se trouve un seul chromosome acrocentrique issu de l'une des paires ayant la translocation, aboutissant à un spermatozoïde à 22 chromosomes. Le mode de ségrégation adjacent est à l'origine de 8,9% à 23,3% des spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés (Syme and Martin 1992; Escudero et al. 2000; Perrin et al. 2009).

- **Le mode de ségrégation 3:0** est plus rare, et aboutit à la formation d'un spermatozoïde à 21 et à 24 chromosomes.

La ségrégation méiotique des translocations robertsonienne peut aboutit à une trisomie ou une monosomie complète. Le risque de déséquilibre pour le conceptus pour ces hommes, dépendra des chromosomes impliqués : risque de trisomie 21 ou bien de disomie uniparentale si elle concerne les chromosomes 14 ou 15.

Concernant la translocation (13;14), qui est la plus fréquente (Gardner et al. 2011) , le risque théorique de déséquilibre fœtal est de 1%, et peut aboutir à une grossesse avec la naissance vivante d'un enfant atteint de trisomie 13. Cependant, le risque de fausses-couches précoces est plus important (Scriven et al. 2001). Concernant les translocations (14;21), le risque de déséquilibre fœtal est plus important, et est de l'ordre de 5% (Boué and Gallano 1984).

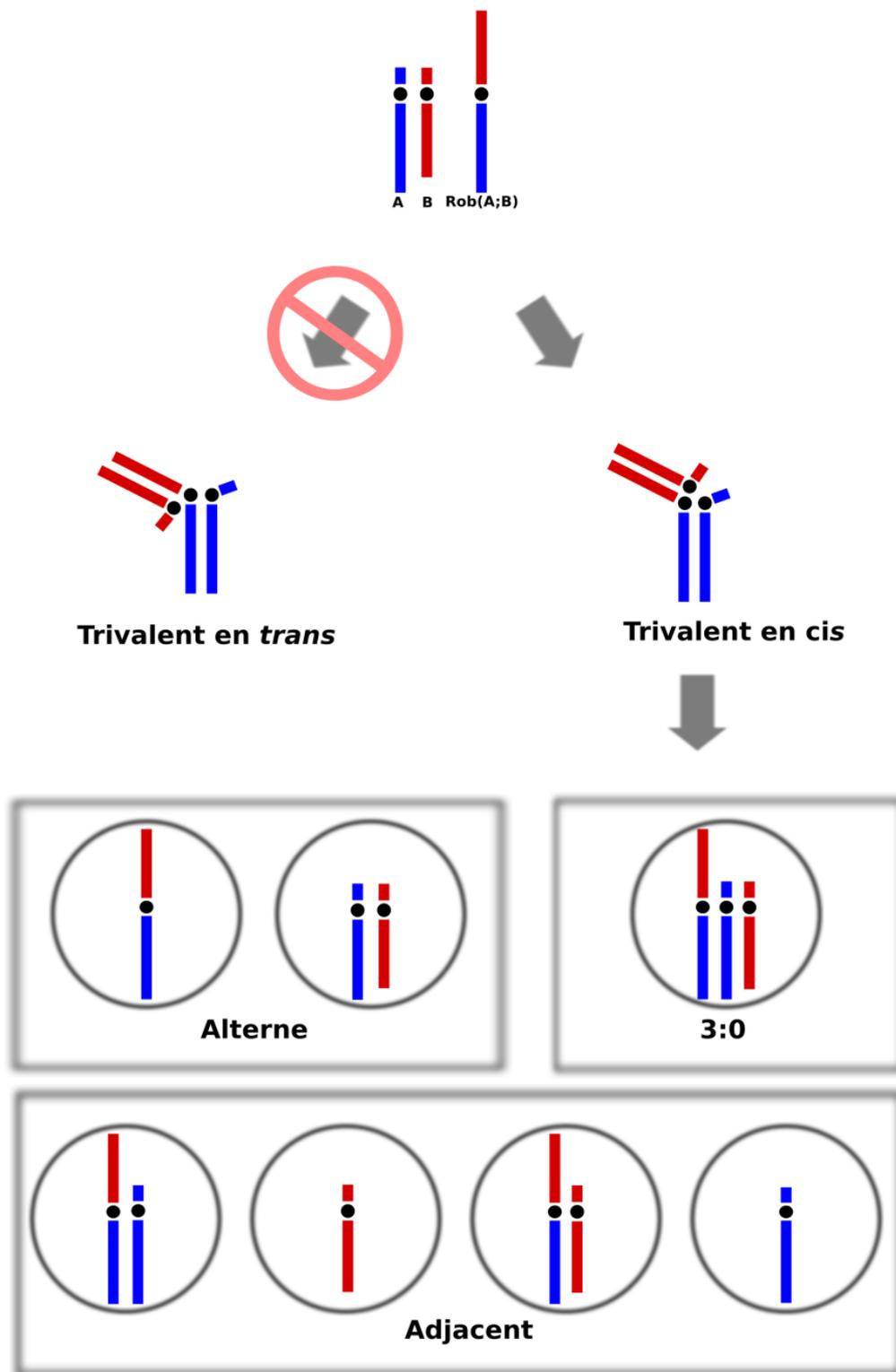


Figure 12 : Ségrégation méiotique gamétique de patients porteurs d'une translocation robertsonienne

2 - Translocation réciproque équilibrée

Au cours de la prophase de la première division méiotique (méiose I), les deux centromères homologues chromosomiques concourent à la formation d'un quadrivalent. Ce quadrivalent aboutit à 5 modes de ségrégations méiotiques différents que sont le mode alterne, l'adjacent 1, l'adjacent 2, 3:1 et 4:0, et cela en fonction des chromosomes et des points de cassures impliqués (Figure 13).

- **Le mode de ségrégation alterne** est à l'origine de spermatozoïdes chromosomiquement normaux ou équilibrés. Les chromosomes transloqués sont transmis dans un spermatocyte II et leurs homologues normaux dans un autre spermatocyte II. Le mode de ségrégation alterne produit une fréquence égale de spermatozoïdes chromosomiquement normaux ou équilibrés.

Les modes de ségrégations adjacent 1, adjacent 2, 3:1 et 4:0, aboutissent à des spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés (Morel et al. 2004). Plusieurs études ont montrées que la proportion de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés, chez les porteurs d'une translocation réciproque équilibrée, varie de 18,6% à 80,7% (Morel et al. 2004 ; Anton et al. 2007 ; Wiland et al. 2008 ; Perrin et al. 2010). Ces variations peuvent s'expliquer par le fait que le pourcentage de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés va dépendre du type de chromosomes impliqués (position du centromère et taille des segments transloqués) et de la localisation des points de cassure (Simpson and Bishoff, 2002 ; Morel et al. 2004).

- **Le mode de ségrégation adjacent 1**, transmet un chromosome transloqué dans un spermatocyte II, avec le chromosome normal non homologue inclus dans la translocation. Le mode de ségrégation adjacent 1 est le plus fréquent parmi les modes aboutissant à des spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés, et correspond à une moyenne d'environ 37%. La proportion de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés varie d'une translocation à l'autre (Benet et al. 2005).
- **Le mode de ségrégation adjacent 2**, transmet un chromosome transloqué dans un spermatocyte II, avec son chromosome homologue normal.

- **Le mode de ségrégation 3:1**, correspond à la ségrégation de trois chromosomes dans un spermatocyte II (aboutissant à la formation de spermatozoïdes avec 22 chromosomes), et de la ségrégation de un chromosome dans un autre spermatocyte II (aboutissant à la formation de spermatozoïdes avec 24 chromosomes).

- **Le mode de ségrégation 4:0**, plus rare, correspond à la ségrégation de quatre chromosomes dans un spermatocyte II (aboutissant à la formation de spermatozoïdes avec 25 chromosomes), tandis que l'autre spermatocyte II n'en reçoit aucun (aboutissant à la formation de spermatozoïdes avec 21 chromosomes).

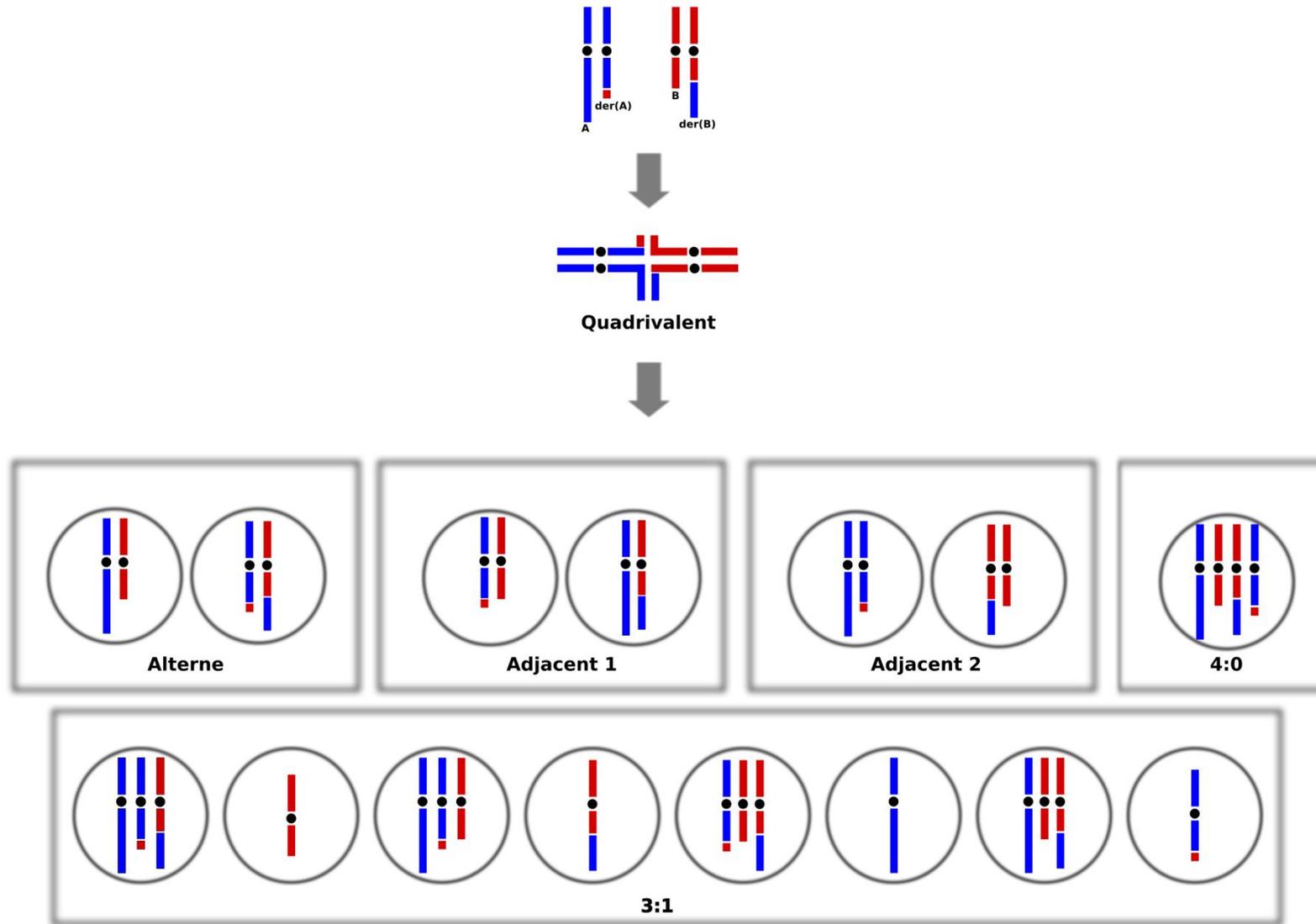


Figure 13 : Ségrégation méiotique gamétique de patient porteur d'une translocation réciproque équilibrée

III - Techniques d'analyse de la ségrégation méiotique

Pour étudier la ségrégation méiotique dans les spermatozoïdes, deux méthodes classiques existent : la fécondation inter-spécifique homme – hamster afin d'obtenir des caryotypes spermatiques, et la FISH sur noyaux spermatiques.

1 - Fécondation inter-spécifique homme – hamster

La fécondation inter-spécifique entre un spermatozoïde humain et un ovocyte de hamster doré permet l'analyse des caryotypes spermatiques. Les chromosomes métaphasiques humains peuvent être observés avec les techniques de marquages en bandes de la cytogénétique conventionnelle. C'est cependant une technique coûteuse, de faible rendement et difficile à mettre en œuvre et seul des spermatozoïdes ayant la capacité de féconder un ovocyte pourront être analysés.

2 - Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

La technique d'hybridation *in situ* permet d'étudier un grand nombre de spermatozoïdes. Son principe repose sur la mise en place d'un appariement spécifique entre une séquence d'acides nucléiques et une sonde complémentaire. Elle permet ainsi la détection de séquences d'acides nucléiques sur des chromosomes en métaphase ou des noyaux en interphase.

C'est une technique très sensible et spécifique, qui n'est pas affectée par la capacité du spermatozoïde à féconder un ovocyte contrairement à la technique de fécondation inter-spécifique homme – hamster (Egozcue et al. 1997). En fonction des sondes utilisées, la FISH permet de détecter des séquences répétées, uniques ou de chromosomes entiers (Trask et al. 1991). Le marquage des sondes s'effectuait avec des composants radioactifs au début, puis sont apparus les composants non radioactifs dont les fluorochromes (il s'agit alors de sondes dites fluorescentes) (Pieters et al. 1990). Cependant cette technique ne se concentre que sur les anomalies des chromosomes étudiés et ne permet pas de donner des informations sur les autres chromosomes.

L'utilisation de plusieurs fluorochromes permet aujourd'hui d'hybrider plusieurs sondes en même temps. Il existe plusieurs types de sondes capables de s'hybrider à une région chromosomique.

- Les sondes composées de séquences d'ADN répétées s'hybrident sur des séquences spécifiques répétées en tandem sur plusieurs centaines de kilobases. Il s'agit des sondes centromériques ou CEP (Chromosome Enumeration Probe).
- Les sondes spécifiques d'un locus, ou LSI (Locus Specific Identifier), s'hybrident sur des séquences spécifiques d'une région de l'ADN.
- Les sondes composées de séquences uniques, englobent deux types de sondes :

Les BACs ou Bacterial Artificial Chromosome. Il s'agit de segments de 100-200 kilobases du génome humain qui ont été clonés dans des vecteurs. Les BACs sont des ADN circulaires dans lequel un fragment d'ADN du génome humain a été inséré et dont l'origine de réplication est issue de la bactérie *Escherichia Coli*. Le site internet public UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>) permet de connaître la position précise d'un BAC dans le génome humain et donc de choisir les BACs d'intérêt en fonction du réarrangement chromosomique à étudier.

Les « sondes de peinture chromosomique », correspondent à un ensemble de fragments d'ADN représentant un chromosome entier.

La technique de FISH est développée dans le chapitre « 2 – Réalisation de la technique FISH » (p76).

IV - Quelles solutions actuellement ?

Pour un couple dont l'homme est porteur d'une anomalie chromosomique de structure, les chances d'obtenir une grossesse avec naissance d'un enfant en bonne santé sont donc directement liées à la fréquence d'embryons chromosomiquement normaux ou équilibrés, qui est elle-même liée à la fréquence des spermatozoïdes normaux ou équilibrés. L'analyse par FISH des noyaux spermatiques permet d'évaluer le risque génétique et d'orienter le couple, qui bénéficiera d'un conseil génétique adapté à l'anomalie chromosomique parentale afin d'établir la meilleure stratégie de diagnostic d'une éventuelle transmission déséquilibrée. Selon que le risque de déséquilibre pour le conceptus est élevé, modéré ou faible par rapport à

la population générale, il pourra être discuté avec le couple de la possibilité de réaliser un diagnostic prénatal, éventuellement un diagnostic préimplantatoire, ou les diriger vers l'utilisation d'un sperme de donneur ou une adoption (Munné et al. 2000; Escudero et al. 2000, 2003).

1 - Le diagnostic prénatal (DPN)

Le diagnostic prénatal (DPN), correspond à l'ensemble des moyens médicaux cliniques, biologiques et d'imageries qui peuvent être mis en œuvre en cours de la grossesse pour détecter *in utero* chez l'embryon ou le fœtus une affection d'une particulière gravité, en vertu de *l'Arrêté du 1er juin 2015 déterminant les recommandations de bonnes pratiques relatives aux modalités d'accès, de prise en charge des femmes enceintes et des couples, d'organisation et de fonctionnement des centres pluridisciplinaires de diagnostic prénatal en matière de diagnostic prénatal et de diagnostic préimplantatoire.*

Le diagnostic prénatal chromosomique peut être proposé à un couple dont le conjoint est porteur d'un remaniement équilibré. Le risque de déséquilibre à terme va dépendre du type de la translocation et des chromosomes impliqués.

➤ Le dépistage non invasif des anomalies chromosomiques fœtales (DPNI)

Il s'agit d'un test de dépistage préconisé pour le dépistage de la trisomie 21, qui peut s'appliquer au dépistage des trisomies 13 et 18 fœtales. Parmi ses indications se trouve les patientes à risque accru de trisomie 21 (parents porteurs d'une translocation robertsonienne impliquant un chromosome 21). Il consiste en un prélèvement veineux périphérique chez la femme enceinte à partir de la 10^{ième} semaine d'aménorrhée. Même si ce test présente une excellente sensibilité et spécificité pour dépister une trisomie 21, il n'est pas fiable à 100% et il existe de rares cas de faux positifs et de faux négatifs. De même, l'ensemble du génome n'est pas exploré, et d'autres anomalies chromosomiques peuvent être méconnues. (*Recommandations pour le dépistage non invasif des anomalies chromosomiques fœtales (DPNI), version 2 – 2015* ACLF). Les tests ADN libre circulant de la trisomie 21 (ADNlcT21), disponibles depuis 2015, reposent sur la recherche d'une surreprésentation éventuelle du nombre de copies du chromosome 21 dans l'ADN libre circulant dans le sang maternel. En cas de résultat positif, il devra être confirmé par l'établissement d'un caryotype fœtal. En France, les femmes ont accès à ces tests. D'après l'HAS (Haute Autorité de Santé), la procédure de dépistage combiné au 1^{er} trimestre de grossesse, avec proposition de réaliser

le test ADNlcT21, doit être maintenue et proposée aux femmes enceintes dont le risque de trisomie 21 fœtale est compris entre 1/1 000 et 1/51 (*Place des tests ADNlcT21 dans le sang maternel dans le dépistage de la T21 fœtale, HAS, avril 2017*).

2 - Le diagnostic préimplantatoire (DPI)

En France, la pratique du diagnostic préimplantatoire (DPI) est autorisée depuis 1999. Il correspond à un diagnostic biologique réalisé à partir de cellules prélevées sur l'embryon *in vitro*. Le DPI concerne les couples ayant une forte probabilité de donner naissance à un enfant atteint d'une maladie génétique grave et reconnue comme incurable au moment du diagnostic. Le statut génétique ou chromosomique de l'embryon peut être connu après FIV-ICSI et avant un transfert dans l'utérus. Au 3^{ème} jour de développement, un ou deux blastomères peut être prélevé, ou au 5^{ème} jour de développement par prélèvement des cellules du trophoctoderme pour contourner le problème lié à un mosaïcisme (Figure 14). Ces cellules sont ensuite analysées par FISH pour les anomalies chromosomiques recherchées. La prise en charge en DPI est généralement longue, et le délai avant d'obtenir un enfant en bonne santé est allongé, du fait de la perte d'ovocytes qui seront fécondés par un spermatozoïde chromosomiquement déséquilibré pouvant parfois aboutir à une absence d'embryon sain. Idéalement, pour éviter cette perte, il faudrait pouvoir sélectionner en ICSI un spermatozoïde chromosomiquement normal ou équilibré. Le seul moyen actuel de s'assurer de la présence d'un génome équilibré est la réalisation d'une FISH sur les noyaux spermatiques, mais avec l'inconvénient que ces spermatozoïdes ne seront pas utilisables en AMP une fois la technique effectuée. Plusieurs techniques de sélection des spermatozoïdes ont été développées dans ce but, et seront développées dans la partie « *Technique de sélection des spermatozoïdes en AMP* » (p57).

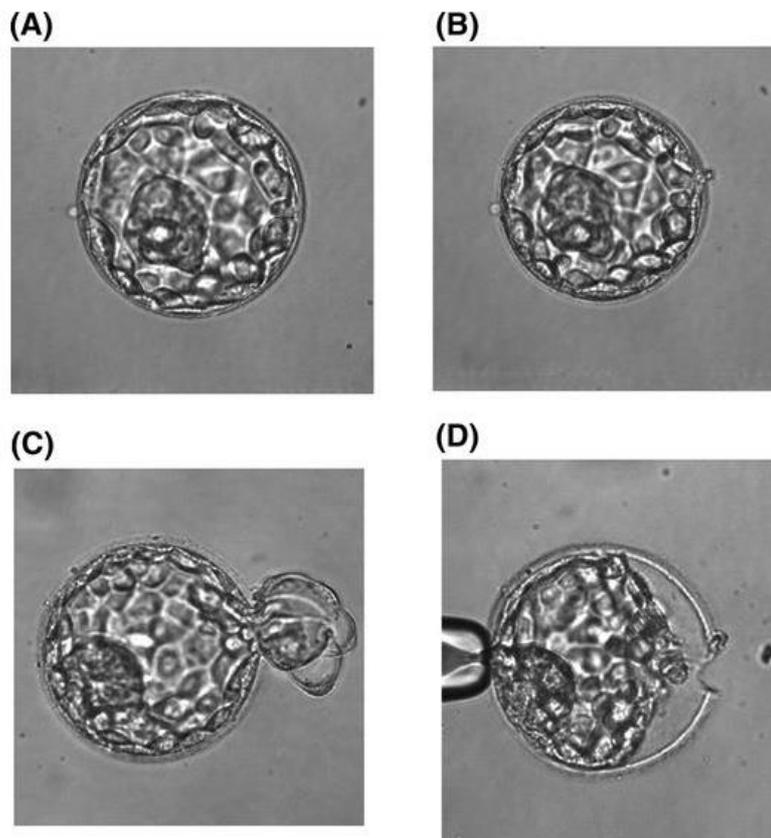


Figure 14 : Biopsie des cellules du trophoctoderme à J5 (d'après Kokkali et al. 2007)

(A) Blastocyste à J5. (B) Ouverture créée dans la zone pellucide, à l'opposé de la masse cellulaire interne via un laser. (C) Des cellules du trophoctoderme forment une hernie en dehors de la zone pellucide 4h plus tard, elles seront prélevées lors de la biopsie du trophoctoderme. (D) Peu après la biopsie du trophoctoderme.

3 - Preimplantation Genetic Screening (PGS)

Cette technique est employée dans plusieurs pays pour des couples ayant un risque d'obtenir des embryons porteurs d'une anomalie chromosomique de nombre. Elle peut être indiquée dans le cadre d'un âge maternel avancé ou d'antécédents de fausses couches à répétition et d'échecs d'implantations répétés (Sifer et al. 2012). Une analyse des blastomères est effectuée par une technique FISH, et de 6 à 15 chromosomes par embryon peuvent être analysés (généralement les chromosomes 13, 16, 18, 21, 22, X et Y). Le dépistage d'aneuploïdie en préimplantatoire permet de sélectionner les embryons normaux candidats à un transfert dans l'utérus. Cependant, son utilité est de plus en plus controversée suite à la publication de plusieurs études qui montrent des difficultés à mettre en évidence un réel bénéfice de cette technique (Sifer et al. 2012).

Marqueurs de l'apoptose dans l'infertilité masculine

Dans notre organisme, l'apoptose correspond à un mécanisme de mort cellulaire programmée. Elle participe à éliminer les cellules âgées, anormales ou surnuméraires afin d'obtenir une homéostasie au sein des tissus. Lors de la spermatogenèse, le processus d'apoptose est nécessaire pour maintenir constant le nombre de spermatocytes entrant en méiose et préserver l'équilibre entre les cellules germinales et les cellules de Sertoli. Ce sont ces dernières qui permettent de réguler la prolifération et la différenciation des cellules germinales, elles sont responsables de l'induction de 50% - 70% du mécanisme d'apoptose des cellules germinales entrant en méiose I (Billig et al. 1995). L'avènement des techniques de détection au niveau moléculaire a considérablement développé nos connaissances sur les mécanismes cellulaires. Nos données concernant l'apoptose cellulaire se sont enrichies au fil des dernières années. Plusieurs travaux ont montré une augmentation des altérations apoptotiques dans les spermatozoïdes éjaculés de patients infertiles. Même si leurs origines restent encore controversées, leur détection dans le sperme éjaculé représente un intérêt dans l'exploration de l'infertilité en AMP.

I - Présence de marqueurs apoptotiques dans le sperme de patients infertiles

Bien qu'un phénomène physiologique d'apoptose des spermatozoïdes ait lieu au niveau testiculaire, des taux plus élevés d'apoptose dans le sperme éjaculé sont rapportés chez des hommes infertiles comparés à des hommes fertiles. Une étude précurseur de Baccetti et al. a mis en évidence 0,1% de spermatozoïdes apoptotiques dans un groupe d'hommes fertiles, contre 10% chez ceux ayant une varicocèle, 20% chez les patients avec cryptorchidie, et jusqu'à 50% chez les hommes porteurs d'un séminome testiculaire. Ces spermatozoïdes et spermatides présentaient les mêmes altérations apoptotiques qu'une cellule somatique en apoptose au niveau de la chromatine, de l'enveloppe nucléaire et de la membrane plasmique, la présence de vacuoles intracytoplasmiques, un statut particulier des mitochondries, indépendamment de l'origine de l'infertilité masculine (Baccetti et al. 1996).

De façon générale, ces altérations apoptotiques sont principalement des altérations membranaires avec externalisation de la phosphatidylsérine (PS), une réduction du potentiel de membrane mitochondriale, une activation des caspases et une fragmentation de l'ADN spermatique.

Ces stigmates apoptotiques présents dans les spermatozoïdes correspondent à différentes étapes de l'apoptose cellulaire (Figure 15). L'engagement du récepteur Fas, suivi de l'activation de la caspase-8 puis de la caspase-3, précèderaient la fragmentation de l'ADN spermatique. Ces voies extrinsèques permettraient la libération de facteurs proapoptotiques par les mitochondries, conduisant à l'activation de la caspase-3, conduisant aussi à la fragmentation de l'ADN spermatique (Marchetti et al. 2017).

La signification de l'expression de ces marqueurs et leur impact sur les résultats de l'ICSI concernant les taux de fécondation, le développement pré-embryonnaire, les taux d'implantation et/ou de fausses couches spontanées, de grossesses et de naissances restent controversés (Herrero et al. 2013; Caroppo et al. 2013; Lewis et al. 2013; Parmegiani et al. 2014). Cependant, le lien existe entre résultats obtenus en AMP, potentiel de fertilité masculine et degré d'intégrité de l'ADN spermatique (Garrido et al. 2013).

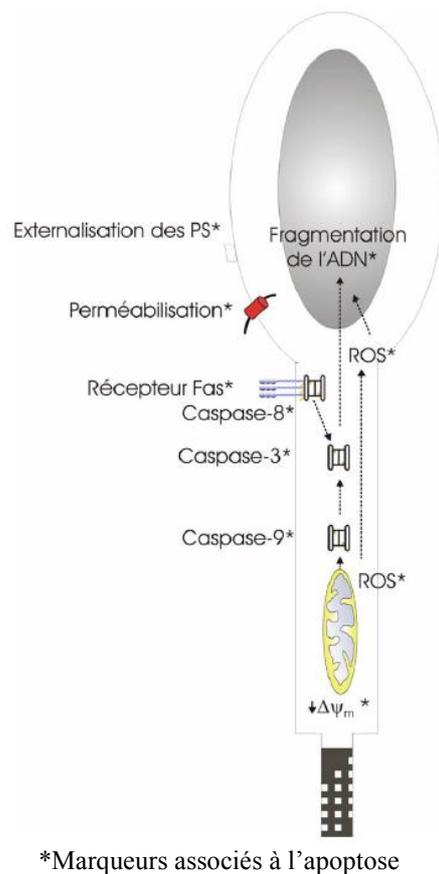


Figure 15 : Voies apoptotiques hypothétiques dans le sperme de patients infertiles (d'après Marchetti and Marchetti, 2017)

II - La fragmentation de l'ADN spermatique

L'intégrité du génome paternel est un paramètre important pour obtenir une grossesse avec la naissance d'un enfant en bonne santé, aussi bien de conception naturelle que par des techniques d'AMP. La mesure de la fragmentation de l'ADN est plus fiable que la concentration et la mobilité des spermatozoïdes, car elle présente un moindre degré de variation biologique comparé aux paramètres spermatiques (Evenson et al. 1991; A. Zini et al. 2001).

1 - Organisation de la chromatine spermatique

Au cours de l'étape de la spermiogenèse, la chromatine spermatique subit plusieurs étapes de compaction et de protamination, pour aboutir à une structure condensée, qui rend les spermatozoïdes résistant aux dommages de l'ADN.

Au sein d'une cellule somatique, la chromatine est organisée en structure nucléosomale. La molécule d'ADN s'enroule sur 146 paires de bases autour d'un octamère d'histone. Un octamère est formé de deux copies de chaque histone H2A, H2B, H3 et H4. La cinquième histone est l'histone de liaison H1 (Figure 16).

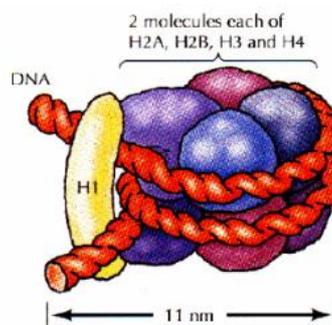


Figure 16 : Le nucléosome

Lors des premières étapes de la spermiogenèse, une perte de la structure nucléosomale se réalise en remplaçant les histones par des protéines de transition. Au cours de la différenciation des spermatides, les protéines de transition représentent 90% des protéines basiques de la chromatine entre l'étape d'enlèvement des histones et l'étape d'incorporation des protamines (Figure 17).

L'ADN spermatique est plus sensible au stress oxydatif (SO) dans les cas où la compaction et la protamination de la chromatine au cours de la spermiogenèse sont incomplètes. Ainsi, des cassures de l'ADN résultant de l'action de substances réactives de l'oxygène (ROS) ont été observées dans les spermatozoïdes (Kemal et al. 2000). A l'intérieur du noyau spermatique, le génome haploïde est empaqueté en une structure très compacte contenant les protamines et quelques histones persistantes, restant ainsi sous une forme transcriptionnellement inactive jusqu'à la fécondation.

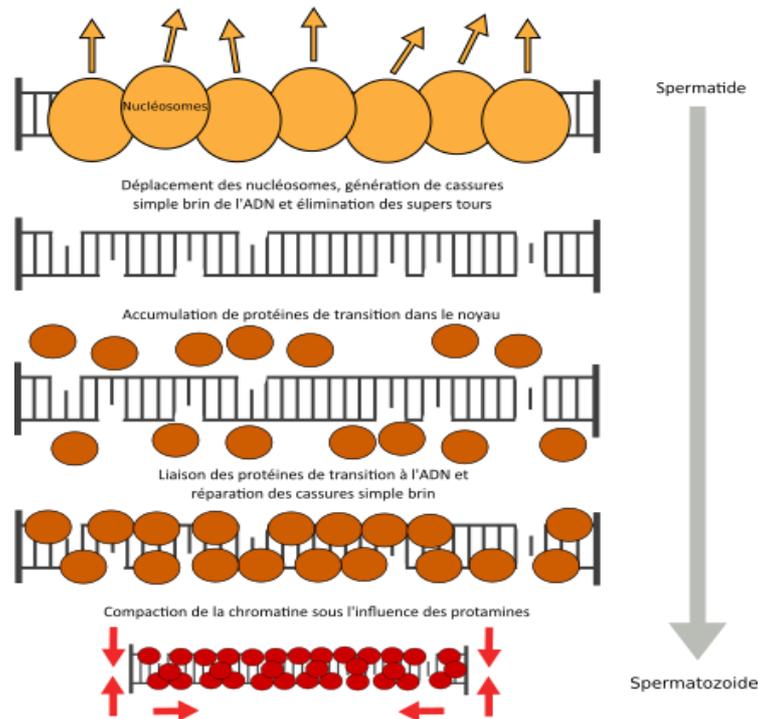


Figure 17 : Les différentes étapes du remodelage de la chromatine lors de la spermiogenèse

2 - Origines de la fragmentation de l'ADN spermatique

L'origine exacte de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes n'est pas encore bien établie, elle serait multifactorielle (Zini et al. 2009). Les altérations de l'ADN spermatique pourraient avoir lieu lors de la spermatogenèse et/ou lors de leur transport dans le testicule. L'association de différents mécanismes a été proposée, telles que l'altération de la compaction de la chromatine lors de la spermiogenèse, la production de ROS, l'action de caspases et endonucléases endogènes, la radiothérapie et chimiothérapie, l'action de toxiques issues de l'environnement (Sakkas and Alvarez 2010).

2-1 L'apoptose

Le facteur Fas est une protéine de surface cellulaire impliquée dans le phénomène de mort cellulaire programmée (Lee et al. 1997). Il s'agit d'une protéine transmembranaire appartenant à la famille du récepteur du TNF (Tumor Necrosis Factor), qui peut induire le signal de mort cellulaire par sa liaison avec des anticorps anti-Fas ou par le ligand de Fas (Fas-L) (Griffith et al. 1995) (Figure 18).

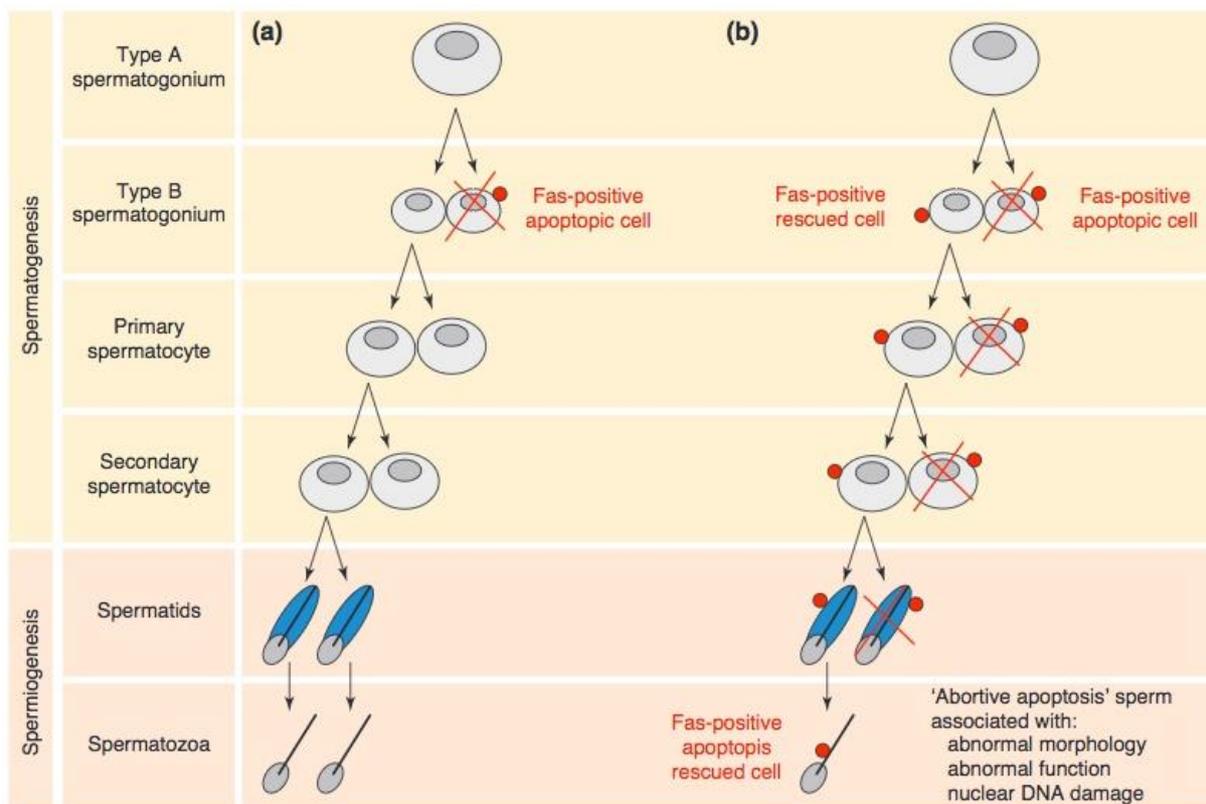


Figure 18 : Le rôle de la protéine Fas au cours de la spermatogénèse chez les hommes ayant des paramètres spermatiques (a) normaux et (b) anormaux (oligozoospermique, asthénozoospermique et tératozoospermique) (d'après Sakkas et al. 1999).

2-2 Production de ROS

Des antioxydants sont naturellement présents dans le liquide séminal, donnant une protection aux gamètes contre les ROS. Lorsque ceux-ci dépassent le système de défense naturelle des antioxydants, les ROS contribuent à la dégradation des lipides, des protéines et de l'ADN. Or, la membrane plasmique des spermatozoïdes est très riche en acides gras poly-insaturés, et est

sensible aux dommages causés par la peroxydation des lipides, qui peuvent entraîner une destruction des acides gras, d'où une altération des propriétés membranaires du spermatozoïde (Sanocka and Kurpisz 2004). Normalement, au cours de la spermiogenèse, la chromatine spermatique subit plusieurs étapes de compaction, et de protamination, pour aboutir à une structure condensée, qui rend les spermatozoïdes résistants aux dommages de l'ADN. L'ADN spermatique est plus sensible au SO dans les cas où la compaction et la protamination de la chromatine au cours de la spermiogenèse sont incomplètes. Ainsi, des cassures de l'ADN résultantes de l'action de ROS ont été observées dans les spermatozoïdes (Kemal Duru et al. 2000).

Il existe des sources endogènes et exogènes des ROS. Parmi les causes endogènes, il y a dans le sperme deux principales sources que sont les leucocytes et les spermatozoïdes immatures. Les leucocytes sont la source prédominante de ROS. Il s'agit en majorité de polynucléaires, et de macrophages, en provenance de la prostate et des vésicules séminales. Un stimulus de nature inflammatoire peut leur faire relarguer jusqu'à 100 fois plus de ROS qu'habituellement (Agarwal et al. 2003). Pendant la spermatogenèse, les spermatides endommagées, voient leurs évolutions stoppées : elles conservent alors un excès de cytoplasme autour de leur pièce intermédiaire, appelé cytoplasme résiduel. Celui-ci peut activer le système de la NADPH, aboutissant à la production de ROS (Rengan et al. 2012). Une varicocèle de haut grade est associée à de hauts taux de ROS au niveau du plasma séminal, qui est fortement corrélé à une diminution de l'intégrité de l'ADN spermatique (Smith et al. 2006). Les hommes infertiles présentant une varicocèle, ont des concentrations de ROS plus élevées et d'antioxydants diminués dans leur sperme par rapport à des hommes fertiles (Abd-Elmoaty et al. 2010). Il existe aussi des sources exogènes de ROS. En effet plusieurs toxiques peuvent augmenter la production de ROS au niveau testiculaire : les hydrocarbures, les métaux lourds tels que le cadmium, le chrome, le plomb, le manganèse et le mercure, les xénobiotiques tels que les insecticides, les pesticides et les phtalates, qui sont tous sources de SO (Aitken, et al. 2006). Les radiations électromagnétiques, dont des études ont mis en évidence un impact significatif des radiations des téléphones mobiles sur la qualité du sperme, et une augmentation des ROS dans le sperme (Agarwal et al. 2008). Le tabac, dont la consommation augmente de 48% la concentration en leucocytes du plasma séminal, et de 107% le taux de ROS (Saleh et al. 2002). La consommation excessive d'alcool augmente la production de ROS via la présence de l'éthanol, alors que des carences en antioxydants sont mises en évidence chez les personnes alcooliques (Koch et al. 2004). Le stress, dont des études ont montré un lien entre une période d'exposition au stress psychologique et une diminution de la qualité spermatique,

par l'intermédiaire de l'augmentation de la production de ROS dans le plasma séminal, et une diminution des antioxydants (Eskiocak et al. 2006). L'obésité, par l'intermédiaire du tissu adipeux qui libère des cytokines pro-inflammatoires, augmente la production de ROS des leucocytes (Singer and Granger 2007). La qualité globale du sperme est influencée par l'équilibre entre la production de ROS et l'apport d'antioxydants (Figure 19).

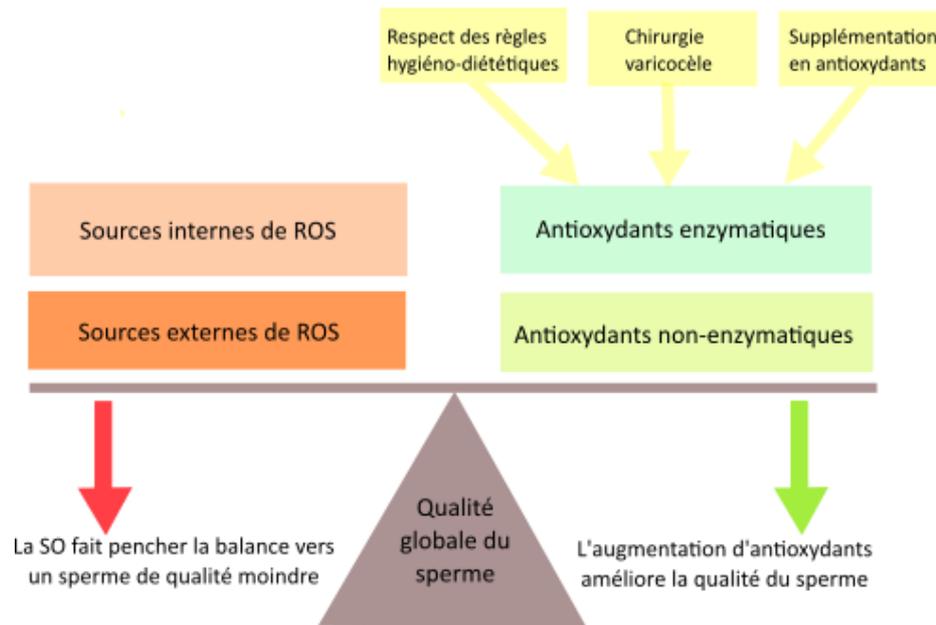


Figure 19 : Balance entre oxydants et antioxydants, et ses conséquences sur la qualité spermatique

2-3 L'altération de la compaction de la chromatine

Toute altération dans le mécanisme de remodelage de la chromatine peut causer une altération de sa compaction. Les altérations de la compaction de la chromatine pendant la spermiogenèse peuvent provoquer une fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes éjaculés. Dans le noyau des spermatozoïdes, environ 85% des histones sont remplacés par les protamines lors de la spermiogenèse (Barone et al. 1994). Les protamines sont des petites protéines nucléaires participant à la compaction de l'ADN, en remplaçant les protéines de transitions, qui avaient elles-mêmes remplacées les histones des spermatozoïdes, au cours de la spermiogenèse (Figure 17). La protamine P1 est synthétisée comme une protéine alors que la protamine P2 est issue de la protéolyse d'un précurseur (Oliva et al. 2006). Un ratio déséquilibré des protamines P1 et P2 peut provoquer une diminution de la quantité de protamines liées à l'ADN, rendant la chromatine spermatique plus sensible aux phénomènes

de cassures (Muratori et al. 2000). Des études ont montrés qu'une élévation anormale du ratio P1/P2 chez des hommes infertiles était due à une diminution de l'expression de P2 (Carrell and Liu 2001; Aoki et al. 2005; Castillo et al. 2011), voir une absence totale de P2 dans certains cas (Carrell and Liu 2001).

3 - Techniques d'évaluation de la fragmentation de l'ADN spermatique

La fragmentation de l'ADN spermatique comme indicateur de bonne qualité spermatique est récemment devenue source d'intérêt, et beaucoup de méthodes ont été développées pour mesurer l'intégrité de l'ADN spermatique (Ménézo et al. 2007). La qualité de la chromatine des spermatozoïdes peut être évaluée par plusieurs techniques.

- La technique TUNEL (TdT-mediated-dUTP nick-end labeling)

Parmi les techniques classiquement utilisées pour la détection de l'apoptose, l'étude de l'intégrité de l'ADN spermatique avec la technique TUNEL est une des plus courantes. Elle permet de quantifier l'incorporation de dUTP (DéoxyUridine TriPhosphate) au niveau des groupements 3'OH accessibles suite aux cassures de l'ADN, et cela en présence de TdT (Terminal désoxynucléotidyl Transférase). Le dUTP est couplé à un fluorochrome dont la fluorescence est détectable *in situ*. La quantification peut ainsi être réalisée par cytométrie de flux ou au microscope à fluorescence.

La technique TUNEL est développée dans le chapitre « VII - La technique TUNEL » (p77).

- La technique COMET

Les spermatozoïdes sont lysés en milieu alcalin et une électrophorèse est réalisée, l'ADN est alors révélé par un colorant fluorescent spécifique.

- Le SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay)

C'est une technique développée en cytométrie de flux, qui utilise une coloration à l'acridine orange (AO). L'AO est un agent intercalant, qui met en œuvre la propriété de dénaturation de l'ADN en condition acide, ou thermique complémentaire. La fluorescence verte (AO associé à de l'ADN bicaténaire) et rouge (AO associé à l'ADN simple brin ou dénaturé) sont mesurées pour chaque spermatozoïde, qui permet le calcul de l'index de fragmentation de

l'ADN (DFI, DNA fragmentation index) et l'hétérogénéité de la population de spermatozoïdes analysée.

D'une certaine façon, TUNEL, SCSA et COMET sont des techniques complémentaires. TUNEL et COMET peuvent mesurer les cassures simples et doubles brins de l'ADN, et le SCSA peut détecter les anomalies de compaction de la chromatine (Evenson et al. 2002; Perreault et al. 2003).

D'autres méthodes, plus subjectives, existent :

- Le SCD test (Sperm Chromatin Dispersion), étudie la dispersion des boucles d'ADN après dénaturation acide et extraction des nucléoprotéines par le DTT (DiThioThreitol) associé au SDS (Sodium Dodecyl Sulfate).

- L'Acridine Orange Test, le test au bleu d'aniline, le test chromomycine A3.

4 - Conséquences et risques en AMP

La fragmentation de l'ADN spermatique pourrait influencer de façon négative la capacité fécondante des spermatozoïdes *in vitro* (Sergerie et al. 2005).

Chez des hommes ayant une fragmentation d'ADN spermatique mesurée par TUNEL supérieure à 25%, le taux de fécondation après ICSI est inférieur à 20% (Lopes et al. 1998). Une étude de Benchaib et al. a mis en évidence, chez 104 couples prise en charge en AMP avec ICSI qu'une fragmentation de l'ADN spermatique supérieure à 10% amenait à une diminution significative du taux de grossesse (Benchaib et al. 2003). Fernandez Gonzalez et al. ont mené une étude sur les conséquences à long terme concernant le développement et le comportement de souris nées après ICSI avec un spermatozoïde à ADN fragmenté. Ils mettent en évidence l'apparition d'effets tardifs tels qu'une croissance anormale, un vieillissement prématuré, un comportement anormal, le développement de tumeurs mésoenchymateuses. En fonction du taux de fragmentation de l'ADN spermatique, les ovocytes pourraient partiellement réparer l'ADN fragmenté et se développer jusqu'à un stade blastocyste capable de s'implanter et de donner une naissance vivante. Cependant une réparation incomplète peut mener à des pathologies s'exprimant tardivement dans la vie (Fernández-Gonzalez et al. 2008).

Un spermatozoïde à l'ADN fragmenté peut féconder un ovocyte mature, et un développement embryonnaire est possible tant que les dommages de l'ADN spermatique ne dépassent pas la capacité de réparation de l'ovocyte. Il apparaît donc prudent de ne pas réaliser une

fécondation avec un spermatozoïde à l'ADN fragmenté lors d'une ICSI (Delbes et al. 2013; Sakkas 2013).

Dans le but de diminuer le taux de fragmentation de l'ADN spermatique, plusieurs méthodes sont proposées. Par exemple, la mise en place d'un traitement anti-oxydant pendant plusieurs mois avant la réalisation d'une ICSI (Greco et al. 2005). Cependant les avis sont controversés quant aux effets de ces traitements antioxydants, certaines études ont mis en évidence une inefficacité voire des effets délétères de ceux-ci (Menezo et al. 2014). Plus récemment, de nouvelles techniques de sélection des spermatozoïdes ont été développées, et sont abordées dans la partie « *Techniques de sélection des spermatozoïdes en AMP* » (p.57).

III - Marqueurs des altérations membranaires

1 - Externalisation membranaire de phosphatidylsérine

Au cours du phénomène d'apoptose, la membrane du spermatozoïde subit une modification de son asymétrie accompagnée de l'externalisation d'un phospholipide particulier : la phosphatidylsérine (PS). La translocation de la PS de la membrane interne vers la membrane externe est à l'origine de l'envoi d'un signal destiné aux macrophages à proximité de la cellule dans le but qu'ils la phagocytent. La PS possède une forte affinité pour l'annexine V, une protéine de 35 kDa. L'annexine V ne peut pas traverser la membrane plasmique et sa fixation à la PS au niveau membranaire signe une altération de cette dernière et correspond à une étape précoce de l'apoptose. Par ailleurs, lorsque la cellule est à un stade de nécrose cellulaire, la membrane plasmique devient perméable et laisse entrer l'annexine V. Cette liaison spécifique PS – annexine V permet la détection et la quantification des cellules apoptotiques (Van Engeland et al. 1998). Cependant, ces mêmes modifications de la membrane plasmique peuvent être observées dans d'autres situations différentes de l'apoptose : par exemple, le phénomène de capacitation des spermatozoïdes s'accompagne d'une expression de la PS sur la membrane externe de la membrane plasmique (Martin et al. 2005; Baumber and Meyers 2006). Cette situation peut remettre en cause l'utilisation de la PS pour détecter l'apoptose cellulaire.

2 - Perte de l'intégrité membranaire

La perte de l'intégrité membranaire peut être mise en évidence à l'aide de colorants vitaux, tel que l'iodure de propidium (IP). Le double marquage par annexine V couplée à un fluorochrome d'une part et d'autre part l'IP, qui ne pénètre qu'à un stade tardif de l'apoptose ou lors de la nécrose, est une technique intéressante pour détecter la perméabilité membranaire. Elle permet de faire la distinction entre les spermatozoïdes vivants (annexine V- / IP-), les spermatozoïdes nécrosés (annexine V- / IP+), les spermatozoïdes en phase précoce d'apoptose (annexine V+ / IP-) et les spermatozoïdes en phase tardive d'apoptose ou nécrosés (annexine V+ / IP+) (Glander and Schaller 1999). De nombreux autres fluorochromes ont été utilisés pour déterminer la viabilité des spermatozoïdes par cytométrie en flux (Gillan et al. 2005), mais sont d'utilité limitée puisqu'ils ne permettent pas d'évaluer le pouvoir fécondant. Aussi, une technique récente a été développée afin d'exclure les spermatozoïdes ayant une altération membranaire : la technique de tri magnétique, basée sur l'utilisation de microbilles magnétiques recouvertes d'annexine V. Cette technique sera développée dans le chapitre « 7 - *Magnetic activated cell sorting (MACS)* » (p65).

IV - Altération du potentiel de membrane mitochondriale

Les mitochondries jouent un rôle majeur dans l'apoptose cellulaire. Ces organites participent à l'activation de réactions cataboliques, il est observé une chute du potentiel de membrane mitochondriale précédant l'apoptose nucléaire. Cette chute est associée à une production de ROS accrue qui contribuent à l'apoptose cellulaire. Des méthodes de mesure à l'aide de fluorochromes lipophiles cationiques ont été développées en cytométrie en flux pour mesurer la chute du potentiel de membrane mitochondriale dans le sperme éjaculé (Marchetti et al. 2004).

V - Activation des caspases

Les caspases sont une famille de protéases à cystéine qui jouent un rôle majeur dans les phases d'initiation et d'exécution du processus d'apoptose (Said et al. 2004). La présence de plusieurs caspases actives (caspases 1, 3, 8 et 9) a été mise en évidence dans les spermatozoïdes de patients infertiles par l'intermédiaire de dosage enzymatique (Marchetti et

al. 2004). Cependant, leur activation n'est pas totalement spécifique de l'apoptose car elles sont aussi impliquées dans d'autres voies de signalisation tels que la réponse inflammatoire, la différenciation et la prolifération cellulaire (Lamkanfi et al. 2007).

Les marqueurs apoptotiques sont une piste intéressante. La possibilité d'exclure des spermatozoïdes apoptotiques représente un avantage majeur en AMP.

Techniques de sélection des spermatozoïdes en AMP

Depuis l'apparition de la technique d'ICSI introduite par Palermo en 1992, la prise en charge des infertilités masculines a été révolutionnée (Palermo et al. 1992). Certains patients abusivement qualifiés de stériles pour une origine génétique pouvaient alors concevoir. La question du risque encouru par les enfants nés des techniques d'AMP d'hommes porteurs d'une translocation chromosomique s'est alors posée. Les seules solutions existantes à l'heure actuelle pour éviter les fausses couches à répétitions, ou les naissances avec malformation et déséquilibre chromosomique, concernant cette population d'hommes, reposent sur le DPN ou la prise en charge en DPI. Mais ces techniques sont longues de réalisation, et le statut chromosomique du spermatozoïde à l'origine de la fécondation est inconnu. Alors que l'ICSI se base sur la sélection d'un spermatozoïde à partir de critère de morphologie typique et de mobilité, l'idée de pouvoir sélectionner un spermatozoïde avec un génome normal ou équilibré est de plus en plus explorée.

Dans une première partie, nous rappellerons les techniques classiques de séparation des spermatozoïdes en vue d'une ICSI, puis nous aborderons les méthodes plus récentes de sélection de spermatozoïdes.

I - Techniques classiques de séparation des spermatozoïdes en vue d'ICSI

Parmi les techniques classiques de préparation des spermatozoïdes en AMP, les plus usuelles sont le gradient de densité (GD) et la migration ascendante ou Swim-Up (SU). Ces méthodes permettent de sélectionner les spermatozoïdes en fonction de leur mobilité et de leur morphologie (Le Lannou and Blanchard 1988). Elles visent à reproduire les étapes de sélection des spermatozoïdes qui ont lieu lors de leur remontée dans le tractus génital féminin, avec, pour conséquence, l'élimination du plasma séminal qui contient des agents décapacitants pour le remplacer par un milieu favorisant la capacitation des spermatozoïdes. Elles permettent aussi une élimination des débris cellulaires, des spermatozoïdes morts ou immobiles et favorisent l'élimination d'agents infectieux.

1 - Gradient de densité (GD)

Le principe du GD (ou DGC, Density Gradient Centrifugation) repose sur la sélection de spermatozoïdes en fonction de leur densité, qui dépend de la tête du spermatozoïde contenant le noyau ainsi que de sa forme générale. Elle est réalisable grâce à l'utilisation d'une solution mère colloïdale de particules de silice recouvertes de siliane. Le sperme pur est délicatement déposé sur un gradient à deux phases, l'une à 90% et l'autre à 45%. Après centrifugation, la phase supérieure est retirée et seul le culot est conservé (Figure 20).

2 - Migration ascendante ou Swim-Up (SU)

Les spermatozoïdes sont séparés du plasma séminal et des agents décapacitants par un simple lavage (mélange à un milieu de lavage, étape de centrifugation simple et récupération du surnageant). Le principe du SU repose sur la sélection active des spermatozoïdes mobiles à partir du culot au-dessus duquel est ajoutée une phase de milieu de culture. Les spermatozoïdes les plus mobiles vont migrer vers la surface alors que ceux qui seront morts, immobiles et peu mobiles resteront au niveau du culot. Le SU est réalisé dans une étuve à 37°C sous 5% de CO₂, pendant 45 min. Après migration, la surface est aspirée à l'aide d'une pipette afin de recueillir les spermatozoïdes les plus mobiles (Figure 21).

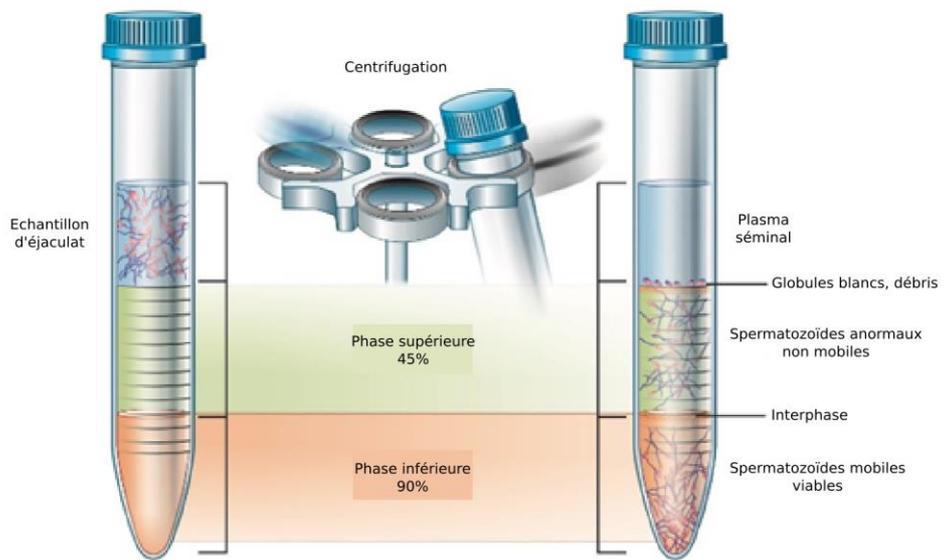


Figure 20 : Schéma de réalisation d'un gradient de densité (GD)
(d'après Beydola et al. 2012)

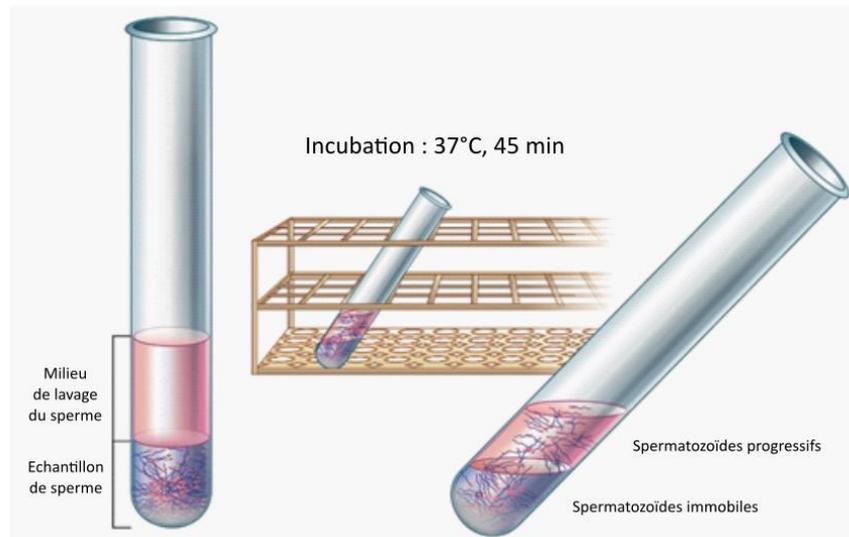


Figure 21 : Schéma de réalisation d'une migration ascendante ou Swim-Up (SU)
(d'après Beydola et al. 2012)

II - Nouvelles techniques de sélection des spermatozoïdes

Même si les techniques classiques sont efficaces pour sélectionner des spermatozoïdes mobiles et morphologiquement typiques, elles ne prennent pas en compte d'autres paramètres spermatiques importants tels que les altérations apoptotiques, l'intégrité de l'ADN spermatique et l'ultrastructure du spermatozoïde (Ghaleno et al. 2014). Ainsi, plusieurs nouvelles méthodes de sélection des spermatozoïdes ont été développées : certaines se basent sur la morphologie, l'empaquetage de l'ADN, la vitalité, l'aptitude à se lier à l'acide hyaluronique, la mobilité, la présence de charges ou de marqueurs apoptotiques sur la membrane plasmique.

1 - Potentiel Zeta

Cette méthode se base sur le fait que la charge électrique à travers la membrane plasmique d'un spermatozoïde mature est de -16mV à -20mV (Henkel 2012). Lors de la maturation épидидymaire, la membrane plasmique du spermatozoïde acquiert des glycoprotéines de revêtement Gp20/CD52 à l'origine de cette charge négative. La séparation des spermatozoïdes matures peut alors s'effectuer par leur adhésion à une surface chargée positivement dans un milieu sans albumine (Said and Land 2011). La suspension de spermatozoïdes est déposée dans un tube chargé positivement. Les spermatozoïdes matures chargés négativement (A) adhéreront contre la paroi du tube alors que les spermatozoïdes immatures (B) n'adhéreront pas et seront éliminés (Figure 22).

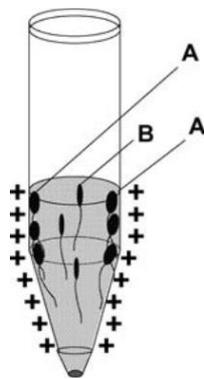


Figure 22 : Principe de la technique de sélection des spermatozoïdes par Zeta-potential
(d'après Said and Land 2011)

2 - MSOME

Le MSOME, ou Motile Sperm Organelle Morphology Examination, correspond à une analyse morphologique des spermatozoïdes à un fort grossissement (x6 600). Il permet d'analyser l'acrosome, la région post-acrosomale, la pièce intermédiaire, les mitochondries et le noyau (Bartoov et al. 2002). La présence de vacuoles au niveau du noyau, ainsi que leur taille sont évaluées. Un spermatozoïde contenant plus de 50% de vacuoles est associé à un ADN spermatique fragmenté et peut être utilisé comme critère de qualité du spermatozoïde (Oliveira et al. 2010). La technique du MSOME est souvent associée à l'ICSI et revêt alors le terme d'IMSI (Intracytoplasmic Morphologically Selected sperm Injection).

Une classification morphologique des spermatozoïdes en fonction des différentes anomalies qu'ils présentent (nombre de vacuoles, surface vacuolaire par rapport à la surface de la tête) a été proposée (Tableau 1 et Figure 23).

Tableau 1 : Classification des spermatozoïdes observés en MSOME(d'après Saïdi et al. 2008)

Type 0	Spermatozoïde sans vacuole
Type I	Spermatozoïde avec une seule vacuole couvrant $\leq 4\%$ de la surface de la tête
Type II	Spermatozoïde avec une seule vacuole couvrant 4-16% de la surface de la tête ou au moins deux vacuoles couvrant 0-16% de la surface de la tête
Type III	Spermatozoïde avec une ou plusieurs vacuole(s) occupant plus de 16% de la surface de la tête

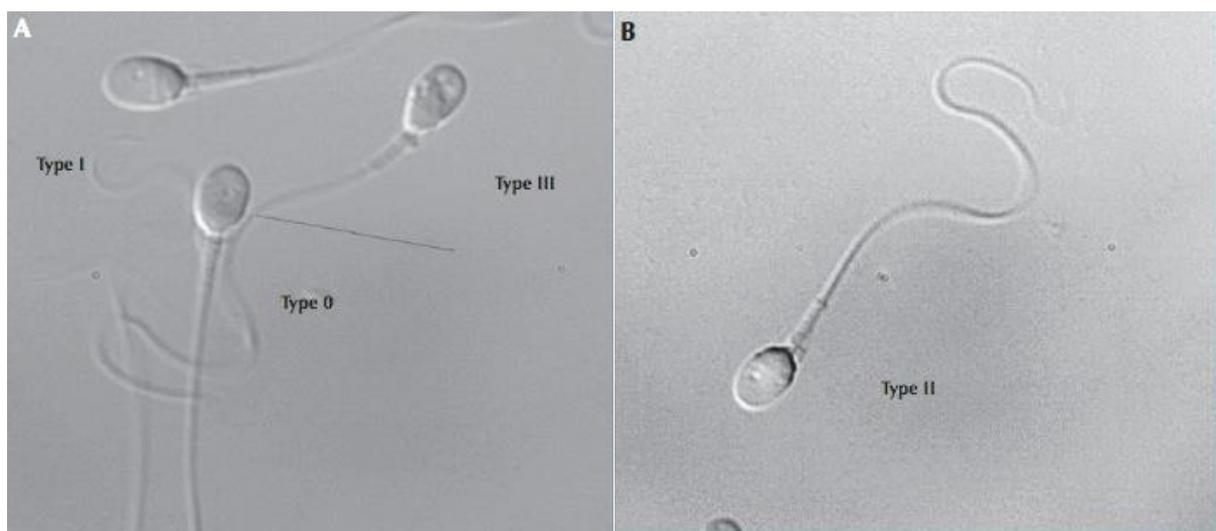
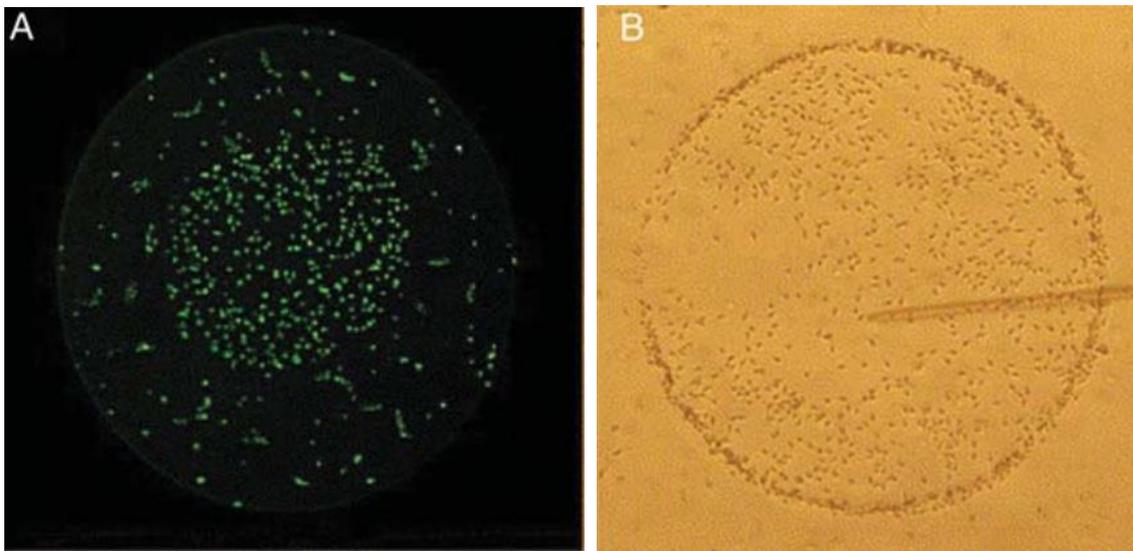


Figure 23 : Différents types de spermatozoïdes observés en MSOME. (A) Type 0, I et III (B) Type II (d'après Saïdi et al. 2008)

3 - Liaison à l'acide hyaluronique

Cette technique se base sur la capacité des spermatozoïdes matures à se fixer à l'acide hyaluronique contenu dans le cumulus oophorus pour le traverser et féconder l'ovocyte par la suite. Seul un spermatozoïde mature, c'est-à-dire ayant achevé le remodelage de sa membrane plasmique et sa maturation nucléaire, peut se fixer à l'acide hyaluronique (Cayli et al. 2003; Huszar et al. 2003). Deux systèmes de sélection par l'acide hyaluronique sont commercialisés : HA-binding et PICSI (Picked Spermatozoa for ICSI). La méthode de l'HA-binding consiste à venir déposer les spermatozoïdes dans un milieu hypervisqueux contenant l'acide hyaluronique : les spermatozoïdes matures sont identifiables à leur mouvement ralenti (Figure 24 (A)). La méthode PICSI consiste en l'usage d'une boîte de culture contenant des points recouverts d'un hydrogel d'acide hyaluronique, sur lesquels la tête des spermatozoïdes matures vient s'immobiliser par liaison à ce dernier, tout en conservant la mobilité de leur flagelle (Figure 24 (B)).

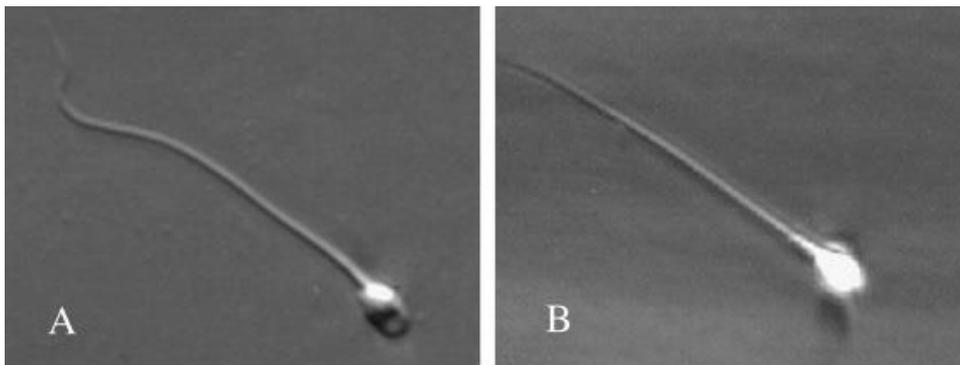


(A) Méthode de l'HA-binding, (B) Méthode PICSI

Figure 24 : Sélection de spermatozoïdes par liaison à l'acide hyaluronique
(d'après Jakab et al. 2005)

4 - La biréfringence des spermatozoïdes

Cette technique se base sur la propriété de biréfringence qui reflète une texture compacte et organisée du spermatozoïde en microscopie polarisée. Elle permettrait de sélectionner des spermatozoïdes de structure en apparence normale (Gianaroli et al. 2010; Petersen et al. 2011). Les spermatozoïdes ayant un acrosome intact peuvent être distingués de ceux ayant déjà accompli leur réaction acrosomique en fonction du type de réfringence observée (biréfringence totale *versus* biréfringence partielle respectivement). Une étude de Petersen et al. a montré un taux de fragmentation d'ADN spermatique significativement plus élevé dans les spermatozoïdes ayant une biréfringence totale par rapport à ceux ayant une biréfringence partielle (Petersen et al. 2011). Ainsi, la technique de sélection par biréfringence permettrait de sélectionner des spermatozoïdes à l'ADN peu fragmenté et ayant débuté leur réaction acrosomique (Figure 25).



(A) La biréfringence au niveau post-acrosomal indique que la réaction acrosomale a déjà eu lieu (B) la biréfringence au niveau de la tête, de l'acrosome et du noyau permet d'identifier un spermatozoïde n'ayant pas réalisé de réaction acrosomale.

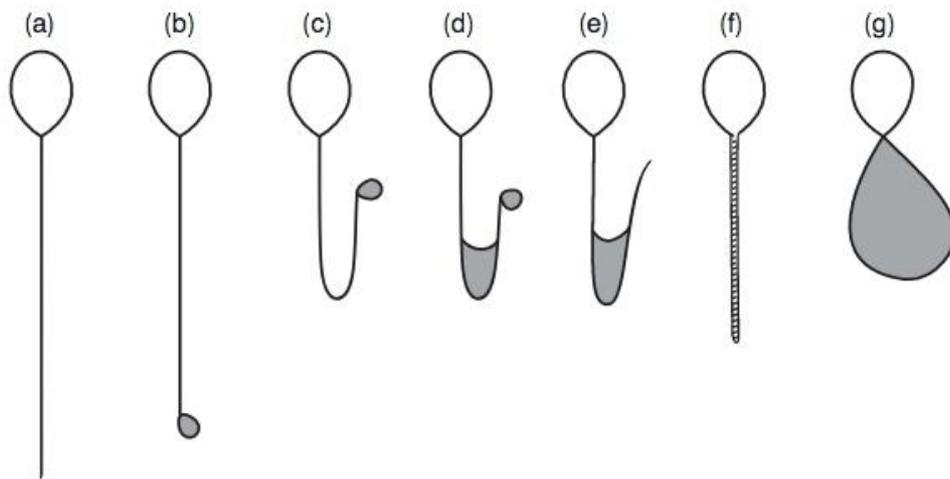
Figure 25 : Technique de sélection par biréfringence (d'après Gianaroli et al. 2010)

5 - Technologie microfluidique

La technologie microfluidique permet de sélectionner des spermatozoïdes sur des critères de mobilité et de morphologie. Il s'agit d'un dispositif à deux chambres séparées par une membrane en matière plastique poreuse, le sperme brut est injecté dans une chambre et seuls les spermatozoïdes les plus mobiles peuvent passer l'obstacle (Asghar et al. 2014).

6 - L'Hypo-Osmotic Swelling Test (HOS-test)

Cette technique se base sur la propriété de semi-perméabilité de la membrane intacte du spermatozoïde qui induit un gonflement de ce dernier et une courbure du flagelle dans des conditions hypo-osmotiques. Selon l'aspect de la courbure de son flagelle, le spermatozoïde peut être classé en 7 grades de (a) à (g) (Figure 26). L'intégrité de l'ADN spermatique se refléterait à travers l'intégrité de la membrane du spermatozoïde (Aitken et al. 1998). Bassiri et al. ont montré qu'il existait une association entre un faible taux de fragmentation d'ADN spermatique et certains profils HOS, notamment le grade d.



(a) : aucun changement, (b à g) : différents types de changement du flagelle, la zone grisée correspond au gonflement flagellaire.

Figure 26 : Représentation schématique des changements morphologiques typiques des spermatozoïdes induits par un stress hypo-osmotique (après HOS-test) (d'après World Health Organization, 2010)

7 - Magnetic activated cell sorting (MACS)

Cette technique se base sur la détection d'un marqueur apoptotique au niveau de la membrane plasmique du spermatozoïde. Lors de l'apoptose, la phosphatidylsérine (PS) est un phospholipide externalisé au niveau de la membrane cellulaire de façon précoce. Ce dernier a une très forte affinité pour l'annexine V, une protéine qui est conjuguée à des microbilles magnétiques pour cette méthode. Le mélange de sperme mis en incubation avec les microbilles magnétiques conjuguées à l'annexine V, est déposé sur une colonne contenant des

billes magnétiques, le tout soumis à un champ magnétique externe (aimant). Le passage à travers la colonne aimantée permet de séparer le prélèvement en deux populations : une population de spermatozoïdes annexine V- (spermatozoïdes sans externalisation de la PS, correspondant à la fraction recueillie) et une population annexine V+ (spermatozoïdes ayant externalisé la PS, correspondant à la fraction retenue dans la colonne aimantée).

Son principe est illustré à la Figure 28 (p73).

Objectifs de l'étude

Des études récentes montrent que les gamètes chromosomiquement déséquilibrés ont un taux d'ADN fragmenté significativement plus élevé que les gamètes chromosomiquement normaux ou équilibrés. Plusieurs théories sont avancées pour expliquer la présence de spermatozoïdes vivants et féconds avec un ADN fragmenté et chromosomiquement déséquilibré dans l'éjaculat de ces patients. Nous avons émis l'hypothèse qu'une apoptose abortive au niveau testiculaire, c'est-à-dire un processus apoptotique qui n'aurait pas été mené à terme, pourrait expliquer la présence de ces spermatozoïdes.

Dans cette étude, nous appliquerons la technique MACS afin de séparer les spermatozoïdes de patients porteurs d'une anomalie chromosomique de structure en deux populations distinctes annexine V- (spermatozoïdes non apoptotiques) et annexine V+ (spermatozoïdes apoptotiques).

Nous étudierons la fragmentation de l'ADN spermatique par la technique TUNEL et la ségrégation méiotique par FISH. Ces évaluations seront réalisées sur l'éjaculat total et sur chaque population de spermatozoïdes issus du tri par MACS, chez un même patient. Ces analyses nous permettront de voir s'il existe des variations de la fréquence des spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés et/ou fragmentés.

Ce projet nous permettra aussi d'avoir une première idée quant à son potentiel de sélection concernant des spermatozoïdes de meilleure qualité. Cela pourrait contribuer à développer une nouvelle stratégie de prise en charge des couples dont l'homme est porteur d'une anomalie chromosomique de structure afin d'augmenter les chances de grossesse et de donner naissance à un enfant en bonne santé. Il s'agit d'une étude innovante car, à notre connaissance, aucune étude n'a comparé les taux de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés des deux populations annexine V- et V+ à ceux observés dans l'éjaculat total dans ce type d'infertilité masculine chromosomique.

Patients et méthodes

I - Patients

Quatre hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure ont été inclus dans cette étude. L'analyse chromosomique par caryotype a été réalisée à partir de culture de lymphocytes issus d'un prélèvement de sang périphérique. Nous avons un porteur d'une translocation robertsonienne et trois porteurs d'une translocation réciproque équilibrée (Tableau 2). Nous avons travaillé sur des paillettes de sperme cryocongelées qui ont été obtenues avec la participation de différents centres nationaux (CHU de Clermont Ferrand et de Toulouse). Les patients avaient reçu une information claire et avaient donné leur consentement écrit au sujet d'une utilisation des paillettes de sperme cryocongelées dans le cadre de la recherche.

Tableau 2 : Caryotype de quatre hommes porteurs d'une translocation robertsonienne ou réciproque équilibrée

Patient	Caryotype
P1	45,XY,rob(13;14)(q10;q10)
P2	46,XY,t(4;12)(q31;q23)
P3	46,XY,t(9;12)(q31;p12)
P4	46,XY,t(1;15)(p22.2;q21.1)

II - Déroulement de l'étude

Après décongélation d'une paillette de sperme cryocongelé, trois analyses ont été réalisées : une analyse de la ségrégation méiotique par technique de FISH, une évaluation de la fragmentation d'ADN spermatique par technique TUNEL et une mesure de l'apoptose par annexine-FITC (Fluorescein IsoThioCyanate). Une nouvelle mesure de la fragmentation d'ADN spermatique est réalisée après la mise en incubation du reste de sperme avec les microbilles magnétiques et le BB (Binding Buffer), ceci afin d'évaluer l'impact du BB sur ce paramètre. Suite à la technique de séparation des spermatozoïdes par MACS, cet ensemble de trois analyses a été renouvelé sur la fraction d'annexine V-, et sur la fraction d'annexine V+. De plus la concentration en spermatozoïde a été estimée après chaque étape de l'étude (Figure 27).

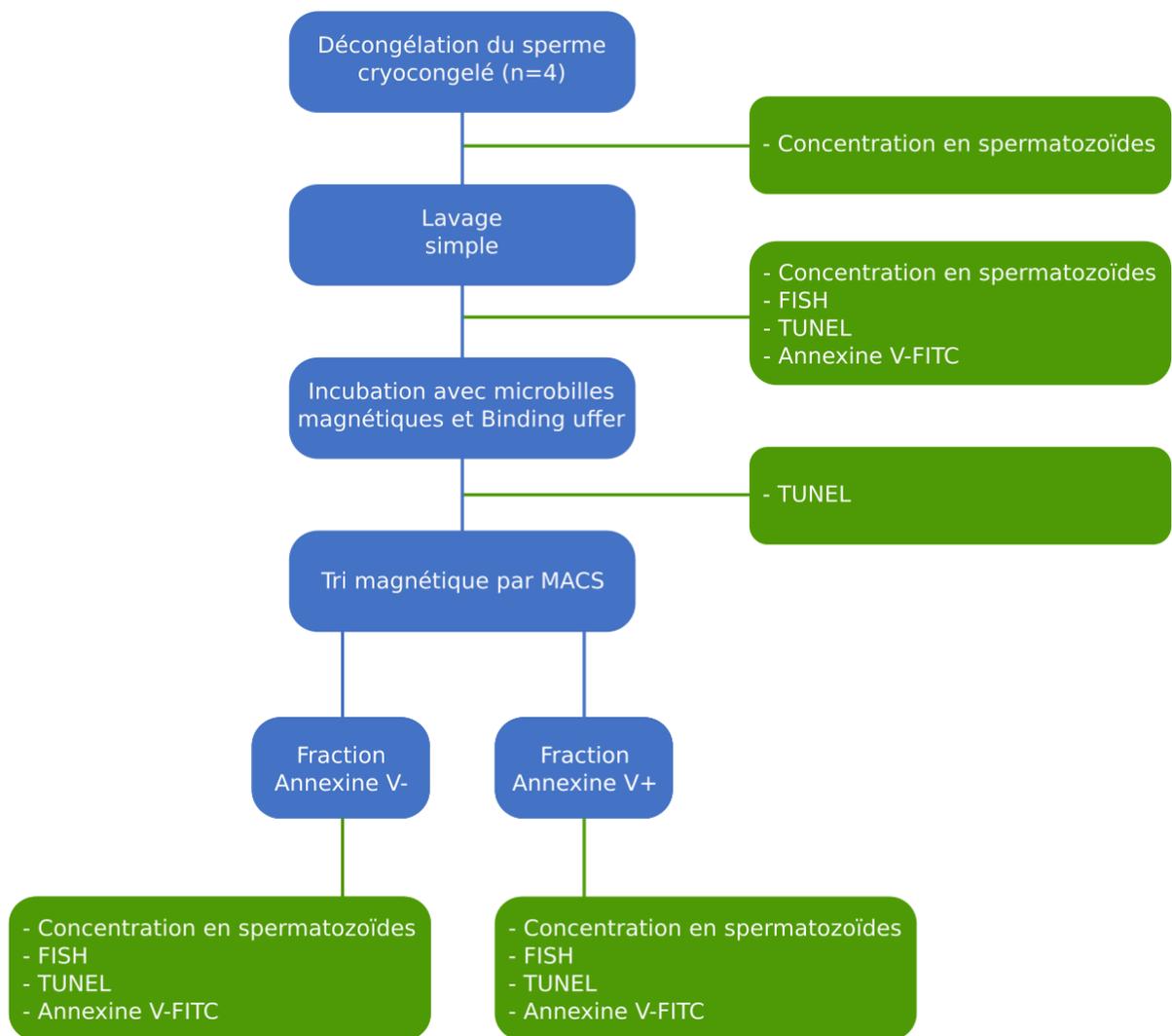


Figure 27 : Diagramme de flux de l'étude

III - Préparation des échantillons de sperme

Les échantillons de sperme cryocongelés ont été décongelés pendant 30 min à température ambiante et ont subi une étape de lavage simple dans 1 ml de BB 1X (Binding buffer, Miltenyi Biotec SAS, Paris) afin d'éliminer le cryoprotecteur. Après centrifugation, le surnageant a été éliminé et le culot remis en suspension dans du BB 1X. Des frottis ont été réalisés pour la réalisation d'une FISH, d'une technique TUNEL et d'une analyse de l'apoptose par annexine-FITC+. Le reste du prélèvement a été utilisé pour la séparation par technique MACS.

IV - Concentration totale en spermatozoïdes

Afin d'évaluer le nombre de spermatozoïdes obtenu dans les différentes fractions séparées avant et après tri, nous avons mesuré la concentration totale en spermatozoïdes (10^6) à chaque étape de l'étude : après la décongélation des paillettes cryocongelées, après l'incubation avec les microbilles magnétiques et le BB, dans la fraction d'annexine V- et dans la fraction d'annexine V+. Ces mesures ont été réalisées en accord avec les recommandations de l'OMS (World Health Organization 2010), par dilution au $1/10^{\text{ème}}$ (20 μl de sperme dilué dans 180 μl d'eau distillée), dans une cellule de Malassez.

V - Séparation par la technique MACS

Après réalisation des frottis, le culot de spermatozoïdes restant est remis en suspension et a été incubé avec 100 μL de microbilles d'annexine V, complété jusqu'à obtention d'un volume final de 500 μL par du BB 1X, puis un temps d'incubation à température ambiante de 15 min a été respecté. La suspension de microbilles et de spermatozoïdes a été déposée au sommet de la colonne de séparation contenant des microbilles ferromagnétiques, le tout placé dans un champ magnétique externe (MiniMACS, Miltenyi Biotec, SAS Paris). Les spermatozoïdes sans externalisation de la PS (non apoptotiques) sont passés à travers la colonne et constituaient la fraction annexine V négative (annexine V-). La colonne a ensuite été lavée avec 500 μl de BB 1X. Les spermatozoïdes avec externalisation de la PS (apoptotiques) retenus dans la colonne de séparation ont été élués avec du BB 1X après que celle-ci ait été retirée du champ magnétique externe, les spermatozoïdes ainsi recueillis constituaient la fraction annexine V positive (annexine V+). La technique MACS est schématisée à la Figure 28.

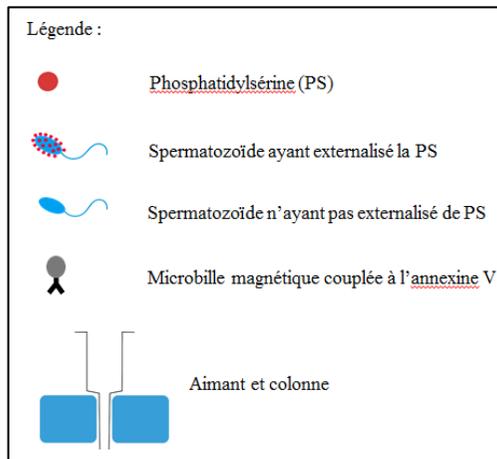
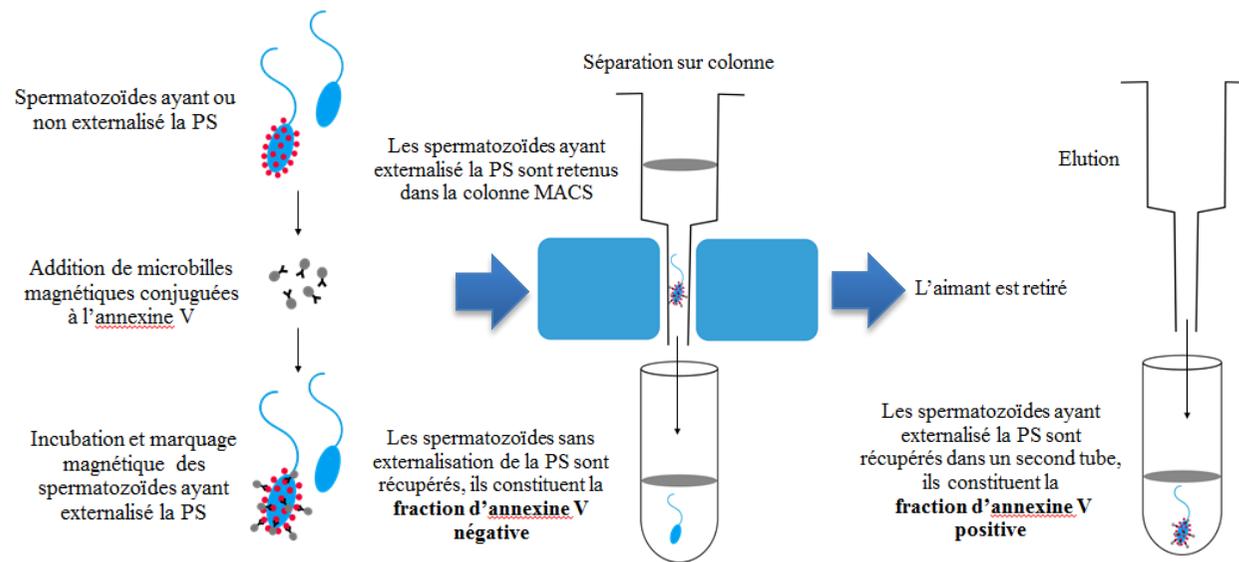


Figure 28 : Schéma explicatif de la technique MACS

VI - Technique FISH sur sperme

Nous avons effectué une FISH avec un mélange de sondes spécifiques pour chaque patient permettant de détecter tous les variants de la ségrégation méiotique (Tableau 3). Ces sondes correspondaient à des BACs, sélectionnés avec l'aide du site UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>), et des sondes commerciales prêtes à l'emploi. Afin d'obtenir un signal satisfaisant lors de la lecture au microscope, un « pool de BACs » marqué par un même fluorochrome a été réalisé. Il s'agissait d'un ensemble de 5 à 6 BACs contigus de façon à atteindre une longueur moyenne de 500 000 pb. Les étapes de mise en culture, extraction, marquage et précipitation des BACs ont toutes été réalisées au laboratoire et sont détaillées ci-dessous.

Tableau 3 : Mélange des sondes utilisées pour effectuer la FISH sur les spermatozoïdes de quatre hommes porteurs d'une translocation robertsonienne ou réciproque équilibrée

Patient	Mélanges des sondes utilisées pour l'analyse par FISH
P1	BACs en 13q33.3 (Green), BACs en 14q32.33 (Orange), CEP18 (Aqua)
P2	BACs en 4q22.1 (Aqua), BACs en 4q34.1 (Green), CEP12 (Orange)
P3	BACs en 12p13.33 (Aqua), BACs en 9q34 (Green), CEP12 (Orange)
P4	BACs en 1q24.1-24.2 (Aqua), BACs en 15q26.3 (Green), BACs en 1p36.33 (Orange)

1 - Méthode de préparation des BACs

➤ Mise en culture des BACs

Les BACs sont stockés au laboratoire au sein d'une BACthèque, à -80°C dans du glycérol. Après sélection des BACs d'intérêts, 1 ml de ceux-ci sont décongelés et mélangés à 25 ml d'une solution de LB / Chloramphénicol (1,6 ml de Chloramphénicol avec 800 ml de milieu LB (Luria Bertani). Le tout est placé une nuit à agitation à 37°C. Après une centrifugation (25 min, 3000 g à 4°C), le surnageant est éliminé et le culot conservé à -20°C jusqu'à l'étape d'extraction.

➤ Extraction des BACs

Le culot est mis en suspension dans 800 µl de GTE 1X (Glucose Tris EDTA) / lysozyme et incubé 15 min dans de la glace. Sont rajoutés 1,6 ml de SDS/NaOH, incubation 5 min dans la glace, puis 1,2 ml d'acétate de potassium 3M, incubation 15 min dans la glace. Une centrifugation est effectuée (25 min, 3000 g à 4°C), et le surnageant est filtré et mélangé à 1,8 ml d'isopropanol, incubation 15 min dans la glace. Après élimination du surnageant, 500 µl de TE 1X (Tris-HCl-EDTA) et 500 µl de chlorure de lithium sont ajoutés, incubation 15 min dans la glace, suivi d'une centrifugation (25 min, 3000 g à 4°C). Le surnageant est éliminé, 300 µl de TE 1X (et 7 µl de RNases A (10mg/ml) sont ajoutés, incubation au bain marie à 37°C pendant 1 heure. Sont ajoutés 8 µl de protéinase K (10 mg/ml) et mis en incubation une nuit à 37°C. Le lendemain, 400 µl de phénol-chloroforme sont ajoutés, suivi d'une centrifugation (10 min, 11000g, à température ambiante), permettant l'obtention de deux phases distinctes. Au niveau de la phase supérieure, 250 µl sont prélevés, auxquels sont rajoutés 100 µl d'acétate d'ammonium 7,5M et 600 µl d'éthanol absolu, incubation 1 heure à -20°C. Après une centrifugation (15 min, 11000g, à température ambiante), le surnageant est éliminé, 500 µl d'éthanol à 70° sont ajoutés, puis une centrifugation est de nouveau effectuée (10 min, 11000g, à température ambiante). Le surnageant est éliminé, puis en fonction de la taille du culot obtenu, 50 à 100 µl de TE 1X sont ajoutés. Une quantification des échantillons est réalisée par spectrophotomètre.

➤ Marquage des BACs

Les BACs sélectionnés ainsi que les réactifs du kit Vysis (Rungis, France) sont décongelés à température ambiante. En fonction du nombre de BACs, un mélange est réalisé (Tableau 4).

L'ensemble de la manipulation doit être réalisé à l'abri de la lumière.

Lorsque le mix est préparé et bien homogénéisé, 10,2 µl du mélange sont répartis dans des microtubes et 0,7 µl de fluorochrome sont ajoutés dans chacun d'eux, ainsi que 1 µl d'ADN de BAC. Après homogénéisation, les microtubes sont mis en incubation une nuit au bain-marie à 15°C. Le lendemain, la réaction enzymatique est stoppée en incubant les microtubes au bain-marie 10 min à 72°C. Ils sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

➤ Précipitation des BACs

Cette étape correspond à la préparation des BACs afin de réaliser la technique FISH.

Un microtube par pool de BACs doit être préparé. Le mélange est préparé en fonction du nombre de BACs et du nombre de frottis à analyser. Afin d'éviter les hybridations non spécifiques, le réactif Cot-1 est utilisé. La précipitation des BACs est réalisée par l'acétate et l'éthanol. Après homogénéisation, le mélange est placé 15 min à -20°C, puis une centrifugation est réalisée (30 min, 17000g, à 4°C). Le surnageant est éliminé, 10 µl de tampon Locus Specific Identifier sont ajoutés et après homogénéisation, les pools de BACs ainsi préparés, sont conservés à -20°C.

Tableau 4 : Composition des mélanges correspondant aux étapes de marquage et de précipitation des BACs.

Etapes	Mélange
Marquage des BACs	4,43 µl d'H ₂ O + 0,42 µl dTTP 0,3 mM + 0,84 µl dATP 0,3 mM + 0,84 µl dCTP 0,3 mM + 0,84 µl dGTP 0,3 mM + 1,2 µl de tampon 10X + 1,80 µl d'enzyme
Précipitation des BACs	4 µl d'H ₂ O + 5 µl de BAC marqué + 1 µl Cot-1 DNA + 1 µl d'acétate Na3M + 25 µl d'éthanol 100°

2 - Réalisation de la technique FISH

Une fois secs, les frottis ont subi une étape de fixation dans une solution de Carnoy pendant une nuit. Avant l'hybridation, les noyaux spermatiques ont été décondensés dans une solution de NaOH 1N à température ambiante puis lavés dans un bain de SSC 2X (Saline Sodium Citrate) pendant 5 à 10 min à température ambiante. Ils ont été immergés dans un bain contenant une solution de SSC 2X/0,4%NP40 pendant 30 min à 37°C et ont été passés dans une série de bain d'éthanol de concentration croissante (70, 90 et 100%) pendant 3 min chacun à température ambiante et séchés à l'air libre sous hotte. La dénaturation a été effectuée simultanément sur les spermatozoïdes et les sondes pendant une durée de 1 min à 70°C. Les frottis ont été incubés durant la nuit dans une chambre d'incubation humidifiée à l'abri de la lumière à 37°C. Ils ont été lavés pendant 30 secondes dans une solution de SSC 0,4X/0,3%NP40 à 72°C et 15 secondes dans une solution de SSC 2X/0,1%NP40 à température ambiante. Finalement, du 4',6-diamidino-2-phenyl-indole (DAPI) a été ajouté sur

chaque frottis et une lamelle de verre est déposée. Les frottis ainsi préparés ont été conservés au réfrigérateur à +4°C jusqu'à la lecture. L'analyse s'effectue sur microscope à épifluorescence dans l'obscurité (Zeiss AxioPlan Microscope (Zeiss, Le Pecq, France)). Le contenu chromosomique des spermatozoïdes a été déterminé selon la combinaison des signaux fluorescents observés. Au moins 2000 spermatozoïdes devaient être analysés par frottis. L'acquisition a été réalisée avec une caméra CDD couplée à ISIS (*In Situ* Imaging System) (Metasystems, Altlussheim, Allemagne).

Les différentes compositions des solutions utilisées pour réaliser une FISH sont disponibles dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Compositions des différentes solutions utilisées pour réaliser une FISH

Solutions	Compositions
Carnoy	20 ml acide acétique + 60 ml méthanol
SSC 2X/0,4%NP40	10 ml SSC20X + 90 ml H ₂ O distillée + 400 µl NP40
SSC 2X/0,1%NP40	10 ml SSC20X + 90 ml H ₂ O distillée + 100 µl NP40
SSC 0,4X/0,3%NP40	10 ml SSC4X + 90 ml H ₂ O distillée + 300 µl NP40

VII - La technique TUNEL

La fragmentation de l'ADN spermatique a été réalisée après décongélation des paillettes cryocongelées, après incubation avec les microbilles magnétiques et le BB et après la technique de séparation par MACS dans la fraction d'annexine V- et d'annexine V+.

Une fois séchés, les frottis ont subi une étape de fixation dans une solution de Carnoy pendant une nuit. Ils ont été immergés dans une solution de prétraitement de SSC 2X/0,4% NP40 pendant 30 min à 37°C, puis ils sont immédiatement placés dans une série de bains d'éthanol de concentration croissante pendant 3 min chacun (70%/90%/100%).

Nous avons utilisé le kit ApopTag (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France) afin de réaliser la technique TUNEL selon les recommandations du fournisseur. Les compositions des différentes solutions utilisées sont disponibles dans le Tableau 6.

Brièvement, une solution de Buffer Equilibration est déposée sur les frottis ainsi qu'une lamelle souple pendant 30 secondes à température ambiante. Puis la lamelle souple est retirée et un mélange de Buffer Reaction avec de l'enzyme TdT (solution 1) est ajouté, et une nouvelle lamelle souple est déposée, le tout est mis à incuber dans une chambre noire humide à 37°C pendant 1 heure. La lamelle est retirée et les frottis sont incubés pendant 10 min dans

une solution de Stop Wash Buffer (solution 2). Les frottis sont ensuite lavés dans deux bains successifs de PBS 1X pendant 1 min 30 chacun à température ambiante et laissés égouttés. Une dernière solution anticorps anti-DIG conjuguée à la rhodamine est déposée (solution 3), recouverte d'une lamelle souple, et les frottis sont laissés incubés pendant 30 min dans une chambre noire d'humidification à 37°C. Une fois la lamelle retirée, les frottis sont à nouveau passés successivement dans deux bains de PBS 1X pendant 4 min chacun à température ambiante. Une fois séchés à l'air libre, une contre coloration de l'ADN avec du DAPI est effectuée, les frottis peuvent alors être conservés à l'obscurité à +4°C jusqu'à la lecture.

L'analyse s'effectue sur un microscope à épifluorescence dans l'obscurité. Le matériel chromosomique normal émet une fluorescence bleue, et une fluorescence de couleur rouge signe un ADN spermatique fragmenté. Un total de 500 spermatozoïdes est nécessaire pour l'analyse. Seuls les spermatozoïdes avec un flagelle ont été comptabilisés.

Tableau 6 : Compositions des différentes solutions utilisées pour la technique TUNEL

Solution de prétraitement SSC 2X/0,4% NP40	90 ml H2O distillée + 10 ml solution SSC 20X + 400 µl NP40
Solution 1 (pour 1 frottis)	31,5 µl tampon de réaction + 13,5 µl enzyme TdT
Solution 2 (pour 1 frottis)	58,2 ml H2O distillée + 1,8 ml Stop Wash Buffer
Solution 3 (pour 1 frottis)	22,5 µl solution de blocage + 20,5 µl solution anticorps anti-DIG conjugué à la rhodamine

VIII - Analyse de l'apoptose spermatique par l'annexine

V-FITC

L'analyse de l'apoptose par l'annexine V-FITC a été réalisée après décongélation des paillettes cryocongelées et après séparation par la technique MACS dans la fraction d'annexine V- et d'annexine V+. L'échantillon est mis en incubation pendant 15 min à l'obscurité avec 10 µl d'annexine V-FITC et complété jusqu'à 100 µl final avec du BB 1X. Puis 1 ml de BB 1X est ajouté, et après homogénéisation, l'échantillon est mis à centrifuger 10 min à 400 g à température ambiante. Le culot est récupéré et repris dans 10 µl de BB 1X.

Des frottis sont réalisés à partir de l'échantillon homogénéisé et une fois ceux-ci séchés, une contre coloration avec du DAPI est effectuée. Ils peuvent alors être conservés à l'obscurité au réfrigérateur à +4°C jusqu'à la lecture.

L'analyse s'effectue sur un microscope à épifluorescence dans l'obscurité. Les spermatozoïdes émettant une fluorescence verte sont comptabilisés comme des spermatozoïdes apoptotiques. Un total de 500 spermatozoïdes sur cinq zones différentes est nécessaire pour l'analyse.

VII - Analyse statistique

Un test de χ^2 indépendant a été utilisé pour comparer le nombre de spermatozoïdes ayant un contenu chromosomiquement déséquilibrés au nombre de ceux ayant un contenu chromosomique normal ou équilibré. Un test de χ^2 indépendant a aussi été réalisé pour évaluer les variations de fréquence des différents modes de ségrégation méiotique chez un même patient. Ce même test a été utilisé pour évaluer le nombre de spermatozoïdes avant et après la technique de séparation par MACS.

Les pourcentages de spermatozoïdes avec fragmentation de l'ADN et ceux des spermatozoïdes apoptotiques ont été comparés avant et après tri par MACS pour chaque patient.

Les analyses de données ont été réalisées avec l'aide du logiciel en ligne BiostaTGV (<http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/>). Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative.

Résultats

I - Patients

Quatre hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure ont été inclus dans cette étude : un patient avec une translocation robertsonienne : 45,XY,rob(13;14)(q10;q10) (P1), et trois patients avec une translocation réciproque équilibrée entre deux autosomes : 46,XY,t(4;12)(q31;q23) (P2), 46,XY,t(9;12)(q31;p12) (P3) et 46,XY,t(1;15)(p22.2;q21.1) (P4).

II - Paramètres spermatiques de base

Les paramètres spermatiques de base sur sperme frais avant la cryocongélation sont présentés dans le Tableau 7. Les concentrations totales de sperme vont de 124,8 millions (P1) à 374,4 millions de spermatozoïdes (P2). Les mobilités progressives s'échelonnent de 28% (P1) à 52% (P3).

Tableau 7 : Paramètres spermatiques de base pour chaque patient sur sperme frais.

Patient	Volume (ml)	Concentration totale (10⁶)	Mobilité progressive (%)	Mobilité totale (%)	Vitalité (%)	Morphologie (critères stricts) (%)
P1	3,2	124,8	28	48	-	-
P2	3,2	374,4	34	41	-	-
P3	5,3	265,0	52	55	-	-
P4	2,8	302,4	35	40	51	31

III - Évolution de la concentration en spermatozoïdes à chaque étape de l'étude

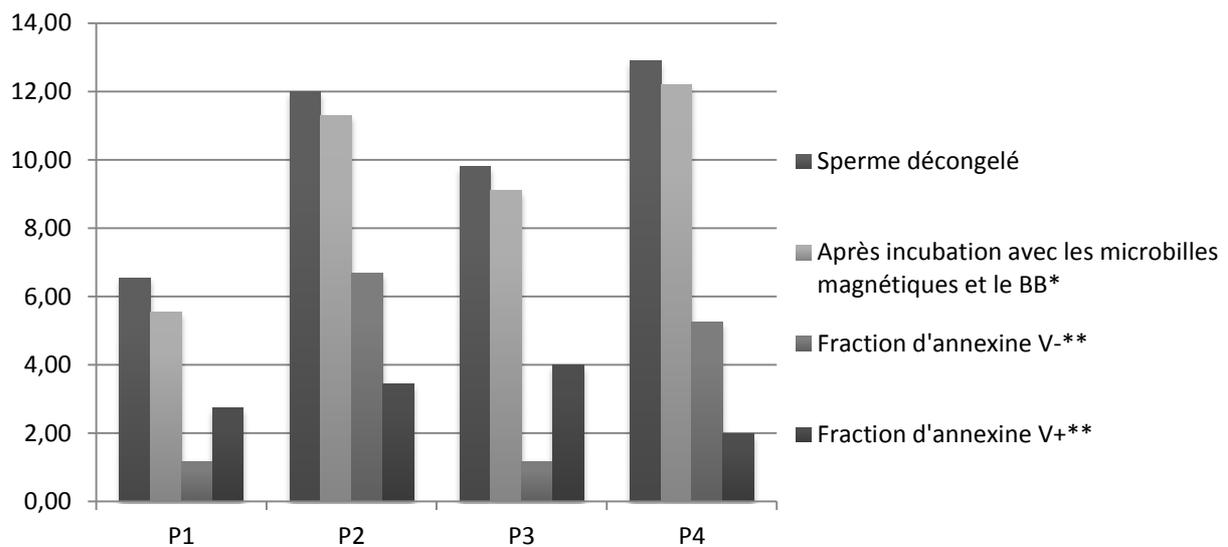
Les données concernant la concentration totale des spermatozoïdes à chaque étape de l'étude sont présentées dans le Tableau 8 et illustrées à la Figure 29.

Après décongélation des paillettes de sperme, la concentration totale en spermatozoïdes allait de 6,55 millions (P1) à 12,9 millions (P4). Le nombre de spermatozoïdes était significativement diminué après l'incubation avec les microbilles magnétiques et le BB. De

même, le nombre de spermatozoïdes était significativement diminué dans la fraction d'annexine V- et d'annexine V+ après l'incubation avec les microbilles magnétiques et le BB.

Tableau 8 : Concentration totale en spermatozoïdes (10^6) dans l'échantillon de sperme décongelé, après l'incubation avec les microbilles magnétiques et le BB, et dans les fractions d'annexine V- et d'annexine V+

Patient	Sperme décongelé	Après incubation avec les microbilles magnétiques et le BB *	Fraction d'annexine V- **	Fraction d'annexine V+ **
P1	6,55	5,55	1,16	2,73
P2	12,00	11,30	6,68	3,43
P3	9,81	9,10	1,16	3,99
P4	12,90	12,20	5,26	1,98
<i>Moyenne</i>	<i>10,32</i>	<i>9,54</i>	<i>3,57</i>	<i>3,03</i>



*Diminution statistiquement significative comparée à l'échantillon de sperme décongelé

**Diminution statistiquement significative comparée à l'échantillon après lavage simple

Figure 29 : Concentration totale en spermatozoïdes (10^6) dans l'échantillon de sperme décongelé, après l'incubation avec les microbilles magnétiques et le BB, et dans les fractions d'annexine V- et d'annexine V+

IV - Analyse de la ségrégation méiotique par FISH

Un exemple de capture de FISH au microscope à épifluorescence est disponible à la Figure 30. Les résultats des mesures par FISH sont illustrés aux Figures 31 et 32 et les données dans le Tableau 9. Entre 2016 (P4) et 2864 (P2) spermatozoïdes ont été analysés.

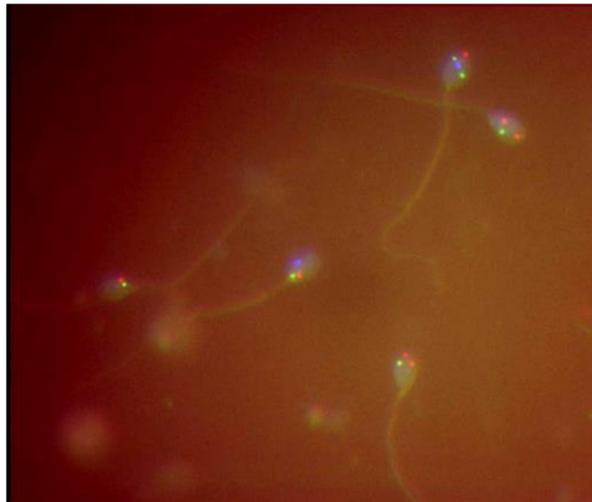


Figure 30 : Capture au microscope à épifluorescence de la FISH sur spermatozoïdes de l'éjaculat total du patient P2 (46,XY,t(4;12)(q31;q23)), avec un pool de BACs en 4q22.1 (Aqua) et en 4q34.1 (Green), et une sonde commerciale CEP12 (Orange)

Concernant les spermatozoïdes normaux ou équilibrés, qui correspondaient au mode de ségrégation alterne : pour tous les patients (de P1 à P4), les taux de spermatozoïdes après décongélation étaient de 79,99%, 44,27%, 48,36% et 37,75% respectivement. Après MACS, il y avait une augmentation significative des spermatozoïdes normaux ou équilibrés dans la fraction annexine V- pour P1, P2, P3 et P4 : avec respectivement 88,03%, 62,77%, 66,16% et 54,76% de spermatozoïdes normaux ou équilibrés ($p < 0,01$ pour les 4 patients). Nous observons, à l'inverse, une diminution significative dans la fraction d'annexine V+ pour P1, P2 et P4 : avec respectivement 75%, 31,63%, et 27,63% de spermatozoïdes normaux ou équilibrés ($p < 0,01$ pour les 3 patients). Pour tous les patients, nous avons observé une différence significative entre les deux fractions annexine V- et V+ ($p < 0,05$), avec une majorité de spermatozoïdes normaux ou équilibrés dans la première, et de spermatozoïdes déséquilibrés dans la seconde (Figure 31).

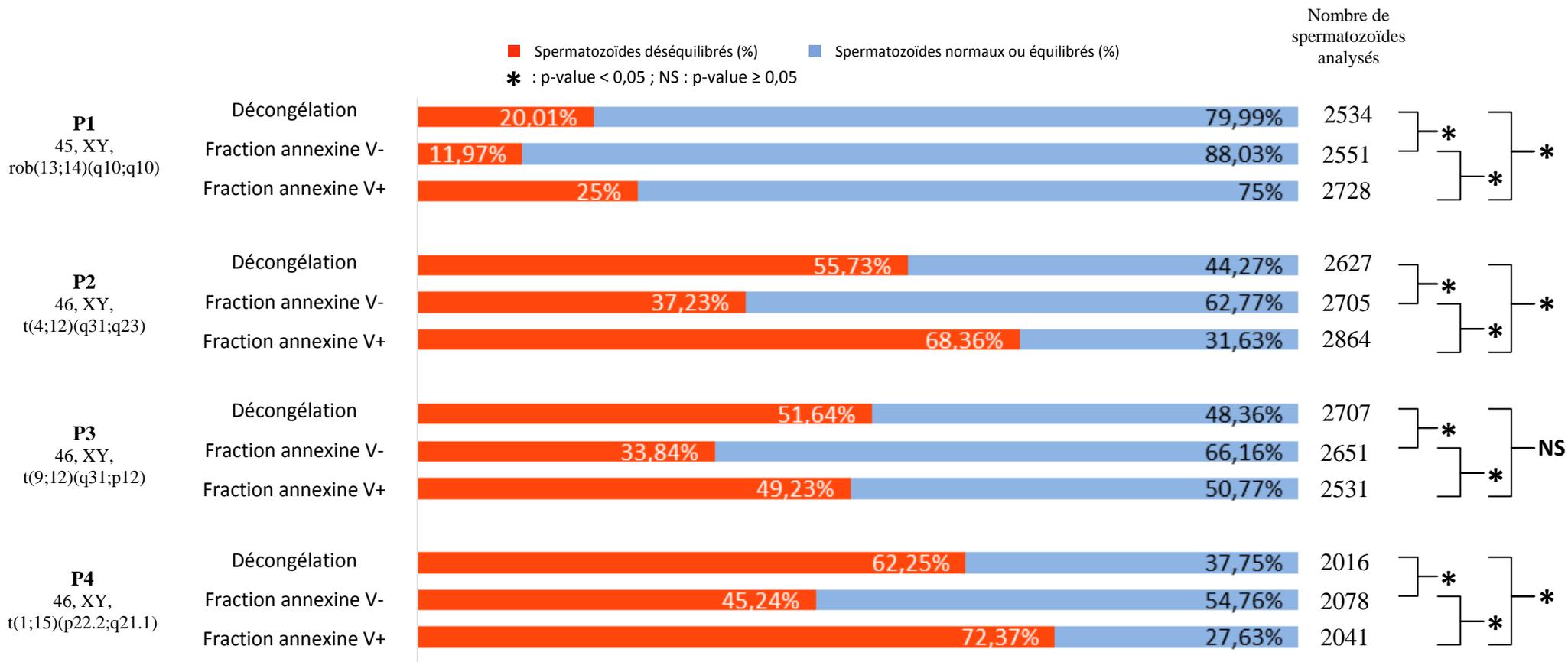
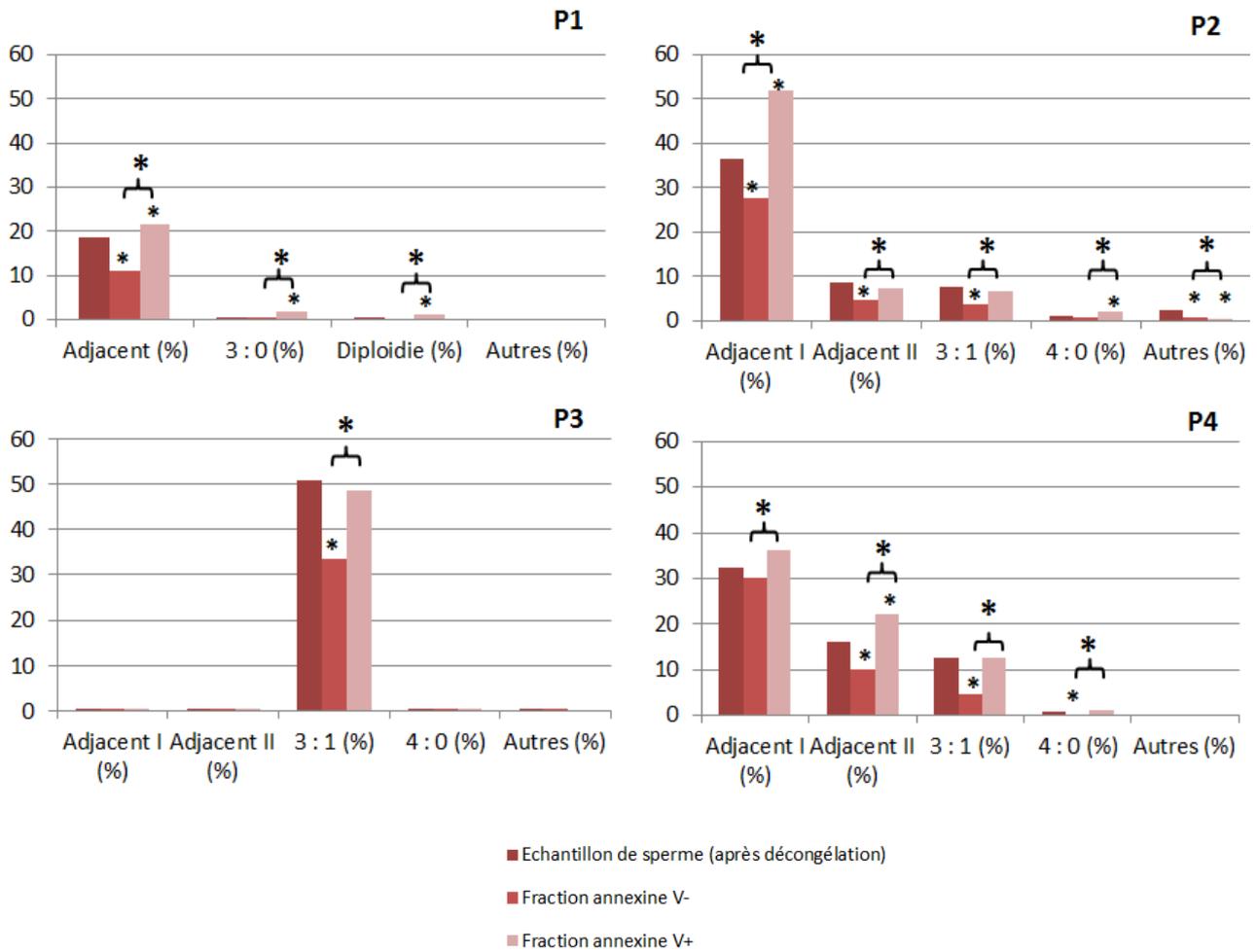


Figure 31 : Taux de spermatozoïdes déséquilibrés et normaux ou équilibrés dans l'échantillon de sperme décongelé, la fraction d'annexine V- et la fraction d'annexine V+.

Concernant la population de spermatozoïdes déséquilibrés, les données obtenues par FISH sont illustrées à la Figure 32 et détaillées dans le Tableau 9. Pour le patient avec la translocation robertsonienne (P1), le mode de ségrégation majoritaire donnant des spermatozoïdes déséquilibrés était l'adjacent (18,82%) puis 3:0 (0,47%). À propos des patients avec une translocation réciproque équilibrée, pour P2 et P4 respectivement, le mode de ségrégation majoritaire donnant des spermatozoïdes déséquilibrés était l'adjacent I (36,43% et 32,49%) suivi de l'adjacent II (8,64% et 16,12%), puis de 3:1 (7,5% et 12,75%) et 4:0 (0,91% et 0,79%). Pour P3, le mode 3:1 (50,83%) était le mode de ségrégation préférentiel, suivi par l'adjacent II (0,18%), l'adjacent I (0,15%) et 4:0 (0,07%). Après MACS, les proportions de spermatozoïdes déséquilibrés issus de chacun de ces différents modes de ségrégation diminuaient significativement dans la fraction annexine V-, et augmentaient dans la fraction annexine V+, excepté pour P3, pour qui, nous observons une diminution significative du mode de ségrégation 3:1 uniquement (ceci s'expliquant par le faible taux des autres modes de ségrégation méiotique (< 0,4%)).



* : Différence statistiquement significative par rapport à l'échantillon de sperme décongelé

* : Différence statistiquement significative entre les deux fractions d'annexine V- et V+

Figure 32 : Variation des pourcentages des différents modes de ségrégation méiotique de la population de spermatozoïdes déséquilibrés dans l'échantillon de sperme après décongélation et dans les fractions d'annexine V- et V+

Tableau 9 : Données des ségrégations méiotiques par FISH

Patient	Modes de ségrégation méiotique	Après décongélation	Fraction d'annexine V-	Fraction d'annexine V+	Différence entre fraction d'annexine V- et V+
P1	Alterne (%)	79,99	88,03*	75*	**
	Adjacent (%)	18,82	11,14*	21,77*	**
	3 : 0 (%)	0,47	0,43	1,87*	**
	Diploidie (%)	0,47	0,2	1,1*	**
	Autres (%)	0,24	0,2	0,26	NS
Nombre de spermatozoïdes analysés		2534	2531	2728	
P2	Alterne (%)	44,27	62,77*	31,63*	**
	Adjacent I (%)	36,43	27,58*	51,99*	**
	Adjacent II (%)	8,64	4,77*	7,19	**
	3 : 1 (%)	7,5	3,66*	6,81	**
	Diploidie ou 4 : 0 (%)	0,91	0,59	2,16*	**
	Autres (%)	2,25	0,63*	0,21*	**
Nombre de spermatozoïdes analysés		2627	2705	2864	
P3	Alterne (%)	48,36	66,16*	50,77	**
	Adjacent I (%)	0,15	0,04	0,16	NS
	Adjacent II (%)	0,18	0,19	0,2	NS
	3 : 1 (%)	50,83	33,38*	48,64	**
	Diploidie ou 4 : 0 (%)	0,07	0,19	0,24	NS
	Autres (%)	0,41	0,04*	0*	NS
Nombre de spermatozoïdes analysés		2707	2651	2531	NS
P4	Alterne (%)	37,75	54,76*	27,63*	**
	Adjacent I (%)	32,49	30,13	36,21	**
	Adjacent II (%)	16,12	10,06*	22,15*	**
	3 : 1 (%)	12,75	4,76*	12,64	**
	Diploidie ou 4 : 0 (%)	0,79	0,19*	1,08	**
	Autres (%)	0,1	0,1	0,29	NS
Nombre de spermatozoïdes analysés		2016	2078	2041	

*Différence significative lors de la comparaison après décongélation versus fraction d'annexine V- ou fraction d'annexine V+ ($p < 0,05$)

**Différence significative en comparant les deux fractions d'annexine V- et V+ entre elles ($p < 0,05$)

NS : Non Significatif ($p \geq 0,05$)

V - Analyse de la fragmentation de l'ADN spermatique par TUNEL

Un exemple de capture des spermatozoïdes au microscope à épifluorescence est présenté à la Figure 33. Les données concernant le taux de fragmentation d'ADN spermatique à chaque étape de l'étude sont présentées dans le Tableau 10 et illustrées à la Figure 34.

Après décongélation des paillettes de sperme, la fragmentation d'ADN spermatique allait de 15% (P1) à 20,6% (P4). Les taux de fragmentation de l'ADN étaient significativement augmentés après l'incubation avec les microbilles magnétiques et le BB ($p = 0,03$). Ils étaient significativement diminués de l'échantillon après l'incubation avec les microbilles magnétiques et le BB, comparé à la fraction d'annexine V- ($p = 0,04$). Aucune différence significative n'a été retrouvée en comparant les taux de fragmentation de l'ADN spermatique de l'échantillon après l'incubation avec les microbilles et le BB ($p = 0,8$).

Tableau 10 : Taux de fragmentation de l'ADN spermatique (TUNEL%) dans l'échantillon de sperme décongelé, après incubation avec les microbilles magnétiques et le BB, dans la fraction d'annexine V- et d'annexine V+

Patient	Sperme décongelé (%)	Après incubation avec les microbilles magnétiques et le BB (%) *	Fraction d'annexine V- (%) **	Fraction d'annexine V+ (%) ***
P1	15	23	9,2	28
P2	16,2	23,4	16,2	36,2
P3	18,4	37	18,6	25,4
P4	20,6	23,8	20	23,4
Moyenne	<i>17,5</i>	<i>26,8</i>	<i>16</i>	<i>28,2</i>

* La fragmentation de l'ADN augmente significativement après incubation avec le BB et les microbilles magnétiques du sperme décongelé ($p < 0,05$)

** La fragmentation de l'ADN diminue significativement de l'incubation avec le BB et les microbilles magnétiques lavage simple, à la fraction d'annexine V- ($p < 0,05$)

*** Aucune différence significative de la fragmentation de l'ADN entre l'échantillon après incubation avec le BB et les microbilles magnétiques, à celui de la fraction d'annexine V+ ($p = 0,8$).

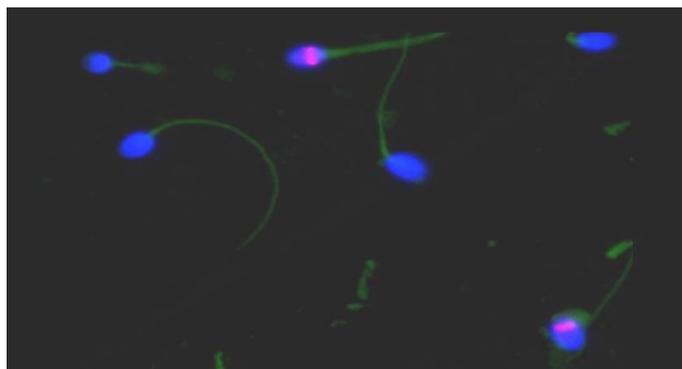
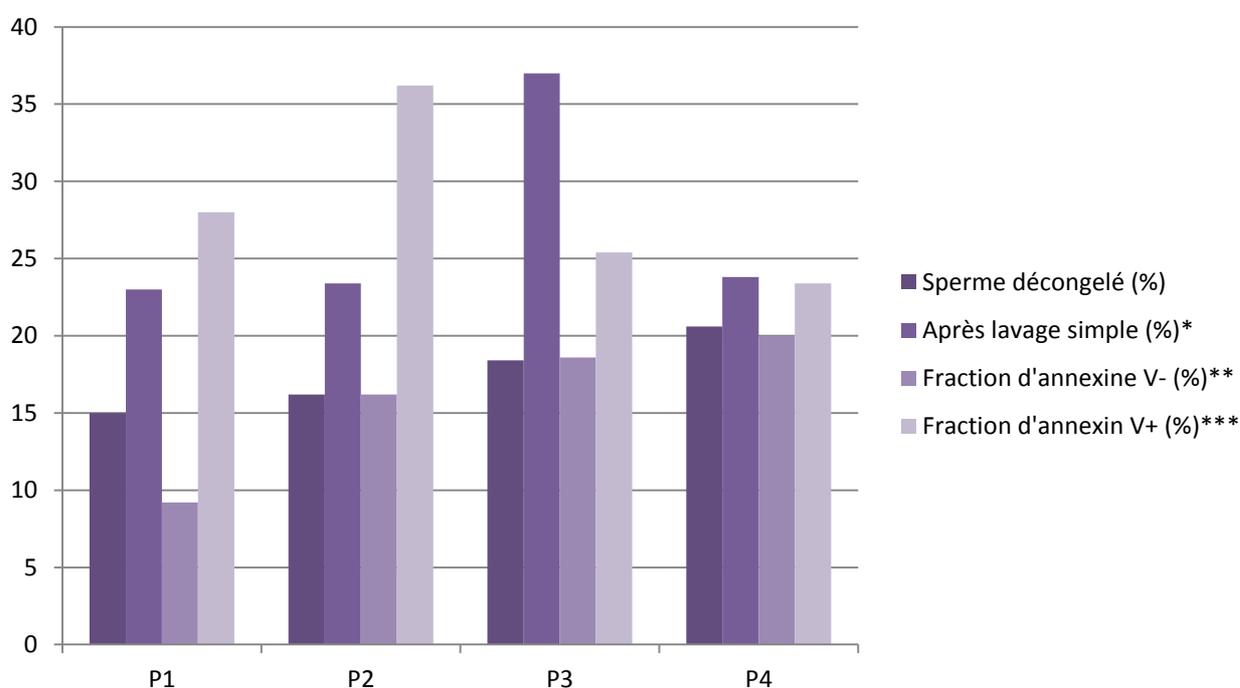


Figure 33 : Capture au microscope à épifluorescence de spermatozoïdes après la technique TUNEL



* La fragmentation de l'ADN augmente significativement après lavage simple du sperme décongelé ($p < 0,05$)

** La fragmentation de l'ADN diminue significativement du lavage simple à la fraction d'annexine V- ($p < 0,05$)

*** Aucune différence significative de la fragmentation de l'ADN entre l'échantillon après lavage simple à celui de la fraction d'annexine V+ ($p = 0,8$)

Figure 34 : Évolution du taux de fragmentation de l'ADN spermatique (TUNEL%) aux différentes étapes de l'étude chez les 4 patients.

VI - Évaluation de l'apoptose avec la liaison annexine V-FITC

Un exemple de capture de spermatozoïdes au microscope à épifluorescence est présenté à la Figure 35. Les données concernant le taux de spermatozoïdes apoptotiques avant et après la technique de séparation MACS sont disponibles dans le Tableau 11 et sont illustrées à la Figure 36.

En comparaison du pourcentage de spermatozoïdes apoptotiques évalué dans les échantillons de sperme après décongélation (57,4%-38%-72,8%-67,2%), celui-ci diminue significativement dans la fraction d'annexine V- (19,6%-14,2%-36%-35,4%) et augmente significativement dans la fraction d'annexine V+ (84,2%-85,6%-88%-83,4%), de P1 à P4 respectivement.

Tableau 11 : Pourcentage de spermatozoïdes annexine V-FITC+ dans le sperme après décongélation et les fractions d'annexine V- et V+

Patient	Sperme après décongélation (%)	Fraction d'annexine V- (%) *	Fraction d'annexine V+ (%) *
P1	57,4	19,6	84,2
P2	38,0	14,2	85,6
P3	72,8	36,0	88,0
P4	67,2	35,4	83,4
Moyenne	58,9	26,3	85,3

*Diminution statistiquement significative de la fraction d'annexine V- ou d'annexine V+ par rapport à l'échantillon de sperme après décongélation

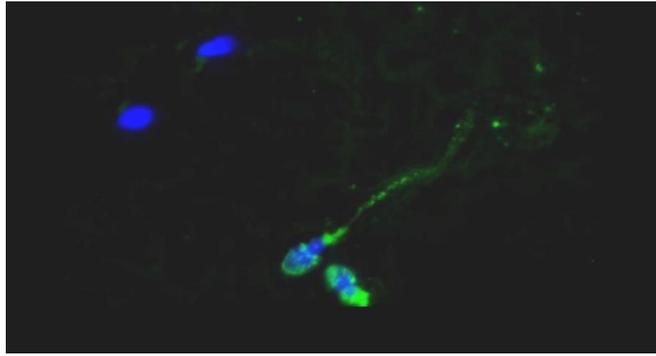
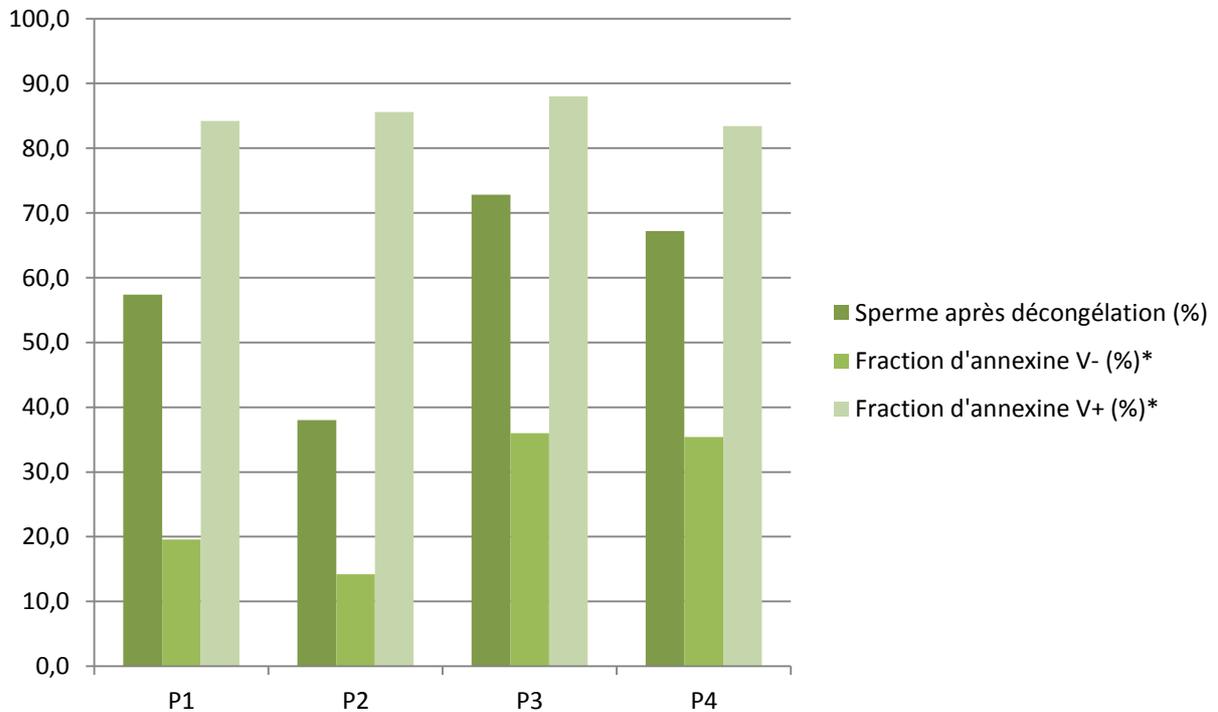


Figure 35 : Capture au microscope à épifluorescence de spermatozoïdes après marquage avec de l'annexine V-FITC



*Diminution statistiquement significative de la fraction d'annexine V- ou d'annexine V+ par rapport à l'échantillon de sperme après décongélation

Figure 36 : Population de spermatozoïde apoptotiques (annexine V-FITC+) dans les échantillons de sperme après décongélation, et dans les fractions d'annexine V- et d'annexine V+ chez les 4 patients

Discussion

I - Techniques de sélection des spermatozoïdes : le lien entre apoptose et contenu chromosomique

Plusieurs techniques de sélection des spermatozoïdes ont montré leur efficacité à réduire significativement la présence d'altérations apoptotiques dans les spermatozoïdes (MSOME, liaison à l'acide hyaluronique, Zech-selector, MACS) (Zahedi et al. 2013; Parmegiani et al. 2014). Depuis 2005, 9 études utilisant ces différentes techniques ont tenté de sélectionner les spermatozoïdes en fonction de leur équipement chromosomique chez des hommes 46,XY infertiles (Tableau 12). Parmi ces études, certains auteurs concluaient à une diminution significative des fréquences d'aneuploïdies dans les spermatozoïdes sélectionnés (Jakab et al. 2005; Garolla et al. 2008; Perdrix et al. 2011; Mongkolchaipak et al. 2013; Seiringer et al. 2013; Vendrell et al. 2014; Esbert et al. 2017). D'autres auteurs n'observaient au contraire aucune différence significative (Levron et al. 2001; Boitrelle et al. 2011).

À notre connaissance, seules 5 études ont été publiées en rapport avec la sélection de spermatozoïdes chromosomiquement équilibrés chez des patients porteurs de translocations (Tableau 13). Deux études ont évalué le potentiel de la technique MSOME pour sélectionner des spermatozoïdes normaux ou équilibrés (Cassuto et al 2011; Chulli et al.2013). Le taux de spermatozoïdes déséquilibrés dans l'éjaculat total après MSOME avait été évalué chez 9 patients porteurs de translocations (6 hommes avec une translocation réciproque équilibrée et 3 hommes avec une translocation robertsonienne) (Cassuto et al. 2011), et 6 hommes présentant une translocation réciproque équilibrée (Chelli et al. 2013). Ces deux études ont conclu que le MSOME ne permettait pas de sélectionner les spermatozoïdes normaux ou équilibrés chez des hommes présentant une anomalie chromosomique constitutionnelle.

Cependant, Vozdova et al. ont évalué les effets des techniques de SU et de liaison à l'acide hyaluronique (HA-binding) sur la sélection de spermatozoïdes déséquilibrés chez 9 porteurs de translocation réciproque équilibrée. Ils retrouvaient une diminution significative des spermatozoïdes déséquilibrés après ces méthodes (Vozdova et al. 2012). En 2014, une étude a rapporté une diminution de 63,6% à 52,3% de spermatozoïdes déséquilibrés après un traitement du sperme par simple GD chez un porteur d'une translocation réciproque équilibrée, avec la naissance par insémination intra-utérine d'un enfant présentant la translocation paternelle (Rouen et al. 2014). Une autre étude plus récente a évalué le potentiel de sélection de spermatozoïdes normaux ou équilibrés par un HOS-test chez 15 hommes porteurs de translocation (10 hommes porteurs d'une translocation réciproque équilibrée et 5

hommes porteurs d'une translocation robertsonienne). Ils montraient une diminution de 96% de la proportion de spermatozoïdes déséquilibrés par cette méthode (Rouen et al. 2017).

À notre connaissance, notre étude est la première en son genre à évaluer le taux de spermatozoïdes normaux ou équilibrés et celui des spermatozoïdes déséquilibrés après utilisation de la technique MACS, dans les deux fractions annexine V- et V+ chez des patients porteurs d'une anomalie chromosomique de structure.

Tableau 12 : FISH sur spermatozoïdes sélectionnés chez des hommes 46,XY infertiles

Publication	Patients		Sélection	FISH Chromosomes	FISH Nombre spermatozoïdes analysés	FISH Résultat	FRAGMENTATION (TUNEL)
Jakab 2005	32	O ou N	AH	X-Y-17	Ejaculat : 4770 Après sélection : 495 à 2079	Disomie : 0,79% ; Diploïdie : 0,51% Disomie : 0,21% (S) ; Diploïdie : 0,09% (S)	Non fait
Garolla 2008	10	O	MSOME	X-Y-18	Ejaculat : 1000 MSOME Morphologie spz normale : 10 MSOME Morphologie avec au moins une large vacuole : 10	14,50% 0% (S) 5,1% (S)	58% (analyse de 400 spz) 9,3% (S) 40,1% (S)
Perdrix 2011	20	T	MSOME	X-Y-18	Ejaculat : 1000 MSOME spz avec une large vacuole >13% de la surface de la tête : 25 à 50	Disomie : 0,84% Diploïdie : 0,47% Disomie : 5,16% (S) Diploïdie : 2,63% (S)	Frag complète 8,6% partielle 11,5% (analyse 500 spz) Frag complète 1,7% (S) partielle 14,5% (NS)
Boitrelle 2011	15	D 46,XY	MSOME	X-Y-18	MSOME « top spz » : 30 MSOME spermatozoïde avec vacuole >25% de la surface de la tête : 30	Disomie : 1,1% Disomie 2,2% (NS)	30,1% (analyse 500 spz après GD) 0,7% (S par rapport 3,1%) (NS par rapport à 1,3%) 1,3% (NS par rapport 0,7%) (NS par rapport à 3,1%)
Levron 2013	8	OAT 46,XY	MSOME Bord Goutte ICSI	X-Y-18	Ejaculat : 648 MSOME « top spz » : 165 Bord goutte ICSI : 174	Disomie : 7,62% Disomie : 8,75% (NS) Disomie : 4,25% (S)	Non fait
Mongkolchaipak 2013	50	D 46,XY	MSOME AH	X-Y-13-18-21	Après GD 90%/40% : 200 AH : 200 MSOME : 30	Disomie : 7% Disomie : 0,8% (S par rapport 7%) (NS par rapport à 0,7%) Disomie : 0,7% (S par rapport 7%) (NS par rapport à 0,8%)	26,8% 2,6% (S par rapport 26,8%) (NS par rapport à 1,7%) 1,7% (NS par rapport 2,6%) (S par rapport à 26,8%)

Tableau 12 (suite) : FISH sur spermatozoïdes sélectionnés chez des hommes 46,XY infertiles

Seiringer 2013	53	N ou T ou D	ZS	X-Y-18	Ejaculat : 250 Après sélection : 250	Disomie + nullisomie + diploïdie : 2,3% Disomie + nullisomie + diploïdie : 1,2% (S)	13,3% (analyse 500 spz par halosperm assay) 0,1% (S) (analyse 300 spz par halosperm assay)
Vendrel 2014	6	N 46,XY	GD MACS	X-Y-18	En moyenne 14 151 +/- 2721 spz analysés à chaque étape	Ejaculat : Aneuploïdie : 7,10% +/- 2,92 Diploïdie : 1,91% +/- 0,75 Après GD 90%/50% : Aneuploïdie : 5,13% +/- 2,22 (S par rapport à 7,10%) Diploïdie : 1,79% +/- 1,11 (S par rapport à 1,91%) Après GD 90%/50% + MACS Aneuploïdie : 4,22% +/- 2,52 (S par rapport à 5,13%) Diploïdie : 1,19% +/- 0,48 (S par rapport à 1,91%)	Après GD 90%/50% : 75,77% +/- 14,73 (S par rapport à 2,84%) Après GD 90%/50% + MACS : 2,84 +/- 3,09 (S par rapport à 75,77%)
Esbert 2017	16	9N-4A-20A-1O T non précisé 46,XY	MACS	X-Y-13-18-21	Après GD 90%/70%/45% + MACS : Annexine V- : 1017 Annexine V+ : 1020	Diploïdie : 0,5% Aneuploïdie : 0,59% (S par rapport à Annexine V+) Diploïdie : 0,37% Aneuploïdie : 0,75% (S par rapport à Annexine V-)	Non fait

N : normozoospermie, O : oligozoospermie, T : tératozoospermie, A : asthénozoospermie, D : anomalies spermatiques diverses,

Méthodes de sélection, AH : liaison à l'acide hyaluronique, MSOME : motile sperm organelle morphology examination, DG : gradient de densité, Bord goutte ICSI : Bordure de goutte ICSI, ZS : Zech-selector, MACS : Magnetic activated cell sorting

NS : non significatif, S : significatif

Spz : spermatozoïde

Tableau 13 : FISH sur spermatozoïdes sélectionnés chez des hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure

Publication	Patients	Sélection	FISH			FRAGMENTATION	
			Nombre de spermatozoïdes	Gamètes équilibrés (%)	Significativité	Nombre de spermatozoïdes	Résultat
Cassuto 2011	6 trans rec	MSOME	Ejaculat trans rec : 250	37,1% à 52,6%	NS		
	3 trans rob		MSOME trans rec				
			Classe 1 : 30 à 50	23,4% à 59,6%	NS		
			Classe 2 : 30 à 50	35,5% à 64,0%	NS		
	2 N, 3 OAT, 1 AT, 3 T		Classe 3 : 30 à 50	38,3% à 51,7%	NS		
			Ejaculat trans rob : 250	70,0% à 88,6%			
			MSOME trans rob				
			Classe 1 : 30 à 50	80,4% à 84,9%	NS		
	Classe 2 : 30 à 50	82,6% à 87,3%	NS				
	Classe 3 : 30 à 50	73,7% à 82,4%	NS				
Vozdova 2012	9 trans rec	SU	Ejaculat trans rec : 1000	44,6%		Sperm Chromatin Structure Assay	
	3 trans rob	AH	SU : 1000	45,5%	NS		
			AH : 1000	49,1%	S(par rapport à l'éjaculat)		
	9 N, 1 OA, 2 T		Ejaculat trans rob : 3000	82,5%	NS		
			SU : 3000	83,5%	NS		
			Etude de « l'effet interchromosomique » 7 / 8 / 13 / 18 / 21 / X / Y 10 000 spermatozoïdes analysés Diminution significative après SU par rapport à l'éjaculat Disomie 18, disomie XY et diploïdie				
Chelli 2013	6 trans rec	MSOME	Ejaculat : 1000	57,2%			
		Sélection ICSI	MSOME : 82	53,7%	NS		
	1 N, 8 D		Selection « ICSI » : 126	56,3%	NS		
			Etude de « l'effet interchromosomique » X / Y / 18				
			Ejaculat : 936	disomie 1,9%	NS		
			MSOME : 90	disomie 1,0%	NS		
		Sélection « ICSI » : 113	disomie 3,4%				

Tableau 13 (suite) : FISH sur spermatozoïdes sélectionnés chez des hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure

Rouen 2014	1 trans rec	GD	Ejaculat GD	63,6% 52,3%	
Rouen 2017	10 trans rec 5 trans rob 12 N, 2 OA, 1 OAT	HOS-test	Ejaculat : 500 HOS-test A : 50 B : 20 B+ : 20 C : 20 D/E : 25 F : 30 G : 70	23,0% à 84,2% 24,0% à 78,0% 56,0% à 99,1% 69,0% à 100,0% 24,0% à 90,0% 10,0% à 88,0% 23,0% à 82,0% 12,2% à 75,0%	NS NS S(par rapport à l'éjaculat) NS NS NS NS
Caire- Tetauru (en cours)	3 trans rec 1 trans rob 3 N, 1 A	MACS	Ejaculat : 2016 à 2707 MACS : Annexine V- : 2078 à 2705 Annexine V+ : 2041 à 2864	37,75% à 79,99% 54,74% à 88,03% 27,63% à 75,00%	S(par rapport à l'éjaculat) NS
					TUNEL Ejaculat : 500 15,0% à 20,6% MACS : Annexine V- : 500 9,2% à 20,0% S(par rapport à l'éjaculat) Annexine V+ : 500 23,4% à 36,2% S(par rapport à l'éjaculat)

trans rec : translocation réciproque équilibré, trans rob : translocation robertsonienne

N : normozoospermie, O : oligozoospermie, T : térazoospermie, A : asthénozoospermie, A : asthénozoospermie, D : anomalies spermatiques diverses

AH : liaison à l'acide hyaluronique, MSOME : motile sperm organelle morphology examination, SU : swim-up, GD : gradient de densité

HOS-test : hypo-osmotic swelling test, MACS : Magnetic activated cell sorting

NS : non significatif, S : significatif

II - Apports de l'analyse de la ségrégation méiotique

➤ Spermatozoïdes chromosomiquement normaux ou équilibrés *versus* spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés

Les porteurs d'anomalie chromosomique de structure font partie d'une population particulière d'hommes infertiles qui présentent un taux élevé de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés dans leur éjaculat (Vegetti et al. 2000). Dans les translocations robertsonienne, le mode alterne permet la production de spermatozoïdes normaux ou équilibrés. Pour P1, pour qui nous trouvons 79,99% de gamètes issus du mode alterne, nos résultats étaient cohérents avec ceux de la littérature avec une production de plus de 75% de spermatozoïdes équilibrés (Anton et al. 2004; Roux et al. 2005). Dans la littérature, les hommes porteurs d'une translocation réciproque produisent entre 18,6% et 80,7% de spermatozoïdes normaux ou équilibrés (Morel et al. 2004; Anton et al. 2007; Wiland et al. 2008; Perrin et al. 2009). C'était le cas de nos trois patients porteurs d'une translocation réciproque, P2, P3 et P4, avec respectivement 44,27%, 48,36% et 37,75% de spermatozoïdes normaux ou équilibrés.

La technique FISH est fréquemment utilisée pour l'analyse de la ségrégation méiotique des spermatozoïdes chez les patients porteurs de translocation (Estop et al. 1997; Van Assche et al. 1999; Escudero et al. 2000; Frydman et al. 2001). Cette technique permet d'estimer la proportion de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés pour chaque patient, dans le but de leur donner une information au sujet des risques de conception. En effet, les patients porteurs de translocation présentent un risque plus élevé d'entraîner des fausses couches répétées ou de donner naissance à des enfants présentant des anomalies chromosomiques (Stern et al. 1999; Munné et al. 2000). Escudero et al. avaient reporté qu'à partir de 63% de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés, il n'y avait pas de grossesse dans les couples où l'homme était porteur d'une translocation (Escudero et al. 2003). Ces résultats étaient basés sur une analyse de diagnostic pré-implantatoire (DPI) chez 11 couples où l'homme était porteur d'une translocation, afin de discuter à partir de quand une stratégie de don de sperme ou d'adoption pour ces couples devait être proposée.

Néanmoins, ces résultats ont été récemment contredits par l'étude de 2017 de Haapaniemi Kouru et al. Les auteurs ont étudié 10 couples où l'homme était porteur de translocation

réciroque, là aussi dans le cadre d'un DPI. Ils concluaient qu'il y avait un faible degré de corrélation entre la proportion de spermatozoïdes équilibrés et celle des embryons équilibrés issus du DPI (Haapaniemi Kouru et al. 2017).

Il serait intéressant d'évaluer si après sélection des spermatozoïdes par technique MACS, le nombre d'embryons équilibrés puisse augmenter. Il apparaît donc primordial d'éliminer le maximum de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés afin de diminuer les risques de fausses couches à répétition ou de naissances d'enfants présentant des anomalies chromosomiques chez ces populations d'hommes infertiles.

À notre connaissance, seules ces deux études ont décrit les effets de la technique MACS sur le taux d'aneuploïdie du sperme chez un patient présentant un caryotype normal (Vendrell et al. 2014; Esbert et al. 2017) (Tableau 12). Elles ont montré que l'utilisation de cette technique permettait de diminuer le taux d'aneuploïdie dans la fraction annexine V-. De plus, en comparant le taux d'aneuploïdie dans les deux fractions annexine V- et V+, ils ont conclu que les spermatozoïdes aneuploïdes étaient retenus préférentiellement dans la colonne MACS (Esbert et al. 2017). Nos résultats concernant les patients ayant une anomalie chromosomique de structure sont concordants avec les leurs. Nous avons mis en évidence une augmentation significative des spermatozoïdes normaux ou équilibrés dans la fraction annexine V- et une diminution significative de cette même catégorie de spermatozoïdes dans la fraction annexine V+, la différence en comparant ces deux fractions était toujours significative.

➤ **Analyse des modes de ségrégation méiotique des spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés**

Nous avons aussi analysé l'impact de la technique MACS sur les différents modes de ségrégation méiotique au sein de la population de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés. Dans la littérature, concernant les hommes porteurs d'une translocation robertsonienne, les modes de ségrégation méiotique produisant des spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés avec des disomies et des nullisomies des chromosomes concernés par la translocation sont les modes adjacent et 3:0. Chez les hommes porteurs d'une translocation réciroque, les spermatozoïdes déséquilibrés sont issus des modes adjacent I, adjacent II, 3:1 et 4:0 (Morel et al. 2004). Nos résultats étaient concordants avec ces données. À noter que pour P3, le principal mode de ségrégation des spermatozoïdes déséquilibrés était le mode 3:1 (50,83%). Ce phénomène a déjà été rapporté dans de précédentes études (Morel et al. 2004; Brugnol et al. 2006). Au sujet des différents modes de ségrégation méiotique

parmi les spermatozoïdes déséquilibrés, nous trouvions qu'il y avait toujours une différence significative entre les deux fractions d'annexine V- et V+, toujours au bénéfice de la fraction d'annexine V- avec une diminution significative des spermatozoïdes déséquilibrés. Il n'existe donc pas de sélection préférentielle selon le déséquilibre chromosomique. Ces résultats sont consistants avec l'idée que cette technique de sélection permet de retenir, dans la colonne MACS, les spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés et cela, sans distinction du mode de ségrégation dont ils sont issus, pour améliorer la sélection d'un spermatozoïde normal ou équilibré en AMP.

III - Apports de l'analyse des marqueurs apoptotiques

Plusieurs études comparatives ont mis en évidence une proportion de marqueurs apoptotiques significativement plus importante dans la population de spermatozoïdes annexine V+ (Said et al. 2006; M.B. Herrero et al. 2012; Gil et al. 2013; Delbes et al. 2013), faisant de la technique MACS une méthode recommandée avant ICSI chez les hommes ayant des taux de fragmentation d'ADN élevé.

➤ Liaison annexine V – FITC

Pour évaluer la proportion de spermatozoïdes exprimant une externalisation de la PS, nous avons utilisé un marquage par l'annexine V couplée à un fluorochrome vert (annexine V-FITC). Nous avons ainsi pu évaluer le réel effet de séparation avant et après la technique MACS des spermatozoïdes externalisant de la PS de ceux ayant leur membrane spermatique intacte. Nous avons mesuré les taux de spermatozoïdes marqués par l'annexineV-FITC dans l'échantillon de sperme décongelé, et les fractions d'annexine V- et d'annexine V+. Ces spermatozoïdes marqués par la liaison annexineV-FITC correspondaient donc aux spermatozoïdes apoptotiques. Nous avons trouvé une moyenne de 58,9% de spermatozoïdes apoptotiques dans les échantillons de sperme décongelé, ces taux diminuaient significativement à une moyenne de 26,3% dans la fraction d'annexine V-, et augmentaient significativement à une moyenne de 85,3% dans la fraction d'annexine V+.

Paash et al. ont analysé les effets de la séparation par technique MACS chez des donneurs de sperme par cytométrie en flux en utilisant l'annexine V conjugué à FITC, et ont conclu à une moyenne de 5,2% +/- 1,0% de spermatozoïdes marqués dans la fraction d'annexine V- *versus*

72,2% +/- 2,7% de spermatozoïdes marqués dans la fraction d'annexine V+ (Paasch et al. 2003). Plus récemment, Vendrell et al. ont étudié la proportion de spermatozoïdes exprimant une externalisation de la PS, en utilisant un marquage par l'annexine V couplée à l'iodure de propidium (IP). Ils ont montré une augmentation du taux de spermatozoïde non apoptotique dans la fraction d'annexine V-. Cette augmentation était significative concernant la population de spermatozoïdes à membrane intacte (Vendrell et al. 2014).

La technique MACS n'élimine pas totalement la population de spermatozoïdes apoptotiques. La présence de spermatozoïdes marqués par l'annexine V-FITC dans la fraction d'annexine V-, pourrait s'expliquer par une liaison non spécifique, ou une quantité insuffisante de microbilles magnétiques pour permettre leur rétention dans la colonne MACS. Cela pourrait être lié à un phénomène de dégradation membranaire en cours. En effet, Glander et Schaller ont montré que la structure primaire de la membrane spermatique pouvait perturber la capacité de l'annexine V à se lier à la PS (Glander and Schaller 2000).

➤ **La fragmentation de l'ADN spermatique**

Plusieurs études ont montré que l'utilisation de MACS après un GD diminuait le taux de fragmentation de l'ADN et des marqueurs apoptotiques, comparé à l'application d'un GD seul (Said et al. 2008 ; Lee et al. 2010 ; Gil et al. 2013 ; Vendrell et al. 2014).

Dirican et al. montraient d'ailleurs, chez 122 couples, une amélioration du taux de clivage et de grossesse par ICSI, après que les spermatozoïdes aient été traités par MACS, par rapport à un groupe contrôle dont le sperme avait été traité uniquement par GD. Il s'agissait d'hommes qui avaient des paramètres spermatiques altérés (OAT) (Dirican et al. 2008). Cependant, Romany et al. concluaient à une absence de différence significative au sujet du taux de fécondation, d'implantation, de grossesse et de naissance vivante, en comparant 237 couples dont le sperme avait été traité soit par SU suivi de MACS, soit par SU seul, avant ICSI. Il s'agissait de couples pris en charge dans le cadre d'un don d'ovocyte, dont les hommes ayant une fragmentation de l'ADN spermatique, ou des marqueurs apoptotiques, étaient exclus (Romany et al. 2014). Une méta-analyse de 2013, montrait, chez des couples ayant bénéficié de la technique MACS dans le cadre d'une AMP une amélioration du taux de grossesse, avec cependant, aucune différence concernant le taux d'implantation et de fausse-couche (Gil et al. 2013). Ils concluaient que la technique MACS présentait des résultats prometteurs chez les couples ayant une infertilité inexplicée dans le cadre d'IIU (Lee et al. 2009, 2010), ainsi que

chez les hommes ayant une fragmentation de l'ADN élevé, pris en charge en ICSI (Polak de Fried and Denaday 2010; Thillo et al. 2011).

Récemment, Sanchez-Martin et al. se sont intéressés à l'application de la technique MACS chez 305 couples dont les hommes présentaient une fragmentation de l'ADN $\geq 30\%$. Les spermatozoïdes étaient traités soit par GD, soit par la technique MACS suivi d'un GD, avant de réaliser une ICSI. Ils ne montraient pas de différence concernant le taux de naissance vivante entre ces deux groupes, et retrouvaient cependant, une diminution importante de l'incidence des fausses-couches, lorsque le sperme avait été traité par GD suivi de MACS. La baisse du taux de fausse-couche après MACS, pourrait s'expliquer par une élimination des spermatozoïdes fragmentés, mais partielle, puisque le taux de naissance vivante restait inchangé (Sánchez-Martín et al. 2017).

Concernant les hommes ayant une anomalie chromosomique de structure, plusieurs équipes ont mis en évidence un taux de spermatozoïdes avec fragmentation de l'ADN plus élevé chez eux (Perrin et al. 2009; García-Peiró et al. 2011; Ferfour et al. 2012; Olszewska et al. 2013). Certains montraient un lien avec l'âge et les paramètres spermatiques (Vozdova et al. 2012), alors que d'autres non (Perrin et al. 2009). Plus récemment, Perrin et al. mettaient en évidence que les spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés avaient un taux de fragmentation de l'ADN significativement plus élevé que les spermatozoïdes chromosomiquement normaux ou équilibrés (Perrin et al. 2011, 2013). Ils proposaient alors l'hypothèse d'une apoptose abortive pour expliquer l'origine de cette fragmentation d'ADN. En effet, les spermatozoïdes au contenu chromosomiquement déséquilibré, qui auraient dû être éliminés au cours de la méiose I, auraient pu échapper à ce processus apoptotique pendant la spermatogenèse tout en conservant leurs marqueurs apoptotiques telles que l'externalisation de la PS et la fragmentation de l'ADN.

Dans une précédente étude, Rouen et al. avaient analysé la fragmentation d'ADN spermatique et la ségrégation chromosomique de spermatozoïdes chez 6 hommes porteurs d'un réarrangement chromosomique (3 translocations réciproques équilibrés, 2 translocations robertsonienne et 1 inversion péricentrique). Ces résultats obtenus dans cette étude corroboraient ceux de Perrin et al. Ils suggéraient que la modification de l'architecture tridimensionnelle du noyau spermatique par la présence d'un contenu chromosomique déséquilibré pouvait expliquer une plus forte sensibilité des spermatozoïdes à des facteurs exogènes de l'apoptose durant leur transit dans les voies génitales masculines (Rouen et al. 2013). Pour ces auteurs, la fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes

chromosomiquement déséquilibrés serait donc induite durant le transit dans les voies génitales masculines.

Après l'incubation avec les microbilles magnétiques et le BB de l'échantillon de sperme décongelé, nous observons une augmentation significative de la fragmentation de l'ADN pour chaque patient. Cette augmentation après incubation peut s'expliquer par l'utilisation de la solution de BB comme milieu de lavage. Le BB rend la membrane plasmique perméable. Nous avons précédemment évalué ces effets au laboratoire, en comparant des analyses de la fragmentation de l'ADN avec ceux de la liaison à l'annexine V-FITC avant et après que les spermatozoïdes aient été incubés avec cette solution (données non montrées). Nous trouvons, alors, que le taux de fragmentation d'ADN augmentait, alors que celui d'apoptose restait totalement inchangé. Ce résultat confirmait donc que le BB n'avait aucun effet sur l'apoptose, et n'induisait pas non plus la fragmentation d'ADN. Le BB en perméabilisant la membrane plasmique faciliterait l'accès et donc l'intégration des enzymes révélant l'ADN à la lecture de la technique TUNEL. Cependant, en comparant les taux de fragmentation d'ADN spermatique des échantillons de sperme décongelé à ceux de la fraction d'annexine V-, il n'y avait pas de diminution significative de cette dernière. Une diminution significative de la fragmentation de l'ADN spermatique dans la fraction d'annexine V-, et une augmentation significative dans la fraction annexine V+ étaient observées, par rapport à l'échantillon de sperme décongelé après incubation avec les microbilles magnétiques et le BB.

IV - Effets sur la concentration des spermatozoïdes

Il est reconnu que la technique MACS peut mener à une perte significative du nombre de spermatozoïdes. Cakar et al. ont montré une diminution significative de la concentration et du nombre de spermatozoïdes de mobilité progressive après séparation par MACS d'échantillons de 10 patients normozoospermiques, et de 10 patients oligozoospermiques (Cakar et al. 2016). Concernant la concentration en spermatozoïdes, notre étude confirme cette tendance. La fréquence de spermatozoïdes recueillie après la technique MACS dans la fraction d'annexine V- variait de 20,9% (P1) à 59,11% (P2), et celle recueillie dans la fraction d'annexine V+ variait de 16,22% (P4) à 49,19% (P1). Le nombre total de spermatozoïdes diminuait significativement aussi après l'incubation avec les microbilles magnétiques et le BB, qui suivait la décongélation des paillettes. En connaissance de cette perte de spermatozoïdes après application de la technique MACS, il apparaît plus difficile de l'utiliser dans la réalisation de

FIV ou d'IIU, et l'ICSI devrait être plus adaptée, d'autant plus lorsque les paramètres spermatiques de base sont perturbés.

V - Comment optimiser la technique MACS ?

Plusieurs études ont montré un bénéfice dans le fait d'associer des techniques classiques de sélection des spermatozoïdes que sont le GD et/ou le SU à la technique MACS. La plupart mettent en évidence une optimisation de la sélection des spermatozoïdes non apoptotiques lorsqu'elles sont associées à la technique MACS. Pour exemple, Tavalae et al. montraient une diminution de plus de 48,6% du taux de fragmentation d'ADN spermatique dans la fraction annexine V- après une préparation associant la technique MACS suivi d'un GD, comparativement à la technique MACS, qui lorsqu'elle est appliquée seule diminuait de 26,9% le taux de fragmentation d'ADN (Tavalae et al. 2012).

Dans le but de réaliser toutes les étapes d'analyse de notre étude et de voir les apports seulement liés à la technique MACS, nous n'avons pas réalisé de GD ou de SU. Nous avons réalisé un simple lavage du sperme après décongélation, une étape qui était nécessaire à l'élimination du cryoprotecteur. De nombreuses études comparatives sur la séquence idéale à effectuer ont été menées et les avis restent controversés (Tavalae et al. 2012; Bucar et al. 2015). Certains réalisent un GD avant MACS (de Vantéry Arrighi et al. 2009; Herrero et al. 2012), Herrero et al. ont montré une amélioration de la qualité spermatique des spermatozoïdes congelés-décongelés dans le cadre d'une ICSI chez un patient ayant un cancer, en utilisant un GD avant la technique MACS (Herrero et al. 2013). D'autres auteurs recommandent de réaliser un SU supplémentaire après MACS et GD. Bucar et al. trouvaient une diminution de 83,3% du taux de fragmentation d'ADN après une association de la technique MACS suivi d'un GD puis d'un SU (Bucar et al. 2015). Certains auteurs ne montraient aucune différence dans l'ordre de ces séquences (Zahedi et al. 2013), par exemple Cakar et al. ont montré qu'il n'y avait aucune différence significative en comparant des séquences de SU ou GD avant MACS et de SU et GD seules (Cakar et al. 2016). D'autres recommandent de réaliser un GD après MACS (Tavalae et al. 2012; Berteli et al. 2017). Une récente étude de Berteli et al. concluait que les séquences GD suivies de MACS ou MACS suivi de GD étaient plus efficaces pour diminuer les taux de fragmentation d'ADN par rapport aux techniques seules (MACS ou GD), mais recommandait le protocole MACS + GD car celui-ci permettait d'obtenir significativement plus de spermatozoïdes à la mobilité

progressive et de morphologie typique (Berteli et al. 2017). Par ailleurs, il a été émis l'hypothèse que l'externalisation de la PS pouvait être due à un phénomène physiologique correspondant à l'initiation de la capacitation et de la réaction acrosomiale. Certains auteurs préconisent donc de réaliser un GD après MACS pour pouvoir séparer les spermatozoïdes réellement apoptotiques et non pas les spermatozoïdes annexine V+ induits par la capacitation qui a lieu lors de la séparation du liquide séminal des spermatozoïdes au moment du GD (Tavalaee et al. 2012; Zahedi et al. 2013).

VI - Application en AMP : les premières naissances humaines

La technique MACS est une méthode simple, sans effet délétères ou magnétiques détectables sur les spermatozoïdes suite à leur passage dans la colonne de séparation (Grunewald et al. 2009). Les microbilles magnétiques n'affecteraient pas la viabilité cellulaire et sont biodégradables (Miltenyi et al. 1990). Les premières grossesses réalisées par ICSI après traitement du sperme du conjoint OATS par MACS ont été publiées en 2008 et montraient un taux de clivage et de grossesse augmentés comparativement à la technique d'ICSI seule (Dirican et al. 2008). En 2010, les premières naissances d'enfants nés après ICSI d'un spermatozoïde sélectionné avec MACS ont été publiées (Polak de Fried and Denaday 2010; Rawe et al. 2010). La question de l'inocuité de cette technique du fait de la présence de microparticules sur la membrane plasmique des spermatozoïdes annexine V-, et de la méthode de sélection immuno-magnétique reste toujours d'actualité. Dès 2013, une première étude s'est penchée sur les paramètres néonataux des grossesses issues d'ICSI avec MACS (poids de naissance, âge gestationnel, malformation, mort périnatale), montrant que les enfants nés par MACS avaient des caractéristiques similaires aux enfants nés après ICSI (Ugozzoli et al. 2013). Une étude de Lukaszuk et al. rapporte le cas d'une naissance par ICSI suite à une TESA (aspiration testiculaire de spermatozoïdes) préparée avec MACS, dont l'enfant a été suivi pendant 4 années, et qui concluait à une croissance et un développement psychomoteur et mental normal (Lukaszuk et al. 2015). Plus récemment, Romany et al. ont analysé plusieurs critères obstétricaux et périnataux de 65 naissances issues d'ICSI préparées par MACS comparés à un groupe de 66 naissances issues d'ICSI seules, et ne montraient aucune différence entre ces deux groupes (Romany et al. 2017). Ces premières analyses sont encourageantes mais la question des effets à long terme sur le développement et la santé des enfants nés de cette technique persistent.

Conclusion

Dans notre étude, nous avons observé après technique MACS une diminution significative des spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés, du taux de fragmentation d'ADN spermatique et de la proportion des spermatozoïdes apoptotiques dans la fraction d'annexine V⁻, et inversement dans la fraction d'annexine V⁺. Dans de précédentes études nous avons émis l'hypothèse qu'une apoptose abortive au niveau testiculaire, c'est-à-dire, un processus apoptotique non mené à terme, pourrait expliquer la présence de spermatozoïdes vivants à l'ADN fragmenté, et chromosomiquement déséquilibrés, dans l'éjaculat de ces hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure.

Néanmoins tous les mécanismes qui permettent à ces spermatozoïdes de ne pas être éliminés restent actuellement débattus. Leurs présences dans l'éjaculat des porteurs d'une anomalie chromosomique de structure nous font poser la question du risque encouru par la femme (risque de fausse couche à répétition), et de celui de l'enfant à naître (risque de malformation). Le seul moyen pour éviter ces risques est de proposer un DPI. Mais ce dernier est de prise en charge longue pour permettre au couple d'avoir un enfant en bonne santé. En effet, le statut chromosomique équilibré ou non du spermatozoïde injecté lors de l'ICSI, reste inconnu. La technique MACS utilisée dans notre étude, permettrait de réduire significativement le taux de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés et fragmentés. Il s'agit d'une méthode prometteuse pour augmenter les chances de sélectionner un spermatozoïde chromosomiquement normal ou équilibré lors de techniques d'AMP, telle que l'ICSI chez des hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure. Ainsi, en s'inscrivant dans une stratégie de prise en charge réfléchie, elle pourrait diminuer le risque chromosomique pour le conceptus, et pourrait augmenter le taux de grossesse et diminuer celui de fausses-couches.

Bibliographie

- Abd-Elmoaty MA, Saleh R, Sharma R, Agarwal A. Increased levels of oxidants and reduced antioxidants in semen of infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 2010;94:1531–1534.
- Agarwal A, Deepinder F, Sharma R, Ranga G, Li J. Effect of cell phone usage on semen analysis in men attending infertility clinic: an observational study. *Fertil Steril* 2008;89:124–128.
- Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol RBE* 2015;13:.
- Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003;79:829–843.
- Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998;59:1037–1046.
- Aitken RJ, Skakkebaek NE, Roman SD. Male reproductive health and the environment. *Med J Aust* 2006;185:414–415.
- Aksglaede L, Wikström AM, Rajpert-De Meyts E, Dunkel L, Skakkebaek NE, Juul A. Natural history of seminiferous tubule degeneration in Klinefelter syndrome. *Hum Reprod Update* 2006;12:39–48.
- Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10). *Hum Reprod Oxf Engl* 2004;19:1345–1351.
- Anton E, Vidal F, Blanco J. Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers. *Hum Reprod Oxf Engl* 2007;22:2088–2092.

- Aoki VW, Liu L, Carrell DT. Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Hum Reprod Oxf Engl* 2005;20:1298–1306.
- Asghar W, Velasco V, Kingsley JL, Shoukat MS, Shafiee H, Anchan RM, Mutter GL, Tüzel E, Demirci U. Selection of functional human sperm with higher DNA integrity and fewer reactive oxygen species. *Adv Healthc Mater* 2014;3:1671–1679.
- Baccetti B, Collodel G, Piomboni P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae). *J Submicrosc Cytol Pathol* 1996;28:587–596.
- Barone JG, De Lara J, Cummings KB, Ward WS. DNA organization in human spermatozoa. *J Androl* 1994;15:139–144.
- Barrière P. Quelle technique pour quelle infertilité masculine? *J Gynécologie Obstétrique Biologie Reproduction* 2008, Volume 36, numéro S3, p65-68.
- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezes Y, Barak Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl* 2002;23:1–8.
- Baumber J, Meyers SA. Changes in membrane lipid order with capacitation in rhesus macaque (*Macaca mulatta*) spermatozoa. *J Androl* 2006;27:578–587.
- Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, Guérin JF. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod Oxf Engl* 2003;18:1023–1028.
- Benet J, Oliver-Bonet M, Cifuentes P, Templado C, Navarro J. Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:281–290.
- Berteli TS, Da Broi MG, Martins WP, Ferriani RA, Navarro PA. Magnetic-activated cell sorting before density gradient centrifugation improves recovery of high-quality spermatozoa. *Andrology* 2017;5:776–782.
- Beydola T, Sharma R, Agarwal A. *Sperm preparation and selection techniques*. 2012; Jaypee Brothers Medical Publishers.

- Billig H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen M, Hsueh AJ. Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 1995;136:5–12.
- Bioforma. *Exploration de la fonction de reproduction versant masculin*. 2009; Bioforma cahier n°42: Paris.
- Boitrelle F, Ferfourri F, Petit JM, Segretain D, Tourain C, Bergere M, Bailly M, Vialard F, Albert M, Selva J. Large human sperm vacuoles observed in motile spermatozoa under high magnification: nuclear thumbprints linked to failure of chromatin condensation. *Hum Reprod Oxf Engl* 2011;26:1650–1658.
- Bojesen A, Gravholt CH. Klinefelter syndrome in clinical practice. *Nat Clin Pract Urol* 2007;4:192–204.
- Bonduelle M, Liebaers I, Deketelaere V, Derde M-P, Camus M, Devroey P, Van Steirteghem A. Neonatal data on a cohort of 2889 infants born after ICSI (1991-1999) and of 2995 infants born after IVF (1983-1999). *Hum Reprod Oxf Engl* 2002;17:671–694.
- Boué A, Gallano P. A collaborative study of the segregation of inherited chromosome structural rearrangements in 1356 prenatal diagnoses. *Prenat Diagn* 1984;4 Spec No:45–67.
- Brugnon F, Van Assche E, Verheyen G, Sion B, Boucher D, Pouly JL, Janny L, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. *Hum Reprod Oxf Engl* 2006;21:685–693.
- Bucar S, Gonçalves A, Rocha E, Barros A, Sousa M, Sá R. DNA fragmentation in human sperm after magnetic-activated cell sorting. *J Assist Reprod Genet* 2015;32:147–154.
- Buzzi J, Valcarcel A, Lombardi E, Oses R, Rawe V, Young E. P-020 Magnetic activated cell sorting (macs) improves oocyte donation results associated to severe male factor infertility. *Hum Reprod* 2010;25:.

- Cakar Z, Cetinkaya B, Aras D, Koca B, Ozkavukcu S, Kaplanoglu İ, Can A, Cinar O. Does combining magnetic-activated cell sorting with density gradient or swim-up improve sperm selection? *J Assist Reprod Genet* 2016;33:1059–1065.
- Caroppo E. Sperm sorting for selection of healthy sperm: is it safe and useful? *Fertil Steril* 2013;100:695–696.
- Carrell DT, Liu L. Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *J Androl* 2001;22:604–610.
- Cassuto NG, Hazout A, Benifla JL, Balet R, Larue L, Viot G. Decreasing birth defect in children by using high magnification selected spermatozoon injection. *Fertil Steril* 2011;96:S85.
- Castillo J, Simon L, Mateo S de, Lewis S, Oliva R. Protamine/DNA Ratios and DNA Damage in Native and Density Gradient Centrifuged Sperm From Infertile Patients. *J Androl* 2011;32:324–332.
- Cayli S, Jakab A, Ovari L, Delpiano E, Celik-Ozenci C, Sakkas D, Ward D, Huszar G. Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. *Reprod Biomed Online* 2003;7:462–468.
- Chelli MH, Ferfour F, Boitrelle F, Albert M, Molina-Gomes D, Selva J, Vialard F. High-magnification sperm selection does not decrease the aneuploidy rate in patients who are heterozygous for reciprocal translocations. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:525–530.
- Chevret E, Rousseaux S, Monteil M, Usson Y, Cozzi J, Pelletier R, Sele B. Meiotic behaviour of sex chromosomes investigated by three-colour FISH on 35,142 sperm nuclei from two 47,XYY males. *Hum Genet* 1997;99:407–412.
- De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod Oxf Engl* 1991;6:245–250.
- Delbes G, Herrero MB, Troeung E-T, Chan PTK. The use of complimentary assays to evaluate the enrichment of human sperm quality in asthenoteratozoospermic and

- teratozoospermic samples processed with Annexin-V magnetic activated cell sorting. *Andrology* 2013;1:698–706.
- Dirican EK, Özgün OD, Akarsu S, Akın KO, Ercan Ö, Uğurlu M, Çamsarı Ç, Kanyılmaz O, Kaya A, Ünsal A. Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet* 2008;25:375–381.
- Douet-Guilbert N, Basinko A, Le Bris M-J, Herry A, Morel F, De Braekeleer M. Stratégies d'identification des marqueurs chromosomiques surnuméraires en cytogénétique constitutionnelle. *Pathol Biol* 2008;56:362–367.
- Egozcue J, Blanco J, Vidal F. Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update* 1997;3:441–452.
- Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, García F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F, Egozcue J. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 2000;6:93–105.
- Engeland M van, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 1998;31:1–9.
- Esbert M, Godo A, Soares SR, Florensa M, Amorós D, Ballesteros A, Vidal F. Spermatozoa with numerical chromosomal abnormalities are more prone to be retained by Annexin V-MACS columns. *Andrology* 2017;5:807–813.
- Escudero T, Abdelhadi I, Sandalinas M, Munné S. Predictive value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis for translocations. *Fertil Steril* 2003;79 Suppl 3:1528–1534.
- Escudero T, Lee M, Carrel D, Blanco J, Munné S. Analysis of chromosome abnormalities in sperm and embryos from two 45,XY,t(13;14)(q10;q10) carriers. *Prenat Diagn* 2000;20:599–602.

- Eskiocak S, Gozen AS, Taskiran A, Kilic AS, Eskiocak M, Gulen S. Effect of psychological stress on the L-arginine-nitric oxide pathway and semen quality. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol* 2006;39:581–588.
- Estop AM, Cieply KM, Aston CE. The meiotic segregation pattern of a reciprocal translocation t(10;12)(q26.1;p13.3) by fluorescence in situ hybridization sperm analysis. *Eur J Hum Genet EJHG* 1997;5:78–82.
- Evenson DP, Jost LK, Baer RK, Turner TW, Schrader SM. Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reprod Toxicol* 1991;5:115–125.
- Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002;23:25–43.
- Ferfourri F, Boitrelle F, Tapia S, Molina Gomes D, Selva J, Vialard F. Sperm FISH analysis of a 46,XY,t(3;6)(p24;p21.2),inv (8)(p11;2q21.2) double chromosomal rearrangement. *Reprod Biomed Online* 2012;24:219–223.
- Fernández-Gonzalez R, Moreira PN, Pérez-Crespo M, Sánchez-Martín M, Ramirez MA, Pericuesta E, Bilbao A, Bermejo-Alvarez P, Dios Hourcade J de, Fonseca FR. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biol Reprod* 2008;78:761–772.
- Frydman N, Romana S, Le Lorc'h M, Vekemans M, Frydman R, Tachdjian G. Assisting reproduction of infertile men carrying a Robertsonian translocation. *Hum Reprod Oxf Engl* 2001;16:2274–2277.
- Frydman R. *Infertilité, prise en charge globale et thérapeutique*. 2016; Elsevier Masson.
- García-Peiró A, Oliver-Bonet M, Navarro J, Abad C, Guitart M, Amengual MJ, Gosálvez J, Benet J. Dynamics of sperm DNA fragmentation in patients carrying structurally rearranged chromosomes. *Int J Androl* 2011;34:e546–e553.
- Gardner RJM, Sutherland GR, Shaffer LG. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*. 2011; Oxford University Press: Oxford, New York.

- Garolla A, Fortini D, Menegazzo M, De Toni L, Nicoletti V, Moretti A, Selice R, Engl B, Foresta C. High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. *Reprod Biomed Online* 2008;17:610–616.
- Garrido N, García-Herrero S, Meseguer M. Assessment of sperm using mRNA microarray technology. *Fertil Steril* 2013;99:1008–1022.
- Gatinois V, Puechberty J, Lefort G, Geneviève D, Pellestor F. Les remaniements chromosomiques complexes - Un paradigme pour l'étude de l'instabilité chromosomique. *médecine/sciences* 2014;30:55–63.
- Ghaleno LR, Valojerdi MR, Janzamin E, Chehrazi M, Sharbatoghli M, Yazdi RS. Evaluation of conventional semen parameters, intracellular reactive oxygen species, DNA fragmentation and dysfunction of mitochondrial membrane potential after semen preparation techniques: a flow cytometric study. *Arch Gynecol Obstet* 2014;289:173–180.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Crippa A, Lappi M, Capitani S, Baccetti B. Birefringence characteristics in sperm heads allow for the selection of reacted spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2010;93:807–813.
- Gil M, Sar-Shalom V, Melendez Sivira Y, Carreras R, Checa MA. Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:479–485.
- Gillan L, Evans G, Maxwell WMC. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 2005;63:445–457.
- Glander HJ, Schaller J. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol Hum Reprod* 1999;5:109–115.
- Glander H-J, Schaller J. Hidden Effects of Cryopreservation on Quality of Human Spermatozoa. *Cell Tissue Bank* 2000;1:133–142.

- Greco E, Romano S, Iacobelli M, Ferrero S, Baroni E, Minasi MG, Ubaldi F, Rienzi L, Tesarik J. ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Hum Reprod Oxf Engl* 2005;20:2590–2594.
- Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 1995;270:1189–1192.
- Grunewald S, Reinhardt M, Blumenauer V, Said TM, Agarwal A, Abu Hmeidan F, Glander H-J, Paasch U. Increased sperm chromatin decondensation in selected nonapoptotic spermatozoa of patients with male infertility. *Fertil Steril* 2009;92:572–577.
- Haapaniemi Kouru K, Malmgren H, White I, Rodriguez Sanchez A, Syk Lundberg E. Meiotic segregation analyses of reciprocal translocations in spermatozoa and embryos: no support for predictive value regarding PGD outcome. *Reprod Biomed Online* 2017;34:645–652.
- Henkel R. Sperm preparation: state-of-the-art--physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian J Androl* 2012;14:260–269.
- Hennebicq S, Pelletier R, Bergues U, Rousseaux S. Risk of trisomy 21 in offspring of patients with Klinefelter's syndrome. *Lancet Lond Engl* 2001;357:2104–2105.
- Herrero MB, Delbes G, Chung J-T, Son W-Y, Holzer H, Buckett W, Chan P. Case report: the use of annexin V coupled with magnetic activated cell sorting in cryopreserved spermatozoa from a male cancer survivor: healthy twin newborns after two previous ICSI failures. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:1415–1419.
- Herrero MB, Delbes G, Troueng E, Holzer H, Chan PTK. Differential enrichment of sperm with no DNA strand breaks using magnetic activated cell sorting (MACS) in men with various categories of semen parameters. *Hum Reprod* 2012;27:121-150.
- Huang C, Lee T, Chen C, Wu G, Lee C, Lee M. Sperm preparation by magnetic-activated cell sorting improve the sperm-zona pellucida binding capacity and reduces apoptotic sperm. *Hum Reprod* 2009;24:217–224.

- Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril* 2003;79 Suppl 3:1616–1624.
- Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, Revelli A, Ravelli A, Huszar G. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril* 2005;84:1665–1673.
- Johnson MD. Genetic risks of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening. *Fertil Steril* 1998;70:397–411.
- Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, Krausz C, European Association of Urology Working Group on Male Infertility. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol* 2012;62:324–332.
- Kemal Duru N, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 2000;74:1200–1207.
- Koch OR, Pani G, Borrello S, Colavitti R, Cravero A, Farrè S, Galeotti T. Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Mol Aspects Med* 2004;25:191–198.
- Kokkali G, Traeger-Synodinos J, Vrettou C, Stavrou D, Jones GM, Cram DS, Makrakis E, Trounson AO, Kanavakis E, Pantos K. Blastocyst biopsy versus cleavage stage biopsy and blastocyst transfer for preimplantation genetic diagnosis of β -thalassaemia: a pilot study. *Hum Reprod* 2007;22:1443–1449.
- Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ* 2007;14:44–55.
- Le Lannou D, Blanchard Y. Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by Percoll density gradient centrifugation or swim-up procedure. *J Reprod Fertil* 1988;84:551–556.
- Lee J, Richburg JH, Younkin SC, Boekelheide K. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* 1997;138:2081–2088.

- Levron J, Aviram-Goldring A, Madgar I, Raviv G, Barkai G, Dor J. Sperm chromosome abnormalities in men with severe male factor infertility who are undergoing in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2001;76:479–484.
- Lewis SEM, John Aitken R, Conner SJ, Iuliis GD, Evenson DP, Henkel R, Giwercman A, Gharagozloo P. The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. *Reprod Biomed Online* 2013;27:325–337.
- Lindenbaum RH, Hultén M, McDermott A, Seabright M. The prevalence of translocations in parents of children with regular trisomy 21: a possible interchromosomal effect? *J Med Genet* 1985;22:24–28.
- Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998;69:528–532.
- Luciani JM, Guichaoua MR, Mattei A, Morazzani MR. Pachytene analysis of a man with a 13q;14q translocation and infertility. Behavior of the trivalent and nonrandom association with the sex vesicle. *Cytogenet Cell Genet* 1984;38:14–22.
- Lukaszuk K, Wcislo M, Liss J, Stachowicz A, Jakiel G, Lukaszuk M, Pastuszek E, Woclawek-Potocka I, Galvao A, Bialobrzeska D. First Pregnancy, Somatic and Psychological Status of a 4-Year-Old Child Born following Annexin V TESA Sperm Separation. *AJP Rep* 2015;5:e105–e108.
- Marchetti C, Gallego M-A, Defossez A, Formstecher P, Marchetti P. Staining of human sperm with fluorochrome-labeled inhibitor of caspases to detect activated caspases: Correlation with apoptosis and sperm parameters. *Hum Reprod Oxf Engl* 2004a;19:1127–1134.
- Marchetti C, Jouy N, Leroy-Martin B, Defossez A, Formstecher P, Marchetti P. Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. *Hum Reprod Oxf Engl* 2004b;19:2267–2276.
- Marchetti C, Marchetti P. Place des marqueurs de l'apoptose dans l'exploration de l'infertilité masculine. *Gyn Obstétrique & Fertilité* 2005; 33; 669-677

- Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R. Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction. *Hum Reprod Oxf Engl* 2005;20:3459–3468.
- Menezo Y, Evenson D, Cohen M, Dale B. Effect of antioxidants on sperm genetic damage. *Adv Exp Med Biol* 2014;791:173–189.
- Ménézo YJR, Hazout A, Panteix G, Robert F, Rollet J, Cohen-Bacrie P, Chapuis F, Clément P, Benkhalifa M. Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reprod Biomed Online* 2007;14:418–421.
- Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990;11:231–238.
- Mongkolchaipak S, Vutyavanich T. No difference in high-magnification morphology and hyaluronic acid binding in the selection of euploid spermatozoa with intact DNA. *Asian J Androl* 2013;15:421–424.
- Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris M-J, Herry A, Amice V, Amice J, De Braekeleer M. Meiotic segregation of translocations during male gametogenesis. *Int J Androl* 2004;27:200–212.
- Moretti E, Anichini C, Sartini B, Collodel G. Sperm ultrastructure and meiotic segregation in an infertile 47, XYY man. *Andrologia* 2007;39:229–234.
- Mroz K, Hassold TJ, Hunt PA. Meiotic aneuploidy in the XXY mouse: evidence that a compromised testicular environment increases the incidence of meiotic errors. *Hum Reprod Oxf Engl* 1999;14:1151–1156.
- Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Fung J, Gianaroli L, Cohen J. Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Fertil Steril* 2000;73:1209–1218.
- Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, Gambera L, Baccetti B, Biagiotti R, Forti G. Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl* 2000;21:903–912.

- Neri G, Serra A, Campana M, Tedeschi B. Reproductive risks for translocation carriers: cytogenetic study and analysis of pregnancy outcome in 58 families. *Am J Med Genet* 1983;16:535–561.
- Nicopoulos JDM, Gilling-Smith C, Almeida PA, Homa S, Nice L, Tempest H, Ramsay JWA. The role of sperm aneuploidy as a predictor of the success of intracytoplasmic sperm injection? *Hum Reprod Oxf Engl* 2008;23:240–250.
- Ogur G, Van Assche E, Vegetti W, Verheyen G, Tournaye H, Bonduelle M, Van Steirteghem A, Liebaers I. Chromosomal segregation in spermatozoa of 14 Robertsonian translocation carriers. *Mol Hum Reprod* 2006;12:209–215.
- Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 2006;12:417–435.
- Oliveira JBA, Massaro FC, Baruffi RLR, Mauri AL, Petersen CG, Silva LFI, Vagnini LD, Franco JG. Correlation between semen analysis by motile sperm organelle morphology examination and sperm DNA damage. *Fertil Steril* 2010;94:1937–1940.
- Olszewska M, Fraczek M, Huleyuk N, Czernikiewicz A, Wiland E, Boksa M, Zastavna D, Panasiuk B, Midro AT, Kurpisz M. Chromatin structure analysis of spermatozoa from reciprocal chromosome translocation (RCT) carriers with known meiotic segregation patterns. *Reprod Biol* 2013;13:209–220.
- Paasch U, Grunewald S, Fitzl G, Glander H-J. Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. *J Androl* 2003;24:246–252.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet Lond Engl* 1992;340:17–18.
- Parmegiani L, Cognigni GE, Filicori M. Sperm selection: effect on sperm DNA quality. *Adv Exp Med Biol* 2014;791:151–172.
- Perdrix A, Travers A, Chelli MH, Escalier D, Do Rego JL, Milazzo JP, Mousset-Siméon N, Macé B, Rives N. Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles. *Hum Reprod Oxf Engl* 2011;26:47–58.

- Perreault SD, Aitken RJ, Baker HWG, Evenson DP, Huszar G, Irvine DS, Morris ID, Morris RA, Robbins WA, Sakkas D. Integrating new tests of sperm genetic integrity into semen analysis: breakout group discussion. *Adv Exp Med Biol* 2003;518:253–268.
- Perrin A, Basinko A, Douet-Guilbert N, Gueganic N, Le Bris M-J, Amice V, De Braekeleer M, Morel F. Aneuploidy and DNA fragmentation in sperm of carriers of a constitutional chromosomal abnormality. *Cytogenet Genome Res* 2011;133:100–106.
- Perrin A, Caer E, Oliver-Bonet M, Navarro J, Benet J, Amice V, De Braekeleer M, Morel F. DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality. *Fertil Steril* 2009;92:583–589.
- Perrin A, Nguyen MH, Bujan L, Vialard F, Amice V, Guéganic N, Douet-Guilbert N, De Braekeleer M, Morel F. DNA fragmentation is higher in spermatozoa with chromosomally unbalanced content in men with a structural chromosomal rearrangement. *Andrology* 2013;1:632–638.
- Petersen CG, Vagnini LD, Mauri AL, Massaro FC, Cavagna M, Baruffi RLR, Oliveira JBA, Franco JG. Relationship between DNA damage and sperm head birefringence. *Reprod Biomed Online* 2011;22:583–589.
- Pieters MH, Geraedts JP, Meyer H, Dumoulin JC, Evers JL, Jongbloed RJ, Nederlof PM, Flier S van der. Human gametes and zygotes studied by nonradioactive in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1990;53:15–19.
- Polak de Fried E, Denaday F. Single and twin ongoing pregnancies in two cases of previous ART failure after ICSI performed with sperm sorted using annexin V microbeads. *Fertil Steril* 2010;94:351.e15-18.
- Ravel C, Berthaut I, Siffroi J-P. *Infertilités masculines*. 2009; EMC (Elsevier Masson, Paris).
- Ravel C, Chantot-Bastaraud S, Cretet J, Roynard P, Sibony M, Maurin N, Belaud-Rotureau M-A, Berthaut I. Syndrome de Klinefelter : qualité des gamètes et spermatogénèse. *Gynécologie Obstétrique Fertil* 2011;39:525–528.
- Rawe VY, Alvarez CR, Uriondo HW, Papier S, Miasnik S, Nodar F. ICSI outcome using Annexin V columns to select non-apoptotic spermatozoa. *Fertil Steril* 2009;92:S73–S74.

- Rawe VY, Boudri HU, Alvarez Sedó C, Carro M, Papier S, Nodar F. Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. *Reprod Biomed Online* 2010;20:320–323.
- Rengan AK, Agarwal A, Linde M van der, Plessis SS du. An investigation of excess residual cytoplasm in human spermatozoa and its distinction from the cytoplasmic droplet. *Reprod Biol Endocrinol RBE* 2012;10:92.
- Rives N, Milazzo JP, Miraux L, North M-O, Sibert L, Macé B. From spermatocytes to spermatozoa in an infertile XYY male. *Int J Androl* 2005;28:304–310.
- Romany L, Garrido N, Cobo A, Aparicio-Ruiz B, Serra V, Meseguer M. Obstetric and perinatal outcome of babies born from sperm selected by MACS from a randomized controlled trial. *J Assist Reprod Genet* 2017;34:201–207.
- Romany L, Garrido N, Motato Y, Aparicio B, Remohí J, Meseguer M. Removal of annexin V-positive sperm cells for intracytoplasmic sperm injection in ovum donation cycles does not improve reproductive outcome: a controlled and randomized trial in unselected males. *Fertil Steril* 2014;102:1567–1575.e1.
- Rouen A, Carlier L, Heide S, Egloff M, Marzin P, Ader F, Schwartz M, Rogers E, Joyé N, Balet R. Potential selection of genetically balanced spermatozoa based on the hypo-osmotic swelling test in chromosomal rearrangement carriers. *Reprod Biomed Online* 2017;
- Rouen A, Hyon C, Balet R, Joyé N, Cassuto NG, Siffroi J-P. First Birth after Sperm Selection through Discontinuous Gradient Centrifugation and Artificial Insemination from a Chromosomal Translocation Carrier. *Case Rep Genet* 2014
- Rouen A, Pyram K, Pollet-Villard X, Hyon C, Dorna M, Marques S, Chantot-Bastaraud S, Joyé N, Cassuto NG, Siffroi J-P. Simultaneous cell by cell study of both DNA fragmentation and chromosomal segregation in spermatozoa from chromosomal rearrangement carriers. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:383–390.
- Rousseaux S, Chevret E, Monteil M, Cozzi J, Pelletier R, Devillard F, Lespinasse J, Sèle B. Meiotic segregation in males heterozygote for reciprocal translocations: analysis of

- sperm nuclei by two and three colour fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1995;71:240–246.
- Roux C, Tripogney C, Morel F, Joanne C, Fellmann F, Clavequin MC, Bresson JL. Segregation of chromosomes in sperm of Robertsonian translocation carriers. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:291–296.
- Said TM, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Glander H-J, Paasch U. Evaluation of sperm recovery following annexin V magnetic-activated cell sorting separation. *Reprod Biomed Online* 2006;13:336–339.
- Said TM, Land JA. Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2011;17:719–733.
- Said TM, Paasch U, Glander H-J, Agarwal A. Role of caspases in male infertility. *Hum Reprod Update* 2004;10:39–51.
- Saïdi R, Rives N, Gruel E, Mazurier S, Mousset-Siméon N, Macé B. Nouvelle classification du spermocytogramme à fort grossissement. 2008;10:315–324.
- Sakkas D. Novel technologies for selecting the best sperm for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2013;99:1023–1029.
- Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010;93:1027–1036.
- Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertil Steril* 2002;78:491–499.
- Samri I, Bouguenouch L, Hamdaoui H, El Otmani I, El Omairi N, Chaouki S, Hida M, Ouldin K. Marqueurs chromosomiques: à propos d'un cas. *Pan Afr Med J* [Internet] 2013;15.
- Sánchez-Martín P, Dorado-Silva M, Sánchez-Martín F, González Martínez M, Johnston SD, Gosálvez J. Magnetic cell sorting of semen containing spermatozoa with high DNA

- fragmentation in ICSI cycles decreases miscarriage rate. *Reprod Biomed Online* 2017;34:506–512.
- Sanocka D, Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol RBE* 2004;2:12.
- Schlösser J, Nakib I, Carré-Pigeon F, Staerman F. Infertilité masculine: définition et physiopathologie. *Ann Urol* 2007;41:127–133.
- Scriven PN, Flinter FA, Braude PR, Ogilvie CM. Robertsonian translocations--reproductive risks and indications for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod Oxf Engl* 2001;16:2267–2273.
- Seiringer M, Maurer M, Shebl O, Dreier K, Tews G, Ziehr S, Schappacher-Tilp G, Petek E, Ebner T. Efficacy of a sperm-selection chamber in terms of morphology, aneuploidy and DNA packaging. *Reprod Biomed Online* 2013;27:81–88.
- Sergerie M, Bleau G, Teulé R, Daudin M, Bujan L. Sperm DNA integrity as diagnosis and prognosis element of male fertility. *Gynecol Obstet Fertil* 2005;33:89–101.
- Sifer C. Le screening des embryons par diagnostic préimplantatoire avant transfert intra-utérin n'a pas d'intérêt. *Gynécologie Obstétrique Fertil* 2012;40:452–455.
- Singer G, Granger DN. Inflammatory responses underlying the microvascular dysfunction associated with obesity and insulin resistance. *Microcirc N Y N 1994* 2007;14:375–387.
- Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Rios R, Morales I, Castro A. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod Oxf Engl* 2006;21:986–993.
- Smyth CM, Bremner WJ. Klinefelter syndrome. *Arch Intern Med* 1998;158:1309–1314.
- Spriggs EL, Martin RH. Analysis of segregation in a human male reciprocal translocation carrier, t(1;11) (p36.3;q13.1), by two-colour fluorescence in situ hybridization. *Mol Reprod Dev* 1994;38:247–250.

- Stern C, Pertile M, Norris H, Hale L, Baker HW. Chromosome translocations in couples with in-vitro fertilization implantation failure. *Hum Reprod Oxf Engl* 1999;14:2097–2101.
- Stochholm K, Juul S, Gravholt CH. Diagnosis and mortality in 47,XYY persons: a registry study. *Orphanet J Rare Dis* 2010;5:15.
- Syme RM, Martin RH. Meiotic segregation of a 21;22 Robertsonian translocation. *Hum Reprod Oxf Engl* 1992;7:825–829.
- Tachdjian G, Brisset S, Courtot A, Schoëvaërt D, Tosca L. *Embryologie et Histologie Humaines*. 2016; Elsevier Masson
- Tavalaee M, Deemeh MR, Arbabian M, Nasr-Esfahani MH. Density gradient centrifugation before or after magnetic-activated cell sorting: which technique is more useful for clinical sperm selection? *J Assist Reprod Genet* 2012;29:31–38.
- Templado C, Vidal F, Navarro J, Marina S, Egozcue J. Meiotic studies and synaptonemal complex analysis in two infertile males with a 13/14 balanced translocation. *Hum Genet* 1984;67:162–165.
- Therman E, Susman B, Denniston C. The nonrandom participation of human acrocentric chromosomes in Robertsonian translocations. *Ann Hum Genet* 1989;53:49–65.
- Thillo GV, Guidobono M, Young E, Jorro MR, Vila M, Rawe V. Biological safety and live births after selection of non-apoptotic spermatozoa during ICSI. *Fertil Steril* 2011;96:S160–S161.
- Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, Lopes P, Tabaste JM, Spira A. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod Oxf Engl* 1991;6:811–816.
- Tournaye H, Staessen C, Liebaers I, Van Assche E, Devroey P, Bonduelle M, Van Steirteghem A. Testicular sperm recovery in nine 47,XXY Klinefelter patients. *Hum Reprod Oxf Engl* 1996;11:1644–1649.
- Trask BJ. Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends Genet TIG* 1991;7:149–154.

- Ugozzoli F, Sedó CA, Fiszbajn G, Nodar F, Kopelman S, Papier S. Neonatal outcome after ICSI with MACS for selection of non apoptotic spermatozoa: first report. *Fertil Steril* 2013;100:S474.
- Ushijima C, Kumasako Y, Kihale PE, Hirotsuru K, Utsunomiya T. Analysis of chromosomal abnormalities in human spermatozoa using multi-colour fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod Oxf Engl* 2000;15:1107–1111.
- Van Assche E, Staessen C, Vegetti W, Bonduelle M, Vandervorst M, Van Steirteghem A, Liebaers I. Preimplantation genetic diagnosis and sperm analysis by fluorescence in-situ hybridization for the most common reciprocal translocation t(11;22). *Mol Hum Reprod* 1999;5:682–690.
- Vantéry Arrighi C de, Lucas H, Chardonnens D, Agostini A de. Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. *Reprod Biol Endocrinol RBE* 2009;7:1.
- Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, Liebaers I, Van Steirteghem A. Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod Oxf Engl* 2000;15:351–365.
- Vendrell X, Ferrer M, García-Mengual E, Muñoz P, Triviño JC, Calatayud C, Rawe VY, Ruiz-Jorro M. Correlation between aneuploidy, apoptotic markers and DNA fragmentation in spermatozoa from normozoospermic patients. *Reprod Biomed Online* 2014;28:492–502.
- Vialard F, Bailly M, Bouazzi H, Albert M, Pont JC, Mendes V, Bergere M, Gomes DM, Mazancourt P de, Selva J. The high frequency of sperm aneuploidy in klinefelter patients and in nonobstructive azoospermia is due to meiotic errors in euploid spermatocytes. *J Androl* 2012;33:1352–1359.
- Vidal F, Templado C, Navarro J, Marina S, Egozcue J. Meiotic and synaptonemal complex studies in a 14/21 translocation carrier. *Int J Androl* 1982;5:21–26.

- Vincent M-C, Daudin M, De MP, Massat G, Mieusset R, Pontonnier F, Calvas P, Bujan L, Bourrouillout G. Cytogenetic investigations of infertile men with low sperm counts: a 25-year experience. *J Androl* 2002;23:18-22-45.
- Vorona E, Zitzmann M, Gromoll J, Schüring AN, Nieschlag E. Clinical, endocrinological, and epigenetic features of the 46,XX male syndrome, compared with 47,XXY Klinefelter patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:3458–3465.
- Vozdova M, Kasikova K, Oracova E, Prinosilova P, Rybar R, Horinova V, Gaillyova R, Rubes J. The effect of the swim-up and hyaluronan-binding methods on the frequency of abnormal spermatozoa detected by FISH and SCSA in carriers of balanced chromosomal translocations. *Hum Reprod Oxf Engl* 2012;27:930–937.
- Wiland E, Hobel CJ, Hill D, Kurpisz M. Successful pregnancy after preimplantation genetic diagnosis for carrier of t(2;7)(p11.2;q22) with high rates of unbalanced sperm and embryos: a case report. *Prenat Diagn* 2008;28:36–41.
- Wong EC, Ferguson KA, Chow V, Ma S. Sperm aneuploidy and meiotic sex chromosome configurations in an infertile XYY male. *Hum Reprod Oxf Engl* 2008;23:374–378.
- World Health Organization, editor. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 2010; World Health Organization: Geneva.
- Zahedi A, Tavalae M, Deemeh MR, Azadi L, Fazilati M, Nasr-Esfahani MH. Zeta potential vs apoptotic marker: which is more suitable for ICSI sperm selection? *J Assist Reprod Genet* 2013;30:1181–1186.
- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Mouzon J de, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, Vanderpoel S, International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology, World Health Organization. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertil Steril* 2009;92:1520–1524.
- Zini A, Kamal K, Phang D, Willis J, Jarvi K. Biologic variability of sperm DNA denaturation in infertile men. *Urology* 2001;58:258–261.

Zini A, San Gabriel M, Baazeem A. Antioxidants and sperm DNA damage: a clinical perspective. *J Assist Reprod Genet* 2009;26:427–432.

Serment d’Hippocrate

Au moment d’être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d’être fidèle aux lois de l’honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J’interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l’humanité.

J’informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n’exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l’indigent et à quiconque me le demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis(e) dans l’intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l’intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l’indépendance nécessaire à l’accomplissement de ma mission. Je n’entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J’apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu’à leurs familles dans l’adversité.

Que les hommes et mes confrères m’accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j’y manque. »

Serment prononcé par le Docteur.....

Le

Pour l’Ordre national des médecins,

Le médecin

Autorisation d'imprimer



IMPRIME 3 – AUTORISATION D'IMPRIMER THESE DE DOCTORAT EN MEDECINE

INTERNE

Madame / Monsieur CAIRE-TETAURU ELODIE
Inscrit-e en DES de BIOLOGIE MEDICALE

Titre définitif de la thèse soutenue :

LES APPORTS DU TRI DE SPERMATOZOÏDES CHEZ DES HOMMES PORTEURS D'UNE ANOMALIE
CHROMOSOMIQUE DE STRUCTURE

ACCORD DU PRESIDENT DU JURY DE THESE SUR L'IMPRESSION DE LA THESE

OUI :
NON :

La présente autorisation d'imprimer sa thèse est délivrée à l'interne susmentionné.

Brest, le 4/10/2017

Le directeur de l'UFR de médecine et des
sciences de la santé de Brest


C. BERTHOU



Le président du jury de thèse


Centre Hospitalier Régional Universitaire de BREST
Professeur en Médecine
Gynécologie-Généraliste
Médecin de la Fertilité
RPPS 1100052042

CAIRE-TETAURU (Élodie) – Les apports du tri de spermatozoïdes chez des hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure. – 131 pages, 36 figures, 13 tableaux

Thèse : Médecine : Brest 2017

RESUME :

Le tri cellulaire à l'aide de microbilles magnétiques conjuguées à l'annexine V (MACS) est une technique qui permet de séparer les spermatozoïdes en deux populations annexine V+ et annexine V- (spermatozoïdes apoptotiques et non apoptotiques respectivement).

L'objectif de cette étude est d'estimer le taux de spermatozoïdes chromosomiquement normaux, le taux de fragmentation de l'ADN et le taux de spermatozoïdes apoptotiques, avant et après MACS, pour évaluer sa potentielle utilisation auprès de ces hommes infertiles.

Quatre patients ont été inclus dans cette étude, un porteur d'une translocation robertsonienne et trois porteurs d'une translocation réciproque équilibrée. Une analyse de la ségrégation méiotique par FISH, de la fragmentation de l'ADN spermatique par TUNEL, et de l'apoptose par l'annexine V-FITC, ont été réalisés chez ces patients. La proportion de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés, le taux de fragmentation de l'ADN et de spermatozoïdes apoptotiques, diminuent significativement dans la population d'annexine V- et augmentent significativement dans la population d'annexine V+, par rapport à l'éjaculat de départ. Ces premiers résultats encourageants suggèrent une application de cette technique MACS dans le cadre d'une aide médicale à la procréation chez ces hommes infertiles, afin de mieux sélectionner la population de gamètes chromosomiquement normaux et non apoptotiques qui diminuerait le risque chromosomique pour le conceptus, et pourraient augmenter le taux de grossesse et diminuer celui de fausse couche.

MOTS CLES :

Anomalie chromosomique de structure
MACS
Spermatozoïdes chromosomiquement équilibrés
FISH
Apoptose
Fragmentation de l'ADN

JURY :

Président :
M. le Professeur Philippe MERVIEL

Membres :
M. le Professeur Claude FEREC
M. le Professeur Denis SARROUILHE
Mme le Docteur Aurore PERRIN
M. le Docteur Frédéric MOREL

DATE DE SOUTENANCE :

23 octobre 2017

ADRESSE DE L'AUTEUR :

Nocunolé, 56620, PONT-SCORFF