



23^{ème} JOURNÉE ORLÉANAISE SUR LA PRISE EN CHARGE DES COUPLES INFERTILES

Orléans, 31/03/2023

Spermatozoïdes et stress oxydant : une histoire d'amis et d'ennemis !

Prof. Joël R. DREVET
Université Clermont Auvergne (UCA)
Faculté de Médecine
Laboratoire GRéD.
Clermont-Ferrand
FRANCE



THE UNIVERSITY OF
NEWCASTLE
AUSTRALIA

CECOS

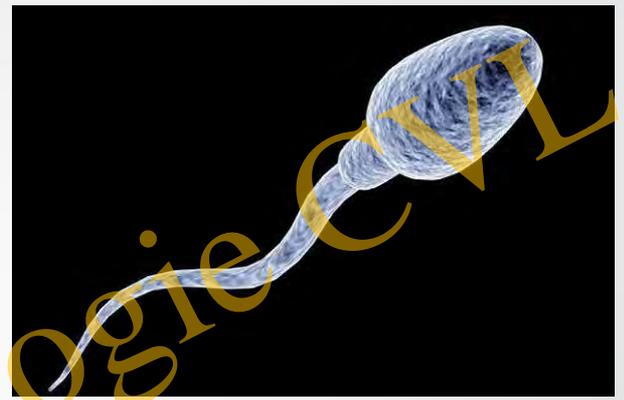
INSTITUT
RHONALPIN

Pour la reproduction humaine

UCA
UNIVERSITÉ
Clermont
Auvergne

cnrs
dépasser les frontières

Inserm
Institut national
de la santé et de la recherche médicale



1: **Stress oxydant** chez les pluricellulaires animaux.

2: Dommages oxydants et spermatozoïde (→ dommage à l'ADN spermatique)

3: La situation en clinique

- *Diagnostic*

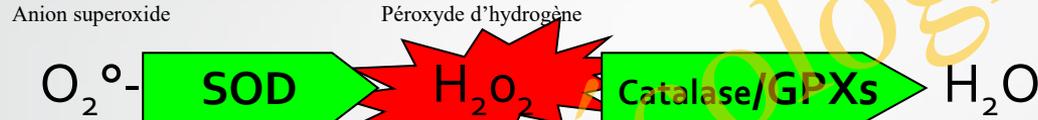
- *Approches thérapeutiques*

- *Techniques PMA & stress oxydant*

STRESS OXYDANT (organismes aérobies)

Requis pour un métabolisme normal

Métabolisme Oxydatif



Maturation des protéines --> pontages disulfures
Modulateur de voies de transduction de signaux



Attaques (Lipides, Protéines, Glucides, ADN)



MORT CELLULAIRE

Sites majeurs de production: mitochondrie (chaîne respiratoire).
cytoplasme cellulaire (enzymes de la glycolyse par exemple)



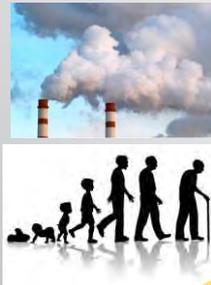
CAUSES

GENETIQUE INDIVIDUELLE
 INFECTION / INFLAMMATION
 DESORDRES METABOLIQUES
 REGIME ALIMENTAIRE DESEQUILIBRE
 DROGUES/MEDICAMENTS
 TABAGISME/ALCOOLISME
 EXPOSITIONS CHIMIQUES (POLLUANTS)
 EXPOSITIONS PHYSIQUES

CHALEUR / RADIATIONS



AGE



*STRESS OXYDANT
MODERE A ELEVE*

Sources
EOR/ROS

*Espèces Oxygénées Réactives/
Reactive Oxygen Species*



Lipides mbaires
 Protéines/sucres
 ADN nucléaire et mito^{al}

*Toutes les cellules de l'organisme
sont concernées!*

Spermatozoïdes plus que tout autre

- PMA** - cryopréservation !
- milieu de culture !
 - protocoles de sélection (FIV/ICSI)!
 - exposition à la lumière!



Aptitudes des gamètes à gérer les dommages oxydants sont très différentes

Ovule:

- métabolisme actif (y compris activités de réparation de l'ADN)
- un important contenu cytosolique avec profusion de molécules/enzymes à activités protectrices (antioxydants primaires et secondaires)



Spermatozoïde

- une cytodifférenciation poussée (noyau haploïde condensé → 0 transcription)
- un métabolisme réduit (ex: pas d'activité de réparation de l'ADN)
- pas de réponse au stress (autres que nécrose/apoptose)
- pas ou peu de cytoplasme (faibles protections intrinsèques)
- des lipides membranaires particuliers (AGPI)

susceptibles à l'oxydation

une fois oxydés (générateurs d'aldéhydes toxiques [4-HNE]) → producteurs de ROS

Ambiguïtés:

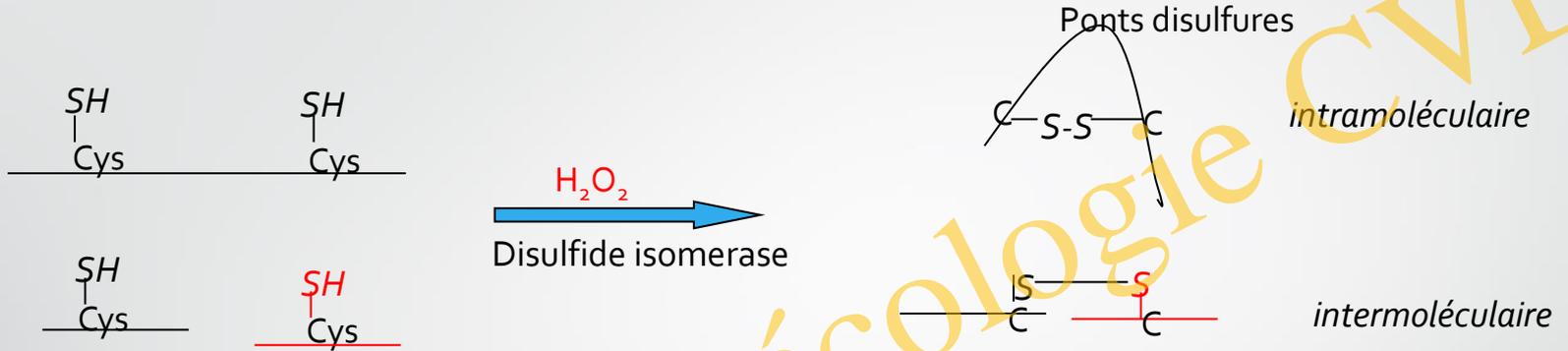
- *spz mobiles producteurs de ROS**
- *processus oxydants participent à la maturation des spz.*
- *ROS participent à la signalisation de la capacitation*



* Totic & Walton, Nature 1946. → Spz produces ROS (H₂O₂)



PONTAGE DISULFURE INTENSE EN POST-TESTICULAIRE DES PROTEINES SPERMATIQUES



CAPUT SPZ
Proteins

C-SH 90%

C-S-S-C 10%

CAUDA SPZ
Proteins

C-SH 10%

C-S-S-C 90%

Protéines spermatisques concernées

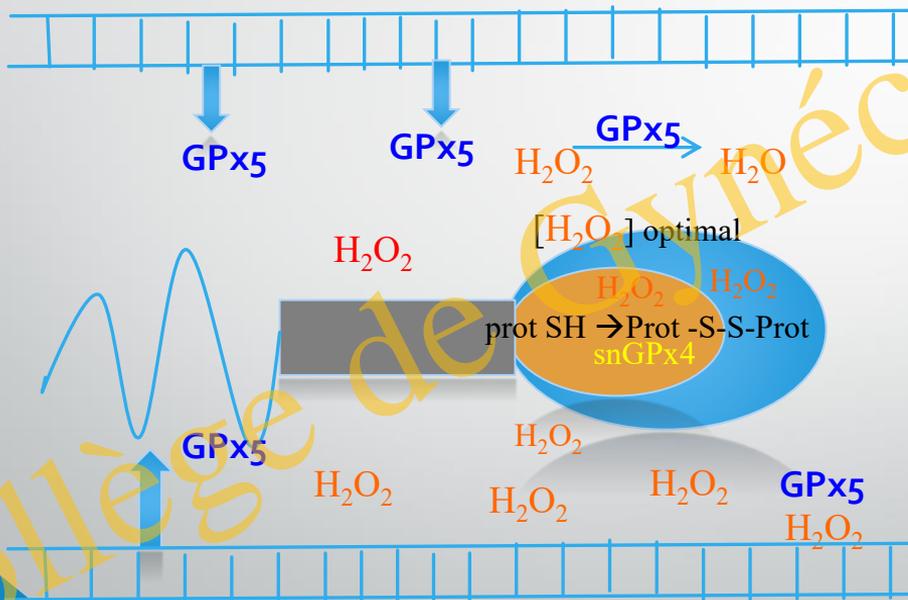
Protéines membranaires

Protéines flagellaires

Protéines nucléaires (protamines)

H₂O₂ : un acteur essentiel de la qualité nucléaire du SPZ

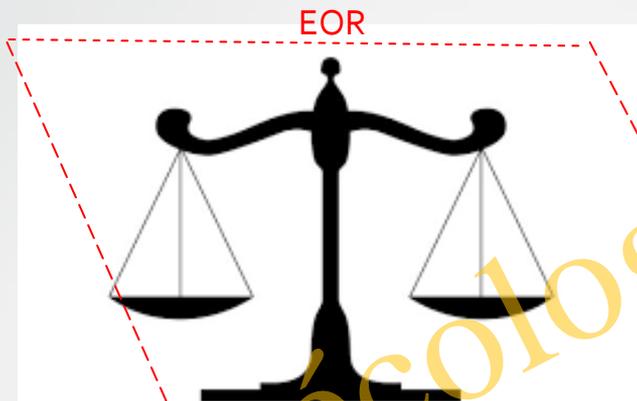
CAPUT



Ponts inter et intra-protamines



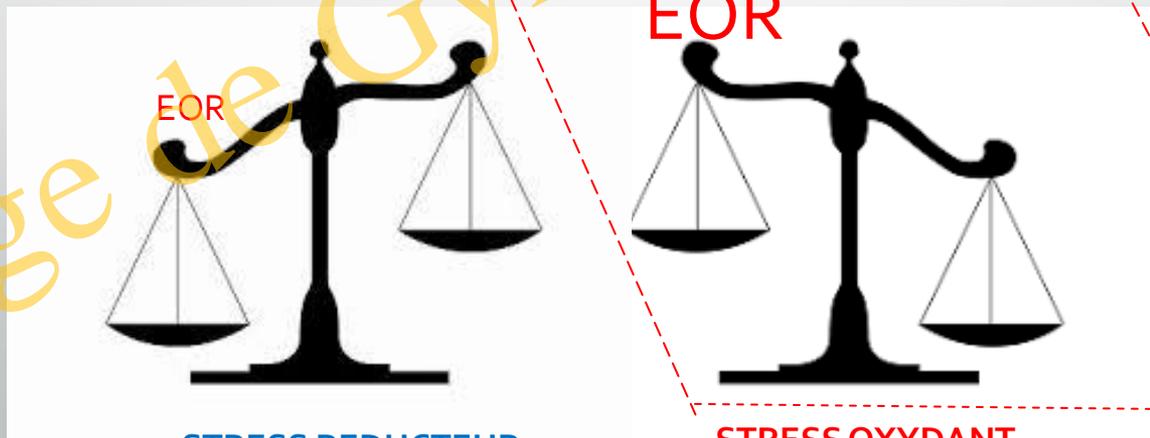
Effet physiologiques « bénéfiques » versus effets délétères (pathologiques)



Si AO augmentent
Si EOR diminuent

Si AO diminuent
Si EOR augmentent

Equilibre fragile!

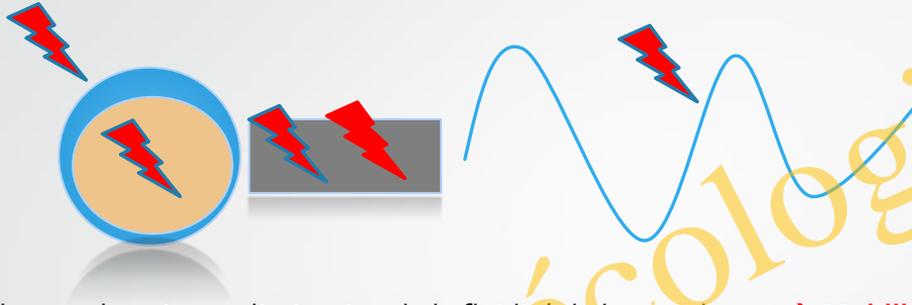


STRESS REDUCTEUR

STRESS OXYDANT



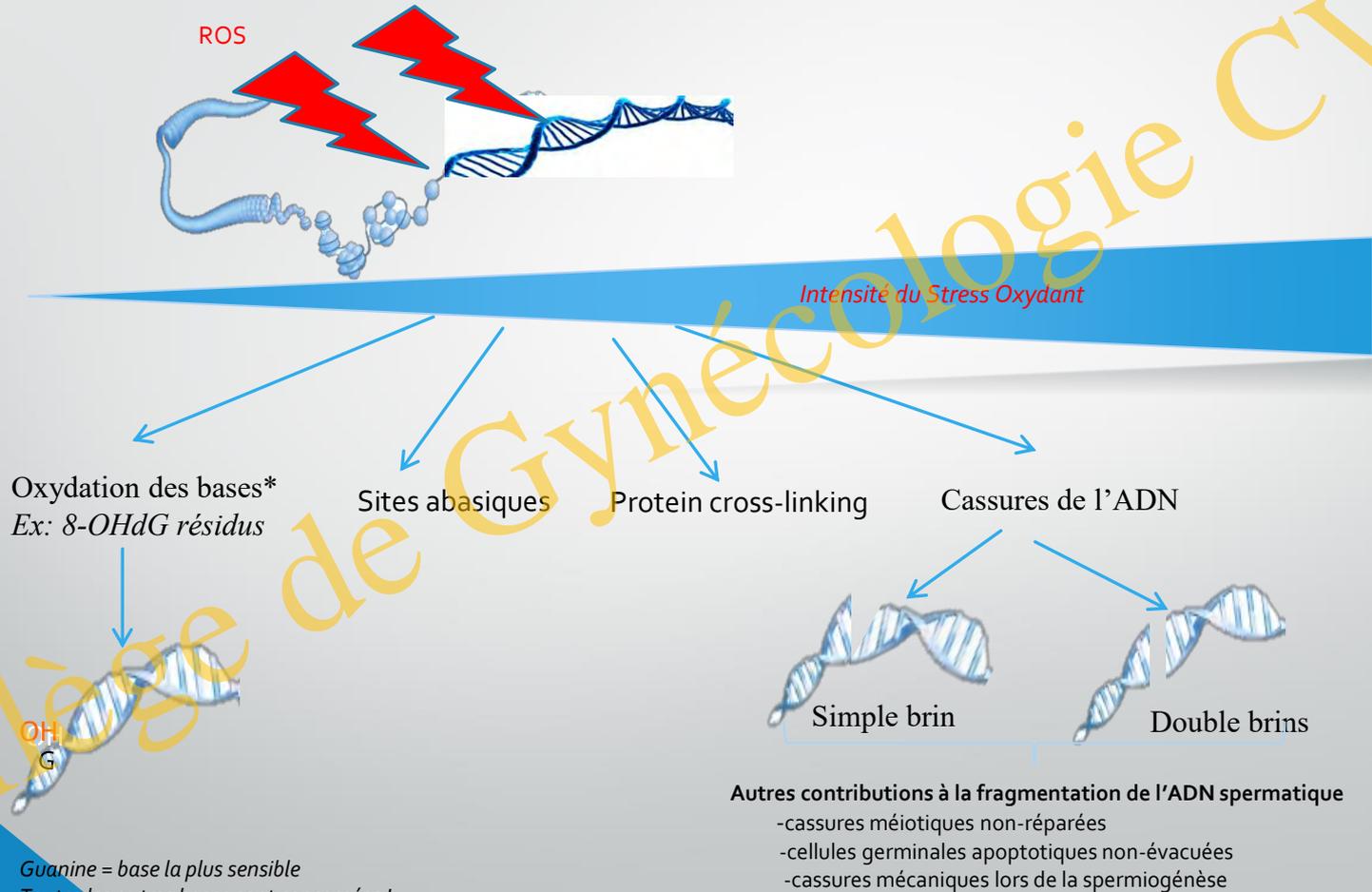
IMPACTS DES ROS SUR LES STRUCTURES ET FONCTIONS SPERMATIQUES



- sur la membrane plasmique : diminution de la fluidité de la membrane → **Mobilité affectée**
- sur les fonctions mitochondriales → **Mobilité affectée**
- oxydation des lipides, sucres et protéines membranaires → **reconnaissance** gamétique affectée
- interférences avec la signalisation cellulaire (H_2O_2 - 2nd messenger dans la **capacitation**) → **fécondation compromise**
- attaques de l'ADN spermatique → **risque mutagénique héritable si pas corrigé par l'ovocyte**
 - altérations du développement embryonnaire
 - augmentation des pathologies dans la descendance
 - affaiblissement génétique/ pérennité de l'espèce



LES MULTIPLES VISAGES DES DOMMAGES OXIDANTS A L'ADN

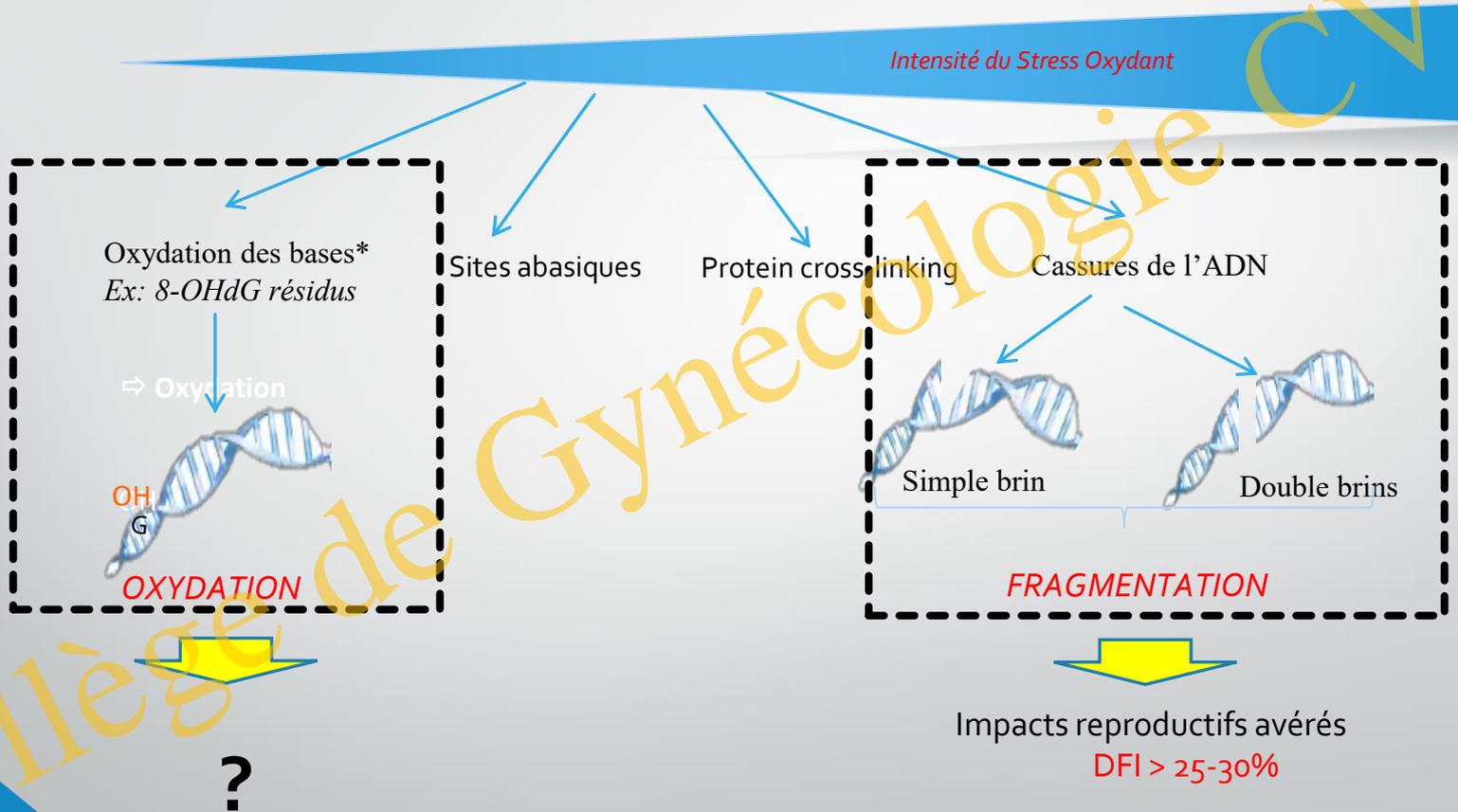


- Guanine = base la plus sensible
- Toutes les autres bases sont concernées !



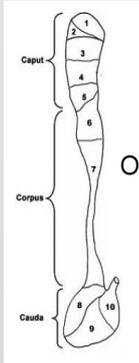
FRAGMENTATION & OXYDATION DE L'ADN SPERMATIQUE : 2 SITUATIONS LE PLUS SOUVENT IMBRIQUEES

QUELS IMPACTS RESPECTIFS SUR LE SUCCES REPRODUCTIF?



Genèse d'un modèle murin à spermatozoïde dont le noyau est oxydé

Souris *Gpx5^{-/-}*

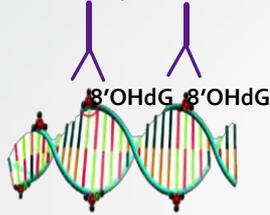


Protection AO luminale diminuée

Oxidative stress



Anticorps anti-8OHdG



ICC : anti 8-OHdG antibody



- 65% of cauda sperm population is oxidized
- No increased DNA fragmentation
- No membrane lipid peroxidation
- No impact on sperm morphology
- No impact on sperm mobility
- No impact on sperm ability to fertilize

Région du noyau spermatique encore en assemblage nucleosomal (càd avec des histones donc de moindre compaction) sont sensibles aux dommages

Confocal microscopy

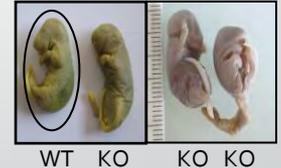


Nucleosome : 146 bp
Protamine toroïd : 50 to 100 kb

Impacts Reproductifs quand un spz oxydé féconde

KO males X WT females

miscarriages
abnormal development
perinatal mortality



L'oxydation du noyau spermatique seule altère le succès reproductif

Chabory et al., J.Clin. Invest, 2009
Noblanc et al., J. Androl., 2011
Noblanc et al., PLoS ONE 2012



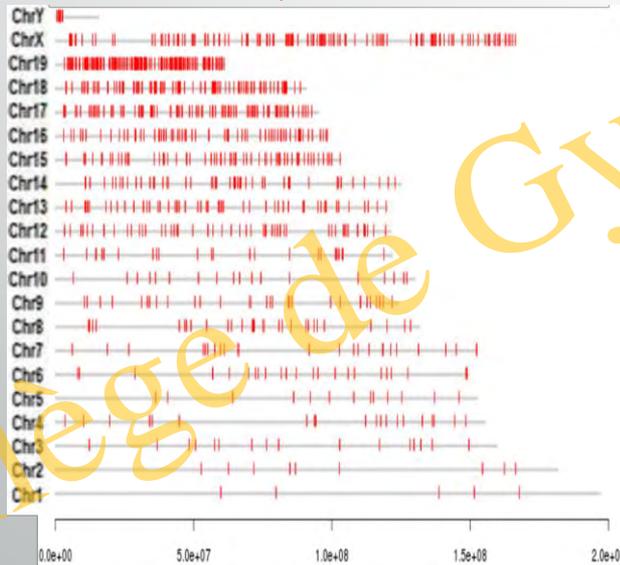
Identification des régions oxydées sur le noyau spermatique



Immunoprecipitation of oxidized sequences
+
High throughput sequencing



Heat map of highly oxidized regions on the mouse sperm chromosomes



Région oxydée = 200-400 pb long contenant ($1 > G-OH > n$)

WT : < 60 régions oxydées, 0 point chaud d'oxydation
KO : > 16000 régions oxydées. + >1000 points chauds

Représente:

> $n \cdot 10^6$ résidus oxydés que l'œuf fécondé devra réparer!
BER : base excision repair pathway maternel

*Si absence de réparation ou erreur de réparation par l'ovocyte :
Introduction de mutations de novo (transversions)*

-létales embryonnaires (échecs pré-implantatoires; avortements,
-héritables/transmissibles



Quelle est la situation en clinique ?

-rencontre-t-on souvent des hommes dont le noyau spermatique est oxydé ?



Y a-t-il une raison de penser que le spermatozoïde humain est susceptible à l'oxydation?

oui !! Car spz à faible compaction nucléaire

Souris : histones persistantes < 1% ADN spermatique

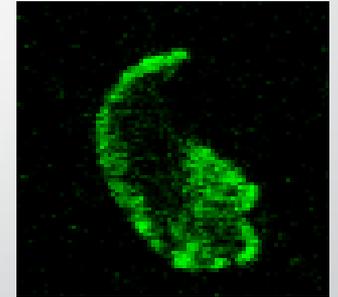
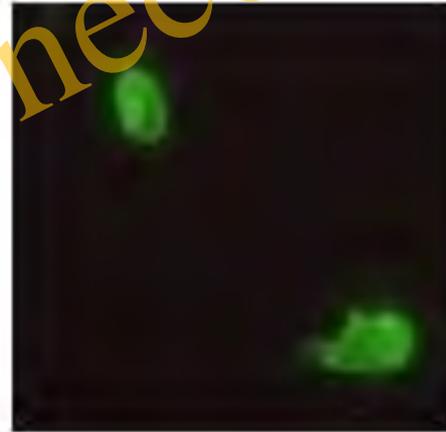
Homme : histones persistantes > 10% ADN spermatique

8-OHdG reactivity



Negative control

8-OHdG reactivity



Rappel: profil des atteintes oxydantes dans un noyau spermatique murin

Noyau entier concerné par l'oxydation chez l'homme
Noyau de plus faible niveau de condensation



Oxydation du noyau spermatique pas mesurée en clinique!

Seule la fragmentation est occasionnellement évaluée

SCSA, sperm chromatin structural assay

SCD, sperm chromatin dispersion

Comet

TUNEL

Ou accessoirement, le niveau de condensation de l'ADN spermatique

coloration bleu d'aniline/bleu de toluidine

CMA₃, chromomycine A₃

Mbmb, Monobromobimane

***PB : si l'oxydation accompagne souvent la fragmentation et est cause de fragmentation
on peut avoir de l'oxydation en absence de fragmentation***

→ Nécessité d'avoir un test spécifique

-fiable, discriminant

-reproductible, non subjectif

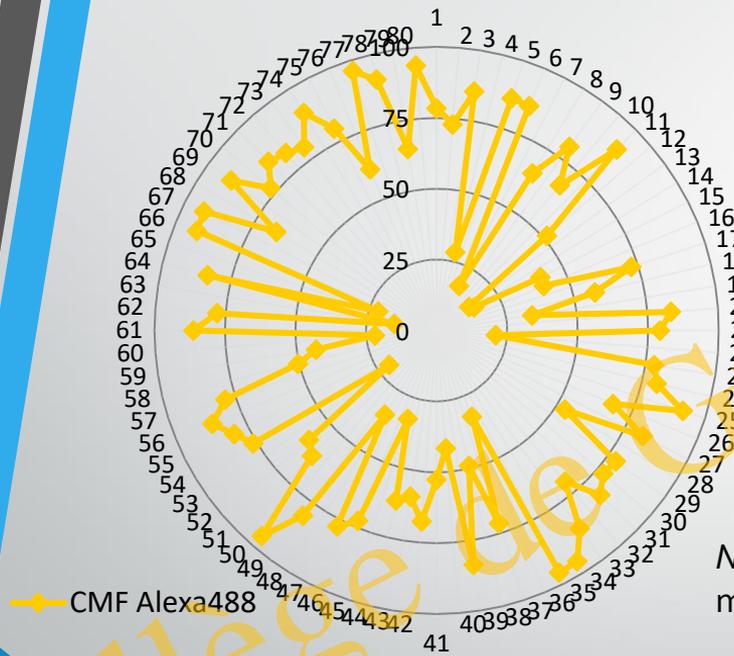
-facile à mettre en œuvre





Niveau d'oxydation du noyau spermatique humain en clinique

Détection 8-OHdG / cytométrie en flux



> 200 patients testés (11/2015 → 02/2017)
 - sans sélection (spermologie, AMP)
 - sans préparation (« sperme frais »)

Pourcentages de cellules positives pour 8-OHdG
 → 15% à 98%,
 moyenne : 66%

2 patients sur 3 montrent des niveaux de 8-OHdG modérés à élevés quelle que soit l'origine de l'infertilité

Nota bene : dans des cohortes similaires seul 1 patient sur 7 montre des niveaux de fragmentation supérieurs à la norme (DFI > 25%).

Corrélations bonnes avec : leucocytospermie
 asthénozoospermie
 IMC élevé

Spermatozoïdes à noyau oxydé est une situation très fréquente dans la pratique clinique !!



Quelles sont les régions du noyau spermatique humain sujettes à l'oxydation (1)



Collection of normozoospermic sperm samples from fertile donors (n=8)

Sperm samples

+ H₂O₂ (5mM)

OXIDIP

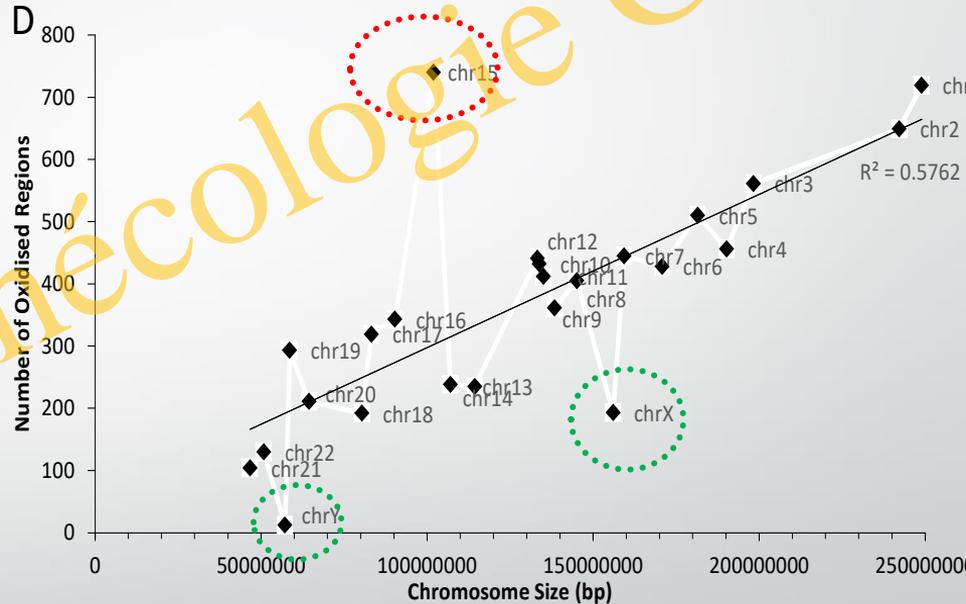
OXIDIP

NGS_{control}

Analyse comparée

NGS_{H₂O₂}

3500 Régions impactées 54500



1/ Plus un chromosome est long plus on trouve de régions oxydées
2/ certains chromosomes dérogent à ce constat

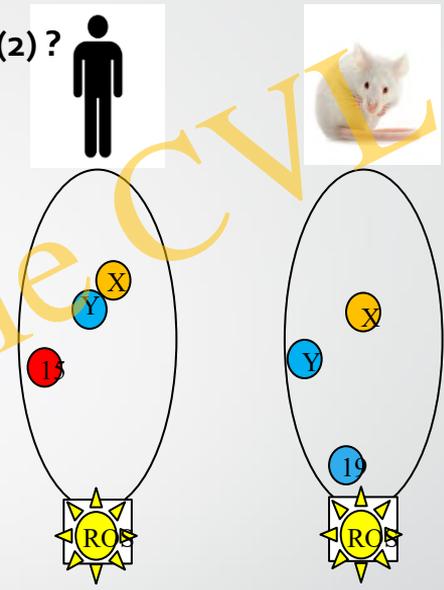
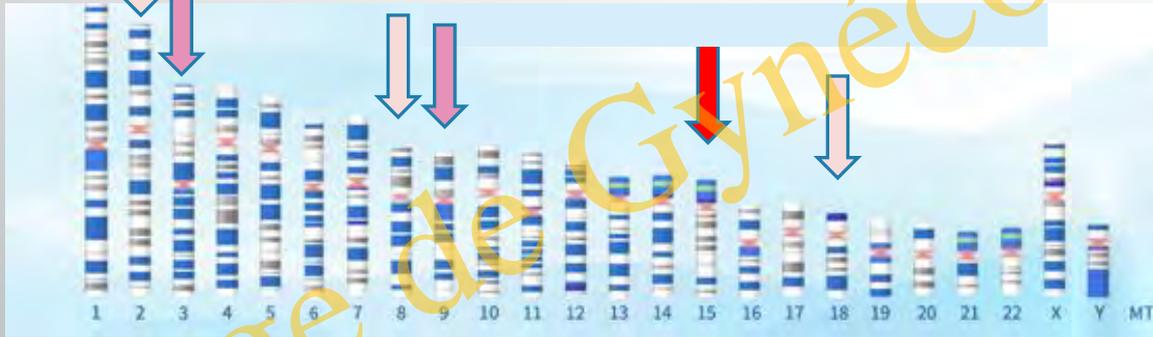
- plus susceptibles
- moins susceptibles



Quelles sont les régions du noyau spermatique humain sujettes à l'oxydation (2) ?

10 régions chromosomiques du spermatozoïde humain particulièrement susceptibles à l'oxydation

Chr15	3 régions
Chr9	2 régions
Chr3	2 régions
Chr8	1 région
Chr2	1 région
Chr18	1 région



Xavier et al., Human Reprod 2019

Caractéristiques : * régions enrichies en histones (mais aussi régions non associées à histones ou protamines)
 * la susceptibilité à l'oxydation de ces régions est en partie expliquée par la position du chromosome dans le noyau spermatique.

(cf noyau spermatique souris. *Kocer et al., 2015; Champroux et al., 2018*)



Ces 10 régions de susceptibilité des chr spermatiques aux dommages oxydants sont-elles plus oxydées dans les situations d'infertilité rencontrées en clinique ?

Fertile donors/infertile donors

n=62 each

Sperm selection

DNA preparation

qPCR
amplification

Oxidized DNA
Recovery
+
qPCR
amplification

Normozoospermiques
Infertilités idiopathiques

8 régions/10 plus oxydées dans la cohorte infertile
3 régions/10 plus fragmentées dans la cohorte infertile

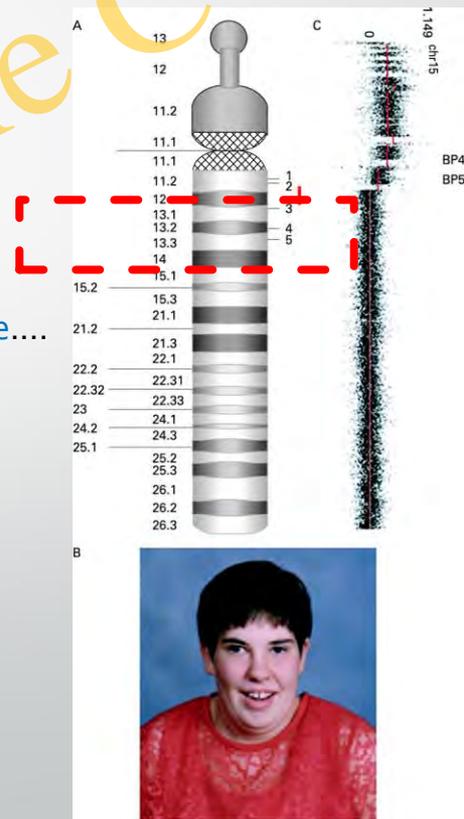


Une région du chromosome 15 montre la plus forte susceptibilité



15q13-15q14

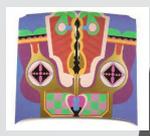
- associée au syndrome de Prader-Willi (SPW)
 - associée au syndrome d'Angelman (SA)
 - associée aux troubles du spectre autistique
 - associée à de multiples anomalies congénitales dans la descendance
 - associée aux troubles bipolaires / retard de croissance pré-postnatal, schizophrénie....
- } Empreinte paternelle
- *En bleu* : situations connues pour être en corrélation avec l'âge du père et supposées associées à des dommages oxydants à l'ADN du spermatozoïde



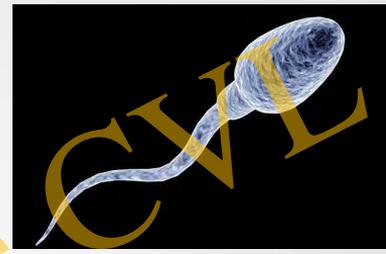


Conclusions intermédiaires:

- noyau du spermatozoïde humain très susceptible à l'oxydation
- 7 patients sur 10 vus en clinique ont un niveau d'oxydation du noyau spermatique de modéré à élevé
- certaines régions chromosomiques sont préférentiellement touchées par l'oxydation ces régions de susceptibilité sont effectivement plus touchées chez les patients infertiles
- certaines des régions chromosomiques susceptibles à l'oxydation concernent des régions géniques impliquées dans des pathologies dont la fréquence dans la descendance est accrue lorsque l'âge du père est avancé.



Conduite à tenir dans la pratique clinique



Diagnostic

1 - Tester

Thérapie

2- Corriger si possible

° *uniquement les patients qui le nécessite!*

° *avec les bons ingrédients!*

° *avec les bonnes doses!*

Innocuité

3 - Si AMP → faire attention de ne pas augmenter les dommages oxydants au noyau spermatique



Déclaration de conflits d'intérêt



*Business Unit
Clermont Auvergne Innovation
UCA
Clermont-Ferrand*

Plateforme de services et de R&D
Directeur (2020-)



Ewing, New-Jersey, USA

US Biotech company
Scientific advisor. (2014-)

Tester

- Condensation (Bleu d'aniline, Bleu de Toluidine,...)
- Fragmentation (SCSA®, TUNEL, Comet®, SCD)
- Oxydation (OxyDNA®)

EVALSEM®

Spermologie Santé
PMA Conservation des semences
Patrimoine génétique
Cryoconservation

Nos offres de service Prestations

L'évaluation de la qualité des semences mâles fraîches ou cryoconservées est un enjeu pour l'agro-industrie de l'insémination artificielle des animaux de rente. Les programmes de conservation des espèces, comme en clinique pour les technologies de la procréation médicalement assistée (PMA). Forte de ses 25 années d'expertise en spermologie chez les mammifères, la plateforme EVALSEM s'attache au lancement d'une plateforme de service et de R&D.

Les activités de la plateforme visent principalement à décliner un ensemble de tests afin d'apprécier la qualité structurale et fonctionnelle spermatique incluant une évaluation de l'intégrité du patrimoine génétique paternel. Elle ambitionne aussi de travailler au développement de nouveaux milieux de manipulation et de conservation des semences, ainsi qu'au développement d'approches thérapeutiques non-invasives de restauration et de contrôle (immunocontraception) de la fertilité.

- Evaluation de paramètres spermatiques classiques (numération, morphologie, mobilité, viabilité),
- Evaluation de paramètres spermatiques spécifiques (condensation nucléaire, fragmentation nucléaire, oxydation nucléaire, activité mitochondriale),
- Evaluation de paramètres séminaux (pH, niveau d'espèces oxygénées réactives, capacité antioxydante totale,...),
- Cryoconservation de spermatozoïdes mûrs pour la conservation de lignées,
- Développement de nouveaux milieux de congélation de spermatozoïdes.

Nos équipements

- Station d'analyse "Sperm Class Analyser" (Microptic, Spain)
- Cytomètre en flux « Attune TM NxT » (Thermo Fisher Scientific, France).
- Station de cryopreservation « Microdigit cool » (IMV, France)
- Système Timalapse « GERE » (Genea Biomedx, Australie)

Institutions partenaires



Exemples de réalisations

- Membre d'un groupe international d'expertise de la qualité spermatique après préparation de spermatozoïdes pour la clinique sur le nouveau système FELIXTM (Memphasys, Australie).
- Collaboration avec ALLICE (France) pour l'évaluation de la qualité spermatique de Béliers et de Taureaux sélectionnés comme reproducteurs en centres d'insémination artificielle.
- Partenariat scientifique depuis 2014 avec la société de biotechnologie CELLOXESS LLC (New Jersey, USA) dans le développement de traitements non invasifs (supplémentations orales) de l'infertilité masculine et féminine.



Equipements



Référent

Joël DREVET
Responsable scientifique

Contacts

developpement-innovation
@clermontauvergneinnovation.com
0473.60.18.30

Demander un devis

En savoir +



Traiter : Oui! mais pas n'importe qui !.... et pas avec n'importe quoi !



Et environ 100-120 autres possibles ??????????

Ingrédients
Doses
Durées
?

Human Reproduction, Vol.31, No.2 pp. 252–262, 2016

Advanced Access publication on January 4, 2016 doi:10.1093/humrep/dev302

human
reproduction

ORIGINAL ARTICLE **Andrology**

A novel antioxidant formulation designed to treat male infertility associated with oxidative stress: promising preclinical evidence from animal models

P. Gharagozloo^{1,*}, A. Gutiérrez-Adán², A. Champroux³, A. Noblanc³, A. Kocer², A. Calle², S. Pérez-Cereales², E. Pericuesta², A. Polhemus¹, A. Moazamian¹, J.R. Drevet³, and R.J. Aitken^{4,5}

¹CellOxess LLC, 15 Roszel Road, Princeton, NJ 08540, USA ²INIA, Animal Reproduction, Madrid 28040, Spain ³GREd Lab CNRS UMR6293-INSERM U1103, Université Blaise Pascal-Clermont II, Clermont-Ferrand 63001, France ⁴Hunter Medical Research Institute, New Lambton Heights, NSW 2305, Australia ⁵The University of Newcastle, University Drive, Callaghan, NSW 2308, Australia

*Correspondence address. Tel: +1-609-818-9100; Fax: +1-609-818-9109; E-mail: parviz.gharagozloo@celloxess.com

Submitted on July 25, 2015; resubmitted on September 24, 2015; accepted on November 9, 2015

Downloaded from <https://academic.oup.com/humrep/article/>

All-natural isoforms of VitE
Proprietary blend of carnithines
Personalized (preconceptual, Plus, Max)



<https://www.fertilix.com>



Attention aux protocoles classiques de sélection des spermatozoïdes pour la FIV !



Received: 8 November 2022 | Revised: 2 January 2023 | Accepted: 10 January 2023

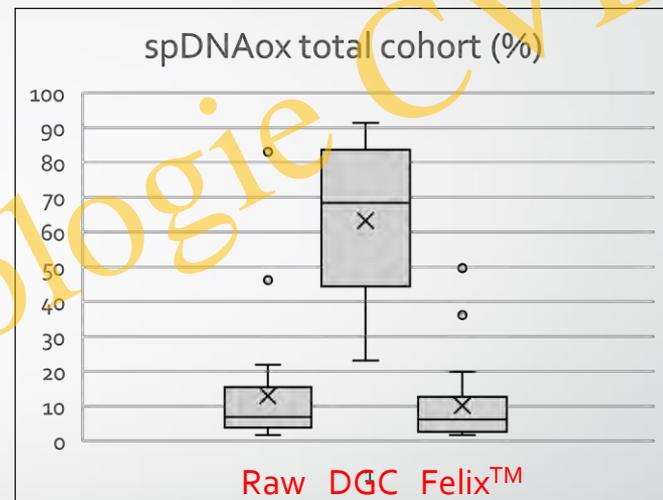
DOI: 10.1111/andr.13384

ORIGINAL ARTICLE

ANDROLOGY  WILEY

Spermatozoa isolation with Felix™ outperforms conventional density gradient centrifugation preparation in selecting cells with low DNA damage

Pauline Villeneuve¹ | Fabrice Saez¹  | Elisa Hug¹ | Areski Chorfa¹ |
Rachel Guiton¹  | Benoit Schubert² | André Force² | Joël R. Drevet¹ 





Merci de votre attention !



Collège de Gynécologie CVL

INSERM
advancing the frontiers
Inserm
Institut national
de la santé et de la recherche médicale

THE UNIVERSITY OF
NEWCASTLE
AUSTRALIA

UNIVERSITÉ
Clermont
Auvergne

15

Hypertension, essential, susceptibility to
CLL/lymphoma, B-cell
Lymphoma, diffuse large cell
Necdin
Prader-Willi syndrome
Angelman syndrome
Hair color, brown
Spastic paraplegia
Limb deformity
Schizophrenia, neurophysiologic defect in
Isovaleric acidemia
Spherocytosis, hereditary, Japanese type
Barter syndrome
Amyotrophic lateral sclerosis, juvenile recessive
Dyserythropoietic anemia, congenital, type III
Griscelli syndrome
Deafness, autosomal recessive
Hepatic lipase deficiency
Marfan syndrome
Shprintzen-Goldberg syndrome
Ectopia lentis, familial
Leukemia, acute promyelocytic, PML/RARA type
Cardiomyopathy, familial hypertrophic
Enhanced S-cone syndrome
Glutaric aciduria, type IIA
Epilepsy, nocturnal frontal lobe, type 2
PAPA syndrome
Diabetes mellitus, insulin-dependent

100 million base pairs



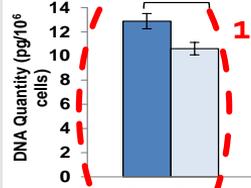
Prader-Willi/Angelman syndrome (paternally imprinted)
Eye color, brown
Human coronavirus sensitivity
Albinism, oculocutaneous, type II and ocular
Andermann syndrome
Cardiomyopathy, dilated and familial hypertrophic
Epilepsy, juvenile myoclonic
Spinocerebellar ataxia
Microcephaly, primary autosomal recessive
Dyserythropoietic anemia, congenital, type I
Muscular dystrophy, limb-girdle, type 2A
Dyslexia
Amyloidosis, hemodialysis-related
Ceroid-lipofuscinosis, neuronal, late infantile
Gynecomastia, familial
Virilization, maternal and fetal
Colorectal cancer
Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome, type Ib
Bardet-Biedl syndrome
Tay-Sachs disease
GM2-gangliosidosis
Tyrosinemia, type I
Mental retardation, severe
Hypercholesterolemia, familial, autosomal recessive
Retinitis pigmentosa, autosomal recessive
Otosclerosis
Bloom syndrome



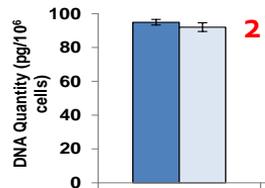
Fertile



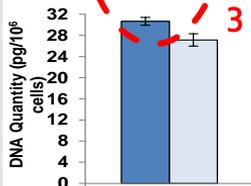
Infertile



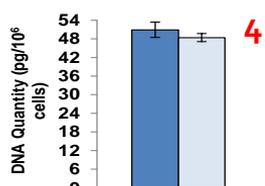
Total DNA



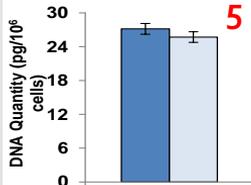
Total DNA



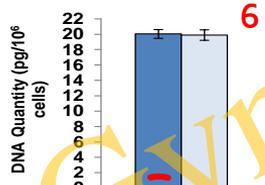
Total DNA



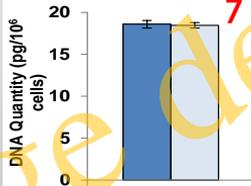
Total DNA



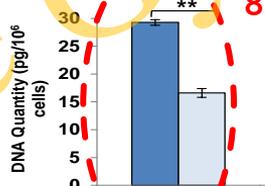
Total DNA



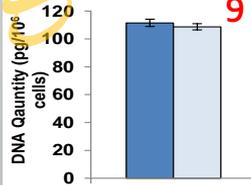
Total DNA



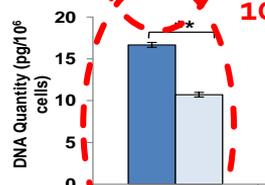
Total DNA



Total DNA



Total DNA



Total DNA

qPCR génomique

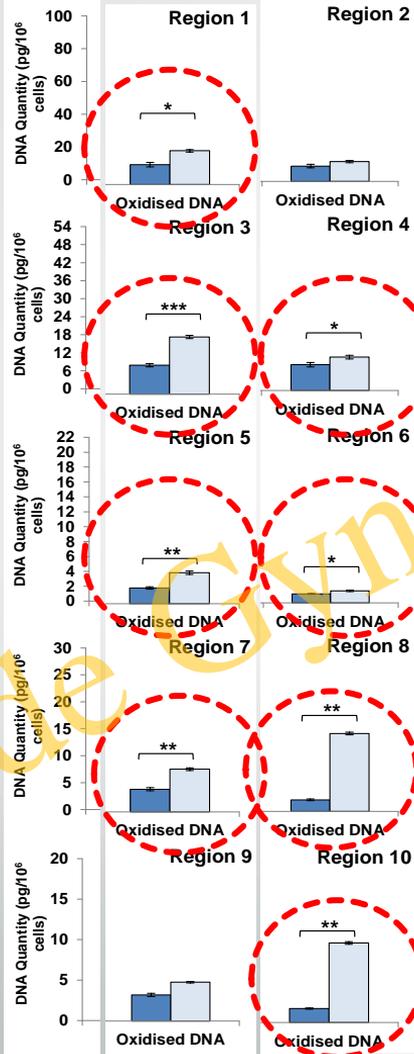
3 de ces 10 régions sont moins amplifiables donc probablement plus fragmentées dans la cohorte infertile.



Fertile



Infertile



Immunoprécipitation des régions oxydées

+

Amplification des régions de susceptibilité

8 de ces 10 régions sont plus amplifiables donc plus oxydées dans la cohorte infertile.