

2m11.3326.2.

Université de Montréal

Influence du tabagisme et des antioxydants sur la fertilité masculine

par

Karine Boulanger

Sciences biomédicales

Faculté de médecine

11638835

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en Sciences biomédicales

Avril, 2005

©Karine Boulanger, 2005



W

4

U58

2005

V. 172

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Influence du tabagisme et des antioxydants sur
la fertilité masculine**

présenté par:

Karine Boulanger

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

D^{re} Michèle Brochu, président-rapporteur

D^r Gilles Bleau, directeur de recherche

D^{re} Marie-Hélène Mayrand, membre du jury

RÉSUMÉ

Les effets du tabagisme et du stress oxydatif sur la reproduction sont causes de graves inquiétudes. Alors que leur impact est avéré chez la femme, ils demeurent un sujet de controverse en reproduction masculine. D'une part, des méta-analyses n'indiquent aucune influence significative du tabagisme sur la fertilité masculine. D'autre part, plusieurs auteurs rapportent des effets néfastes de la fumée de cigarette et des radicaux libres oxygénés sur les propriétés des spermatozoïdes; avec des résultats parfois contradictoires.

Notre premier objectif était de vérifier si le tabagisme cause des dommages à l'ADN des spermatozoïdes. Nos travaux montrent que le degré de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes de fumeurs n'est pas statistiquement différent de celui des non-fumeurs. Nous avons réussi à identifier une cause d'erreur dans la littérature: la façon de conserver le sperme avant son analyse peut introduire un biais dans l'évaluation de l'intégrité de l'ADN.

Notre deuxième objectif était de déterminer si une supplémentation en vitamine E et sélénium, des antioxydants efficaces, peut améliorer la qualité des spermatozoïdes. Un essai clinique a été réalisé auprès de 23 hommes de couples infertiles. Après 4 mois de traitement, nous avons observé une augmentation significative du nombre de spermatozoïdes mobiles dans le groupe supplémentation ; mais aucun changement dans le groupe placebo. Malgré l'accroissement de la concentration sérique en vitamine E dans le groupe supplémentation, la teneur en malondialdéhyde, un indicateur de stress oxydatif, n'a pas varié de façon significative durant l'étude. De même, le degré de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes est demeuré stable. Ces données servent de base à une étude chez des patients présentant du tabagisme et un stress oxydatif. Nous concluons qu'une supplémentation en vitamine E et sélénium augmente le nombre et la mobilité des spermatozoïdes, ce qui pourrait améliorer la fertilité masculine.

Mots-clés: Spermatozoïdes, vitamine E, sélénium, infertilité masculine, fragmentation de l'ADN, TUNEL.

ABSTRACT

The impact of cigarette smoking and of oxidative stress on reproduction is a matter of serious concern. While detrimental effects are well documented in women, the consequences on male reproduction remain controversial. Meta-analyses conclude in no significant influence of smoking on male fecundity. However, several reports, though not unanimous, indicate that smoke components as well as reactive oxygen species cause a decrease in semen quality and compromise sperm DNA integrity.

Our first objective was to test whether or not smoking induces sperm DNA damages. Our results show that the degree of sperm DNA fragmentation in smokers is not statistically different from that of non-smokers. We also succeeded in identifying the reason for conflicting reports in the literature: freezing of semen as a mean of conservation prior to analysis introduces a bias in the evaluation of DNA integrity.

Our second objective was to determine if supplementation with vitamin E and selenium, two antioxidants, can improve the quality of the spermatozoa. A clinical study was conducted on 23 men of infertility couples. After 4 months of treatment, semen analyses revealed a significant increase in total motile sperm count in the supplement group; no such change occurred in the control group. Despite increases in serum vitamin E concentration in the group with supplement, the serum concentration of malondialdehyde, an indicator of oxidative stress, did not change significantly. The degree of sperm DNA fragmentation also remained relatively constant. This study serves to establish parameters for a clinical trial designed to treat smokers that present with oxidative stress. We conclude that supplementation with vitamin E and selenium causes an increase in sperm count and motility that might improve male fecundity.

Keywords: Spermatozoa, vitamin E, selenium, male infertility, DNA fragmentation, TUNEL.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES ANNEXES	ix
LISTE DES SIGNES ET ABRÉVIATIONS	x
REMERCIEMENTS	xiii
1. INTRODUCTION	1
1.1 Les spermatozoïdes	1
1.2 L'infertilité masculine	9
1.3 Les causes possibles des dommages à l'ADN des spermatozoïdes.....	11
1.4 L'origine des dommages à l'ADN des spermatozoïdes	13
1.5 La nature et les sources des radicaux libres oxygénés.....	16
1.6 Les systèmes de défense contre les radicaux libres oxygénés.....	23
1.7 L'évaluation des dommages à l'ADN des spermatozoïdes	31
2. OBJECTIFS DU PREMIER PROJET DE RECHERCHE	36
3. ARTICLE 1: SPERM DNA FRAGMENTATION IN MEN WHO SMOKE.....	37
Abstract	39
Résumé	40
1. Introduction	41
2. Materials and methods.....	44
3. Results	49
4. Discussion	52
References	59

4. OBJECTIFS DU DEUXIÈME PROJET DE RECHERCHE	62
5. EFFET D'UN SUPPLÉMENT DIÉTÉTIQUE EN VITAMINE E ET SÉLÉNIUM DANS LE TRAITEMENT DE L'INFERTILITÉ MASCULINE: ÉTUDE PILOTE RANDOMISÉE À DOUBLE INSU AVEC PLACEBO. 63	63
5.1 Introduction	63
5.2 Matériel et méthodes	64
5.3 Résultats	70
5.4 Discussion	78
6. DISCUSSION GÉNÉRALE	83
7. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	85
BIBLIOGRAPHIE	86
ANNEXES I-XII	I

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

Tableau I: Différentes substances oxygénées hautement réactives, incluant radicaux libres oxygénés et oxydants réactifs	16
Tableau II: Cellules et structures cellulaires responsables de la production de radicaux libres oxygénés	18
Tableau III: Les effets bénéfiques et néfastes d'un supplément diététique en vitamine E rapportés dans la littérature.....	28
Tableau IV: Les valeurs normales des paramètres du spermogramme selon l'Organisation mondiale de la santé.....	31

CHAPITRE 3: ARTICLE 1: SPERM DNA FRAGMENTATION IN MEN WHO SMOKE

Table I: The effect of freeze-thawing on sperm DNA fragmentation as measured by the TUNEL assay.....	57
Table II: The effect of freeze-thawing on sperm DNA fragmentation as measured by the TUNEL assay (fluorescence units).....	57
Table III: The effect of freeze-thawing on sperm DNA fragmentation as measured by the radioenzymatic assay on isolated DNA	58
Table IV: The effect of raw freezing of semen on sperm chromatin density	58

CHAPITRE 5: EFFET D'UN SUPPLÉMENT DIÉTÉTIQUE EN VITAMINE E ET SÉLÉNIUM DANS LE TRAITEMENT DE L'INFERTILITÉ MASCULINE: ÉTUDE PILOTE RANDOMISÉE À DOUBLE INSU AVEC PLACEBO

Tableau I: Critères d'inclusion et d'exclusion.....	64
Tableau II: Sommaire des analyses statistiques pour les paramètres du sperme du groupe supplémenté	74
Tableau III: Sommaire des analyses statistiques pour les paramètres du sperme du groupe placebo.....	74

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

Figure 1: Régulation hormonale de l'appareil génital masculin.....	2
Figure 2: Spermatogenèse et spermiogenèse dans un tubule séminifère.....	3
Figure 3: Schéma de la spermatogenèse chez l'humain	4
Figure 4: Schéma d'un spermatozoïde mature avec son aspect en microscopie électronique....	8
Figure 5: Les principaux radicaux libres oxygénés et leurs produits de réactions	17
Figure 6: Structure chimique de la vitamine E	25
Figure 7: Structure chimique de la vitamine C et de sa forme déshydrogénée	26
Figure 8: La régulation métabolique du sélénium	29
Figure 9: Types de résultats obtenus selon la technique COMET.....	32
Figure 10: Types de résultats obtenus selon la technique TUNEL.....	34

CHAPITRE 3: ARTICLE 1: SPERM DNA FRAGMENTATION IN MEN WHO SMOKE

Figure 1: The effect of raw freezing of semen on the electron microscopic appearance of spermatozoa	56
--	----

CHAPITRE 5: EFFET D'UN SUPPLÉMENT DIÉTÉTIQUE EN VITAMINE E ET SÉLÉNIUM DANS LE TRAITEMENT DE L'INFERTILITÉ MASCULINE: ÉTUDE PILOTE RANDOMISÉE À DOUBLE INSU AVEC PLACEBO

Figure 1: La concentration sérique en vitamine E en fonction du nombre de mois de traitement chez les sujets ayant reçus le supplément en vitamine E et sélénium ou le placebo.	75
Figure 2: La concentration sérique en vitamine C en fonction du nombre de mois de traitement chez les sujets ayant reçus le supplément en vitamine E et sélénium ou le placebo	76

LISTE DES ANNEXES

- Annexe I:** L'effet d'un supplément diététique en vitamine E et sélénium sur le volume de l'échantillon en fonction du nombre de mois de traitementII
- Annexe II:** L'effet d'un supplément diététique en vitamine E et sélénium sur la numération des spermatozoïdes en fonction du nombre de mois de traitement..... III
- Annexe III:** L'effet d'un supplément diététique en vitamine E et sélénium sur le pourcentage de motilité des spermatozoïdes à 30 minutes en fonction du nombre de mois de traitement.... IV
- Annexe IV:** L'effet d'un supplément diététique en vitamine E et sélénium sur le pourcentage de motilité des spermatozoïdes à 2 heures en fonction du nombre de mois de traitement..... V
- Annexe V:** L'effet d'un supplément diététique en vitamine E et sélénium sur le pourcentage de motilité des spermatozoïdes à 6 heures en fonction du nombre de mois de traitement..... VI
- Annexe VI:** L'effet d'un supplément diététique en vitamine E et sélénium sur le pourcentage de spermatozoïdes normaux en fonction du nombre de mois de traitement..... VII
- Annexe VII:** L'effet d'un supplément diététique en vitamine E et sélénium sur la concentration en leucocytes en fonction du nombre de mois de traitementVIII
- Annexe VIII:** L'effet d'un supplément diététique en vitamine E et sélénium sur la concentration en cellules immatures en fonction du nombre de mois de traitement IX
- Annexe IX:** L'effet d'un supplément diététique en vitamine E et sélénium sur la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes en fonction du nombre de mois de traitement..... X
- Annexe X:** L'effet d'un supplément diététique en vitamine E et sélénium sur la concentration en malondialdéhyde en fonction du nombre de mois de traitement XI
- Annexe XI:** L'effet d'un supplément diététique en vitamine E et sélénium sur la concentration en vitamine C dans le sperme en fonction du nombre de mois de traitementXII
- Annexe XII:** Évolution de la concentration sérique de cotinine en fonction du nombre de mois de traitement chez les sujets non-fumeurs et fumeursXIII

LISTE DES SIGNES ET ABRÉVIATIONS

ABP	« Androgen binding protein »
ADN	Acide désoxyribonucléique ou « Deoxyribonucleic acid »
AMP	Assistance médicale à la procréation ou « Assisted medical procreation »
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANOVA	Analyse de la variance ou « Analysis of variance »
Ad	Spermatogonie A sombre
AOT	Test à l'acridine orange ou « Acridine orange test »
Ap	Spermatogonie A pâle
AP	Phosphatase alcaline ou « Alkaline phosphatase »
ATP	Adénosine triphosphate
ATPase	Enzyme spécifique à l'hydrolyse de l'ATP
ARN	Acide ribonucléique
CHUM	Centre hospitalier de l'Université de Montréal
IC, CI	Intervalle de confiance ou « Confidence interval »
COMET	Analyse unicellulaire sur gel d'électrophorèse ou « Single cell gel electrophoresis »
DNase	Désoxyribonucléase
dUTP	Désoxyuridine triphosphate
<i>e.g.</i>	Par exemple ou « <i>exemplia gracia</i> »
E.T., S.D.	Écart-type ou « Standard deviation »
FACScan	Cytométrie en flux ou « Flow cytometer cell sorter »
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine ou « Fluorescein iso-thiocyanate »
FIV	Fécondation <i>in vitro</i>
FSH	Hormone folliculo-stimulante ou « Follicle stimulating hormone »
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance ou « High performance liquid chromatography »
GnRH	Hormone gonadolibérine ou « Gonadotrophin releasing hormone »
GPx	Glutathion peroxydase
GRD	Glutathion réductase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion oxydé
H1	Histone-1
HP1	Protamine-1 humaine ou « Human protamine-1 »
HP2	Protamine-2 humaine ou « Human protamine-2 »
HP3	Protamine-3 humaine ou « Human protamine-3 »
HP4	Protamine-4 humaine ou « Human protamine-4 »
ICSI	Injection intracytoplasmique de spermatozoïdes ou « Intracytoplasmic sperm injection »

IL-6	Interleukine 6
IL-8	Interleukine 8
kb	Kilo-base
LH	Hormone lutéinisante ou « Luteinizing hormone »
MDA	Malondialdéhyde
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
NO	Oxyde nitrique
NT	Test <i>in situ</i> des coupures dans l'ADN ou « <i>In situ</i> nick translation »
8-OHdG	8-hydroxy-2-déoxyguanosine
OMS, WHO	Organisation mondiale de la santé ou « World Health Organization »
P1	Famille de protamines 1
P2	Famille de protamines 2
PBS	Tampon phosphate salin ou « Phosphate-buffered saline »
PHGPx	Phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase
PI	Iodure de propidium ou « Propidium iodide »
Pol I	Polymérase 1
RLO, ROS	Radicaux libres oxygénés ou « Reactive oxygen species »
SCD	Test de dispersion de la chromatine des spermatozoïdes ou « Sperm chromatin dispersion »
SCSA	Analyse de la structure de la chromatine des spermatozoïdes ou « Sperm chromatin structure assay »
Se	Sélénium
SOD	Superoxyde dismutase
TdT	Déoxyribonucléotidyle exotransférase ou « Terminal deoxynucleotidyle Transferase »
TN	Tampon Tris-NaCl ou « Tris-NaCl buffer »
Topo II	Topoisomérase II
TPs	Protéines de transition
TP1	Protéine de transition-1 ou « Transition protein-1 »
TP2	Protéine de transition-2 ou « Transition protein-2 »
TUNEL	Marquage des brins d'ADN avec la déoxyribonucléotidyle exotransférase ou « Terminal uridine nick end-labeling »
VC	Vitamine C
VE	Vitamine E

À mon filleul, Samuël.

REMERCIEMENTS

Les pages que vous vous apprêtez à lire sont le fruit de nombreux efforts dans lesquels plusieurs personnes remarquables m'ont aidée. Je veux ici leur témoigner toute ma gratitude en adressant de chaleureux mercis à:

D^r Gilles Bleau pour la confiance qu'il m'a accordée, le savoir qu'il m'a transmis avec passion, et surtout la chance qu'il m'a donnée de réaliser ce projet d'étude clinique au sein de son équipe.

Mes parents, Brigitte et Clément, pour les valeurs qu'ils m'ont transmises, un atout précieux durant mes études à la maîtrise. Mon frère Guy et ma sœur Josée pour leurs mots d'encouragements et la fierté dont ils me témoignent. Mon grand amour, Dominic, pour son écoute, sa disponibilité et sa bonne humeur assidue. Merci d'être toujours là pour moi!

Suzanne Charland pour son aide technique au laboratoire d'Andrologie, ses justicieux conseils et surtout pour sa grande amitié.

D^r Henri Knafo pour son aide et son professionnalisme dans le suivi des patients.

Toute l'équipe du département de gynécologie-obstétrique de l'hôpital St-Luc du CHUM, spécialement à Francine Tremblay et à Carole Rhéaume, infirmières, et à Suzanne Fortin, technicienne, pour leur disponibilité durant l'étude clinique, à Catherine Malo pour sa minutie lors des analyses de spermacytogrammes ainsi qu'à Geneviève Laforest pour les analyses d'HPLC.

1. INTRODUCTION

1.1 Les spermatozoïdes

1.1.1 La régulation hormonale de la spermatogenèse

Le testicule adulte remplit deux fonctions essentielles: la production des spermatozoïdes qui transmettent les gènes du mâle à la progéniture, et la production des hormones nécessaires au développement et au maintien de la fonction reproductrice de l'adulte. La spermatogenèse dépend étroitement de deux grands systèmes régulateurs: l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire (GnRH, LH/FSH, testostérone), et les facteurs paracrines.

La régulation endocrinienne débute dans l'hypothalamus qui produit et libère de manière pulsatile l'hormone gonadolibérine (Gonadotrophin Releasing Hormone-GnRH). Ce décapeptide agit directement sur les cellules spécialisées de l'hypophyse antérieure qui synthétisent et sécrètent les gonadotrophines: la FSH (Follicle-Stimulating Hormone) et la LH (Luteinizing Hormone). La LH se lie à des récepteurs présents à la surface des cellules de Leydig, cellules polygonales regroupées en amas et situées dans l'espace interstitiel, pour stimuler la production d'androgènes via la transformation du cholestérol, principalement en testostérone. Cette hormone s'accumule dans les tubules séminifères et l'espace interstitiel à des concentrations très élevées, propriété nécessaire à la stimulation et au déroulement de la spermatogenèse dans les tubes séminifères. De plus, elle exerce un rétrocontrôle sur la libération hypophysaire de la LH. Il est à noter qu'en l'absence de LH, les taux d'androgènes s'effondrent et la spermatogenèse cesse.

Dans le compartiment tubulaire des testicules, la FSH et la testostérone stimulent la synthèse d'ABP (Androgen Binding Protein) et de protéines sécrétoires par les cellules de Sertoli: certaines, telle la transferrine, sont impliquées dans le transport de nutriments vers les cellules germinales (Sharpe, 1994). En réponse à l'action de la FSH, ce processus est régulé par des boucles de rétrocontrôle via l'inhibine et l'activine, également produites par les cellules de Sertoli (Herbert et coll., 1995). L'inhibine réduit considérablement la sécrétion de FSH alors que la testostérone empêche la sécrétion de la LH (Hall, 1994; Sharpe, 1994). De plus, avant la puberté aussi bien que chez l'adulte, les cellules de Sertoli interagissent avec les cellules de la

lignée spermatique et coordonnent ainsi l'organisation spatio-temporelle de la spermatogenèse. Un schéma du contrôle endocrinien de la spermatogenèse est présenté à la figure 1.

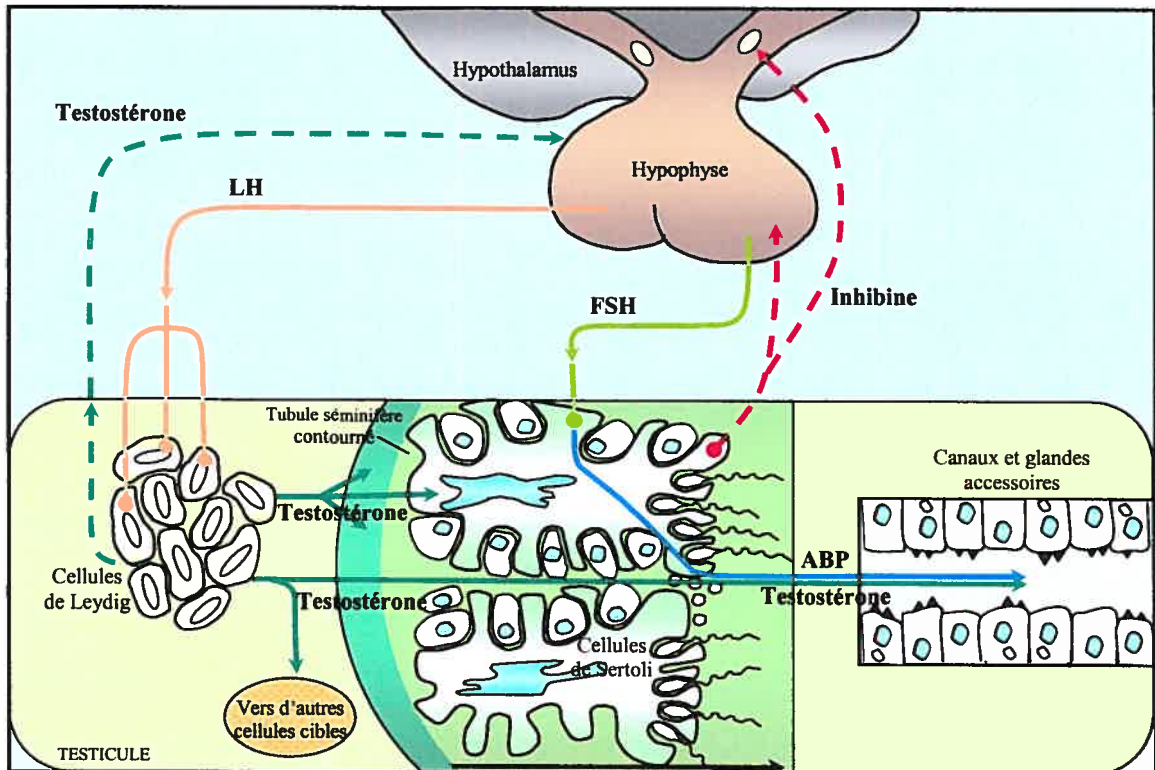


Figure 1: Régulation hormonale de l'appareil génital masculin. (Inspiré de Stevens et Lowe, 1997)

Légende: → = Stimulation ---→ = Inhibition

1.1.2 La spermatogenèse

De la puberté jusqu'au terme de la vie, un grand nombre de spermatozoïdes est produit dans les tubules séminifères des testicules, à raison de 100 à 200 millions par jour, selon un processus de développement et de maturation s'échelonnant sur environ 70 jours et que l'on désigne spermatogenèse (Thibault et Levasseur, 2001). Les cellules germinales du testicule immature, restées quiescentes au stade interphase depuis la naissance, sont réactivées à la puberté, suite à la sécrétion élevée de gonadotrophines, et entrent dans un engrenage de cycles mitotiques. Dans la portion basale de l'épithélium des tubules séminifères, entre les cellules de Sertoli, on retrouve un réservoir autoregénérateur de cellules germinales souches dotées d'un grand noyau pâle à chromatine homogène et dispersée, appelées les spermatogonies A1. Elles se retrouvent

en trois types: les spermatogonies de type A sombres (Ad), A pâles (Ap) et B. Ce sont des cellules possédant un ou deux nucléoles distincts et des noyaux lobés. Le type Ad représenterait les cellules souches de la lignée. Ces cellules donnent naissance, par mitose à intervalles d'environ 42 heures, à d'autres spermatogonies Ad pour renouveler l'épithélium germinal et à quelques spermatogonies Ap. À leur tour, les Ap (2n) se divisent pour constituer des amas de cellules filles reliées entre elles par des ponts cytoplasmiques, puis se différencient en spermatogonies de type B dont le noyau est plus petit et plus arrondi. Poussées vers la lumière des tubules séminifères, ces dernières deviendront par la suite des spermatocytes de premier ordre (spermatocyte I, équivalent 4n), de grandes cellules ovalaires au noyau arrondi présentant un nombre élevé de nucléoles (Drews, 1998). Une micrographie d'une coupe d'un tubule séminifère est présentée à la figure 2.

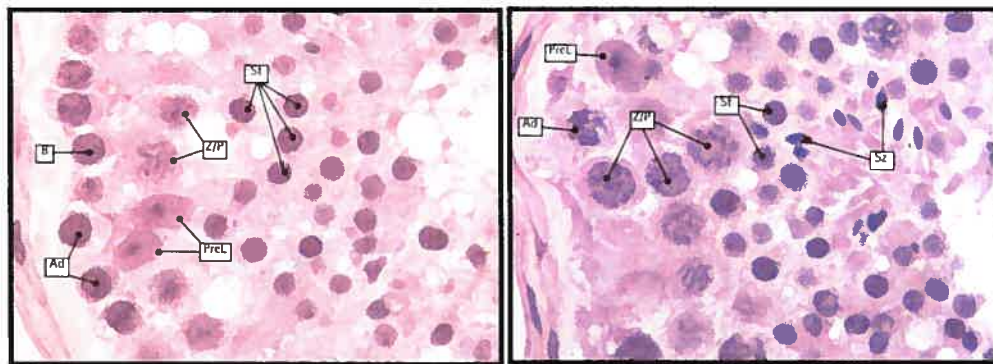


Figure 2: Spermatogenèse et spermiogenèse dans un tubule séminifère (coupe transversale)
(Tiré de Stevens et Lowe, 1997).

Légende: Spermatogonies de types Ad et B et spermatocytes I au stade préleptotène (PreL) ou zygotène/pachytène (Z/P); St: Spermatides; Sz: Spermatozoïdes

Quelques temps après leur formation dans la partie intratubulaire basale du testicule, les spermatocytes de premier ordre, en phase leptotène, répliquent leur ADN. Lorsque les jonctions serrées unissant les cellules de Sertoli se rompent transitoirement, ils se frayent un chemin jusqu'au compartiment tubulaire juxtaluminal. Ils subissent alors une première prophase méiotique prolongée, d'environ 22 jours. C'est au stade pachytène que s'effectue la formation de chiasmata, phénomène à l'origine d'échanges de matériel génétique entre les chromatides. La première division de la méiose donne deux spermatocytes de deuxième ordre (spermatocyte II, équivalent 2n); en quelques heures, chaque spermatocyte II entre rapidement en seconde

division de la méiose pour former deux spermatides haploïdes rondes précoces ($1n$) où chaque chromatide est partagée entre ces cellules (Thibault et Levasseur, 2001). Ces spermatides se transforment en spermatozoïde selon le processus de la spermiogenèse. Un schéma des principales étapes de la spermatogenèse est présenté à la figure 3. Notons qu'un nouveau cycle de spermatogenèse est initié suite à un intervalle de temps correspondant à environ 25% de la durée totale de la spermatogenèse et ce, à différents moments dans diverses régions du testicule. Ce mécanisme permet ainsi une production de spermatozoïdes selon un flux constant et non-pulsatile.

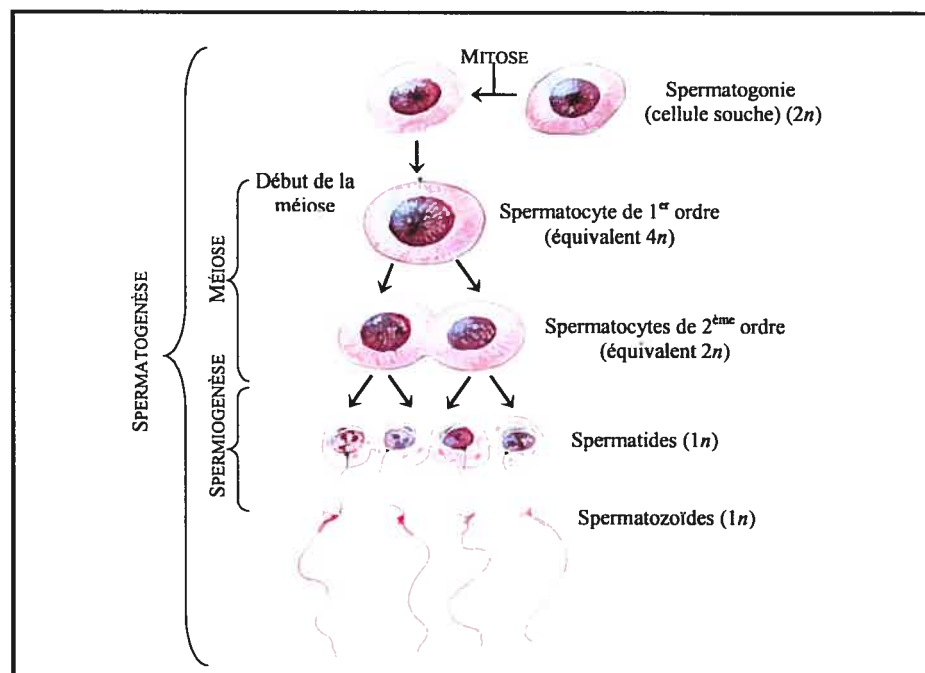


Figure 3: Schéma de la spermatogenèse chez l'humain (Tiré de Fox, 1996).

1.1.3 La spermiogenèse

La spermiogenèse est un processus caractérisé par un impressionnant remodelage de la chromatine et du cytoplasme des spermatides où l'aspect de ces derniers se modifie pour donner des spermatides adoptant l'aspect allongé du spermatozoïde. Pendant cette période, les spermatides forment un acrosome et un flagelle; et enfin, il y a condensation de la chromatine. Durant ces importantes transformations morphologiques, la vésicule acrosomiale change de forme pour donner la cape acrosomiale, laquelle entoure la moitié antérieure du noyau. Elle est formée à partir de vésicules de l'appareil de Golgi. Les deux centrioles migrent au pôle opposé

postérieur de la spermatide; le centriole distal s'alignant à angle droit par rapport à la membrane plasmique, il sera à la base de la formation du complexe axonémal du flagelle du spermatozoïde. Il y a élaboration de microtubules qui formeront le flagelle et regroupement des mitochondries qui se disposent en spirale au niveau de la pièce intermédiaire du flagelle. La majeure partie du cytoplasme du spermatozoïde, en particulier dans les régions du col et de la pièce intermédiaire, est éliminée et ces résidus cytoplasmiques sont évacués dans le corps résiduel. Durant cette période, le noyau s'aplatit et s'allonge, il y a formation d'un pôle antérieur recouvert par la cape acrosomiale, et d'un pôle postérieur relié au complexe axonémal en développement (Thibault et Levasseur, 2001).

La condensation de la chromatine est une des dernières modifications structurales durant la spermiogenèse; elle entraîne une inactivation transcriptionnelle (Hecht, 1995, 1998). Lors de ce processus, les histones, protéines de type somatique riches en lysine, sont acétylées, dégradées par des enzymes protéolytiques et remplacées par quatre types de protamines (HP1, HP2, HP3 et HP4) par l'intervention d'une série de protéines nucléaires basiques de transition (TP1 et TP2) uniques au testicule (Dadoune, 1995). Cette transition « histones-protamines » résultera en une extrême compaction, presque biochimiquement inerte, sous forme de structures toroïdales de l'ADN contenant environ 50 Kbp d'ADN (Fuentes-Mascorro et coll., 2000). La forte expression des protéines de transitions (TPs) durant la spermiogenèse serait aussi impliquée dans la réparation des brisures simple brin de l'ADN et participerait donc au maintien de l'intégrité du génome haploïde mâle durant la spermiogenèse (Caron et coll., 2001).

La classe de protamines 1 (P1) comprend HP1, une protéine basique riche en arginine et en cystéine, et d'une masse moléculaire deux fois moindre que celles des histones. Quant à la classe des protamines 2 (P2), représentée par HP2, HP3 et HP4, elle se distingue par son contenu riche en histidine et pauvre en tyrosine et son habileté à se lier au zinc sur des résidus d'arginine et de cystéine (Wouters-Tyrou et coll., 1998). Durant leur transport vers le noyau, les protamines subissent une phosphorylation qui leur permet une liaison optimale à l'ADN et ensuite une déphosphorylation qui augmente la condensation de l'ADN. De plus, ces protéines spécialisées seront unies par des ponts disulfures inter-moléculaires; ceci permet de contrecarrer efficacement les forces de répulsion électrostatique dans la structure hélicoïdale de l'ADN et contribue ainsi à la compaction du matériel génétique durant le transit des

spermatozoïdes dans l'épididyme (Eddy, 2002). L'ensemble de ce processus résulte en une déprogrammation du génome du futur spermatozoïde et permet, après la fécondation, de reprogrammer seulement l'expression des gènes essentiels à la réplication cellulaire et aux premiers stades de l'embryogenèse (McPherson et Longo, 1993a).

Après avoir complété la spermiogenèse, les spermatozoïdes sont libérés dans la lumière des tubules séminifères et baignent dans le liquide sécrété par les cellules de Sertoli. À ce stade, ils n'ont pas encore acquis leur motilité et sont inaptes à féconder. Grâce au péristaltisme et à la poussée exercée par les autres spermatozoïdes, ils sont entraînés à l'intérieur de la courte et délicate structure des canaux efférents vers l'épididyme où ils acquièrent leur maturité.

1.1.4 La maturation des spermatozoïdes

À l'origine, les premières fonctions attribuées à l'épididyme correspondaient à la réabsorption du liquide baignant les spermatozoïdes, au transport et au stockage des spermatozoïdes, fonctions dépendantes de la testostérone. Depuis les travaux de Bedford (1967) et d'Orgebin-Crist (1967), l'épididyme est aussi reconnu pour son implication dans la maturation des spermatozoïdes. Durant une période d'une dizaine de jours, les spermatozoïdes séjournent dans ce tube long de six mètres et y subissent des modifications majeures tant structurales, biochimiques que physiologiques, nécessaires pour acquérir mobilité et pouvoir fécondant. En effet, le liquide épидидymaire, par ses glycoprotéines qui se lient à la surface des spermatozoïdes, modifie la membrane plasmique du spermatozoïde surtout en changeant sa composition lipidique et donc sa fluidité (Elzanaty et coll., 2002). Durant ce transit dans l'épididyme, les spermatozoïdes subissent également une condensation finale de leur chromatine par l'établissement d'un plus grand nombre de liaisons disulfures intra- et intermoléculaires impliquant les protamines, ce qui conduit à une réduction du volume du noyau. Généralement, c'est à partir de la région proximale du corps de l'épididyme que les premiers spermatozoïdes fonctionnels peuvent être trouvés; ils séjournent dans la queue de l'épididyme pour ensuite être acheminés par péristaltisme vers l'ampoule du canal déférent en attente de l'éjaculation (Thibault et Levasseur, 2001).

1.1.5 La structure du spermatozoïde mature

Le spermatozoïde mature est constitué d'une tête et d'un flagelle (Figure 4). La tête apparaît oblongue (vue de face) et aplatie (vue de côté), elle comprend le noyau haploïde de forme allongée et l'acrosome qui recouvre environ les 3/4 antérieurs du noyau (Stevens et Lowe, 1997). Le flagelle est constitué d'un col et des pièces intermédiaire, principale et terminale. La partie proximale de la région du col du flagelle est un segment court et rétréci qui contient la paire de centrioles, dont un des deux est la base du complexe axonémal de la queue du spermatozoïde. La limite inférieure de la pièce intermédiaire est marquée par l'annulus, un rétrécissement brusque associé à un épaissement de la membrane plasmique. On retrouve dans la partie intermédiaire une gaine de mitochondries allongées disposées en spirale autour des fibres denses. Ces mitochondries fournissent l'énergie métabolique (ATP) qui sera nécessaire pour produire les mouvements en coup de fouet de la queue du spermatozoïde et le propulser à une vitesse de 1 à 4 mm/minute. Quant à la pièce principale, elle représente le segment le plus long du flagelle, avec l'axonème entouré de neuf fibres denses segmentées longitudinales, elles-mêmes entourées par de nombreuses fibres externes concentriques. L'axonème se prolonge sur toute la longueur du flagelle; il se compose de deux microtubules centraux de tubuline A et B entourés d'une rangée de neuf doublets de microtubules périphériques.

Outre la tubuline, d'autres protéines jouent un rôle important dans la motilité du spermatozoïde. Ainsi, les molécules de dynéine, une enzyme attachée aux doublets de microtubules et liée à l'ATPase, permettent le mouvement en hydrolysant l'ATP. Le mouvement provient des glissements des microtubules qui entraînent des cycles d'accrochage et de décrochage des bras de dynéine sur les microtubules adjacents (Thibault et Levasseur, 2001). L'histone H1 stabilise aussi les microtubules de manière à éviter qu'ils ne se désassemblent dans le flagelle.

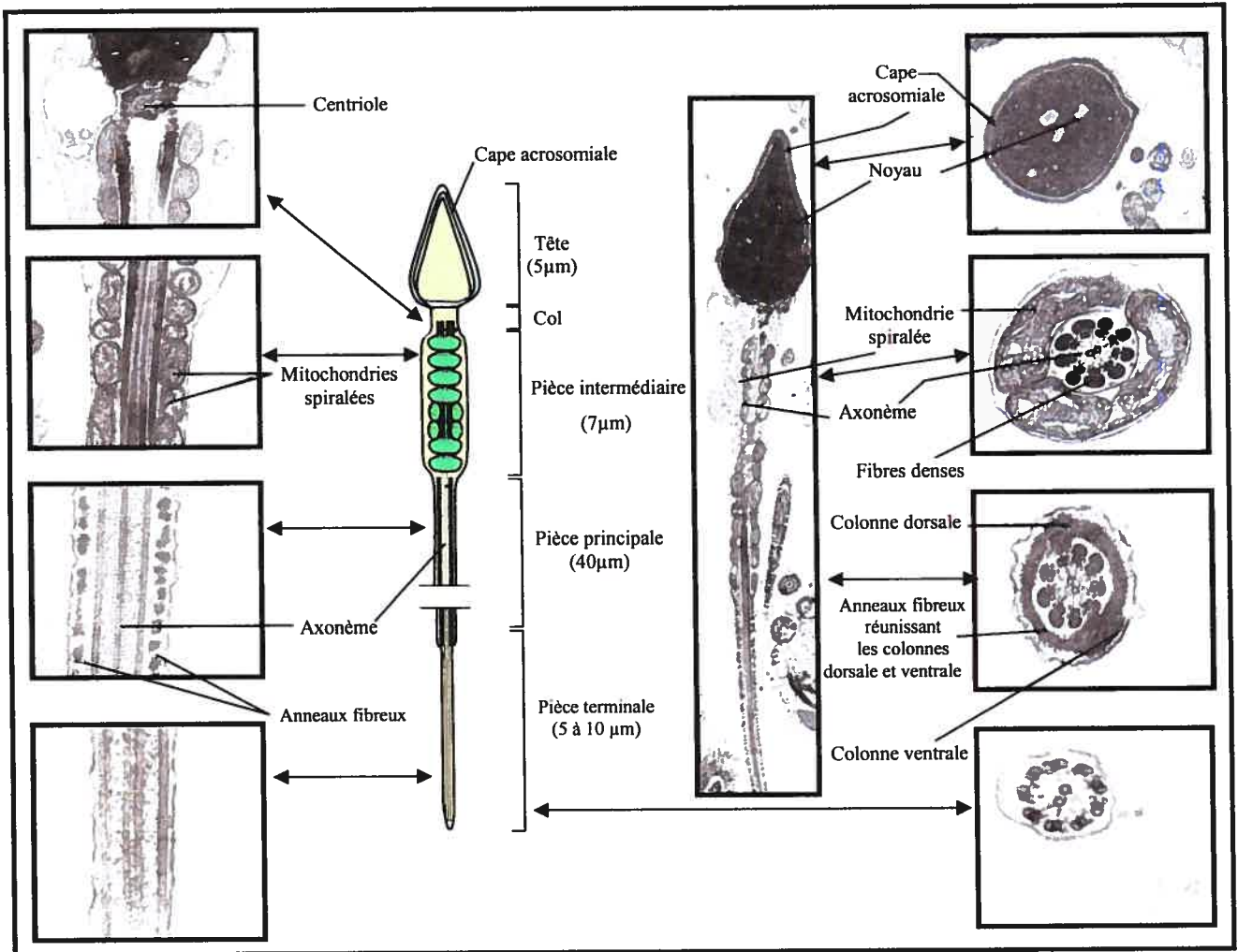


Figure 4: Schéma d'un spermatozoïde mature avec son aspect en microscopie électronique

(Inspiré de Stevens et Lowe, 1997).

1.2 L'infertilité masculine

Des statistiques récentes indiquent que l'infertilité, définie comme l'incapacité à concevoir après un an de rapports sexuels non protégés, affecte environ 10 à 15% des couples. L'homme est impliqué dans plus de 50% des cas (WHO, 1999; Sharlip et coll., 2002). On identifie des facteurs strictement masculins chez environ 10-30% des couples alors que dans près de 15% à 30% des cas, on retrouve des anomalies chez les deux partenaires.

L'étiologie de l'infertilité masculine relève de plusieurs ordres. Parmi les causes reconnues, citons les anomalies du chromosome Y, des mutations, des maladies infectieuses, les oblitérations des voies spermatiques, les radiations, la chimiothérapie et les dysfonctions érectiles (Agarwal et Said, 2005). Cependant, dans la majorité des cas d'infertilité masculine, la cause du problème reste inexpliquée. Devant ce tableau, le traitement a souvent fait appel à des méthodes empiriques. Notons que le développement de l'injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI), une technique d'assistance médicale à la procréation (AMP) introduite au début des années 1990, représente un progrès marquant, reconnu comme ayant un taux de succès relativement élevé.

Parce que l'infertilité peut toucher directement les deux partenaires à la fois, il est impératif de procéder à une évaluation médicale adaptée au couple. Chez l'homme, outre l'examen physique, le diagnostic de l'infertilité masculine comprend des tests de laboratoire tels les dosages hormonaux et le spermogramme. Quoique très utile dans les cas extrêmes d'azoospermie, d'oligozoospermie sévère et de nécrozoospermie, le spermogramme s'avère peu prédictif de la survenue d'une grossesse (Evenson et coll., 2002).

De plus, les paramètres usuels ne permettent pas d'évaluer l'intégrité de la chromatine des spermatozoïdes, une propriété importante pour le succès des techniques d'AMP (Sakkas et coll., 1996). Dans ce domaine, un des champs de recherche les plus actifs durant la dernière décennie porte justement sur l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes. Tel que décrit plus loin, la chromatine des spermatozoïdes présente une structure spécialement organisée et condensée; ceci permet de protéger le génome paternel et de faciliter son transport dans les tractus génitaux mâle et femelle (Manicardi et coll., 1998). Il a été rapporté que plusieurs hommes infertiles présentent un taux de fragmentation de l'ADN plus élevé que celui de sujets fertiles (Host et

coll., 2000a, b). Des défauts dans l'organisation de l'ADN des spermatozoïdes ont également été associés à une baisse du pouvoir fécondant des spermatozoïdes *in vivo* et *in vitro* (Benchaïd et coll., 2003; Spano et coll., 2000). Ces données confirment l'utilité de la mesure des dommages à l'ADN des spermatozoïdes dans le diagnostic de l'infertilité masculine.

1.3 Les causes possibles des dommages à l'ADN des spermatozoïdes

L'âge avancé, la prise de certains médicaments oncogéniques, les infections de l'appareil génital (incluant la leucocytospermie), le tabagisme ainsi que les dommages iatrogènes (par exemple la cryopréservation) ont été identifiés comme des causes possibles des dommages à l'ADN des spermatozoïdes. Les résultats démontrent qu'elles corrélerent avec une augmentation du taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes. Notons que de toutes ces causes, nous ne détaillerons celles qui portent sur les travaux présentés dans ce mémoire.

1.3.1 Leucocytospermie

Des leucocytes en faible nombre sont présents dans la plupart des échantillons de sperme. On leur attribue un rôle dans la surveillance immunitaire et la phagocytose des spermatozoïdes anormaux (Tomlinson et coll., 1992). Cependant, une concentration élevée de leucocytes dans le sperme indique un phénomène inflammatoire de l'appareil génital, le plus souvent d'origine infectieuse. La présence de médiateurs pro-inflammatoires dans les testicules, telles des cytokines, pourrait mener à des altérations dans la régulation de la spermatogenèse et, par la suite, à des aberrations de l'ADN (Cohen et Pollard, 1995). Les leucocytes, particulièrement les polymorphonucléaires, peuvent générer des quantités importantes de RLO susceptibles de causer des dommages oxydatifs à l'ADN des spermatozoïdes (Saleh et coll., 2002a) (Voir la section 1.5).

1.3.2 Le tabagisme

Au Canada, environ 30% des hommes et des femmes en âge de procréer fument la cigarette. La fumée de cigarette contient plusieurs centaines de substances nocives dont la nicotine et le monoxyde de carbone, des substances reconnues comme cancérigènes et mutagènes telles que le benzo(a)pyrène, le diméthylbenzo(a)anthracène et le naphthalène. Ces substances peuvent affecter la reproduction en perturbant directement le contrôle hormonal de la spermatogenèse ou en agissant, de manière directe, sur les cellules germinales ou les cellules de Sertoli. Plusieurs études associent le tabagisme à une réduction de la qualité de sperme, plus spécifiquement à une diminution de la numération et de la motilité des spermatozoïdes (baisses

de 20 et 22% respectivement) ainsi qu'à une augmentation du nombre de spermatozoïdes anormaux (augmentation de 17%) (Kunzle et coll., 2003). D'autres ont rapporté des concentrations faibles en antioxydants dans le sperme et une augmentation du stress oxydatif (Fraga et coll., 1996). Une revue exhaustive de la littérature montre une baisse d'environ 15 % des paramètres usuels du spermogramme chez les fumeurs (Vine, 1996).

Quelques études ont rapporté que le tabagisme pourrait affecter l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes (Belcheva et coll., 2004; Sepaniak et coll., 2005). Ainsi, des fumeurs participant à un programme de fécondation *in vitro* (FIV) ont présenté un pourcentage significativement plus élevé de fragmentation de l'ADN que les non-fumeurs (Sun et coll., 1997) ainsi qu'une tendance à la diminution des taux de succès (Zitzmann et coll., 2003). Notre laboratoire n'a pas confirmé ces observations (Sergerie et coll., 2000). Certains métabolites de la fumée de cigarette pourraient perturber le processus de la spermatogenèse avec recrutement de leucocytes vers les tubules séminifères pour éliminer les spermatozoïdes anormaux par phagocytose, induisant ainsi un stress oxydatif. La cause exacte de l'augmentation de la concentration en leucocytes dans le sperme d'hommes infertiles fumeurs n'a pas encore été identifiée. Certains proposent que les métabolites de la fumée de cigarette pourraient induire une réaction inflammatoire dans le tractus génital mâle, avec libération subséquente de médiateurs chimiques de l'inflammation (e.g. IL-6 et IL-8) pouvant recruter et activer des leucocytes qui peuvent générer des taux élevés de RLO dans le sperme (Comhaire et coll., 1999; Saleh et coll., 2002b). D'autres ont observé que le liquide séminal des fumeurs serait plus pauvre en substances antioxydantes, telle la vitamine E, réduisant ainsi la protection déjà faible de l'ADN des spermatozoïdes (Fraga et coll., 1996).

1.3.3 Les dommages iatrogènes à l'ADN des spermatozoïdes

La cryopréservation, souvent utilisée lors des inséminations intra-utérines et autres AMP, représente une source potentielle de dommages iatrogènes à l'ADN. Bien que la cryopréservation des spermatozoïdes testiculaires ne semble pas augmenter le taux de fragmentation de l'ADN (Steele et coll., 2000), d'autres études indiquent que la congélation-décongélation augmente significativement les dommages à l'ADN des spermatozoïdes matures seulement chez les hommes infertiles (Donnelly et coll., 1999a, b).

1.4 L'origine des dommages à l'ADN des spermatozoïdes

Les mécanismes exacts responsables des dommages à l'ADN des spermatozoïdes n'ont pas encore été complètement élucidés; cependant trois théories retiennent principalement l'attention.

1.4.1 Des défauts dans l'organisation de la chromatine des spermatozoïdes

Dans les spermatides allongées, la présence de ces brèches correspond à un besoin physiologique; retrouvées en grande quantité, ces dernières ne sont pas nuisibles en autant qu'elles soient liées par la topo II, un préalable important pour l'achèvement de la spermiogenèse (McPherson et Longo, 1993b). Il a été postulé que le remodelage de la chromatine durant la spermiogenèse nécessite l'activité de nucléases endogènes (e.g. la topoïsomérase II, topo II) qui permet de créer ainsi que de lier des brèches dans l'ADN pour « ouvrir » la chromatine et faciliter le processus de protamination. Ces brèches sont ensuite refermées (McPherson et Longo, 1993b). Si l'activité de la topo II est anormale ou bloquée par un d'inhibiteur spécifique (De Jonge, 2002), les brèches ne sont pas correctement réparées et peuvent se retrouver dans le spermatozoïde mature, même morphologiquement normal. La présence de brèches endogènes dans l'ADN des spermatozoïdes matures semble donc indiquer des anomalies survenues durant la spermiogenèse, et un processus de maturation incomplet (Manicardi et coll., 1995).

1.4.2 La dégénérescence issue d'une apoptose anormale

L'apoptose, décrite comme la mort cellulaire programmée, s'effectue à des moments spécifiques de la période embryonnaire pour permettre le développement normal des tissus et, durant la vie adulte, d'éliminer des cellules non-fonctionnelles ou inutiles. Au niveau du testicule, l'apoptose préviendrait la surproduction des gamètes, c'est-à-dire une production surpassant la capacité des cellules de Sertoli à assurer leur maturation (Sakkas et coll., 1999; Sinha Hikim et Swerdloff, 1999). Grâce à l'apoptose, près de 75% des spermatogonies A et 20% des cellules germinales entre les stades de spermatocyte de premier ordre et spermatide seraient ainsi éliminées. Elle peut être déclenchée par des facteurs intrinsèques ainsi que des

agents extrinsèques telles que l'irradiation (Hasegawa et coll., 1998), la chimiothérapie et l'exposition à des toxines (Lee et coll., 1997).

La voie impliquant Fas/Fas ligand semble servir d'intermédiaire dans le processus d'apoptose des spermatozoïdes (Lee et coll., 1997). Chez les hommes normospermiques, le pourcentage de cellules positives pour Fas est faible comparativement à plus de 50% chez les sujets ayant un spermogramme anormal. Cette observation indique que l'épurement approprié des spermatozoïdes via l'apoptose n'aurait pas lieu chez certains hommes infertiles: une apoptose inachevée se produirait, tel que révélé par la présence de spermatozoïdes présentant des marqueurs apoptotiques (la protéine Fas) (Sakkas et coll., 2002) et des dommages de l'ADN (Huszar et coll., 1997). Les dommages à l'ADN résulteraient de l'activation des caspases 8 et 9 puis de la caspase 3, laquelle à son tour induirait l'activation d'une désoxyribonucléase (CAD ou facteur de la fragmentation de l'ADN) menant à la dégradation de l'ADN (Said et coll., 2004). Les taux des caspases 3 et 9 dans les spermatozoïdes matures chez des patients infertiles sont plus élevés que ceux des donneurs de sperme, en corrélation avec les taux de RLO dans le liquide séminal.

Les travaux de Maione et coll. (1997) ont démontré qu'en réponse à l'inclusion d'ADN exogène assimilé, les nucléases du spermatozoïde mature sont activées selon un processus similaire à l'apoptose. Ceci indique que même dans son état condensé, le spermatozoïde mature serait capable de répondre à des « gâchettes apoptotiques » en activant le début de la cascade moléculaire menant à la dégénérescence apoptotique de l'ADN (Vinatier et coll., 1996). Les brisures double brin de l'ADN résultant de l'activation de nucléases endogènes sont une des caractéristiques de l'apoptose (Gorczyca et coll., 1993). Par ailleurs, le processus apoptotique au niveau des organelles et du cytoplasme semble être modifié dans le spermatozoïde mature. Les spermatozoïdes «marqués» pour une dégradation apoptotique peuvent avoir des caractéristiques de motilité et de morphologie normales (Barroso et coll., 2000; Host et coll., 2000a, b). La perte de leur pouvoir fécondant se reflèterait donc dans le taux de fragmentation de l'ADN et le niveau d'activité des endonucléases.

1.4.3 Les radicaux libres oxygénés et le stress oxydatif

Dans certaines conditions, l'oxygène peut servir de substrat dans des réactions enzymatiques qui mènent à la formation de substances oxygénées hautement réactives, souvent sous forme de radicaux libres (Halliwell et Gutteridge, 1989). Ces derniers possèdent un ou plusieurs électrons non appariés et ont un court temps de vie d'environ 10^{-11} à 10^{-9} secondes, ce qui leur permet de réagir rapidement avec divers composés organiques, stabilisant ainsi leur structure électronique. Le terme « stress oxydatif » est appliqué lorsque la quantité d'oxydants excède celle des antioxydants (Sies, 1993), que des produits de peroxydation des lipides sont générés et que ces phénomènes causent des effets pathologiques.

1.5 La nature et les sources des radicaux libres oxygénés

Les principaux RLO sont l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) provenant de la dismutation de $O_2^{\cdot-}$ et le radical hydroxyle ($\cdot OH$) dérivant d'une réaction impliquant H_2O_2 . Les termes « oxydants réactifs » ou « radicaux libres oxygénés » (RLO) font référence aux radicaux libres ou substances oxygénées activées qui peuvent causer des dommages oxydatifs (Tableau I).

Tableau I: Différentes substances oxygénées hautement réactives, incluant radicaux libres oxygénés et oxydants réactifs (D'après Ochsendorf, 1999).

Espèces	Génération	Temps de demi-vie	Distance de déplacement
Radical hydroxyle ($\cdot OH$)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Réaction interrompue du H_2O_2 	0,3 ns	1,8 nm
Anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mitochondrie/RE: transport d'électrons 	0,4 μs –1 ms	55 nm–3 μm
HO_2^{\cdot}	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Forme protonée du superoxyde 		
NO^{\cdot}	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Produit de la réaction catalysée par l'oxyde nitrique synthase 		
Radical peroxyde lipidique (LOO^{\cdot})	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Abstraction d'un proton de formes allyliques de lipides polyinsaturés 	1–10 s	
Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mitochondrie: phosphorylation oxydative ▪ Peroxysome: métabolisme des acides gras ▪ Produits de plusieurs oxydases ▪ Dismutation par la SOD 	Persistant	
Hydroperoxyde lipidique ($LOOH$)			
Oxygène singulet (1O_2)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Dismutation de $O_2^{\cdot-}$ ▪ Réaction du H_2O_2 avec l'hypochlorite 	μs –ms	

Les réactions de ces molécules sont couplées à plusieurs cycles tels que les réactions de Haber-Weiss et de Fenton, lesquels engendrent le radical hydroxyle ($\cdot OH$) hautement réactif (Figure 5).

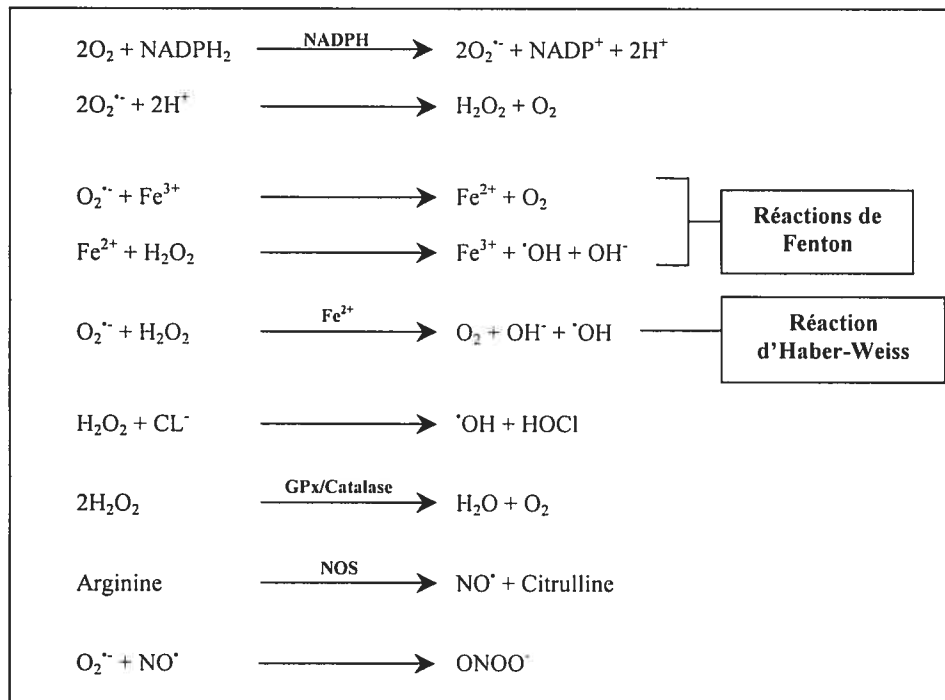


Figure 5: Les principaux radicaux libres oxygénés (RLO) et leurs produits de réactions.

(Tiré de Ochsendorf, 1999).

Légende: NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate; SOD: Superoxyde dismutase; GPx: Glutathion peroxydase; NOS: Oxyde nitrique synthétase

Plusieurs composants du sperme peuvent générer des RLO. Alors que les spermatozoïdes normaux en produisent de faibles quantités, les spermatozoïdes anormaux, particulièrement ceux affectés d'un défaut de la pièce intermédiaire, ainsi que les cellules de la lignée germinale représentent des sources importantes. En effet, des études récentes ont démontré que le taux de production de RLO dans le sperme est en corrélation négative avec le pourcentage de spermatozoïdes normaux (selon les critères de l'OMS) (Ollero et coll., 2001; Gil-Guzman et coll., 2001). La production de RLO, en autres le $O_2^{\cdot-}$, par les spermatozoïdes qui ont retenu leur résidu cytoplasmique, pourrait être reliée à une hausse de l'activité de certaines enzymes telles la créatine phosphokinase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) (Gomez et coll., 1996; Aitken, 1999). Le tableau II présente la nature et les diverses sources de RLO rapportées dans la littérature.

Tableau II: Cellules et structures cellulaires responsables de la production de RLO.

Composantes cellulaires	Références	
Spermatozoïdes:		
♦ Normaux	Holland et coll., 1982 Alvarez et coll., 1987 Aitken et Clarkson, 1987	Iwasaki et Gagnon, 1992 Plante et coll., 1994 Ford et coll., 1997
♦ Anormaux	Zini et coll., 1993	
▪ reste cytoplasmique	Rao et coll., 1989 Aitken et coll., 1994 Sikka et coll., 1995	Ochsendorf, 1999 Gil-Guzman et coll., 2001
Cellules de la lignée spermatique:	Iwasaki et Gagnon, 1992	Aitken et coll., 1994
Leucocytes:	Aitken et West, 1990 Kovalski et coll., 1992 Kessopoulou et coll., 1993 Tomlinson et coll., 1993 Aitken et coll., 1994	Plante et coll., 1994 Ford et coll., 1997 Henkel et coll., 1997 Whittington et Ford, 1999

Il est maintenant bien établi que les leucocytes activés (positifs au test à la peroxydase), sont une autre source majeure de RLO (Kessopoulou et coll., 1993). Les cellules en cause peuvent être les polymorphonucléaires qui représentent quelque 50 à 60% des leucocytes présents dans le sperme, et les macrophages qui comptent pour 20 à 30% (Thomas et coll., 1997). Les leucocytes peuvent être activés en réponse à divers stimuli générés lors d'une réaction inflammatoire ou d'une infection (Pasqualotto et coll., 2000). En fait, la quantité de RLO produite par les leucocytes activés est 1000 fois plus grande que celle produite par les spermatozoïdes lors de la capacitation (de Lamirande et Gagnon, 1995). Néanmoins, de hauts niveaux de RLO présents dans le sperme sont souvent associés à un pourcentage élevé de spermatozoïdes anormaux, une perte de motilité totale et une numération très basse (Mazzilli et coll., 1994).

Dans les spermatozoïdes, deux enzymes seraient responsables de la génération de $O_2^{\bullet-}$: la diaphorase (oxydo-réductase NADH-dépendante) mitochondriale et la NADPH oxydase membranaire. La première est localisée dans la pièce intermédiaire du spermatozoïde et intégrée dans le système respiratoire mitochondrial avec une activité accrue chez les patients infertiles (Gavella et Lipovac, 1992). Elle serait probablement la source majeure de RLO produits par les spermatozoïdes des patients infertiles et produirait les 2/3 des RLO détectés à l'intérieur de la cellule (Plante et coll., 1994). La deuxième candidate, la nicotinamide adénine

dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase, localisée à la membrane plasmique du spermatozoïde, est impliquée dans le déclenchement d'une importante production de RLO lors de la capacitation et/ou de la réaction acrosomiale (de Lamirande et Gagnon, 1999). De plus, les RLO générés à l'intérieur de la cellule sont moins susceptibles d'atteindre l'espace extracellulaire que ceux produits par la NADPH oxydase membranaire, là où ces derniers sont libérés directement dans le milieu extracellulaire, tel qu'observé avec les leucocytes (Halliwell et Gutteridge, 1989). L' $O_2^{\cdot-}$ produit par ces deux enzymes peut ensuite être transformé en H_2O_2 et HO^{\cdot} dans une réaction catalysée par le fer. En outre, l'activité de cette cascade serait en corrélation directe avec la production de $O_2^{\cdot-}$ par les spermatozoïdes (Gavella et coll., 1995).

1.5.1 Les effets nocifs des RLO

John MacLeod a, le premier, proposé l'implication d'un stress oxydatif comme cause possible d'anomalies des spermatozoïdes: il a observé que leur incubation en conditions de tension élevée en oxygène cause une perte de motilité (MacLeod, 1943). Trente ans plus tard, Thaddeus Mann et Roy Jones ont établi que le stress oxydatif et la peroxydation des lipides qui en résulte pouvaient être des facteurs significatifs dans l'étiologie de l'infertilité masculine (Jones et Mann, 1973; Jones et coll., 1978, 1979).

Il est maintenant bien reconnu que les RLO produisent des effets délétères aux fonctions du spermatozoïde (Saleh et Agarwal, 2002). Ceci tient surtout à la proportion élevée d'acides gras polyinsaturés - principalement d'acide docosahexanoïque (22:6) - dans leur membrane plasmique, l'absence de mécanismes de réparation de l'ADN et leur faible concentration cytoplasmique en piègeurs de RLO (Sharma et Agarwal, 1996). Des dommages cellulaires surviennent généralement lorsque la production de RLO excède leur élimination; un tel déséquilibre pourrait être à la base de certains cas d'infertilité masculine inexplicée (Sharma et Agarwal, 1996) et responsable de perturbations de la spermatogenèse (Lenzi et coll., 1994). D'ailleurs, les spermatozoïdes de certains hommes infertiles pouvaient produire des taux élevés de radicaux libres oxygénés; on évalue à environ 25% la proportion d'hommes suivis en clinique de fertilité affectés par ce problème (Iwasaki et Gagnon, 1992).

1.5.1.1 Peroxydation des lipides membranaires du spermatozoïde

La cascade de la peroxydation des lipides implique les étapes d'initiation et de propagation. Le radical hydroxyle ($\text{HO}\cdot$) est un des plus puissants initiateurs de ce processus (Aitken et Fisher, 1994). La membrane plasmique des spermatozoïdes est riche en acides gras polyinsaturés, ceux-ci possèdent des doubles liaisons non-conjuguées séparées par des groupements méthyls et susceptibles de perdre un électron. Dans le cas où il y a perte d'un électron, le radical produit est stabilisé par le réarrangement des doubles liaisons, formant ainsi un conjugué diène pouvant réagir rapidement avec l' O_2 . Des radicaux peroxydes lipidiques ($\text{LOO}\cdot$) et des hydroperoxydes lipidiques (LOOH) seront formés suite à cette réaction. En conditions normales, ces derniers restent stables jusqu'à ce qu'ils entrent en contact avec des métaux de transitions tels que le fer ou le cuivre. Cependant, ils peuvent être clivés par la phospholipase A2 et métabolisés en alcool par la glutathion peroxydase. En présence d'ions métalliques de transition, ils sont transformés en radicaux peroxydes et alkoxydes qui se propagent par la cascade de la peroxydation des lipides (Alvarez et Storey, 1995) dans la membrane plasmique. Ceci peut générer des dommages importants aux spermatozoïdes. La dégradation de ces lipides peroxydés amène la formation de métabolites très toxiques, c'est-à-dire les hydroxy-alkényles (Windsor et coll., 1993), le 4-hydroxy-2-nonenal (Selley et coll., 1991) et le malondialdéhyde (Jones et coll., 1979).

1.5.1.2 Diminution de la motilité des spermatozoïdes

Du point de vue mécanistique, l'attaque par les RLO provoque une perte de fluidité et une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique des spermatozoïdes; ces modifications entraînent une baisse de motilité (Iwasaki et Gagnon, 1992). Une corrélation inverse a d'ailleurs été démontrée entre le pourcentage de spermatozoïdes motiles et la quantité de RLO détectée (Armstrong et coll., 1999). Les RLO peuvent également perturber l'activité des structures responsables du mouvement des spermatozoïdes: l'addition de faibles concentrations de RLO cause des dommages réversibles à l'axonème (Iwasaki et Gagnon, 1992). Cet effet résulterait surtout de la déplétion en ATP associée à une diminution de la phosphorylation AMPc-dépendante des protéines de l'axonème (de Lamirande et Gagnon, 1992). L'inhibition, via une oxydation par le H_2O_2 , par des enzymes telles la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) (impliquées dans

la production d'ATP et de NADPH respectivement) pourrait être responsable de cette diminution en ATP.

1.5.1.3 Dommages à l'ADN des spermatozoïdes causés par le stress oxydatif

Le stress oxydatif est aussi connu pour affecter l'intégrité du génome du spermatozoïde: il peut provoquer des brisures simple ou double brin d'ADN (Aitken et Krausz, 2001), et oxyder des bases azotées de l'ADN (Kodama et coll., 1997). Sur de longues périodes, il pourrait également altérer le processus de condensation de l'ADN du spermatozoïde (Koh et coll., 1997); par exemple, chez des hommes subfertiles, on a observé une augmentation de l'instabilité de la chromatine et de sa sensibilité à la dénaturation en association avec un stress oxydatif (Evenson et coll., 2002). Cette vulnérabilité de la chromatine peut résulter, en partie, de la pauvreté en systèmes antioxydants (Aitken et coll., 1996) et de l'absence d'activité enzymatique réparatrice d'ADN dans le spermatozoïde (Matsuda et coll., 1989). Les dommages causés à l'ADN des spermatozoïdes pourraient être discrets et des plus difficiles à suspecter (Shen et coll., 1997). Malheureusement, dans les techniques de reproduction médicalement assistées, ces effets ne peuvent être détectés avant la fécondation; ils peuvent même se voir amplifiés lorsque les spermatozoïdes sont préparés pour l'injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI) (Lopes et coll., 1998) ou la fécondation *in vitro* (FIV).

Les dommages causés par les RLO s'observent aussi au niveau des protéines nucléaires, lesquelles subissent une dénaturation en substrats rendus disponibles pour la protéolyse cellulaire (Davies, 1987). Ceci conduit à des modifications cytosquelettiques (Hindshaw coll., 1986) et à l'inhibition de processus cellulaires tels la respiration mitochondriale et la synthèse d'ARN et d'ADN (Comporti, 1989).

1.5.2 Le double rôle des RLO

D'une manière en apparence paradoxale, la production excessive de RLO est nuisible aux spermatozoïdes humains alors que ces substances « nocives » sont aussi impliquées dans le contrôle physiologique de la fonction spermatique (de Lamirande et coll., 1993). Il s'agit, dans le deuxième cas, d'une production contrôlée et synchronisée de faibles quantités de RLO

nécessaire à l'acquisition de la capacité à féconder des spermatozoïdes (de Lamirande et coll., 1997a, b).

1.5.2.1 La capacitation et l'hyperactivation des spermatozoïdes

Le métabolisme oxydatif permet d'abord la capacitation des spermatozoïdes. Décrite il y a plus de 50 ans, la nature précise de la capacitation n'a pas encore été complètement élucidée. Cependant, il est bien acquis que le processus implique des réactions et des transformations fonctionnelles des lipides membranaires pendant que les spermatozoïdes séjournent dans le tractus génital femelle. À ce niveau, il se produit une augmentation de la pression partielle en oxygène au moment de l'ovulation (Maas et coll., 1977), permettant sans doute de fournir aux spermatozoïdes le substrat nécessaire aux processus d'oxydation et à la capacitation (de Lamirande et Gagnon, 1999). Par la suite, la capacitation permettra l'hyperactivation, une transformation des caractéristiques du mouvement des spermatozoïdes vers un type dit à forte amplitude. Grâce à cette étape, les spermatozoïdes peuvent atteindre l'ovocyte et franchir les différentes couches du cumulus oophorus. Bien que des taux extrêmement bas de O_2^- soient nécessaires pour la capacitation, une production importante de ce radical libre ainsi qu'une phosphorylation progressive des résidus tyrosines sont primordiales pour l'acquisition et le maintien de l'hyperactivation (de Lamirande et coll., 1998).

1.5.2.2 La réaction acrosomiale des spermatozoïdes

La capacitation représente une étape préalable à la réaction acrosomiale: réaction induite suite à la liaison du spermatozoïde à la zone pellucide. Elle consiste en la fusion de la membrane plasmique avec la membrane acrosomiale externe, créant ainsi des fenestrations par lesquelles des enzymes lytiques de l'acrosome sont libérées et peuvent modifier le spermatozoïde et la zone pellucide. Il a été démontré qu'une production de radicaux libres (ou l'ajout de H_2O_2) est nécessaire pour rendre les spermatozoïdes capables aptes à enclencher leur réaction acrosomiale en initiant la peroxydation de lipides membranaires (de Lamirande et coll., 1998).

1.6 Les systèmes de défense contre les radicaux libres oxygénés

En général, les cellules possèdent des systèmes enzymatiques permettant d'éliminer les RLO de manière à prévenir des dommages cellulaires internes. Cependant, les spermatozoïdes - cellules hautement spécialisées - perdent une portion considérable de leur cytoplasme durant les étapes finales de la spermiogenèse. En conséquence, ils sont dépourvus des enzymes aptes à les protéger. Les antioxydants intracellulaires ne peuvent protéger la membrane plasmique tant au niveau de l'acrosome que du flagelle, et la défense antioxydante se limite et dépend de la protection offerte par le liquide séminal (Iwasaki et Gagnon, 1992). Dans le sperme, les spermatozoïdes baignent dans une abondance d'enzymes à activité antioxydante et de piègeurs de RLO présents dans le liquide séminal (Zini et coll., 1993). Ces systèmes de défense maintiennent une balance entre la production et l'élimination des RLO; leur efficacité requiert leur « coopération » permanente, chacun occupant des localisations et visant des cibles spécifiques (Vernet et coll., 2004).

Les antioxydants enzymatiques comprennent la superoxyde dismutase (SOD) (Nissen et Kreysel, 1983), le système glutathion peroxydase/réductase (GPx/GRD) (Chaudière et coll., 1984) et la catalase (Jeulin et coll., 1989). On compte aussi des systèmes auxiliaires qui préviennent la production ou favorisent le métabolisme des pro-oxydants: la NADPH ubiquinone réductase et la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PD) (Kehrer et Lund, 1994).

Les composés antioxydants non-enzymatiques peuvent être soit hydrosolubles, tels la vitamine C (VC ou acide ascorbique, principalement extracellulaire) (Fraga et coll., 1991) et le glutathion intracellulaire (GSH) (Oschendorf et coll., 1998), ou soit liposolubles telle la vitamine E (VE ou α -tocophérol) (Aitken et Clarkson, 1988). On y retrouve aussi l'urate (Thiele et coll., 1995), le pyruvate, le glutathion (Lenzi et coll., 1994), la taurine et l'hypotaurine (Alvarez et Storey, 1983). Notons que de tous ces systèmes antioxydants, nous ne détaillerons ceux qui portent sur les travaux présentés dans ce mémoire.

1.6.2 Les systèmes antioxydants enzymatiques

1.6.2.1 La superoxyde dismutase (SOD)

Présente dans le sperme chez plusieurs espèces animales et chez l'humain, la superoxyde dismutase (SOD) catalyse la dismutation de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Kurpisz et coll., 1996). Plusieurs études indiquent que cette enzyme serait le système de protection le plus efficace dans le liquide séminal, elle serait même un bon indicateur de la qualité de sperme. L'ajout de SOD au sperme peut améliorer la motilité des spermatozoïdes, diminuer la concentration en malondialdéhyde (MDA) (Kobayashi et coll., 1991), et favoriser une meilleure réaction acrosomiale (Griveau et Le Lannou, 1997).

1.6.2.2 La catalase

Le rôle de la catalase est de réduire le H_2O_2 en H_2O (Fujii et coll., 2003). Zini et coll. (1993) ont rapporté une augmentation de l'activité de la catalase dans le liquide séminal et les spermatozoïdes d'échantillons de sperme produisant des quantités élevées de RLO. Cependant, son rôle spécifique dans l'appareil génital masculin reste inconnu à ce jour.

1.6.2.3 Le système de glutathion peroxydase/réductase (GPx/GRD)

La glutathion peroxydase (GPx) est une sélénoprotéine cytoplasmique jouant un rôle important dans plusieurs processus biologiques dont la protection des cellules contre les dommages oxydatifs (Vernet et coll., 2004). Elle peut prévenir la peroxydation des lipides membranaires grâce à sa capacité à réagir directement avec le peroxyde d'hydrogène, l'anion superoxyde, le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) et les radicaux alkoxy (RO^{\cdot}) (Meister et Anderson, 1983; Alvarez et Storey, 1989). Elle réduit aussi les hydroperoxydes lipidiques (LOOH) avec oxydation concomitante de 2 molécules de glutathion (GSH) (Zakowski et Tappel, 1978). La réduction du glutathion oxydé (GSSG) par la glutathion réductase (GRD) permet de régénérer le GSH. L'équivalent de réduction utilisé dans cette réaction est le NADPH, lui-même régénéré dans la réaction catalysée par la glucose-6-phosphate-déshydrogénase (Kosower et Kosower, 1983).

1.6.3 Les antioxydants non-enzymatiques

1.6.3.1 Le glutathion (GSH)

Le glutathion est un tripeptide: le glutamyl-cystéinyl-glycine. Il est nécessaire à l'activité de la GSH peroxydase et à celle de la GSH S-transférase. Un des autres rôles importants du GSH serait de contribuer à la décondensation nucléaire du spermatozoïde dans le cytoplasme de l'ovocyte fécondé (Lenzi et coll., 1998).

1.6.3.2 La vitamine E (VE)

Chimiquement, le terme vitamine E correspond en fait à huit composés naturels faisant partie de deux classes différentes: les tocophérols et les tocotriénols possédant chacun une activité biologique distincte. Grâce à sa liposolubilité, la VE est le plus important antioxydant actif au niveau des membranes plasmiques de diverses cellules (Figure 6). Elle est capable d'inhiber la peroxydation des lipides (sans influencer l'initiation de ce processus) en inactivant les radicaux peroxydes (ROO^{\bullet}) et alkoxydes (RO^{\bullet}) membranaires ou les radicaux libres oxygénés présents dans le milieu environnant (Ford et Whittington, 1998). Elle a même la propriété d'augmenter la biodisponibilité du sélénium et faciliter ainsi son incorporation dans la glutathion peroxydase.

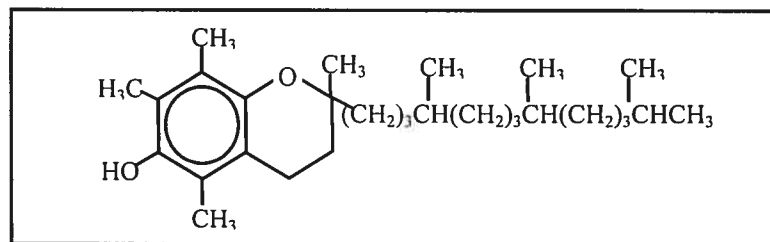


Figure 6: Structure chimique de la vitamine E (Tiré de Goodman et Gilman's, 1999).

Il est important de noter que la réduction des radicaux peroxydes lipidiques en hydroperoxydes mène à l'oxydation de l'alpha-tocophérol en radical tocophéroxyde. Le recyclage de l'alpha-tocophérol s'effectue par la vitamine C, capable de régénérer un tocophérol actif à partir du radical tocophéroxyde, permettant de maintenir à un niveau constant la capacité antioxydante de l'alpha-tocophérol. De cette façon, l'alpha-tocophérol peut être fonctionnel contre les RLO, et ce, à de faibles concentrations (Buettner, 1993).

1.6.3.2 La vitamine C (VC)

La VC est un piègeur hydrosoluble de RLO (Figure 7), principalement de l'anion superoxyde et de l'oxygène singulet (Doba et coll., 1985). Elle possède aussi une fonction prooxydante en réduisant le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} , lequel favorise la formation de $\cdot OH$ à partir de H_2O_2 . La concentration extrêmement élevée en acide ascorbique dans le liquide séminal (10 fois celle du sérum) laisse supposer une telle activité par rapport aux lipides membranaires des spermatozoïdes (Jones et Mann, 1976).

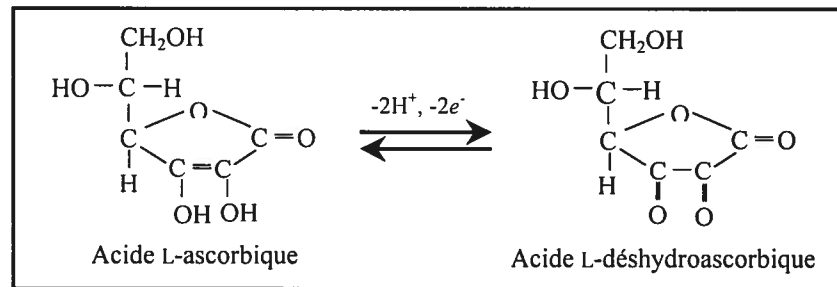


Figure 7: Structure chimique de la vitamine C et de sa forme oxydée (Tiré de Goodman et Gilman's, 1999).

Connaissant les effets nocifs des RLO sur les spermatozoïdes humains, plusieurs auteurs ont évalué l'efficacité d'antioxydants dans le traitement de l'infertilité masculine. On doit constater que les résultats restent controversés (Martin-Du Pan et Sakkas, 1998; Agarwal et coll., 2004) et qu'aucun traitement n'a encore atteint le stade d'application clinique. Le tableau III résume les diverses études rapportées dans la littérature sur les effets bénéfiques ou néfastes d'un supplément diététique en vitamines E et/ou C. Certaines rapportent des effets bénéfiques sur les paramètres du spermogramme tandis que d'autres n'ont observé aucun changement.

In vitro, l'addition de vitamine E au milieu de préparation des spermatozoïdes permet de réduire les dommages oxydatifs causés par la centrifugation (Aitken et Clarkson, 1988); ceci se traduit par une augmentation de leur capacité à fusionner avec les ovocytes dépellucidés de hamsters (Aitken et coll., 1989a) et même d'améliorer leur taux de liaison à la zone pellucide (Kessopoulou et coll., 1995). L'ajout de tels antioxydants, seuls ou en combinaison, serait associée à une diminution de la production de RLO dans le sperme; cependant, ceci ne semble pas bénéfique à la motilité des spermatozoïdes et pourrait même induire des dommages à leur chromatine (Donnelly et coll., 1999b).

1.5.3.3 Le sélénium (Se)

Le sélénium, en tant que composant de séléno-enzymes, est un oligoélément essentiel qui joue un rôle efficace dans la protection de l'ADN des cellules somatiques (Shen et coll., 1995) et germinales (De-Xiang et coll., 2003). Ces enzymes agissent particulièrement via l'inactivation de l'anion superoxyde ainsi que l'inhibition des mécanismes de peroxydation des acides gras insaturés de la membrane plasmique. Un schéma de la régulation métabolique du sélénium est présenté à la figure 8.

Tableau III: Les effets bénéfiques ou néfastes d'un supplément diététique en vitamine E et C, seuls ou en combinaison.

Référence	Supplément	Durée	N	Sujets	Effets	Type d'étude
Kessopoulou et coll., 1995	Vit. E: 600 mg/jour	3 mois	30	Normospermie Taux élevé de RLO dans le sperme	<p>➤ ↑ de la liaison à la zone pellucide (estimée par le « zona binding test »)</p> <p>➤ Aucun changement dans les paramètres du sperme</p>	Randomisée, Placebo, double insu croisée
Moilanen et Hovatta, 1995	Vit. E: 600, 800 ou 1200 mg/jour	3 sem.	15	Normospermie	<p>➤ ↑ [Vit. E] sérique et séminale, mais ne correspond pas aux doses administrées</p> <p>➤ [Vit. E] séminale est faible durant le traitement</p> <p>➤ Aucun changement dans les paramètres du sperme</p>	Ouverte
Geva et coll., 1996	Vit. E: 200 mg/jour	3 mois	15	Normospermie Couple suivi en FIV	<p>➤ Après 1 mois, ↑ du taux de fécondation par cycle</p> <p>➤ ↓ [MDA] des spermatozoïdes</p>	Rétrospective
Suleiman et coll., 1996	Vit. E: 300 mg/jour	6 mois	110	Asthénozoospermie	<p>➤ ↓ [MDA] des spermatozoïdes</p> <p>➤ ↑ du % de motilité des spermatozoïdes</p> <p>➤ Taux de grossesse chez les conjoints: Supplémenté: 21% vs Placebo: 0%</p>	Randomisée, Placebo, double insu
Vézina et coll., 1996	1 ^{er} mois: Vit. E: 400 mg/jour Sélénium: 100 µg/jour Autres mois: Vit. E: 400 mg/jour Sélénium: 200 µg/jour	6 mois	9	OAT	<p>➤ ↑ des taux sériques de vit. E et sélénium</p> <p>➤ ↑ du % de motilité des spermatozoïdes</p> <p>➤ ↑ du % de spermatozoïdes vivants</p> <p>➤ ↑ du % de spermatozoïdes normaux</p>	Ouverte
Kodama et coll., 1997	Vit. E: 200 mg/jour Vit. C: 200 mg/jour GSH: 400 mg/jour	2 mois	36	Sujets infertiles	<p>➤ ↑ de la numération des spermatozoïdes</p> <p>➤ ↓ [8OHdG]</p>	Rétrospective
Scott et coll., 1998	Sélénium seul : 100 µg ou Combiné à: Vit. A: 1 mg, Vit. C: 10 mg Vit. E: 15 mg	3 mois	64	OAT Sujets subfertiles	<p>➤ ↑ du % de motilité des spermatozoïdes</p>	Randomisée, Placebo, double insu
Rolf et coll., 1999	Vit. E: 800 mg/jour Vit. C: 1000 mg/jour	56 jrs	33	Asthénozoospermie	<p>➤ Aucun changement dans les paramètres du sperme</p> <p>➤ Aucun changement du taux de survie 24hres des spermatozoïdes</p> <p>➤ Aucune grossesse durant l'étude</p>	Randomisée, Placebo, double insu
Keskes-Ammar et coll., 2003	Groupe A: Vit. E: 400 mg/jour Sélénium: 225 µg/jour Groupe B: Vit. B: 4,5 g/jour	3 mois	53	Sujets infertiles Volontaires	<p>➤ ↑ du % de motilité des spermatozoïdes du groupe A</p> <p>➤ ↓ [MDA] des spermatozoïdes</p> <p>➤ Aucun changement des paramètres du sperme du groupe B</p>	Randomisée, ouverte

N: taille de l'échantillon étudié; OAT: oligoasthénatozoospermie

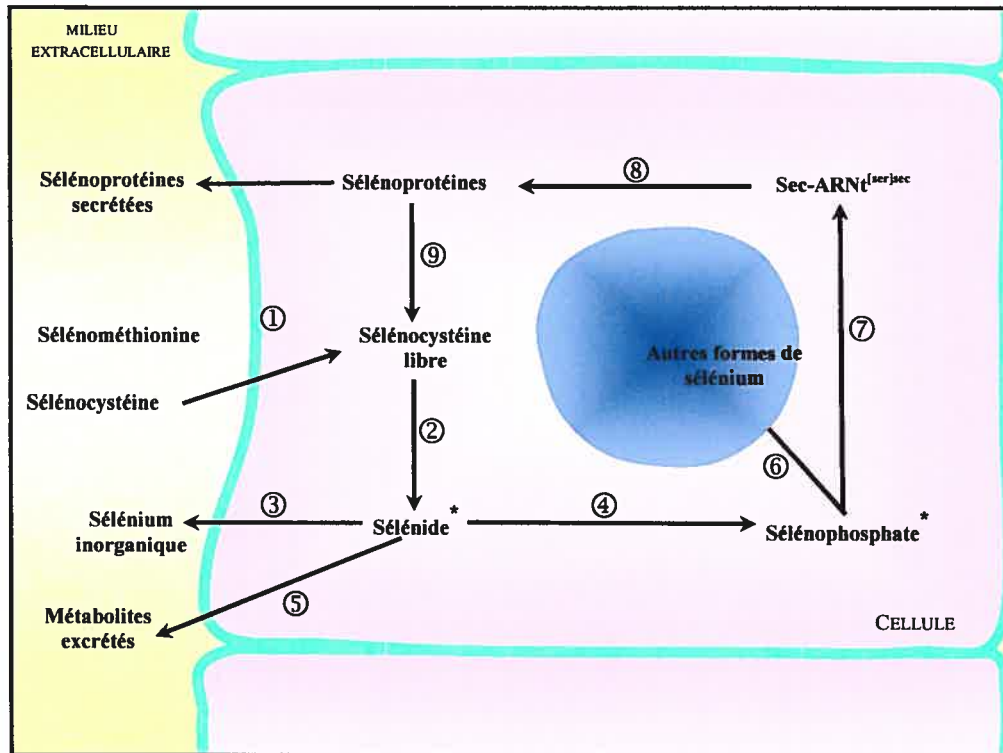


Figure 8: La régulation métabolique du sélénium (Se) (Extrait de Doull, 1999).

Légende: ①: Voie de la transsulfuration. ②: Sélénocystéine β -lyase. ③: Réduction par le glutathion. ④: Sélénophosphate synthétase. ⑤: Méthylation. ⑥: Remplacement du soufre par le sélénium au niveau de ARNt. ⑦: Remplacement de l'oxygène de la sérine par le sélénium : formation de sélénocystéine. ⑧: Décodage de UGA de l'ARNm avec insertion de sélénocystéine dans la structure primaire de la protéine. ⑨: Dégradation protéolytique. * Forme de transport du Se.

La première fonction biologique du Se a été découverte en 1973: il fait partie du site actif de la glutathion peroxydase, une enzyme de la famille des sélénoprotéines (Rotruck et coll., 1973). Ces dernières contiennent du Se sous forme de sélénocystéine ou sélénométhionine (Burk et Hill, 1993). En 1978, Calvin identifie un polypeptide contenant 3 résidus de sélénocystéines, localisé dans les mitochondries de la pièce intermédiaire des spermatozoïdes du rat (Calvin, 1978, 1981). Cette protéine est en fait une « kératine » spécifique, à l'intérieur de la partie fibreuse du flagelle où elle contribue à la formation de la capsule mitochondriale (Ursini et coll., 1999). Elle fait partie des « phospholipid hydroperoxide glutathion peroxydase » (PHGPx) (Lei et coll., 1997) capables de réduire les hydroperoxydes lipidiques (LOOH) en leurs dérivés alcool correspondants, et représente au moins 50% du matériel de cette capsule du spermatozoïde mature (Ursini et coll., 1999). La PHGPx est abondamment exprimée au niveau des testicules du rat (Roveri et coll., 1994) et dans les cellules de la lignée germinale (Mizuno et coll., 2000) sous forme de peroxydase soluble, mais elle existe en tant que protéine insoluble et sans activité enzymatique dans les spermatozoïdes matures. D'autres sélénoprotéines sont

aussi exprimées dans les organes génitaux mâles (Behne et coll., 1997), leur nature reste encore inconnue.

Le Se est reconnu comme un élément essentiel au développement testiculaire normal et à une production de spermatozoïdes mobiles et fertiles (Bleau et coll., 1984; Oldereid et coll., 1998; Ursini et coll., 1999). Les effets principaux d'une carence primaire en Se sur les spermatozoïdes des mammifères consistent en une perte de motilité et une augmentation du nombre de spermatozoïdes anormaux, les anomalies affectent la pièce intermédiaire avec désorganisation de l'hélice mitochondriale (Wallace et coll., 1983; Watanabe et Endo, 1991). Chez l'humain, l'infertilité qui en résulte pourrait être expliquée par une biosynthèse insuffisante de PHGPx.

Les travaux reliant la qualité du sperme aux concentrations en Se dans le sperme et le liquide séminal sont contradictoires. Certains rapportent que la concentration en Se dans le liquide séminal est en corrélation positive avec la concentration en spermatozoïdes chez les hommes normospermiques (Bleau et coll., 1984; Xu et coll., 1993). Ces auteurs ont démontré que la motilité des spermatozoïdes était maximale lorsque la concentration de Se dans le sperme se situait entre 50 et 69 ng/mL; à des valeurs inférieures, la motilité diminuait et la proportion d'hommes avec oligozoospermie augmentait. Ces travaux ont suggéré que le taux de Se dans le sperme d'hommes infertiles est nettement plus bas que celui des sujets ayant une fonction reproductrice normale, et qu'une faible motilité des spermatozoïdes est également associée à une diminution de la concentration en Se dans le sperme. À l'inverse, d'autres équipes n'observent pas de corrélation entre les paramètres du spermogramme et la concentration en sélénium dans le sperme (Takasaki et coll., 1987; Behne et coll., 1988; Roy et coll., 1990). Des données indiquent toutefois des valeurs basses en sélénium dans le sperme lorsque la numération des spermatozoïdes est anormalement basse ou élevée (Behne et coll., 1988). Une explication possible de cette divergence veut que la fertilité masculine soit affectée lorsque la teneur en sélénium dans le sperme est soit très basse ou soit très élevée par rapport à la moyenne, rendant difficile l'établissement de corrélations linéaires (Bleau et coll., 1984). De faibles ainsi que de hautes concentrations en Se dans le sperme semblent être associées à l'infertilité. Chez les hommes subfertiles, un supplément de Se augmente la concentration plasmatique du Se et l'activité de la GPx dans le liquide séminal (Iwanier et Zachara, 1995; Vézina et coll., 1996), indiquant un équilibre entre le sérum et le liquide séminal.

1.7 L'évaluation des dommages à l'ADN des spermatozoïdes

Dans la majorité des études portant sur la qualité du sperme, les auteurs utilisent les paramètres conventionnels du spermogramme incluant la concentration, la motilité et la morphologie des spermatozoïdes (tableau IV). Le choix de ces paramètres sous-entend que les spermatozoïdes « sélectionnés » par le tractus génital femelle ainsi que l'ovocyte mature sont génétiquement adéquats (Yanagimachi et coll., 1995). Or, dans bien des cas, ce concept est loin de s'avérer: à preuve, l'absence de corrélation significative entre d'une part les paramètres conventionnels du spermogramme et d'autre part le degré de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes (Sun et coll., 1997) ou la susceptibilité de leur noyau à la dénaturation (Spano et coll., 2000). Quelques techniques ont récemment été développées afin d'évaluer l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes humains, elles visent également à établir un paramètre prédictif de la fertilité masculine.

Tableau IV: Les valeurs normales des paramètres du spermogramme (*WHO, 1999*)

Paramètres du spermogramme	Valeurs normales	Définitions de l'anomalie
Volume	≥ 2,0 mL	< 2 mL: hypospermie > 6 mL: hyperspermie
PH	7,2 à 8,0	
Numération des spermatozoïdes	≥ 20 x 10 ⁶ /mL	0: azoospermie < 20 x 10 ⁶ /mL: oligozoospermie > 20 x 10 ⁶ /mL: polyspermie
Mobilité des spermatozoïdes à 30 minutes ou	grade A + B ≥ 50%	< 50%: asthénozoospermie
Mobilité en trajet fléchant rapide des spermatozoïdes	grade A ≥ 25%	< 25%: asthénozoospermie
Morphologie normale des spermatozoïdes	≥ 30%	< 30%: tératozoospermie
Leucocytes	≤ 10 ⁶ /mL	> 10 ⁶ /mL: leucocytospermie
Viabilité	≥ 70%	< 70% : nécrospermie

1.7.1 Analyse unicellulaire sur gel d'électrophorèse (« Comet assay »)

Dans cette technique, les spermatozoïdes sont introduits dans une fine couche de gel d'agarose étalée sur une lame de microscope; après leur lyse, ils sont exposés à un courant électrique puis colorés avec un fluorochrome spécifique à l'ADN tel le bromure d'éthidium. En brisant la matrice de protéines grâce au milieu alcalin (pH >10), les brins d'ADN fragmenté se relâchent de leur structure en spirale très enroulée permettant ainsi la migration de ces fragments vers

l'anode (Haines et coll., 1998). Sous microscopie à fluorescence, la coloration révèle des traînées d'ADN rappelant la structure d'une comète, d'où l'appellation de la technique. D'après la forme et la densité de la queue de la comète, il est possible d'interpréter le niveau de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes (Singh et coll., 1988). Un des principes de cette technique est que les gros fragments issus de brisures double brin d'ADN tendent à rester au niveau du noyau tandis que les petits fragments comprenant des cassures simple ou double brin migrent le long de l'étendue de la queue de la comète (Klaude et coll., 1996). Ainsi, des spermatozoïdes avec des taux élevés de fragmentation de l'ADN devraient démontrer une augmentation de l'intensité de la fluorescence (Hugues et coll., 1996) et de la longueur de la queue de la comète (Singh et Stephens, 1998) (Figure 9). Malheureusement, l'interprétation du résultat d'un seul spermatozoïde à la fois est fastidieuse et rend la technique peu représentative d'un échantillon de sperme (lequel contient des millions de cellules hétérogènes (Sakkas et coll., 1999), et aucun seuil discriminant de la fertilité masculine n'a été établi pour cette technique.

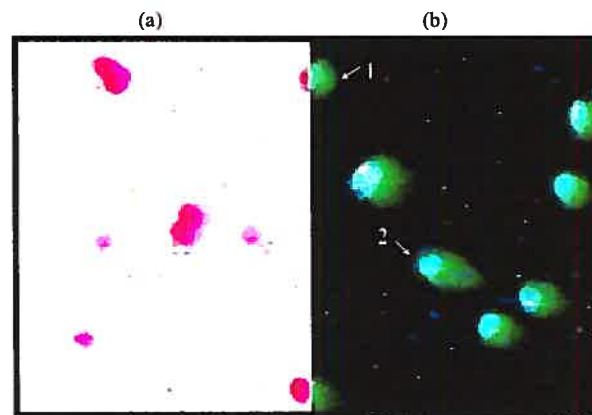


Figure 9: Types de résultats obtenus selon la technique COMET.

(Tiré de http://www.alphascientists.com/embryology_images/sperm1.html, 1999)

Spermatozoïdes observés en microscopie optique (a) et à fluorescence (b). 1: spermatozoïde avec peu de fragmentation de l'ADN. 2: spermatozoïde ayant beaucoup de fragmentation de l'ADN (forme une traînée ressemblant à la queue d'une comète).

1.7.2 Test in situ des coupures de l'ADN (In situ nick translation (NT) assay)

Ce test permet de mesurer l'incorporation du complexe biotine-dUTP grâce à l'activité de l'enzyme polymérase I d'*Escherichia Coli* (DNA Pol I), seulement aux sites des brisures simple brin de l'ADN. L'utilité clinique de cette technique reste très limitée due à son manque de sensibilité (Twigg et coll., 1998) et parce qu'aucune corrélation n'a été observée avec le taux de fécondation lors d'études *in vivo* (Irvine et coll., 2000).

1.7.3 L'analyse de la structure de la chromatine des spermatozoïdes (SCSA)

Le principal objectif de la technique SCSA était d'établir une relation entre la structure de la chromatine et sa fonction, en observant les dommages à l'ADN (Ward et Coffey, 1991). Cette technique permet de mesurer la susceptibilité de l'ADN des spermatozoïdes à se dénaturer *in situ* sous l'effet de la chaleur ou en milieu acide (pH 1,4). Grâce à une coloration différentielle, il est possible de quantifier le changement métachromatique de la fluorescence de l'acridine orange en cytométrie. Il y a émission de fluorescence verte (530 nm) lorsque ce fluorochrome s'intercale dans l'ADN natif et bicaténaire (double brin) ou une émission à 600 nm (rouge) lorsqu'il se lie à l'ADN dénaturé et monocaténaire (simple brin) (Darzynkiewicz et coll., 1976). Par conséquent, une fluorescence verte sera associée à un faible taux de fragmentation de l'ADN tandis que celle en rouge représentera un niveau modéré ou excessif de fragmentation. Le plus important paramètre de la technique SCSA est l'index de la fragmentation de l'ADN (%IFD) qui représente la population de cellules ayant des dommages à l'ADN (Evenson et coll., 2002).

1.7.3.1 Test à l'acridine orange (AOT)

Cette méthode de microscopie en fluorescence, une simplification de la technique SCSA (Tejada et coll., 1984), permet l'observation des spermatozoïdes et autres cellules sur un grand spectre de couleurs. La difficulté à distinguer les couleurs, la perte rapide de la fluorescence et l'hétérogénéité de la coloration des lames causent de graves problèmes d'interprétation des résultats (Duran et coll., 1998). Sa valeur prédictive de la fertilité masculine demeure controversée.

1.7.4 Technique TUNEL (« Terminal Uridine Nick-End Labeling »)

Nous avons choisi la technique TUNEL parce qu'elle est simple rapide et reproductible. Cette technique mesure, grâce à la réaction catalysée par l'enzyme désoxyribonucléotidyle exotransférase (TdT), l'incorporation de multiples complexes de désoxyuridine triphosphate (dUTP) couplée à de la biotine à chaque portion alcool terminale des cassures simple et double brin de l'ADN (Gavrieli et coll., 1992). Le signal est amplifié grâce à l'addition de streptavidine (couplée à la fluorescéine) qui possède une très grande affinité spécifique pour la biotine (Gorczyca et coll., 1993). Le signal pour la fragmentation de l'ADN peut être observé par cytométrie en flux ou en microscopie à fluorescence. Ainsi, un spermatozoïde avec une chromatine intacte ne présente aucune fluorescence, tandis que ceux ayant une fragmentation importante de leur ADN montrent une forte intensité de fluorescence. La figure 10 illustre les différents degrés d'intensité de fluorescence obtenus avec cette technique.

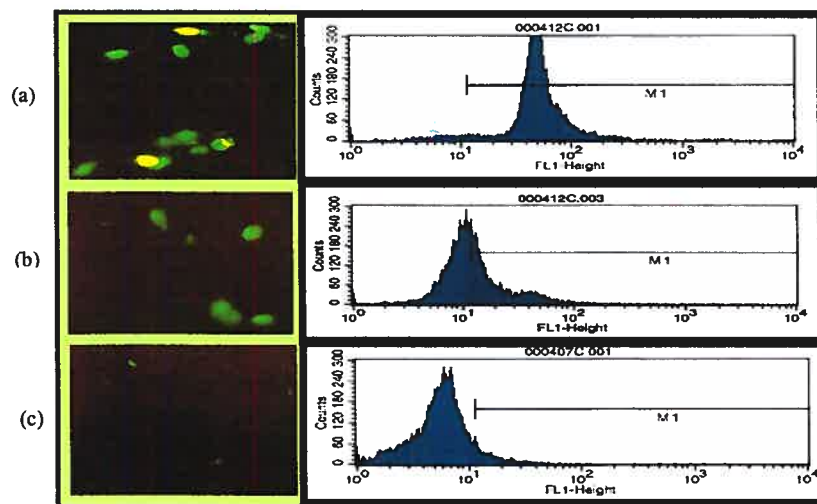


Figure 10: Types de résultats obtenus selon la technique TUNEL (Tiré de Sergerie et coll., 2000).

Images à gauche: des spermatozoïdes observés en microscopie à fluorescence; image à droite, représentations graphiques des résultats obtenus en cytométrie en flux. **a:** un échantillon témoin, traité à la DNase-1, montrant 92% de fragmentation de l'ADN (fluorescence intense). **b:** un échantillon d'un sujet avec 35% de fragmentation de l'ADN (fluorescence moyenne). **c:** un témoin négatif, sans l'enzyme TdT, avec seulement 5% de fragmentation de l'ADN (fluorescence faible).

1.7.6 Dosage de la 8-hydroxy-2'-désoxyguanine (8-OHdG)

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et la chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse (GC/MS) permettent de quantifier spécifiquement le biomarqueur 8-hydroxy-2'-désoxyguanine (8-OHdG). Cette substance est un des 20 principaux produits générés lors de dommages oxydatifs à l'ADN. Les corrélations entre le taux de 8-OHdG et les paramètres du sperme ainsi que la fertilité masculine attestent de la valeur diagnostique potentielle de cette technique (Shen et Ong, 2000).

1.7.7 Test de dispersion de la chromatine des spermatozoïdes (SCD)

Décrite comme la plus simple et la moins coûteuse des analyses de la fragmentation de l'ADN, le test SCD, effectué en gel d'agarose, est basé sur le principe qu'un spermatozoïde dont l'ADN est fragmenté ne produit pas un halo bien caractéristique après dénaturation en milieu acide et enlèvement des protéines nucléaires (Fernandez et coll., 2003).

2. OBJECTIFS DU PREMIER PROJET DE RECHERCHE

Dans le premier chapitre, nous avons présenté une revue de la littérature centrée sur la reproduction masculine. Nous avons discuté en autres du stress oxydatif et de ses effets sur les spermatozoïdes, un sujet de grand intérêt depuis quelques années. Ceci nous a amené à décrire les moyens de défense permettant aux spermatozoïdes de maintenir leur intégrité membranaire ainsi que celle de leur matériel génétique.

Des études avaient récemment rapporté un taux plus élevé de fragmentation l'ADN des spermatozoïdes chez des fumeurs comparativement à des non-fumeurs. Au contraire, notre laboratoire n'a pas pu mettre en évidence une telle différence. Ce premier projet de recherche porte sur les effets de la cryopréservation des spermatozoïdes sur le degré de fragmentation de l'ADN. L'objectif étant de déterminer si la congélation du sperme peut expliquer la divergence des résultats et d'établir l'impact réel du tabagisme sur l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes.

3. ARTICLE 1

Soumis à « Mutation Research » en juin 2005

SPERM DNA FRAGMENTATION IN MEN WHO SMOKE

K. Boulanger, M. Sergerie, G. Laforest, F. Bissonnette and G. Bleau

Département d'obstétrique-gynécologie, Faculté de médecine, Université de Montréal and Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)-Hôpital St-Luc, Université de Montréal, Montréal, Canada.

This study was supported by grants from Philip Morris U.S.A., and by Centre de recherche du CHUM-Hôpital Saint-Luc, Montréal, Québec, Canada.

Reprint requests: Gilles Bleau, Ph.D.
Centre de recherche
CHUM – Hôpital Saint-Luc
264, boul. René-Lévesque est
Montréal, Québec, Canada H2X 1P1
Tel.: 514-890-8000 (35820)
FAX: 514-412-7314
E-mail: gilles.bleau@umontreal.ca

Key words: DNA fragmentation
Spermatozoa
Smoking
TUNEL assay
Male infertility

Abstract

The potential deleterious effect of cigarette smoking on sperm DNA integrity is of paramount importance. Conflicting results indicate either increased or equal degrees of sperm DNA fragmentation in smokers compared to non-smokers. This study aims to resolve this issue by identifying parameters liable to influence the results of the TUNEL assay. Using sperm from fresh semen, TUNEL assay showed no significant difference in degree of DNA fragmentation between smokers and non-smokers. However, freezing at -20°C caused a significant increase in smokers but not in non-smokers. Freezing in liquid nitrogen yielded intermediate values in smokers, but no significant change in non-smokers. Results were similar whether normal men or men consulting for infertility were tested. A radioenzymatic method was developed to label free 3' ends in isolated sperm DNA. In non-smokers, DNA labeling was not significantly influenced by freezing semen at both temperatures compared to fresh semen. In smokers, freezing of semen at -20°C caused a significant increase in DNA labeling, but not freezing in liquid nitrogen. The concentration of vitamin C in semen subjected to freezing at -20°C was lower in smokers than in non-smokers, this suggests that an oxidative stress might contribute to DNA fragmentation. The rate at which sperm chromatin is forced to expand might also be a technical problem. Electron microscopy indicates that freezing of semen at -20°C causes changes in appearance and density of sperm chromatin in smokers but not in non-smokers, this effect might influence the evaluation of DNA integrity. In conclusion, sperm DNA fragmentation in smokers is not significantly different from that in non-smokers. Freezing of sperm can introduce bias in assays for sperm DNA fragmentation. Our results also suggest that sperm from smokers might be less well protected against stressful *in vitro* conditions.

Résumé

L'effet délétère possible du tabagisme sur l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes est d'une importance primordiale. Des résultats contradictoires indiquent des taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes plus élevés ou similaires chez les fumeurs comparativement aux non-fumeurs. L'objectif de cette étude vise à résoudre ce problème en identifiant des paramètres pouvant influencer les résultats de l'analyse TUNEL. En utilisant le sperme frais, l'analyse TUNEL n'a montré aucune différence significative du degré de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes entre les fumeurs et les non-fumeurs. Cependant, la congélation à -20°C a causé une augmentation significative du taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes chez les fumeurs, mais pas chez les non-fumeurs. Par contre, la congélation à -196°C était associée à des valeurs intermédiaires chez les fumeurs, mais à aucun changement significatif chez les non-fumeurs. Les résultats étaient semblables tant chez les sujets normaux que ceux suivis en fertilité. Une méthode radioenzymatique a été développée pour marquer les extrémités 3'OH libres de l'ADN isolé. Chez les non-fumeurs, le marquage de l'ADN par cette technique n'a pas été significativement influencé par la congélation à -20°C et à -196°C comparativement au sperme frais. Chez les fumeurs, la congélation du sperme à -20°C a causé une augmentation significative du marquage de l'ADN, mais pas la congélation dans l'azote liquide. Lorsque les échantillons étaient congelés à -20°C , la concentration en vitamine C dans le sperme était inférieure chez les fumeurs comparativement aux non-fumeurs, ceci suggère qu'un stress oxydatif pourrait contribuer à la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes. La vitesse à laquelle la chromatine est forcée à se décondenser pourrait aussi être un problème technique susceptible de causer une augmentation du taux de fragmentation. La microscopie électronique indique que la congélation du sperme à -20°C cause des changements dans l'aspect et la densité de la chromatine des spermatozoïdes chez les fumeurs mais pas dans les non-fumeurs; cet effet pourrait influencer l'évaluation de l'intégrité de l'ADN. En conclusion, la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes chez les fumeurs n'est pas significativement différente de celle des non-fumeurs. La congélation du sperme pourrait introduire des biais lors de l'évaluation de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes. Nos résultats suggèrent que le sperme des fumeurs pourrait être moins bien protégé *in vitro* contre des conditions stressantes.

1. Introduction

The possible impact of cigarette smoking on male reproduction remains a controversial issue. It was concluded in two meta-analyses that there is no significant reduction in natural fecundity in association with paternal smoking [1,2]. This contrasts with later reports of increased risk of infertility in couples where the male partner smokes [3,4,5]. There is also evidence that heavy smoking by the male partner might increase time to conception in couples [6]. Possible confounding factors in such studies are numerous and it is extremely difficult to discriminate between an effect of male smoking on male fertility versus an effect of passive smoking on women fertility, for it is well established that women who smoke cigarettes have reduced fertility [6]. In a recent study, adjustment for women's smoking status indicated no significant difference in fecundity between male smokers and non-smokers [7]. In the context of assisted reproduction, two studies reported no statistically significant effects of male smoking on pregnancy rate in couples undergoing IVF [8,9] while an other found male smoking to decrease the likelihood of a pregnancy following IVF [10]. More recently, lower pregnancy rates after IVF or ICSI were reported in couples where the men smoked [11].

Numerous studies evaluated the effect of smoking on the usual semen parameters. Here also, divergent results were published, on the whole it was concluded by meta-analysis that cigarette smoking is associated with modest reductions in sperm count, motility and normal morphology [2]. More recent publications on large cohorts either support such a trend [12] or conclude in no statistically significant difference between smokers and non-smokers [13].

The integrity of the sperm genetic material is of paramount importance both in terms of male fertility and risk of transmitting genetic defects to offspring. Cigarette smoke contains a myriad of toxic substances: some are known carcinogens while others generate an oxidative stress, all of which can lead to DNA damage. Prospects of reduced fertility and abnormal progeny are grave issues. Over the last 10 years, important efforts were devoted to evaluate the possible impact of cigarette smoking on sperm DNA integrity. Stemming from studies on somatic cells, several methods were adapted to the investigation of sperm DNA; this often proved difficult mostly because of the highly condensed state of the chromatin in this mammalian gamete.

Immunocytochemistry using antibodies to benzo[a]pyrene diol-epoxyde-DNA adducts (BPDE-DNA adduct) was recently applied to human sperm. One study suggested more intense staining in smokers compared to non-smokers [14]. In contrast, another study reported that current smoking is not associated with BPDE-DNA adducts in sperm [15]. Analyses by ³²P-postlabeling assay also yielded no significant difference in the levels of DNA adducts between smokers and non-smokers [16,17].

Assays for 8-oxo-2-deoxyguanosine (8-oxodG) were used to evaluate the degree of oxidative damage to sperm DNA in relation to smoking. Two studies reported levels of 8-oxodG approximately 50% higher in smokers compared to non-smokers [18, 19]. However, a recent study found mean values of 1.79 and 1.83 residues of 8-oxodG per 10⁵ dG for smokers and non-smokers respectively, a non statistically significant difference [7].

The sperm chromatin structure assay (SCSA) evaluates the integrity of the chromatin (DNA in sperm with immature nuclei is more sensitive to acid-induced denaturation) and is correlated with the degree of DNA fragmentation (DNA fragmentation index). In a study on men from couples consulting for infertility, it was concluded that these two indices of sperm DNA damage were not statistically different in smokers compared to non-smokers [20]. In contrast, in similar patients, sperm from smokers were reported to be more sensitive to acid induced denaturation and to possess a higher level of DNA strand breaks than those from non-smokers [21].

The Comet assay uses electrophoresis applied to sperm subjected to prior decondensation in lysis buffer to release their DNA and assess its integrity. As measured under alkaline conditions, the degree of sperm DNA fragmentation was found to be similar in smokers and non-smokers [22].

The TUNEL assay is an enzymatic method to label free 3' ends, it measures single and double strand breaks in DNA. Two studies reported a higher degree of sperm DNA fragmentation in smokers compared to non-smokers [21,23]. In contrast, our laboratory failed to find any significant difference in percentage of DNA fragmentation between light smokers, heavy smokers and non-smokers [24].

It is difficult to reconcile the often divergent results concerning the effect of smoking on sperm DNA integrity. The primary objective of the present study was to verify whether or not smoking causes sperm DNA fragmentation. The lack of statistically significant difference between smokers and non-smokers led us to investigate parameters liable to introduce bias in assays for DNA integrity.

2. Materials and methods

Study participants

This study was conducted in two groups of subjects: normal men as well as men from couples consulting for infertility. Informed consent was obtained from each volunteer, and the study protocol was approved by the Ethics Committee of the Centre hospitalier de l'Université de Montréal.

Normal subjects included 27 men, aged between 21 and 45 years (median = 32 years). Current smoking behavior was determined through a self-administered questionnaire that was corroborated by assay for serum cotinine. Non-smokers (n = 8) had either never smoked or had smoked less than 100 cigarettes in their lifetime; in all of these men, serum cotinine concentration was below the detection limit of the method. Smokers (n = 19) included men who currently smoked 5 or more cigarettes per day on average; serum cotinine concentration was higher than 50 ng/mL in all the subjects (median: 211 ng/mL, range: 54-434 ng/mL). Semen from these men was used to measure the effect of freezing on sperm DNA fragmentation by the TUNEL assay, on vitamin C levels and on ROS production by the spermatozoa.

Men from couples consulting for infertility ("infertility patients") provided semen samples that were used to measure the effect of freezing on sperm DNA fragmentation by the TUNEL assay (groups of 10 non-smokers and 15 smokers) and by the radioenzymatic technique (groups of 12 non smokers and 12 smokers). Samples from subjects of the latter group were also used to test for ROS production and electron microscopy. For these patients, smoking status was based on questionnaire alone.

After semen analysis, the samples were divided into three aliquots. One was studied as fresh semen: fresh sperm prior to freezing and thawing. Another was frozen at -20°C and then thawed: sperm frozen at -20°C is post freezing and thawing). A third was frozen in liquid nitrogen and then thawed (sperm frozen in liquid nitrogen is post freezing and thawing).

Medians for total sperm count in smokers (289×10^6 /ejaculate; IQ 154 and 398) and non-smokers (242×10^6 /ejaculate; IQ 157 and 394) were not statistically different. As indicated by the high first interquartile values, subjects with low total sperm count were not included in the

groups. This is because each ejaculate had to contain a minimum number of sperm for all tests. For example, a total sperm count of more than *c.a.* 75×10^6 sperm was required to perform the radioenzymatic method under all three experimental conditions.

Measurement of sperm DNA fragmentation by the TUNEL assay

The degree of sperm DNA fragmentation was measured by labeling 3'OH termini by a modification of the terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin end labeling technique (TUNEL), essentially as described previously [23,24]. Briefly, formalin-fixed sperm were centrifuged for 4 min at 10,000g (supernatant removed) and incubated for 10 minutes in 100 μ l of TdT buffer: 1 M sodium cacodylate, 150 mM Tris (pH 7.4), 25 mM CoCl_2 , 1.25 mg/mL bovine serum albumin (BSA) and 0.1% Triton X-100 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Following another centrifugation, the TdT buffer was removed and replaced with 100 μ l of TdT buffer containing 3 μ mol of biotin 16-deoxyuridine triphosphate, 10 U of TdT (Roche Diagnostics, Laval, Canada), and 0.1% Triton X-100. The sperm suspension was then incubated at 37°C for 60 min. After washing with TN buffer (30 mM Tris, pH 7.4, 300 mM NaCl), the spermatozoa were incubated in 100 μ l of staining AP buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl) containing 1% streptavidin conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) (Canadian life technology, Toronto, Canada), incubation was at 37°C in the dark for 60 min. After centrifugation for 4 min at 10,000g, the supernatant was removed and the pellet resuspended in 1 mL of AP buffer before analysis. For negative controls, TdT was omitted from the reaction mixture. As positive controls, sperm were pretreated with 200 U of deoxyribonuclease (DNAse I, RNAse-free) (Roche Diagnostics) for 45 min at 37°C before labeling.

Flow cytometry measurements

Sperm DNA fragmentation was measured using a FACScan flow cytometer (Becton Dickson, San Jose, CA, USA) equipped with a 15 mW argon-ion laser for excitation at 488 nm. Flow during analysis was controlled at *c.a.* 500 sperm/s, and 10,000 cells were analyzed in each sample. Data for light-scattering and emission of fluorescence (monitored at 515-535 nm) were obtained at a fixed gain setting in logarithmic mode. Debris were eliminated based on forward scatter versus side scatter dot plot by drawing a region enclosing the sperm population of interest; staining with propidium iodide (red fluorescence collected through a 620 nm band-

pass filter and a 645 nm long-pass filter) was also performed to eliminate noises. Green fluorescence signal for FITC was collected through a 525 nm band-pass filter and a 550 nm dichroic long-pass filter. The percentage of labeled sperm (gated on histograms above M1 marker for the fluorescence intensity of more than 90% of events for positive DNase I control), and median fluorescence intensity of spermatozoa in each sample were used as measures of sperm DNA fragmentation.

Radioenzymatic labelling of free 3' ends of sperm DNA

DNA extraction

Semen samples from 12 smokers and 12 non-smokers were used either fresh, or after freezing at -20°C or in liquid nitrogen and thawing 24 h later. Sperm DNA was isolated by a modified guanidinium thiocyanate method [25]. A volume of semen corresponding to c.a. 25×10^6 spermatozoa was mixed with 5 mL of PBS followed by centrifugation at $950 \times g$ for 10 min. The sperm pellet was lysed in 2.5 mL of a lysis buffer containing: 6 M guanidinium thiocyanate, 30 mM sodium citrate (pH 7.0), 0.5% sarkosyl, 0.20 mg/mL proteinase K and 0.3 M β -mercaptoethanol, and incubated at 55°C for 3-4 h. Two volumes of isopropyl alcohol were then added directly to the lysate, the tube was inverted gently until the DNA fibers formed a visible ball that was recaptured, washed twice in 70% ethanol and dissolved in approximately 200 μL of water over a 24-h period. The quality and concentration of extracted DNA assessed by absorbance at 260 and 280 nm, aliquots were stored at -20°C before radioenzymatic assay.

Detection of DNA fragmentation by ATP α - ^{35}S incorporation in extracted DNA

Sperm DNA fragmentation was assessed by labeling of 3'OH termini in isolated DNA using TdT as the enzyme and ATP α - ^{35}S as radioactive substrate. Each analysis represents the mean of 6 replicates. For each replicate, 4 μg of isolated DNA were incubated in medium containing 10 μL TdT buffer 5X (1 M potassium cacodylate, 125 mM tris-HCl, 1.25 mg/mL BSA), 5 μL 25 mM CoCl_2 , 15 μCi ATP α - ^{35}S (ICN Biochemicals, Toronto, Canada) and 25 U of TdT. The final volume was adjusted to 50 μL with water and the reaction mixture was incubated overnight at 37°C .

Unreacted ATP α - ^{35}S was removed first by chromatography on MicroSpin G-25 columns (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfée, Canada). Remaining traces of unincorporated ATP α - ^{35}S were eliminated by precipitation: 150 μL of a t-RNA solution (0.25 mg/mL t-RNA in 0.1 M sodium pyrophosphate) were added to the DNA fraction of G-25 column, followed by precipitation with 200 μL of 25% trichloroacetic acid (TCA) and incubation on ice for 10 min. The precipitate was recovered by filtration on SMWP 5 μm filters (Millipore, St-Laurent, Canada) and washed sequentially with 10 mL of 10% TCA and 10 mL of 95% ethanol. The filters were then transferred to scintillation vials containing 5 mL of scintillation cocktail (ICN Biochemicals) to measure radioactivity in a LS-1801 Beckman counter. As negative control, TdT was omitted from the reaction mixture; strongly positive controls were DNA samples pretreated with a combination of 40 U EcoR1 and 40 U BamH1 (New England Biolabs, Mississauga, Canada) for 1 h at 37°C prior to radioactive labeling. A reference standard was run on each assay occasion: it was an aliquot of isolated sperm DNA from a semen donor with high sperm count.

Analysis of sperm chromatin aspect and density

The aspect and density of sperm chromatin were investigated by transmission electron microscopy. Sperm were fixed with 4% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate for 30 min at 4°C. They were then washed twice in 0.2M sodium cacodylate and stored at 4°C until processed for electron microscopy by the usual techniques. Chromatin densities were compared on photomicrographs using the Mesurim 2.4 program (Université d'Amien, Amien, France). A mean value of absorbance was calculated for each spermatozoon: it was based on several measurements made over areas of the nucleus selected to exclude nuclear vacuoles.

Measurement of ROS production

ROS production was measured by chemiluminescence assay in the presence of luminol using a Turner Designs (TD-20/20) luminometer. Frozen and fresh sperm were washed with N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES)-balanced saline buffer (HBS: 130 mM NaCl, 4 mM KCl, 0.5 mM MgCl_2 , 14 mM fructose, and 10 mM HEPES adjusted to pH 8.0 [26] and then suspended at $10 \times 10^6/\text{mL}$ in HBS containing 0.5 mM luminol (from a stock solution in dimethylsulfoxide). Chemiluminescence was monitored over a 10 min period, and results are reported as relative light units (RLU).

High pressure liquid chromatography

Cotinine, a major degradation product of nicotine, was measured by HPLC (Agilent Technologies, Toronto, ON, Canada) essentially as described previously [27] on an ODS (C18) column (4.6 mm x 25 cm, Beckman Instrument) using a mobile phase composed of acetonitrile: diethylamine: formic acid: water (120: 3: 1.25: 875; v:v) adjusted to pH 4.5. Peaks of cotinine were detected at 262 nm. Vitamin C was measured in semen and in blood serum [28]; unless otherwise stated, semen and serum were stored in liquid nitrogen until assay.

Statistical analyses

SigmaStat 2.0 (Jandel Corporation, San Raphael, CA, U.S.A.) was used for data analysis. Semen parameters were compared using parametric or non-parametric tests as required. Two Way Repeated Measures ANOVA was used to test for differences in degree of sperm DNA fragmentation, vitamin C concentration and sperm chromatin density. The Mann-Whitney Rank Sum Test was also used to compare sperm DNA fragmentation between smokers and non smokers as evaluated by the TUNEL assay. A t-test was used to compare the percentages of decrease in vitamin C concentration upon raw freezing of semen at -20°C. A p value less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

The effect of freeze-thawing on sperm DNA fragmentation as measured by the TUNEL assay.

The effect of freeze-thawing on the degree of sperm DNA fragmentation was evaluated by the TUNEL assay. The spermatozoa were either from fresh semen (no freezing), semen frozen at -20°C or semen frozen in liquid nitrogen.

Infertility patients (Table I)

A study was conducted on a group of men from couples consulting for infertility (*infertility patients*), which included 10 non-smokers and 15 smokers. The percentage of spermatozoa showing a significant degree of labeling (% sperm DNA fragmentation) was analyzed by ANOVA on repeated measures (Table I). In the non-smokers, the percentage of sperm DNA fragmentation in fresh sperm ($12.9\% \pm 6.2$) was not significantly different from that of sperm frozen at -20°C ($14.7\% \pm 5.6$) or in liquid nitrogen ($15.7\% \pm 6.7$). In contrast, the results for smokers showed that sperm frozen at -20°C ($24.0\% \pm 17.1$) were more heavily labeled than fresh sperm ($13.6\% \pm 10.6$), this difference was statistically significant; freezing into liquid nitrogen gave an intermediate value ($18.9\% \pm 13.4$).

Examination of the frequency histograms obtained by FACS scan analysis revealed that in cases where freezing of semen is associated with an increase in the percentage of DNA fragmentation, the whole frequency distribution tended to be shifted to the right, i.e. towards higher fluorescence intensities. This suggested that all the spermatozoa are more heavily labeled, and not only a sub-population of sperm. In order to take this effect into account, we also analyzed the median values of fluorescence intensity of the spermatozoa. Results are presented as the mean \pm S.D. of individual median values. ANOVA on repeated measures was used to compare fluorescence intensities, each subject serving as its own control to evaluate sperm treatment effects (Table II).

Infertility patients (Table II)

In non smokers, the median values of fluorescence intensity for fresh sperm from was not statistically different from that of sperm after freezing of semen at -20°C or in liquid nitrogen.

In smokers, freezing of semen at -20°C caused a significant increase in fluorescence intensity compared to fresh sperm; a smaller but significant increase was also observed after freezing in liquid nitrogen. These results corroborate those obtained using percent sperm DNA fragmentation as parameter.

Normal men (Table II)

Results similar to those of infertility patients were obtained in normal men. In non-smokers, there was also no statistically significant difference between fresh sperm and sperm frozen at -20°C or in liquid nitrogen. In smokers, both freezing conditions caused a significant increase in median fluorescence intensity, the effect of freezing at -20°C tended to be higher than freezing in LN.

Smokers compared to non-smokers

A statistical analysis was also conducted on combined data of TUNEL assays from both groups using Mann-Whitney Rank Sum Test. When the results for fresh sperm were compared, there was no statistically significant difference in fluorescence intensity between smokers ($n = 34$) and non-smokers ($n = 18$). In contrast, for sperm frozen at -20°C , fluorescence intensity was higher in smokers (median 7.45 F.U; IQ range: 5.3, 12.9) compared to non-smokers (median 4.35 F.U; IQ range: 3.4, 6.4) ($p < 0.005$).

The effect of freeze-thawing on sperm DNA fragmentation as measured by the radioenzymatic assay on isolated DNA. (Table III)

In the non-smokers, freezing of semen did not cause any significant effect on the degree of sperm DNA fragmentation. A two way repeated measures ANOVA showed that the intensity of radioactive labeling of fresh sperm ($47.9 \pm 9.5 \times 10^3$ cpm/4 μg DNA) was not statistically different from that of sperm frozen at -20°C ($52.1 \pm 8.9 \times 10^3$ cpm/4 μg DNA) or in liquid nitrogen ($42.9 \pm 8.6 \times 10^3$ cpm/4 μg DNA).

In smokers, only freezing of sperm at -20°C caused a significant increase in the degree of sperm DNA fragmentation. Hence, sperm frozen at -20°C were more intensely labeled ($75.3 \pm 14.6 \times 10^3$ cpm/4 μg DNA) than fresh sperm ($52.3 \pm 8.9 \times 10^3$ cpm/4 μg DNA). The labeling of sperm frozen in liquid nitrogen ($60.3 \pm 12.3 \times 10^3$ cpm /4 μg DNA) was not statistically different from that of fresh sperm.

The effect of freeze-thawing on ROS production and vitamin C concentration of in semen.

The basal level of ROS production was extremely low (less than 1 RLU) in fresh semen from smokers and non-smokers; freezing and thawing caused a further decreased to values about baseline instrument level (less than 0.07) in both groups of subjects.

When measured in semen stored in liquid nitrogen, the concentration of vitamin C in smokers (320 ± 163 $\mu\text{moles/L}$) tended to be lower than in non-smokers (524 ± 302 $\mu\text{moles/L}$), but inter-individual variations were large and the difference was not statistically significant. Compared to these values, freezing of semen at -20°C caused significant decreases in vitamin C concentration both in smokers (down to 195 ± 128 $\mu\text{moles/L}$; $n = 9$) and non smokers (down to 399 ± 249 $\mu\text{moles/L}$; $n = 8$) (two way repeated measures ANOVA: $p < 0.05$). This decrease was particularly evident in the subgroup of heavy smokers (more than 15 cigarettes/day, $n = 5$) where the mean value decreased by 55.4 ± 21.0 % compared to 23.1 ± 13.2 % in non smokers ($n = 8$), a highly significant difference ($p = 0.006$, t-test). The serum concentration of vitamin C in smokers (61 ± 26 $\mu\text{moles/L}$) was not statistically different from that of non-smokers (55 ± 18 $\mu\text{moles/L}$), with values well within the normal range.

The effect of freeze-thawing on sperm chromatin density

Electron microscopy was used to assess the effect of freezing of semen at -20°C on sperm chromatin (see Figure 1 for representative data). In non-smokers, this treatment did not produce obvious changes in the appearance of sperm chromatin compared to control sperm (from semen not subjected to freezing). In contrast, freezing of semen from smokers at -20°C caused the sperm chromatin to show contrasting intensities and to appear more heterogeneous than in control sperm. Quantitative assessment of sperm chromatin density corroborated these observations (Table IV). In non-smokers, no significant difference in mean density was observed between treated and control sperm. In smokers, freezing of semen at -20°C was associated with a significant decrease in mean sperm chromatin staining density compared to controls.

4. Discussion

In non-smokers, our results using the TUNEL assay show that freezing of semen in liquid nitrogen without cryoprotectant does not influence the value for percentage of labeled sperm as compared to fresh semen. This corroborates that pre-freeze and post-thaw values for sperm DNA fragmentation, also measured by the TUNEL assay, are not statistically different [29]. These authors observed that the percentage of positive sperm tended to be higher when no cryoprotectant was used compared to TEST-egg yolk and glycerol for example. In this study, seminal plasma had been removed using a sperm preparation technique, this could make sperm more vulnerable to damage if no cryoprotectant is added before the freeze-thaw procedure. Even in the presence of cryoprotectant, seminal fluid would offer an additional level of protection against cryodamage to DNA of sperm prepared by swim-up; this was demonstrated using the Comet assay, and is possibly indicative of protection against oxidative damage by seminal antioxidants [30].

In the non-smokers, we did not observe any statistically significant effect of freezing in liquid nitrogen on the results of the TUNEL assay whether the tests were performed on healthy men or men from couples consulting for infertility. This is at variance with results obtained using the comet assay: freeze-thawing of sperm from infertile men, but not from fertile men, causes significant DNA damage [31]. It should be noticed that in this study the first interquartile value for total sperm count in infertile patients was 28.5×10^6 sperm while ours were above 100×10^6 sperm. Since oligozoospermia is often associated other semen abnormalities, sperm from oligozoospermic patients might be more susceptible to DNA damage by freeze-thawing.

Using staining with acridine orange, a study on healthy normozoospermic men showed sperm chromatin deterioration after freezing in liquid nitrogen (with cryoprotectant) compared to fresh sperm [32]. This was evidenced by increases in SCSA parameters indicative of DNA fragmentation (alpha T: ratio of red to total fluorescence) and modification of the chromatin in terms of accessibility of the fluorescent dye to native DNA. In contrast, the results of the SCSA would not be influenced by raw freezing at -100°C [33]. Other methods of staining with acridine orange also revealed cryodamage to sperm chromatin upon freezing in liquid nitrogen [34, 35]. In non-smokers, we observed that freezing of semen at -20°C did not induce significant change in the percentage of positive sperm as measured by the TUNEL assay. To the best of our knowledge, no other study specifically addressed this issue with respect to human sperm;

freezing at -20°C is not part of cryopreservation protocols in humans. However, such freezing conditions can be part of procedures used to store semen samples prior to laboratory testing; as discussed below, this is liable to introduce technical bias.

The TUNEL assay gave contrasting results in smokers: freezing of semen, particularly at -20°C and to a lesser extent freezing in liquid nitrogen, caused a statistically significant increase in the measure of percent sperm DNA fragmentation. It was also noticed that the whole sperm population showed increased labeling, suggesting that all the sperm had more DNA damage, and not only a sub-population of sperm. An other possibility was the introduction of a bias in the TUNEL assay as a result of freezing at -20° : factors such as increased access of the enzyme TdT to its DNA substrate could result in a more complete labeling of free 3' ends. In order to determine whether freezing of smoker's semen causes a true increase in DNA strand breaks, we developed a radioenzymatic method that we applied to isolated sperm DNA. This approach eliminates factors responsible for compactness of sperm chromatin that could limit access of the enzyme to DNA within the sperm nucleus. A statistical analysis revealed that freezing of semen at -20°C indeed induces new DNA breaks in the sperm of smokers, but not freezing in liquid nitrogen. This indicates that freezing at -20°C would produce two different effects that contribute to the increase in sperm DNA fragmentation as measured by the TUNEL assay. One is the induction of DNA strand breaks *per se*, and the other is through changes in chromatin architecture that allow more complete labeling of the free 3' end originally present in fresh sperm. Freezing in liquid nitrogen would induce only structural changes in chromatin, without additional DNA strand breaks.

In vitro, reactive oxygen species (ROS) can cause DNA fragmentation in sperm, as measured by TUNEL [36]. On the other hand, it was shown by electron paramagnetic resonance spectrometry that frozen and thawed bovine sperm produce significantly more superoxide radicals than fresh sperm [37]. These two observations led thus to test the hypothesis that freezing and thawing of sperm from smokers might induce ROS production conducive to DNA fragmentation. With fresh sperm from smokers, we measured very low levels of ROS production, levels that were not statistically different from those of fresh sperm from non-smokers. Such a result was expected since non-activated sperm have little activity in this regard, and the semen samples that we tested did not contain significant numbers of leukocytes, a rich source of ROS. Freezing of sperm at -20°C abolished this low production close to instrument

baseline level; this might result from inactivation of enzymes responsible for ROS production or release of superoxide dismutase or glutathion peroxidase by disrupted sperm. Here, the low basal level of ROS combined with its decrease upon freezing and thawing argue against a significant effect on the level of sperm DNA fragmentation. This negative result does not totally exclude the possibility of a DNA damaging effect by ROS under this *in vitro* condition. Hence, oxidants other than those detected by the technique that we used could be produced or antioxidants could be lost. This is supported by our observation of lower concentrations of vitamin C in frozen-thawed semen of smokers, particularly heavy smokers, compared to non-smokers.

Other explanations could also account for DNA strand breaks such as the involvement of an endonuclease, and physical stresses causing DNA shearing. Treatment of mouse sperm with a combination of detergent and dithiothriitol (DTT) was shown to induce chromosome breakage [38]. Since chelating reagents can partially prevent this effect, the authors suggested the involvement of an endogenous nuclease in this chromosome breakage. Along similar lines, freeze-thawing of human sperm at -20°C was shown to cause DNA degradation; this was evidenced by pulsed-field gel electrophoresis after decondensation of the sperm in lysis buffer containing of sodium dodecyl sulfate (SDS), DTT and proteinase K [39]. Here also, the inhibitory effect of chelating reagents (EDTA and EGTA) suggested the activation of an endogenous nuclease. Until such enzymatic activity is clearly demonstrated and the nuclease identified, its role in DNA fragmentation remains hypothetical.

We propose another mechanism that could explain DNA degradation under such conditions, namely DNA shearing as a result of rapid chromatin expansion. Basic to this mechanism is the role devoted to zinc: it stabilizes sperm structures during spermiogenesis by forming zinc-thiol complexes [40]. During sperm transit in the epididymis, oxidation of part of the sulfhydryl groups to disulfide bonds decreases thiol/zinc molecular ratio to that of mature sperm. We have previously shown that treatment of sperm with EDTA sharply decreases their rate of decondensation in a mixture of SDS and DTT (41). By chelating zinc, EDTA allows further formation of disulfide bonds, as evidenced by a concomitant decrease in sulfhydryl groups. As a result, EDTA renders sperm more resistant to decondensation in a mixture of detergent and DTT. By slowing down the rate of sperm chromatin expansion, EDTA would prevent or limit damages to DNA.

If, as we predict, a high rate of chromatin expansion can indeed cause DNA fragmentation, this could be of importance in some of the methods (e.g. the Comet assay) designed to evaluate DNA integrity. The highest rates of sperm decondensation in SDS/DTT are obtained through increasing the temperature (10 times faster at 56°C than at 23°C) [41] or through treatment with DTT first, then followed by SDS (the sperm head literally “explodes”) (G. Bleau, unpublished). Such experimental conditions are used to achieve chromatin dispersion in lysis buffer; in certain cases, the technique would reflect more the tertiary and quaternary structure of DNA than the actual presence of strand breaks in the molecule.

We observed that freezing of semen from smokers at -20°C induces changes in the electron microscopic appearance and density of sperm nuclear chromatin, such changes did not occur in sperm from non-smokers. On the other hand, it is well known that freezing and thawing may cause mechanical shearing of isolated DNA. It follows that freezing of semen at -20°C, with the resulting changes in sperm chromatin structure, possibly generated physical forces capable of producing DNA strand breaks. The fact that only sperm from smokers were affected by freezing at -20°C suggests that their chromatin would be less resistant to physical stress. This might have important clinical implications in assisted reproduction: the DNA of sperm from smokers might be at increased risk of physical damage when cryopreservation or sperm preparation techniques are used. In this regard, interesting results were obtained using sperm prepared for IVF by washing (sperm centrifuged twice) and swim-up technique: the percentage of sperm DNA fragmentation, as measured by the TUNEL assay, was higher in smokers compared to non-smokers [23]. This study did not report on original semen samples. Based on the data presented here, physical stress as well as complete removal of seminal fluid, along with its antioxidants, might be responsible for this higher degree of DNA fragmentation in prepared sperm from smokers only. On the other hand, this increase in results of the TUNEL assay might correspond to changes in chromatin structure allowing for more complete labeling of free 3'ends in the sperm of smokers only.

In conclusion, the results of the present study confirm that the degree of sperm DNA fragmentation in smokers is not significantly different from that of non-smokers. Our data also show that storage of semen at -20°C introduces a technical bias that explains why others found increased damage of sperm DNA in smokers compared to non-smokers.

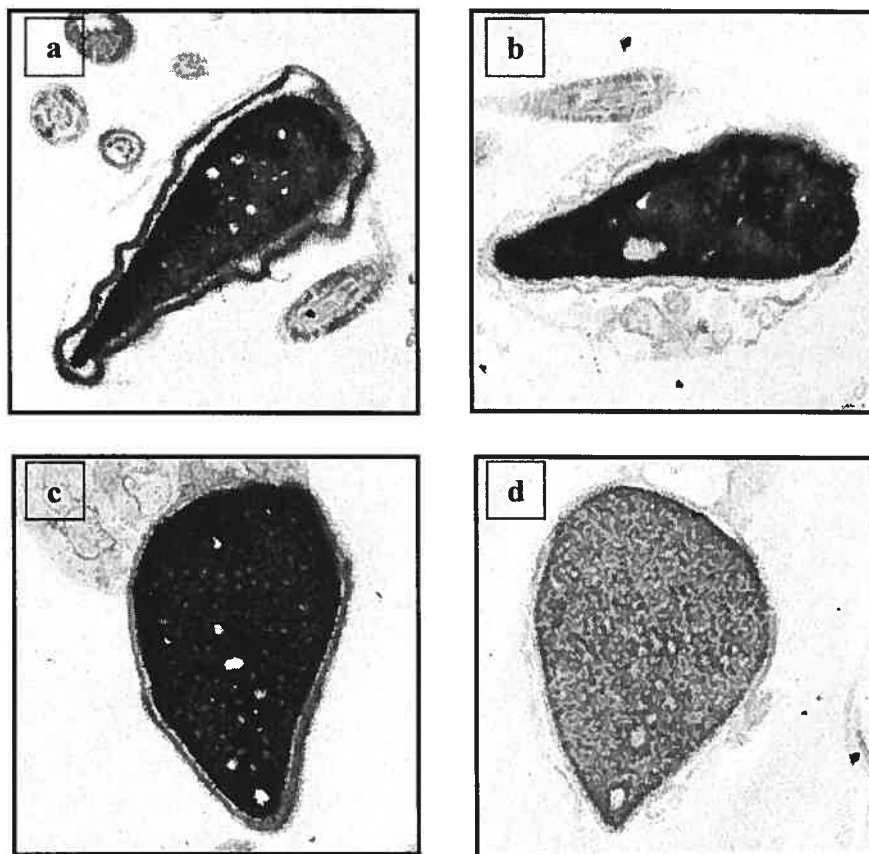


Figure 1: The effect of raw freezing of semen on the electron microscopic appearance of spermatozoa. Typical photomicrographs of spermatozoa from a non smoker (a: control sperm, b: sperm from semen frozen at -20°C), and from a smoker (c: control sperm, d: sperm from semen frozen at -20°C) (magnification 7,100X). Raw freezing of semen caused a significant change in chromatin density of spermatozoa from smokers (see Table IV for quantitative assessment).

Table I: The effect of freeze-thawing on sperm DNA fragmentation as measured by the TUNEL assay.

INFERTILITY PATIENTS	SPERM DNA FRAGMENTATION (%)		
	Sperm from fresh semen	Sperm from semen frozen at -20°C	Sperm from semen frozen into LN
Non-smokers (n = 10)	12.9 ± 6.2 ¹	14.7 ± 5.6	15.7 ± 6.7
Smokers (n = 15)	13.6 ± 10.6 ^a	24.0 ± 17.1 ^a	18.9 ± 13.4

¹ Mean ± S.D. Individual tests for each subject under each assay condition were performed in triplicate.

Statistical analyses on paired data. *a*: *p* < 0.001

Table II: The effect of freeze-thawing on sperm DNA fragmentation as measured by the TUNEL assay (fluorescence units)

SUBJECTS	SPERM DNA FRAGMENTATION (Fluorescence units)		
	Sperm from fresh semen	Sperm from semen frozen at -20°C	Sperm from semen frozen into LN
NORMAL MEN			
Non-smokers (n = 8)	2.84 ± 1.37 ¹	3.85 ± 1.56	3.72 ± 1.89
Smokers (n = 19)	3.13 ± 1.55 ^{a,b}	9.57 ± 5.69 ^a	8.16 ± 4.54 ^b
INFERTILITY PATIENTS			
Non-smokers (n = 10)	5.50 ± 2.55 ¹	6.78 ± 4.93	6.86 ± 4.52
Smokers (n = 15)	5.93 ± 3.23 ^{c,d}	9.24 ± 5.10 ^c	7.89 ± 5.54 ^d

¹ Mean ± S.D. The mean for each group was calculated from median values of fluorescence intensity on the frequency histogram for each sperm sample (in triplicates).

Statistical analyses on paired data. *a*, *b*, *c*, and *d*: *p* < 0.05. *a*: *p* < 0.001; *b*: *p* < 0.001; *c*: *p* < 0.001 *d*: *p* = 0.038

Table III: The effect of freeze-thawing on sperm DNA fragmentation as measured by the radioenzymatic assay on isolated DNA.

SUBJECTS	³⁵ S-dATP incorporation into isolated sperm DNA (10 ³ cpm/4 µg DNA)		
	Sperm from fresh semen	Sperm from semen frozen at -20°C	Sperm from semen frozen into LN
Non-smokers (n = 12)	47.9 ± 9.5 ¹	52.1 ± 8.9	42.9 ± 8.6
Smokers (n = 12)	52.3 ± 8.9 ^a	75.2 ± 14.6 ^a	60.3 ± 12.3

¹ Mean ± s.e.m. Each of the 12 values for non smokers and smokers that were used to calculate the means is itself the mean of 6 replicates.

Statistical analyses on paired data. *a*: *p* < 0.001

Table IV: The effect of raw freezing of semen on sperm chromatin density

SUBJECTS	SPERM CHROMATIN DENSITY (absorbance)	
	Sperm from fresh semen	Sperm from semen frozen at -20°C
Non smokers (sperm from 2 subjects)	62.1 ± 11.8 ¹ n = 45 ²	58.9 ± 12.6 n = 43
Smokers (sperm from 3 subjects)	63.4 ± 11.3 ^a n = 101	47.5 ± 15.0 ^a n = 73

¹ Mean ± S.D. ² n: number of spermatozoa for which chromatin density was measured.

Chromatin density was measured on electron-micrographs using Mesurim 2.4 program.

Statistical analyses on paired data. *a*: *p* < 0.001

References

- [1] E.G. Hughes, B.G. Brennan. Does cigarette smoking impair natural or assisted fecundity? *Fertil. Steril.* 66 (1996) 679-689.
- [2] M.F. Vine. Smoking and male reproduction: a review. *Int. J. Androl.* 19 (1996) 323-337.
- [3] K.M. Curtis, D.A. Savitz, T.E. Arbuckle. Effects of cigarette smoking, caffeine consumption, and alcohol intake on fecundability. *Am. J. Epidemiol.* 146 (1997) 32-41.
- [4] S.E. Chia, S.T. Lim, S.K. Tay, S.T. Lim. Factors associated with male infertility: a case-control study of 218 infertile and 240 fertile men. *Brit. J. Obstet. Gynecol.* 107 (2000) 55-61.
- [5] M.J. Zinaman, C.C. Brown, S.G. Selevan, E.D. Clegg. Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *J. Androl.* 21 (2000) 145-153.
- [6] M.G. Hull, K. North, H. Taylor, A. Farrow, W.C. Ford. Delayed conception and active and passive smoking. *Fertil. Steril.* 74 (2000) 725-733.
- [7] S. Loft, T. Kold-Jensen, N.H. Hjollund, A. Giwercman et coll. Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy. *Hum. Reprod.* 18 (2003) 1265-1272.
- [8] E.G. Hughes, J. Yeo, P. Claman, E.V. YoungLai et coll. Cigarette smoking and the outcomes of in vitro fertilization : measurement of effect size and levels of action. *Fertil. Steril.* 63 (1995) 1350-1252.
- [9] H. Klonoff-Cohen, L. Natarajan, R. Marrs, B. Yee. Effects of female and male smoking on success rates of IVF and gamete intra-Fallopian transfer. *Hum. Reprod.* 16 (2001) 1382-1390.
- [10] K.A. Joesbury, W.R. Edirisinghe, M.R. Phillips, J.L. Yovich. Evidence that male smoking affects the likelihood of a pregnancy following IVF treatment: application of the modified cumulative embryo score. *Hum. Reprod.* 13 (1998) 1506-1513.
- [11] M. Zitzmann, C. Rolf, V. Nordhoff, G. Schrader et coll. Male smokers have a decreased success rate for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* 79 (2003) 1550-1554.
- [12] R. Kunzle, M.D. Mueller, W. Hanggi, M.H. Birkhauser et coll. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil. Steril.* 79 (2003) 287-291.
- [13] H. Trummer, H. Habermann, J. Haas, K. Pummer. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. *Hum. Reprod.* 17 (2002) 1554-1559.
- [14] M.T. Zenzes, R. Bielecki, T.E. Reed. Detection of benzo(a)pyrene diol epoxide-DNA adducts in sperm of men exposed to cigarette smoke. *Fertil. Steril.* 72 (1999) 330-335.

- [15] L. Gaspari, S.S. Chang, R.M. Santella, S. Garte et coll. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human sperm as a marker of DNA damage and infertility. *Mutation Res.* 535 (2003) 155-160.
- [16] J.E. Gallagher, M.F. Vine, M.M. Schramm, J. Lewtas et coll. ³²P-postlabeling analysis of DNA adducts in human sperm cells from smokers and nonsmokers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2 (1993) 581-585.
- [17] S. Horak, J. Polanska, P. Widlak. Bulky DNA adducts in human sperm : relationship with fertility, semen quality, smoking, and environmental factors. *Mutation Res.* 537 (2003) 53-65.
- [18] C.G. Fraga, P.A. Motchnik, A.J. Wyrobek, D.M. Rempel, B.N. Ames. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutation Res.* 351 (1996) 199-203.
- [19] H.M. Shen, S.E. Chia, Z.Y. Ni, A.L. New et coll. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and the association with cigarette smoking. *Reprod. Toxicol.* 11 (1997) 675-680.
- [20] R.A. Saleh, A. Agarwal, R.K. Sharma, D.R. Nelson, A.J. Jr Thomas. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertil. Steril.* 78 (2002) 491-499.
- [21] R.J. Potts, C.J. Newbury, G. Smith, L.J. Notarianni, T.M. Jefferies. Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutation Res.* 423 (1999) 103-111.
- [22] A. Belcheva, M. Ivanova-Kicheva, P. Tzvetkova, M. Marinov. Effects of cigarette smoking on sperm plasma membrane integrity and DNA fragmentation. *Int. J. Androl.* 27 (2004) 296-300.
- [23] J.G. Sun, A. Jurisicova, R.F. Casper. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol. Reprod.* 56 (1997) 602-607.
- [24] M. Sergerie, S. Ouhilal, F. Bissonnette, J. Brodeur, G. Bleau. Lack of association between smoking and DNA fragmentation in the spermatozoa of normal men. *Hum. Reprod.* 15 (2000) 1314-1321
- [25] G. Laforest, M. Sergerie, G. Bleau. Innocuity of tetradecyl-dimethyl-benzyl ammonium fluoride on the DNA of human spermatozoa. *Contraception.* 69 (2004) 425-432.
- [26] E. de Lamirande, C. Gagnon. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J. Androl.* 13 (1992) 368-378.
- [27] R. Greaves, L. Trotter, S. Brennecke, E. Janus. A simple high-pressure liquid chromatography cotinine assay: validation of smoking status in pregnant women. *Ann. Clin. Biochem.* 38 (2001) 333-338.
- [28] A. Rümelin, U. Fauth, M. Halmagyi. Determination of ascorbic acid in plasma and urine by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Clin. Chem. Lab Med.* 37 (1999) 533-536.

- [29] N.K. Duru, M.S. Morshedi, A. Schuffner, S. Oehninger. Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. *J. Androl.* 22 (2001) 646-651.
- [30] E.T. Donnelly, N. McClure, S.E. Lewis. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil Steril.* 76 (2001) 892-900.
- [31] E.T. Donnelly, E.K. Steele, N. McClure, S.E. Lewis. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum. Reprod.* 16 (2001) 1191-1199.
- [32] M. Spano, E. Cordelli, G. Leter, F. Lombardo et coll. Nuclear chromatin variations in human spermatozoa undergoing swim-up and cryopreservation evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Mol. Hum. Reprod.* 5 (1999) 29-37.
- [33] B.L. Sailer, L.K. Jost, D.P. Evenson. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J. Androl.* 16 (1995) 80-87.
- [34] M.E. Hammadeh, S. Greiner, P. Rosenbaum, W. Schmidt. Comparison between human sperm preservation medium and TEST-yolk buffer on protecting chromatin and morphology integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men after freeze-thawing procedure. *J. Androl.* 22 (2001) 1012-1018.
- [35] K.R. Chohan, J.T. Griffin, D.T. Carrell. Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. *Andrologia.* 36 (2004) 321-326.
- [36] S. Lopes, A. Jurisicova, J.G. Sun, R.F. Casper. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 13 (1998) 896-900.
- [37] S. Chatterjee, C. Gagnon. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol. Reprod. Dev.* 59 (2001) 451-458.
- [38] M.A. Szczygiel, W.S. Ward. Combination of dithiothreitol and detergent treatment of spermatozoa causes paternal chromosomal damage. *Biol. Reprod.* 67 (2002) 1532-1537.
- [39] B. Sotolongo, T.T. Huang, E. Isenberger, W.S. Ward. An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. *J. Androl.* 26 (2005) 272-280.
- [40] H.I. Calvin, G. Bleau. Zinc-thiol complexes in keratin-like structures of rat spermatozoa. *Exp. Cell. Res.* 86 (1974) 280-284.
- [41] Y. Jean, A. Perreault, M Auger, K.D. Roberts, A. Chaqdelaine, G. Bleau. Properties of spermatozoa in relation to their elimination after vasectomy. *Arch. Androl.* 3 (1979) 139-146.

4. OBJECTIFS DU DEUXIÈME PROJET DE RECHERCHE

Les résultats du premier projet de recherche ont permis de démontrer que la chromatine des sujets fumeurs semble moins bien résister à la congélation-décongélation que celle des non-fumeurs. Cette vulnérabilité à un tel processus pourrait s'expliquer à la fois par une concentration plus faible d'antioxydants et par une densité plus faible de la chromatine.

Basé sur les rôles essentiels du sélénium et de la vitamine E dans la production de spermatozoïdes, nous voulons déterminer si une supplémentation diététique avec ces deux micronutriments peut améliorer de façon significative la qualité du sperme chez des hommes consultant pour infertilité du couple.

Le deuxième projet de recherche de ce mémoire présente la méthodologie et les résultats d'une étude pilote randomisée portant sur l'effet d'un supplément diététique en vitamine E et sélénium sur la qualité du sperme. Le paramètre principal est ici le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes mesuré selon la technique TUNEL. Un aspect extrêmement important de cette étude consiste en l'approche « contrôle avec placebo ».

5. EFFET D'UN SUPPLÉMENT DIÉTÉTIQUE EN VITAMINE E ET SÉLÉNIUM DANS LE TRAITEMENT DE L'INFERTILITÉ MASCULINE: ÉTUDE PILOTE RANDOMISÉE À DOUBLE INSU AVEC PLACEBO

5.1 Introduction

Défini comme un des problèmes majeurs en santé publique, l'infertilité constitue un enjeu tant sur le plan scientifique, médical que financier. En 2002, le taux de couples présentant des difficultés à procréer s'élevait à environ 15 %, avec une cause masculine exclusive ou associée dans 2/3 des cas (Sharlip et coll., 2002).

Depuis quelques années, de nombreuses études ont portées sur les causes possibles de l'infertilité masculine. Le stress oxydatif induit par une production élevée de RLO figure parmi celles-ci. En effet, plusieurs des études indiquent qu'il provoquerait la perte de fonction du spermatozoïde via des mécanismes impliquant l'induction de dommages oxydatifs, surtout par la peroxydation des lipides membranaires (Griveau et Le Lannou, 1997). Il affecterait également l'intégrité de l'ADN du spermatozoïde en induisant un taux élevé de brisures simple et double brins (Hugues et coll., 1996). Cependant, le liquide séminal assure un certain effet protecteur contre ces dommages oxydatifs par la présence des vitamines E et C et d'enzymes telles la catalase et la superoxyde dismutase.

In vitro, plusieurs études ont démontré un effet bénéfique d'antioxydants sur l'inhibition de la peroxydation des lipides membranaires, l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes et la réaction acrosomiale chez diverses espèces animales (Geva et coll., 1996; Hugues et coll., 1998). Chez l'humain, plusieurs protocoles cliniques ont été proposés afin d'améliorer les paramètres du sperme et le pouvoir fécondant des spermatozoïdes (Agarwal, 2004). Malgré les quelques études démontrant des effets bénéfiques sur la qualité du sperme, aucun protocole thérapeutique n'a encore été démontré efficace dans le traitement de l'infertilité masculine. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet d'un supplément diététique en vitamine E et sélénium sur la qualité du sperme, comparativement au placebo.

5.2 Matériel et méthodes

5.2.1 Sélection des sujets

Les participants à ce projet de recherche provenaient de couples fréquentant la clinique de fertilité de l'Hôpital St-Luc du CHUM. Afin de faciliter le suivi et d'augmenter la probabilité de grossesse, nous avons recruté des couples inscrits au programme d'insémination intra-utérine avec sperme du conjoint. Les autres critères d'inclusion et les critères d'exclusion figurent au tableau I.

Tableau I: Critères d'inclusion et d'exclusion

	Critères d'inclusion	Critères d'exclusion
Chez l'homme	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ≤ 45 ans ▪ Bonne santé en général ▪ Si fumeur : ≥ 5 cigarettes/jour 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vaso-vasostomie ▪ Azoospermie ▪ Varicocèle ▪ Cryptorchidie ▪ Non-disponible pour les analyses mensuelles
Chez la femme	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ≤ 35 ans ▪ Bonne santé en général ▪ Cycles spontanés ou induction de l'ovulation avec gonadotrophines chorioniques (Pregnyl) seulement 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) ▪ Induction de l'ovulation avec gonadotrophines (Pergonal, HMG) ▪ Endométriose stade III et IV ▪ Hystérosalpingographie anormale ▪ Prolactinémie: >70 µg/L ▪ Avortements spontanés à répétition: > 5
Chez le couple	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ≥ 18 ans ▪ Infertilité depuis au moins 1 an. ▪ Fréquenter la clinique de fertilité de l'Hôpital St-Luc du CHUM. ▪ Être inscrit au programme d'insémination intra-utérine avec sperme du conjoint 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Difficultés conjugales majeures chez le couple

Avant de participer à cette étude, chaque sujet a signé un formulaire de consentement libre et éclairé, approuvé par le comité d'éthique du CHUM. Chacun des conjoints devait répondre à un questionnaire concernant son histoire médicale et ses habitudes alimentaires. Nous avons demandé aux patients de ne prendre aucun autre supplément vitaminique et de nous aviser de tout changement de style de vie (e.g. arrêt de tabagisme) durant la période d'étude. Les sujets étaient divisés en deux groupes: des non-fumeurs, n'ayant jamais fumé ou ayant fumé moins de 100 cigarettes dans leur vie, et des fumeurs de plus de 5 cigarettes/jour.

5.2.2 Protocole et supplément diététique

Ce projet clinique est une étude randomisée à double insu, contrôlée par placebo. Une liste randomisée a été élaborée pour les fumeurs et les non-fumeurs quant à l'attribution au groupe placebo ou supplément diététique. Le code numérique a été gardé secret jusqu'à la fin de l'étude. Le protocole comportait 7 visites au laboratoire d'andrologie de l'Hôpital St-Luc; à chaque occasion les sujets produisaient un échantillon de sperme et subissaient une prise de sang. Une valeur de base des paramètres du spermogramme a été obtenue en faisant la moyenne des résultats des 2 visites de la période témoin (t-0a et t-0b), à au moins 2 semaines d'intervalle. Les comprimés de supplément ou de placebo ont ensuite été donnés aux participants. Durant la période de 4 mois de traitement, chaque sujet devait se présenter au laboratoire une fois par mois, puis finalement, 1 mois après l'arrêt du traitement. Une période de traitement de 4 mois a été jugée nécessaire afin de couvrir plus d'un cycle complet de spermatogenèse (durée d'environ 70 jours). Les comprimés de supplément contenaient une combinaison de 200 UI de vitamine E, sous forme d'acétate d' α -tocophérol, et 100 μ g de sélénium, sous forme protéique (Jamieson Laboratories, Windsor, Canada); les comprimés de placebo étaient d'apparence et de goût identiques aux comprimés du supplément. La posologie était de 2 comprimés de chaque supplément par jour.

5.2.3 Spermogramme et prélèvements sanguins

Après 2 à 4 jours d'abstinence sexuelle, les échantillons de sperme ont été obtenus par masturbation et collecte dans des contenants stériles (Starstedt, Montréal, Canada). La qualité du sperme a été évaluée selon les critères de l'OMS (WHO, 1999): après une période de liquéfaction de 30 minutes, le volume de l'échantillon, la numération ($\times 10^6/\text{mL}$) et la motilité des spermatozoïdes à 30 minutes, à 2 et à 6 heures (% de grade A et B) ont été déterminés. Des parties aliquotes de chaque échantillon ont été fixées à la formaline 1% durant 30 minutes et centrifugées à 600g pendant 10 minutes. Le culot a été resuspendu dans 1 mL de solution de tampon phosphate (PBS) Dulbecco 1X (pH 7,4) (Irvine Scientific, Santa Anna, USA) et entreposé à 4°C pour mesurer la fragmentation de l'ADN. Une autre aliquote de 100 μ L a été déprotéinée en ajoutant une solution d'acide perchlorique 10%-acide méta-phosphorique 1 % (PCA- mPA) et congelé à -80°C pour dosage de la vitamine C dans le sperme. Les prélèvements sanguins ont été effectués soit dans des tubes de 10 mL contenant de l'EDTA pour déterminer la formule sanguine complète ou soit sans anticoagulant (SST gel, Becton

Dickinson, Franklin Lakes, USA) pour les dosages sériques. Après une centrifugation à 1000g pendant 12 minutes, le sérum a été divisé en aliquotes de 600 µl, puis congelé à -80°C.

5.2.3.1 Coloration des spermatozoïdes par la technique Wright-Hématoxyline

Afin de mesurer le pourcentage de spermatozoïdes normaux et la concentration en leucocytes et cellules immatures ($\times 10^6/\text{mL}$), les échantillons de sperme ont été colorés par la technique Wright-Hématoxyline. Un volume de 10 µL de sperme a été étalé sur une lame et séché à la température de la pièce. Après fixation dans du méthanol 100% pendant 15 minutes, une solution du colorant de Wright 1X (Fisher Scientifique, Ottawa, Canada) a été appliquée sur la lame durant 2 minutes. Après lavage des lames dans un bain contenant une solution de tampon phosphate (PBS) Dulbecco 1X (pH 7,4) pendant 2 minutes, elles ont été rincées sous un faible jet d'eau distillée et recouvertes d'une solution d'hématoxyline de Harris (sans acide, filtrée) (Fisher, Montréal, Canada) pour une période de 2 minutes. Après un deuxième lavage à l'eau distillée, la lame a été montée à l'Aquatex (Fisher, Montréal, Canada) pour observation en microscopie optique. Pour chaque échantillon de sperme, 400 spermatozoïdes ont été comptés sur 2 lames différentes, en différenciant les spermatozoïdes normaux des anormaux (ex. cassures au niveau du cou ou du flagelle, reste cytoplasmique, tête double, flagelle double, aspect anormal de la chromatine) selon les normes de l'OMS (WHO, 1999). À l'aide de cette technique, nous avons pu également identifier les leucocytes et les cellules immatures, et déterminer leur concentration par rapport à celle des spermatozoïdes.

5.2.3.2 Dosage de la vitamine E

La concentration sérique en vitamine E a été mesurée par HPLC sur colonne DB C-8 (4,6 x 12,5 mm) (Agilent Technologies Canada, Wilmington, Canada). La phase mobile était un mélange de méthanol:eau (95:5, v:v) à un débit de 1 mL/minute; les pics ont été détectés à une longueur d'onde de 280 nm. Afin de calculer la récupération, un volume de 200 µL de standard interne contenant 200 µg d'acétate d' α -tocophérol (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) a été ajouté à un volume égal de sérum. La vitamine E a été extraite une première fois par 2 mL d'hexane suivi d'une centrifugation à 10000g pendant 5 minutes à la température de la pièce. Cette opération a été répétée une deuxième fois, les extraits combinés puis évaporés sous azote, et le résidu dissous dans 150 µL de méthanol pour injection dans la colonne.

5.2.3.3 Dosage de la vitamine C

Des protocoles similaires ont été utilisés pour mesurer la concentration en vitamine C dans le sperme et dans le sérum (Rümelin et coll., 1999). Un volume de 100 µL d'un mélange d'acide perchlorique 10% et d'acide méta-phosphorique 1 % (1:1) a été ajouté à 100 µL de sérum afin de précipiter les protéines et aussi empêcher la dégradation de la vitamine C. Après une incubation de 60 minutes à 0°C, les échantillons ont été centrifugés à 12000g durant 5 minutes à 5°C. Un volume de 100 µL du surnageant (contenant la vitamine C) a été additionné à 100 µL de solution de phase mobile (voir plus bas) suivi d'une centrifugation à 12000g durant 2 minutes à 5°C. Cet extrait a été injecté dans une colonne C-18 (25 cm x 4,6 mm) (Bekman Coulter Canada, Mississauga, Canada). La phase mobile était composée de phosphate d'ammonium ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) 20mM contenant 0,015% d'acide méta-phosphorique (pH 3,5), le débit était fixé à 0,75 mL/minute avec détection des pics à 245 nm.

5.2.3.4 Mesure de la peroxydation des lipides

Le degré de stress oxydatif a été évalué grâce à un des marqueurs de la peroxydation des lipides: le malondialdéhyde (MDA) mesuré dans le sérum par HPLC. La technique utilise une colonne C-18 (3,9 x 300 mm) (Agilent technologies Canada), un débit de 0,8 mL/minute, un détecteur de fluorescence ajusté à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission à 532 et 553 nm respectivement, et une phase mobile composée de 50 mM de phosphate de potassium (KH_2PO_4) à pH 6,5:méthanol (50:50). Pour ce dosage, des volumes de 5 µL d'hydroxytoluène butylé 0,2%, de 250 µL d'acide phosphorique 1,22 M, de 450 µL d'eau distillée et de 250 µL d'acide thiobarbiturique à 0,67 % ont été ajoutés à 50 µL de sérum. Après des incubations d'une heure à 95°C et d'une heure à 0°C, 360 µL de méthanol ont été ajoutés aux échantillons refroidis, suivi de 40 µL de NaOH (10 N). Le tout a été incubé sur glace pour une période d'au moins une heure avant d'être centrifugé à 6500g durant 10 minutes. Le surnageant a servi aux injections dans la colonne.

5.2.3.5 Dosage de la cotinine

La cotinine est le métabolite majeur de la nicotine, souvent utilisé comme biomarqueur du degré d'exposition à la fumée de cigarette. Brièvement, des volumes de 15 µL du standard interne de 2-phényl-2-imidazoline à 1 mg/mL et de 25 µL de NaOH 40% ont été ajoutés à 500

μ L de sérum. La cotinine a été extraite avec 8 mL de dichlorométhane, suivi d'une évaporation sous azote (Greaves et coll., 2001). Le résidu a été dissous dans 150 μ L de phase mobile constituée d'acétonitrile:di-éthylamine:acide formique (12: 0,3: 0,125: 87,5 v/v). Le débit dans la colonne ODS C-18 (Bekman Coulter Canada)  tait de 1 mL/minute. Le pic de cotinine était détecté à 262 nm.

5.2.3.6 Mesure de la fragmentation de l'ADN des spermatozo ides

Le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozo ides a été mesuré par la technique TUNEL pour le marquage des groupements 3'-OH terminaux (Gorzyka et coll., 1993; Sergerie et coll., 2000). Brièvement, les spermatozo ides fixés préalablement à la formaline 1% ont été centrifugés à 10000g pendant 4 minutes, resuspendus dans 100 μ l de tampon TdT (1 M de cacodylate de sodium, 150 mM de Tris (pH 7,4), 25 mM de CoCl_2 , 1,25 mg/mL d'albumine bovine (BSA) et 0,1% de Triton X-100) et incubés pendant 10 minutes. Après une autre centrifugation à 10000g durant 4 minutes, le culot a été mélangé à 100 μ l de tampon TdT contenant 3 μ mol de biotine 16-désoxyuridine triphosphate (dUTP-biotine), 10 UI de d soxynucl otidyle transférase terminale (TdT) (Roche Diagnostics, Laval, Canada), et 0,1% de Triton X-100. Par la suite, les échantillons traités ont été incubés pendant 60 minutes à 37 C. Après un lavage au tampon TN (30 mM de Tris, 300 mM NaCl, pH 7,4), les spermatozo ides ont été resuspendus dans 100 μ l de tampon AP (50 mM de Tris, 150 mM de NaCl à pH 7,4) contenant 1% de streptavidine (Canadian life technology, Toronto, Canada) conjuguée à trois ou quatre molécules d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (1:50) et incubés à 37 C en chambre noire pendant 60 minutes. Après une dernière centrifugation à 10000g durant 4 minutes, le culot a été resuspendu dans 1 mL de tampon AP contenant 10 μ g/mL d'iodure de propidium (PI, Sigma Chemical Co., St Louis, USA) pour analyse en cytométrie en flux (Gorzyka et coll., 1993). Pour les témoins négatifs, l'enzyme TdT a été omis du protocole alors que pour les témoins positifs, les spermatozo ides étaient préalablement traités avec 200 UI de désoxyribonucléase (DNase I, sans RNase) (Roche Diagnostics, Laval, Canada) durant 1 heure à 37 C.

5.2.3.6.1 Mesure en cytométrie en flux

La fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes a été mesurée à l'aide d'un cytomètre en flux FACScan (Becton Dickson, San Jose, USA) équipé d'un laser d'ions à argon, à 15 mW. La longueur d'onde d'excitation était de 488 nm et l'émission a été mesurée à 515-535 nm. Durant l'analyse, le débit était contrôlé à environ 500 spermatozoïdes/seconde. Un total de 10000 évènements a été ainsi recueilli pour chaque analyse. L'intensité médiane de fluorescence des spermatozoïdes a été déterminée. Les débris cellulaires ont été enlevés en se basant sur l'axe du laser (correspond à la taille de la cellule) en fonction de celle diffractée à 90° (correspond à la granulosité de la cellule), grâce au tracé de la population cible de spermatozoïdes.

5.2.4 Analyses statistiques

L'analyse des données a été réalisée avec le logiciel Sigma Stat 2.0 (Jandel Corporation, San Raphael, CA, USA). Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm écart-type ($x \pm \text{é.t.}$) ou en médiane et valeurs interquartiles. Pour toutes les analyses mentionnées plus bas, une valeur de probabilité (p) inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative.

5.3 Résultats

Au total, 25 sujets provenant de couples suivis à la clinique de fertilité de l'hôpital St-Luc du CHUM ont été recrutés pour ce projet. Lorsque ces patients eurent tous complété leur période de traitement (ou se soient retirés de l'étude) et que les analyses eurent été effectuées, le code d'identification a été brisé afin d'effectuer une analyse préliminaire. Les sujets se répartissaient comme suit: 12 patients (4 fumeurs et 8 non-fumeurs) dans le groupe placebo et 11 patients (1 fumeur et 10 non-fumeurs) dans le groupe ayant reçu le supplément en vitamine E et sélénium (ci-après désigné « groupe supplémenté »). De plus, deux sujets (un fumeur et un non-fumeur) se sont retirés de l'étude avant même de recevoir les comprimés, soit lors de la deuxième visite de contrôle t-0b.

Devant le nombre insuffisant de fumeurs, nous présentons les données sur l'efficacité et l'innocuité en incluant tous les sujets du groupe placebo (n = 12) et du groupe supplémenté (n = 11). Il est important de souligner que, sauf pour les résultats des dosages de cotinine qui sont traitées séparément, ceci ne modifie pas les moyennes ou les médianes de façon significative. De plus, les conclusions des analyses statistiques restent les mêmes, que l'on retienne ou non les données obtenues chez les fumeurs.

5.3.1 Effet d'un supplément diététique en vitamine E et sélénium

Lors des analyses statistiques, nous avons utilisé la moyenne des valeurs obtenues aux deux visites de contrôle (t-0a et t-0b) servant à établir les niveaux de base pour chaque sujet, nous désignons cette moyenne par « temps zéro » (T-0). Pour chaque patient et chacun des paramètres du sperme, cette valeur moyenne à T-0 a été comparée à la moyenne des valeurs à T-4 et A-1, la raison étant la suivante. À cause de la durée de la spermatogenèse (environ deux mois chez l'homme), tout traitement susceptible d'améliorer la production des spermatozoïdes prend un certain temps avant de se répercuter sur la qualité du sperme. En corollaire, ce traitement verra son effet sur la qualité du sperme se manifester au-delà de la période d'administration. Pour chacun des deux groupes, nous avons donc comparé, en priorité, la valeur de base (T-0) à la moyenne des valeurs à 4 mois et à 5 mois (un mois post-traitement). Le nombre de patients étant restreint et les comparaisons portant sur des valeurs paires (chaque sujet servant de son propre témoin), nous avons utilisé le test de Wilcoxon, ou le test

de t de Student lorsque la distribution était normale. Les patients pour lesquels la valeur à quatre mois n'était pas disponible n'ont pas été inclus dans l'analyse. Les données résumant les résultats des analyses statistiques pour les paramètres du sperme de chaque groupe sont présentés aux tableaux II et III. Les résultats pour chaque donnée individuelle sont présentés en annexes I à XII.

Pour l'ensemble des patients, l'âge variait de 30 à 42 ans (médiane = 33 ans). Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre le groupe placebo et le groupe supplémenté quant à l'âge des patients eux-mêmes ($p = 0,535$), l'âge des conjointes ($p = 0,697$) ainsi que le nombre de mois d'infertilité ($p = 0,565$).

5.3.2 Paramètres du spermogramme

5.3.2.1 Volume du sperme (Annexe I)

Nous n'avons observé que des variations minimales des moyennes du volume de sperme durant l'étude. Dans les deux groupes, la valeur moyenne à T-0 n'était pas différente de la moyenne des valeurs à T-4 et A-1 (groupe placebo: 3,1 mL; groupe supplémenté: 2,8 mL).

Un seul patient (PM-005) du groupe placebo a montré de façon constante un volume de sperme inférieur 2 mL. Chez ce patient, ce faible volume pourrait être dû à une prostatite ou une vésiculite chronique, deux maladies reconnues pour causer des baisses du volume du sperme ainsi que de la numération et de la motilité des spermatozoïdes (Ochsendorf, 1999). En effet, aux visites T-2 et T-3 de l'étude, le sujet a présenté une augmentation importante du nombre de leucocytes dans le sperme, tel que révélé par la technique de coloration Wright-Hématoxyline, phénomène qui s'est amélioré aux visites T-4 et A-1. Du fait qu'une production importante de RLO par les leucocytes est susceptible d'endommager l'ADN des spermatozoïdes et ainsi augmenter son degré de fragmentation, nous n'avons pas inclus dans les analyses statistiques les valeurs à T-2 et T-3 du sujet PM-005. Ces données figurent entre parenthèses dans les tableaux de résultats dans les annexes I-XII. Quant au patient PM-017, il présentait des valeurs de base normales à t-0a, t-0b, mais des valeurs sous la normale durant la prise du placebo. Dans le groupe supplémenté, les patients PM-007 et PM-020 ont présenté des valeurs de base légèrement inférieures à 2 mL alors que le volume fluctuait autour de la normale aux autres visites.

5.3.2.2 Numération des spermatozoïdes (Annexe II)

Dans le groupe placebo (n = 11), la médiane de la numération est passée de $53,0 \times 10^6/\text{mL}$ en T-0 à $47,5 \times 10^6/\text{mL}$ en T-4/A-1, une différence non significative. Un seul patient (PM-005) de ce groupe a vu sa numération augmenter en T-4/A-1; tel que mentionné plus haut, ce patient a présenté une leucocytospermie importante en T-2 et T-3, mais des valeurs beaucoup plus faibles en T-4 et A-1. Il est probable que cette « guérison » ait libéré les voies spermatiques, d'où l'amélioration de la numération (Malallah et Zissis, 1992). Pour le groupe supplémenté (n = 8), la médiane est passée de $50,0 \times 10^6/\text{mL}$ en T-0 à $69,0 \times 10^6/\text{mL}$ en T-4/A-1, une augmentation de la numération qui est statistiquement significative. Notons que les moyennes arithmétiques en T-4 et A-1 pour le groupe supplémenté exagèrent cette augmentation (Annexe II): en effet, à cause de valeurs manquantes, trois patients présentant des valeurs faibles ne sont pas représentés dans les calculs en T-4 et A-1. Seule une analyse sur valeurs paires permet d'apprécier l'augmentation réelle de la numération calculée à 38 %.

5.3.2.3 Motilité des spermatozoïdes (Annexes III-IV)

Pour évaluer la motilité, une période de 2 heures post-éjaculation est le temps le plus souvent utilisé en clinique; nous avons concentré notre analyse sur cette mesure. Dans le groupe placebo, la médiane du pourcentage de motilité était de 26,0 % en T-0, et de 37,0 % en T-4/A-1; une différence non statistiquement significative. Dans le groupe supplémenté, la valeur base de la motilité en T-0 était de 30,5 %, ce pourcentage a augmenté de façon significative à 41,0 % en T-4/A-1. Dans ce groupe supplémenté, la médiane du nombre de spermatozoïdes motiles par mL (numération x pourcentage de motilité) est passée de $14,0 \times 10^6/\text{mL}$ à $29,0 \times 10^6/\text{mL}$. Ce même paramètre est resté inchangé dans le groupe placebo. Quant aux valeurs obtenues à 30 minutes et à 6 heures les analyses statistiques n'ont démontré aucune différence significative entre les deux groupes (groupe placebo: $p = 0,608$; $p = 0,739$; groupe supplémenté: $p = 0,684$; $p = 0,942$).

5.3.2.4 Morphologie des spermatozoïdes (Annexe VI)

Afin de classer les spermatozoïdes comme normaux ou anormaux, nous avons utilisé les critères morphologiques de l'OMS (WHO, 1999) après coloration au Wright-Hématoxyline. Cette technique permet aussi de bien reconnaître les cellules immatures et les leucocytes. Dans le groupe placebo, la médiane du pourcentage de spermatozoïdes normaux était de 42,2 % en

T-0, et de 41,9 % en T-4/A-1; une différence non statistiquement significative. Dans le groupe supplémenté, les valeurs correspondantes étaient de 45,5 % et 43,1 % en T-4/A-1.

5.3.2.5 Autres composantes du sperme (Annexes VII et VIII)

Le sperme peut contenir plusieurs types de cellules immatures de la lignée germinale, leur présence indique souvent une anomalie de la spermatogenèse. Quant aux leucocytes, leur présence en grand nombre signe habituellement un phénomène inflammatoire ou infectieux d'une des structures de l'appareil génital mâle. Pour ces deux types de cellules, nous n'avons observé aucune différence significative tant chez les sujets du groupe placebo et ceux du groupe supplémenté ($p = 0,935$; $p = 0,536$). De plus, chez la quasi totalité des sujets, la concentration en leucocytes dans le sperme était faible, sauf chez le sujet PM-005.

5.3.3 Fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes (Annexe IX)

Afin de déterminer si un supplément diététique en vitamine E et sélénium peut améliorer l'intégrité de la chromatine des spermatozoïdes, nous avons évalué la fragmentation de l'ADN à l'aide de la technique TUNEL. La mesure du degré de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes serait un paramètre plus fidèle de la fertilité masculine que les données du spermogramme. Lors de l'analyse des histogrammes, nous avons remarqué que la courbe de distribution en fonction de l'intensité de fluorescence présentait une forme non-symétrique; nous avons donc utilisé la médiane pour représenter les valeurs de fragmentation.

Dans le groupe placebo, la valeur moyenne des médianes de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes était de 3,9 unités de fluorescence ($\pm 1,6$) en T-0, et de 4,5 unités de fluorescence ($\pm 2,4$) en T-4/A-1. Pour le groupe supplémenté, la valeur base de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes en T-0 était de 5,9 unités de fluorescence ($\pm 2,4$), et de 4,5 unités de fluorescence ($\pm 2,2$) en T-4/A-1.

Tableau II: Sommaire des analyses statistiques pour les paramètres du sperme du groupe placebo

Paramètres du sperme	Valeur initiale	Valeur finale	p
Numération (10 ⁶ /mL)	53,0 [18,6-59,9]	47,5 [19,1-70,1]	0,765
Mobilité des spermatozoïdes (%)	26,0 [21,5-36,7]	37,0 [28,9-46,7]	0,232
Spermatozoïdes normaux (%)	42,2 [36,2-52,7]	41,9 [38,9-49,7]	0,796
Concentration en spermatozoïdes motiles (10 ⁶ spermatozoïdes motiles/mL)	16 [4-20]	17 [8-27]	0,129
Fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes (moyenne des valeurs médianes)	3,9 ± 1,6	4,5 ± 2,2	0,343

[interquartile]; valeur initiale: T-0; valeur finale: moyenne de T-4 et A-1; valeur de p < 0,05

Tableau III: Sommaire des analyses statistiques pour les paramètres du sperme du groupe supplémenté

Paramètres du sperme	Valeur initiale	Valeur finale	p
Numération (10 ⁶ /mL)	50,0 [25,7-97,2]	69,0 [48,5-139,5]	0,016*
Mobilité des spermatozoïdes (%)	30,5 [19,5-39,0]	41,0 [30,0-49,5]	0,008*
Spermatozoïdes normaux (%)	45,5 [29,1-47,9]	43,1 [31,8-51,2]	0,435
Concentration en spermatozoïdes motiles (10 ⁶ spermatozoïdes motiles/mL)	14 [4-29]	29 [18-58]	0,008*
Fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes (moyenne des valeurs médianes)	5,9 ± 2,4	4,5 ± 2,2	0,419

[interquartile]; valeur initiale: T-0; valeur finale: moyenne de T-4 et A-1; * p < 0,05

5.3.4 Peroxydation des lipides par les RLO

Le malondialdéhyde (MDA) est un des métabolites produits lors de la peroxydation des lipides. Son dosage sérique permet d'évaluer le degré de stress oxydatif. Nous n'avons observé aucune différence significative entre les deux groupes (p = 0,576). Les données se répartissaient comme suit: des valeurs entre 0,71 et 2,91 µM chez les sujets du groupe placebo, et entre 0,68 et 4,15 µM chez les sujets supplémentés (Annexe X).

5.3.5 Concentrations en vitamines E et C

Les dosages sériques de la vitamine E nous ont permis d'une part de vérifier la prise adéquate des comprimés de vitamine E et sélénium par les sujets du groupe supplémenté durant la période de traitement. Dans le groupe placebo, la médiane de la concentration en vitamine E était de 11,7 $\mu\text{mol/L}$ en T-0, et de 12,2 $\mu\text{mol/L}$ en T-4/A-1; le placebo n'a donc pas d'effet sur la concentration en vitamine E. Dans le groupe supplémenté, la valeur correspondante en T-0 était de 12,3 $\mu\text{mol/L}$, avec une augmentation significative à 19,8 $\mu\text{mol/L}$ en T-4/A-1. La figure 1 présente les concentrations sériques en vitamine E chez les sujets sous placebo ou supplément en fonction du nombre de mois de traitement. Ces données confirment l'observance du traitement par les sujets du groupe supplémenté, et donne l'assurance que les sujets du groupe placebo n'ont pas utilisé de supplément à base de vitamine E.

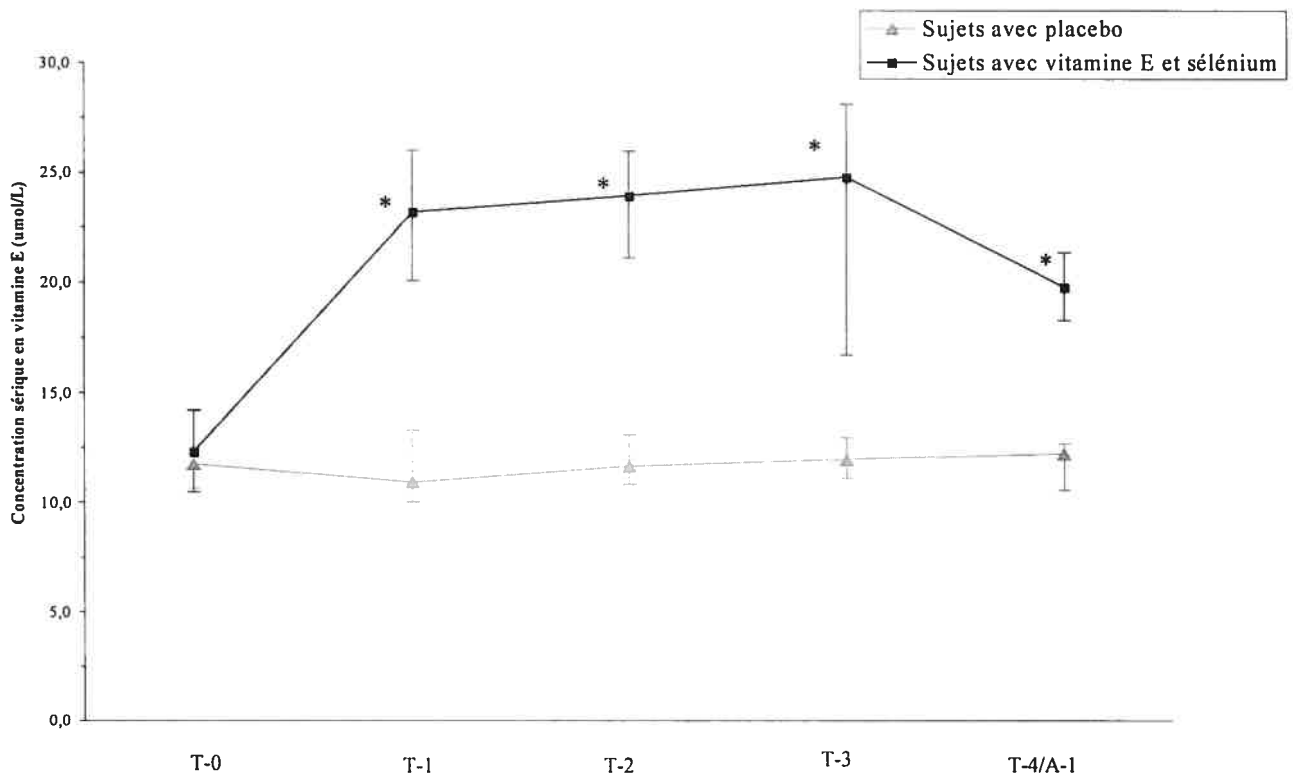


Figure 1: La concentration sérique en vitamine E en fonction du nombre de mois de traitement chez les sujets ayant reçu le supplément en vitamine E et sélénium ou le placebo. * $p < 0,05$

La vitamine C jouant un rôle antioxydant, sa concentration dans le sérum et le sperme reflète le statut antioxydant des sujets, d'où son intérêt dans la présente étude. Dans le groupe placebo, la concentration sérique médiane était de 10,1 $\mu\text{g/mL}$ en T-0 et de 7,03 en T-4/A-1, une diminution statistiquement significative ($p = 0,024$). Dans le groupe supplémenté, la concentration médiane à T-0 était de 10,3 $\mu\text{g/mL}$ et de 7,9 en T-4/A-1, une différence non-significative ($p = 0,055$). La figure 2 présente les concentrations sériques en vitamine C en fonction du nombre de mois de traitement chez les sujets des groupes placebo et supplément.

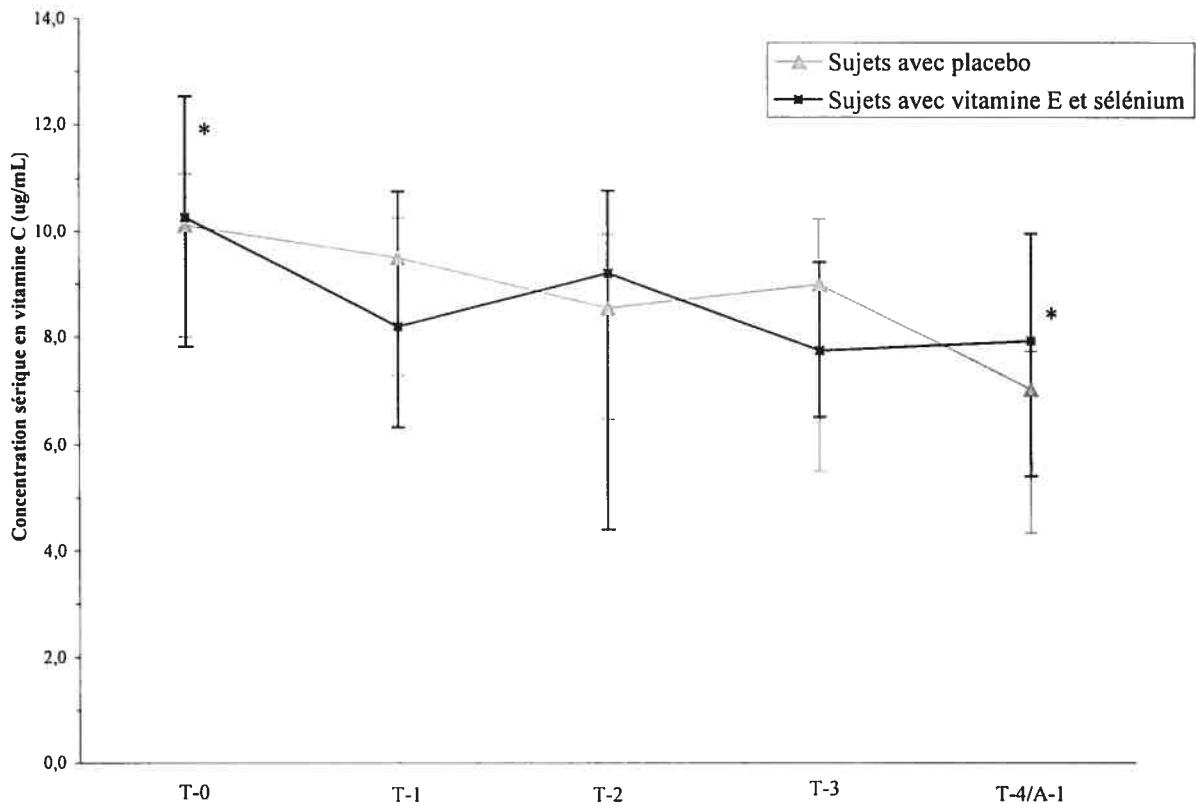


Figure 2: La concentration sérique en vitamine C en fonction du nombre de mois de traitement chez les sujets ayant reçus le supplément en vitamine E et sélénium et le placebo.

* Placebo: T-0 vs T-4/A-1: $p < 0,05$

Tel que déjà rapporté, les concentrations en vitamine C dans le sperme sont beaucoup plus élevées que dans le sérum. Dans le groupe placebo, la concentration initiale médiane était de 73,1 $\mu\text{g/mL}$ et au temps final de 75,0 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,240$). Chez les sujets du groupe supplémenté, elles étaient de 91,8 $\mu\text{g/mL}$ au T-0 et de 82,9 $\mu\text{g/mL}$ au T-4/A-1 ($p = 0,945$) (Annexe XI).

5.3.6 Concentration en cotinine (Annexe XII)

Les dosages sériques de cotinine, un métabolite de la nicotine, nous ont permis d'évaluer le degré d'exposition à la fumée de cigarette. Malgré que la majorité des sujets soient des non-fumeurs, le risque d'avoir des sujets dit « fumeurs passifs » était possible. On peut noter que très rarement des non-fumeurs montrent des valeurs très basses en cotinine. Il s'agit de la consommation occasionnelle d'une cigarette ou de l'exposition à de la fumée secondaire. Chez les fumeurs, les valeurs élevées confirment leur tabagisme, avec un arrêt chez le cas PM-002.

5.4 Discussion

De très nombreuses études *in vitro* ont démontré que des antioxydants tels les vitamines E et C et le glutathion exercent des effets bénéfiques sur les spermatozoïdes. Ces effets se manifestent, entre autres, par une inhibition de la peroxydation des lipides membranaires (Geva et coll., 1996) et une protection de l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes (Hugues et coll., 1998). Ils peuvent aussi prévenir la perte de motilité des spermatozoïdes causée par les leucocytes et maintenir leur capacité à fusionner avec l'ovocyte (Parinaud et coll., 1997).

Il devenait donc prometteur de développer des protocoles de recherche clinique visant à améliorer la fertilité masculine grâce aux antioxydants. Diverses combinaisons d'antioxydants, à différentes doses et durées d'utilisation, ont ainsi été testées. Alors que des améliorations significatives de la qualité du sperme aient été obtenues dans certains cas, aucun de ces protocoles n'a démontré son efficacité à augmenter le taux de grossesse chez des couples infertiles (Agarwal et coll., 2004).

Dans le présent travail, nous avons mesuré l'effet d'un supplément diététique en vitamine E (400 mg/jour) et sélénium (200 µg/jour) sur les paramètres du sperme d'hommes de couples infertiles. Nous avons aussi étudié l'effet de ce supplément sur l'ADN des spermatozoïdes en utilisant la technique TUNEL. Nous avons évalué le statut antioxydant de ces sujets en dosant les vitamines E et C ainsi que le malondialdéhyde, un produit de la peroxydation de lipides. Sachant que le tabagisme a un effet nocif sur la santé, nous avons également estimé l'exposition des sujets à la fumée de cigarettes en mesurant le taux sérique de cotinine, un métabolite de la nicotine.

5.4.1 Effet d'un supplément diététique en vitamine E et sélénium

5.4.1.1 Paramètres du spermogramme

Nos données montrent qu'un supplément diététique en vitamine E (400 mg/jour) et sélénium (200 µg/jour) administré à des hommes de couples infertiles durant une période de 4 mois améliore de façon statistiquement significative la concentration de spermatozoïdes motiles. Une telle augmentation n'a pas été observée dans le groupe recevant le placebo. De plus, ce résultat corrobore ceux de Vézina et coll. (1996), lesquels ont rapporté qu'un même traitement pour une

période de 6 mois améliorerait de manière significative la motilité, la morphologie et la viabilité des spermatozoïdes chez des hommes infertiles. Notons que cette dernière étude ne comportait pas de groupe témoin, laissant planer le doute d'un effet placebo. Plus récemment, une amélioration de la motilité des spermatozoïdes a aussi été observée suite à 3 mois d'un supplément diététique de 400 mg de vitamine E et de 225 µg de sélénium chez des volontaires sains et des sujets infertiles (Keskes-Ammar et coll., 2003).

Sur la base des études contrôlées par placebo, il appert que la combinaison vitamine E et sélénium soit plus efficace que la vitamine E seule. En effet, Kessopoulou et coll. (1995) n'ont observé aucun changement significatif des paramètres conventionnels du spermogramme après un traitement avec la vitamine E (600 mg/jour) durant une période de 3 mois. Il est cependant possible que la durée de traitement, trop courte à notre avis, n'ait pas permis l'amélioration souhaitée. Ainsi, Suleiman et coll. (1996) ont observé qu'un traitement pendant six mois avec la vitamine E améliorerait la motilité de spermatozoïdes chez 60% des sujets atteints d'asthénoszoospermie. Nous croyons que la combinaison de différents antioxydants dans le traitement de l'infertilité masculine semble être plus favorable. En effet, la présence de plusieurs mécanismes pour contrecarrer le stress oxydatif dans l'appareil génital masculin indique que plusieurs antioxydants sont nécessaires à la défense contre les RLO (Agarwal et Saleh, 2002). En général, une supplémentation diététique avec un seul antioxydant s'applique dans les cas de carence unique démontrée par analyse.

Nos résultats et ceux de la littérature suggèrent donc qu'un supplément diététique de vitamine E et sélénium en combinaison durant une période de 4 à 6 mois serait un protocole optimal pour améliorer la qualité des paramètres du sperme chez des hommes de couples infertiles.

Dans cette définition de conditions optimales, il faut retenir qu'une concentration en RLO est nécessaire pour le contrôle physiologique des fonctions du spermatozoïde (de Lamirande et coll., 1993) et des doses massives d'antioxydants pourraient altérer ou nuire à ce processus. En conséquence, les concentrations minimale et maximale en antioxydants qui n'agissent pas comme pro-oxydant ou qui ne modifient le pouvoir fécondant des spermatozoïdes devront être déterminées par des expériences *in vitro*.

5.4.1.2 Fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes

La mesure de l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes est un paramètre important: des bris dans l'ADN peuvent induire des mutations communément observées dans des oncogènes mutés, des gènes suppresseurs de tumeurs et des gènes du développement. La fécondation par un spermatozoïde porteur d'un ADN endommagé peut favoriser la transmission paternelle de gènes compromettant le développement embryonnaire normal (Ahmadi et Ng, 1999).

Seulement deux études ont évalué l'effet d'un supplément diététique en antioxydants sur le taux de dommages oxydatifs de l'ADN des spermatozoïdes. Kodama et coll. (1997) ont observé qu'une combinaison orale de 200 mg de vitamine E et de 400 mg de GSH durant une période de 2 mois diminue de manière significative les dommages à l'ADN des spermatozoïdes, cet effet a été attribué aux concentrations sériques élevées de ces antioxydants. Aussi, une combinaison orale de vitamines A et E (180 mg), de N-acétyl-cystéine (600 mg) et d'acides gras essentiels durant 6 mois diminue le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes (Comhaire et coll., 2000).

Dans le présent travail, nous n'avons pas observé une telle diminution de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes. À notre avis, cette différence s'explique par le fait que ces deux études ont utilisé la technique de dosage du 8-hydroxy-2'-désoxyguanine (8-OHdG), alors que nos données ont été obtenues grâce à la technique TUNEL. Notons que la technique de dosage du 8-OH-dG (Shen et coll., 1999), laquelle mesure un produit de dégradation de l'ADN, est sujette aux artéfacts d'oxydation des bases azotées.

D'autre part, il est possible que la technique TUNEL ne soit pas assez sensible pour détecter une très faible amélioration de l'intégrité de l'ADN. En effet, la technique TUNEL était originellement destinée à la détection de fragments d'ADN résultant de l'apoptose dans les cellules somatiques où des fragments d'ADN d'environ 200 paires de base sont générés par les endonucléases (Levy et Seifer-Aknin, 2001). Un des problèmes majeurs de cette technique réside dans l'état extrêmement condensé de l'ADN des spermatozoïdes engendré par le remplacement des histones par les protamines. Nos résultats pourraient donc sous-estimer la fragmentation selon le degré de compaction de l'ADN des spermatozoïdes. Seule une étude chez un très grand nombre de sujets permettra d'établir s'il existe une corrélation entre la fragmentation de l'ADN et la survenue de grossesses chez les conjointes.

5.4.1.3 Peroxydation des lipides par les RLO

Nous avons évalué le statut oxydatif des sujets en mesurant la concentration sérique en malondialdéhyde (MDA), un marqueur de la peroxydation des lipides. Selon Nielsen et coll. (1997), la concentration sérique moyenne en MDA chez des hommes âgés entre 20-79 ans serait de 1,29 $\mu\text{mol/L}$ (IC_{90} :1,14; 1,53). Nos résultats sont en accord avec cette donnée, la concentration sérique moyenne en MDA est de 1,35 $\mu\text{mol/L}$ (IC_{90} :0,76; 1,94). Tous les sujets de notre étude avaient donc un statut oxydatif normal.

Suleiman et coll. (1996) ont rapporté des taux de MDA dans le sperme significativement plus élevés lorsque la motilité des spermatozoïdes était faible. En rétrospective, notre étude aurait eu avantage à inclure des dosages de MDA dans le sperme.

De plus, nous croyons qu'un supplément diététique administré à des sujets avec un spermogramme anormal aurait augmenté les chances d'observer des effets bénéfiques. Dans notre étude, 19 des 25 sujets présentaient un spermogramme normal. Par rapport au statut oxydatif, le tabagisme représente un des principaux facteurs de risque: la fumée de cigarette contient de nombreuses substances oxydantes, mutagènes et cancérigènes qui augmentent le taux de peroxydation des lipides, avec possiblement des effets indésirables sur la fertilité masculine (Sepaniak et coll., 2004). À cet égard, il sera intéressant d'étudier la réponse à la supplémentation spécifiquement chez des fumeurs présentant un stress oxydatif.

5.4.1.4 Concentrations en vitamines E et C

Selon nos résultats, la médiane des concentrations sériques en vitamine E à T-0 chez les deux groupes (groupe supplémenté: 12,3 $\mu\text{mol/L}$; groupe placebo: 11,7 $\mu\text{mol/L}$) sont plus élevées que celles obtenues par Vézina et coll. (1984) (7,8 $\mu\text{mol/L}$). Les critères de sélection des sujets pourraient, selon nous, expliquer cette différence: ces auteurs ont étudié des sujets présentant à la fois de l'oligozoospermie, de l'asthénozoospermie et de la tératospermie. Or, Omu et coll. (1999) ont observé que les sujets normospermiques avaient une concentration sérique en vitamine E plus élevée (20,0 $\mu\text{mol/L}$) que ceux atteints d'oligozoospermie (10,0 $\mu\text{mol/L}$) ou d'asthénozoospermie (9,0 $\mu\text{mol/L}$). Selon ces auteurs, ces variations pourraient s'apparenter à la déplétion en activité antioxydante des spermatozoïdes anormaux, ceci en relation avec une production accrue de RLO.

Les dosages par HPLC ont montré que les concentrations sériques en vitamine E ont significativement augmenté chez les sujets du groupe supplémenté. Ceci a également été rapporté par Vézina et coll. (1996) sur une période de traitement de 6 mois avec les mêmes antioxydants; ils ont de plus observé une augmentation de la concentration en vitamine E dans le sperme et le liquide. Par contre, Ford et Whittington (1998) n'ont pas détecté cette augmentation de la concentration en vitamine E dans le liquide séminal après une période de traitement de 3 mois à une dose quotidienne en vitamine E de 400 mg. À notre avis, le choix de la posologie d'antioxydants ainsi que la durée de traitement semblent critiques pour influencer les concentrations sériques et séminales de vitamines E et C.

De façon inattendue, nous avons observé une diminution significative de la concentration en vitamine C dans le groupe placebo et une tendance à la baisse (non-significative) dans le groupe supplémenté. Cette différence pourrait résulter de variations saisonnières. En effet, la majorité des sujets ont débuté l'étude en novembre ou décembre et que l'ont complété en mai ou juin. Par conséquent, la diète pourrait expliquer cette diminution (Loh et Wilson, 1973): à l'automne, les fruits et les légumes consommés sont plus frais et contiennent une teneur plus élevée en vitamines, telle la vitamine C que ceux disponibles en mai.

6. DISCUSSION GÉNÉRALE

La réalisation de ces projets de recherche nous permis d'abord de démontrer que la chromatine des spermatozoïdes chez les fumeurs semble plus vulnérable à des conditions stressantes, telle la congélation, que celle des non-fumeurs. Devant ce résultat, le deuxième projet de recherche a été élaboré afin d'évaluer l'effet protecteur d'une supplémentation en vitamine E et sélénium sur l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes. En introduction, nous avons décrit les différentes techniques utilisées pour la mesure de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes; dans cette étude pilote, nous avons évalué l'intégrité de l'ADN grâce à la technique TUNEL. Nos résultats ont démontré qu'un tel supplément diététique ne diminue pas le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, cependant il augmente la concentration en spermatozoïdes mobiles. Jusqu'à date, la littérature ne rapporte aucun traitement avec antioxydants démontré comme efficace pour améliorer l'intégrité de l'ADN.

Malgré toutes les données récentes sur la structure de l'ADN des spermatozoïdes et les nouvelles techniques diagnostiques, aucune solution thérapeutique ne peut être offerte dans le cas d'un résultat élevé du taux de fragmentation de l'ADN. Il est important de souligner que la qualité de l'ADN des spermatozoïdes joue un rôle primordial dans le développement embryonnaire, et ce dès que le développement n'est plus sous le contrôle direct des transcrits maternels. Il peut survenir à compter de ce moment un arrêt du développement de l'embryon si le spermatozoïde impliqué dans la fécondation avait un génome endommagé (Guérin et Benchaïd, 2004). Une évaluation adéquate de la qualité de l'ADN des spermatozoïdes devrait donc figurer comme élément primordial lors des AMP.

Cependant, les différents tests utilisés dans l'évaluation de la chromatine présentent tous des limites. En effet, ils permettent de considérer seulement une cellule à la fois selon un mode binaire: chromatine intacte ou altérée. Il s'avère donc impossible de donner un niveau moyen de dégradation de l'ADN au sein d'une population de spermatozoïdes. De plus, les méthodes d'évaluation de la chromatine ne conservent pas aux spermatozoïdes leur viabilité. Par conséquent, ces derniers bien caractérisés ne peuvent être utilisés pour les AMP.

Malgré tous les développements récents dans ce domaine, et tous les tests appliqués aux spermatozoïdes, il importe de toujours interpréter les résultats avec prudence et nuance. Ainsi,

dans le cas d'un résultat élevé du taux de fragmentation de l'ADN, il serait inopportun de conclure en aucune chance de grossesse et de mettre un terme aux tentatives d'AMP. Une publication récente (Bungum et coll., 2004) rapporte des grossesses à terme obtenues par FIV ou ICSI malgré des taux de fragmentation élevés de l'ADN des spermatozoïdes. Devant l'absence d'un traitement curatif chez les hommes confrontés à ce problème, un changement de certaines habitudes de vie pourrait, dans une certaine mesure, contribuer à ne pas aggraver ce pourcentage de fragmentation de l'ADN. On parle ici de l'arrêt du tabagisme, d'une consommation modérée d'alcool, éviter d'exposer les parties génitales à la chaleur et l'évitement de l'exposition aux produits chimiques ou aux radiations (Hirsh et coll., 2003). En effet, tel que souligné dans l'introduction de ce mémoire, ces différents agents s'avèrent délétères pour la spermatogenèse.

Depuis 1978 (naissance du premier « bébé éprouvette »), la procréation médicalement assistée a enregistré des progrès majeurs, et un pas de géant avec l'arrivée de la technique ICSI pour le traitement de l'infertilité masculine. Cependant, chez des sujets infertiles dont le taux de fragmentation de l'ADN est élevé, défier ainsi les lois de la nature risque d'engendrer des conséquences désastreuses telle la transmission de défauts génétiques à la descendance. Cette possibilité est bien réelle car l'ICSI permet souvent de « forcer » la fécondation, en dépit de caractéristiques anormales de la chromatine. Ce risque pourrait être minimisé moyennant une technologie qui permettrait de sélectionner des spermatozoïdes dont l'ADN est normal. Des efforts sont aussi déployés vers une meilleure compréhension des mécanismes de contrôle de la spermatogenèse, ouvrant de nouvelles perspectives pour prévenir ou réparer les brèches de l'ADN des spermatozoïdes.

7. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le tabagisme et le stress oxydatif qu'il engendre représentent des menaces graves à la santé. Malgré de nombreuses divergences, les données de la littérature suggèrent que l'homme serait moins affecté dans sa santé reproductive que la femme. Néanmoins, des modifications subtiles et difficilement détectables des spermatozoïdes chez les fumeurs pourraient avoir des conséquences désastreuses pour la fertilité et le début du développement embryonnaire, lequel nécessite l'expression de gènes paternels.

Nos résultats indiquent que le degré de dommages à l'ADN des spermatozoïdes de fumeurs n'est pas significativement différent de celui des non-fumeurs. Cependant, ce matériel génétique serait moins bien protégé chez les fumeurs, donc plus susceptible de dommages lors de techniques d'assistance médicale à la procréation.

La solution à tous ces problèmes est aussi simple qu'évidente: arrêter de fumer. Force est toutefois d'admettre que la dépendance s'avère difficile à vaincre dans bien des cas. Chez certains couples infertiles, il y a donc un besoin de pouvoir offrir à des fumeurs un traitement susceptible d'améliorer leur fertilité et de contribuer à prévenir des défauts d'embryogenèse, dû à un génome paternel endommagé, pouvant être responsables de certains avortements spontanés.

Nous avons évalué l'efficacité d'un tel traitement sous la forme d'une supplémentation en vitamine E et sélénium chez des non-fumeurs. Des résultats d'une étude pilote ont montré que ce traitement augmente le nombre de spermatozoïdes mobiles. Nous proposons dans nos prochaines études cliniques qu'une telle supplémentation soit offerte à des patients fumeurs, particulièrement ceux présentant un stress oxydatif ou un degré élevé de fragmentation de l'ADN. De plus, dans une prochaine étude à double insu, le suivi des couples devrait inclure une évaluation des taux de grossesse basée sur le dosage de l'hormone hCG afin de mieux détecter les cas d'avortements spontanés. La supplémentation en vitamine E et sélénium n'a causé aucun effet indésirable, ce qui est un avantage marqué. Elle pourrait également être offerte dans une étude similaire portant sur des patients non-fumeurs et présentant les mêmes types d'anomalies.

Bibliographie

Agarwal A., Nallella K.P., Allamaneni S.S. et coll. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod. Biomed. Online*. 2004; 8: 616-627.

Agarwal A. et Said T.M. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU Int*. 2005; 95: 503-507.

Agarwal A et Saleh R.A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol. Clin. North. Am.* 2002; 29: 817-827.

Ahmadi A. et Ng S.C. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 1999; 284: 696-704.

Aitken R.J. The amoroso lecture. The human spermatozoon - a cell in crisis? *J. Reprod. Fertil.* 1999; 115: 1-7.

Aitken R.J., Buckingham D.W., Carreras A. et coll. Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. *Free Radical Biol. Med.* 1996; 21: 495-504.

Aitken R.J. et Clarkson J.S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1987; 81: 459-469.

Aitken R.J. et Clarkson J.S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J. Androl.* 1988; 9: 367-376.

Aitken R.J., Clarkson J.S. et Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol. Reprod.* 1989a; 40: 183-197.

Aitken R.J., Clarkson J.S., Hargreave T.B. et coll. Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *J. Androl.* 1989b; 10: 214-220.

Aitken R.J. et Fisher H. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays*. 1994; 16: 259-267.

Aitken R.J. et Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reprod.* 2001; 122: 497-506.

Aitken R.J., Krausz C. et Buckingham D. Relationship between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions. *Mol. Reprod. Dev.* 1994; 39: 268-279.

Aitken R.J. et West K.M. Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *Int. J. Androl.* 1990; 13: 433-451.

Alvarez J.G. et Storey B.T. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss motility. *Biol. Reprod.* 1983; 29: 548-555.

Alvarez J.G. et Storey B.T. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gam. Res.* 1989; 23: 77-90.

Alvarez J.G. et Storey B.T. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 1995; 42: 334-336.

Alvarez J.G., Touchstone J.C., Blasco L. et Storey B. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: superoxide dismutase as a major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J. Androl.* 1987; 8: 338-348.

Armstrong J.S., Rajasekaran M., Chamulitrat W. et coll. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* 1999; 26: 869-880.

Barroso G., Morshedi M. et Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 2000; 15: 1338-1344.

Bedford J.M. Effects of duct ligation on the fertilizing ability of spermatozoa from different regions of the rabbit epididymis. *J. Exp. Zool.* 1967; 166: 271-281.

Behne D., Gessner H., Wolters G. et coll. Selenium, rubidium and zinc in human semen and semen fractions. *Int. J. Androl.* 1988; 11: 415-423.

Behne D., Kyriakopoulos A., Kalckloesch M. et coll. Two new selenoproteins found in the prostatic glandular epithelium and in the spermatid nuclei. *Biomed. Environ. Sci.* 1997; 10: 340-345.

Belcheva A., Ivanova-Kicheva M., Tzvetkova P. et Marinov M. Effects of cigarette smoking on sperm plasma membrane integrity and DNA fragmentation. *Int. J. Androl.* 2004; 27: 296-300.

Benchaïd M., Braun V., Lornage J. et coll. Sperm DNA fragmentation decrease the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum. Reprod.* 2003; 18: 1023-1028.

Bleau G., Lemarbre J., Faucher G. et coll. Semen selenium and human fertility. *Fertil. Steril.* 1984; 42: 890-894.

Buettner G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants, lipid peroxidation, alpha-tocopherol and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993; 300: 535-543.

- Bungum M., Humaidan P., Spano M. et coll. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum. Reprod.* 2004; 19: 1401-1408.
- Burk R.F. et Hill K.E. Regulation of selenoproteins. *Ann. Rev. Nutr.* 1993; 13: 65-81.
- Calvin H.I. Selective incorporation of selenium-75 into a polypeptide of the rat sperm tail. *J. Exp. Zool.* 1978; 204: 445-452.
- Calvin H.I., Cooper G.W. et Wallace E. Evidence that selenium in rat sperm is associated with cysteine-rich structural protein of the mitochondrial capsules. *Gam. Res.* 1981; 4: 139-149.
- Caron N., Veilleux S. et Boissonneault G. Stimulation of DNA repair by the spermatidal TP1 protein. *Mol. Reprod. Dev.* 2001; 58: 437-443.
- Doull J. Casarett et Doull's toxicology: the basic science of poisons. 6th edition, McGraw Hill, Kansas City, Kansas, 1999, 1236p.
- Chaudiere J, Wilhelmsen E.C. et Tappel A.L. Mechanism of selenium-glutathione peroxidase and its inhibition by mercaptocarboxylic acids and other mercaptans. *J. Biol. Chem.* 1984; 259:1043-1050.
- Cohen P.E. et Pollard J.W. Cytokines and growth factors in reproduction. IN Bronson, R. (ed.), *Reproductive Immunology 1995*, Blackwell Science, Cambridge, MA.
- Comhaire F.H., Christophe A.B., Zalata A.A. et coll. The effects of combined conventional treatment, oral antioxidants and essential fatty acids on sperm biology in subfertile men. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty. Acids.* 2000; 63: 159-165.
- Comhaire F.H., Mahmoud A.M., Depuydt C.E. et coll. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. *Hum. Reprod. Update.* 1999; 5: 393-398.
- Comporti M. Three models of free radical-induced cell injury. *Chem. Biol. Interact.* 1989; 72: 1-56.
- Dadoune, J.P. The nuclear status of human sperm cells. *Micron.* 1995; 26: 323-345.
- Darzynkiewicz Z., Traganos F., Arlin Z.A. et coll. Cytofluorometric studies on conformation of nucleic acids in situ. II. Denaturation of deoxyribonucleic acid. *J. Histochem. Cytochem.* 1976; 24: 49-58.
- Davies K.J.A. Protein damage and degradation by oxygen radicals: I. General aspects. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 9895-9901.
- de Lamirande E., Eiley D. et Gagnon C. Inverse relationship between the induction of human sperm capacitation and spontaneous acrosome reaction by various biological fluids and the superoxide scavenging capacity of these fluids. *Int. J. Androl.* 1993; 16: 258-266.

- de Lamirande E. et Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J. Androl.* 1992; 13: 379-386.
- de Lamirande E. et Gagnon C. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Rad. Biol. Med.* 1995; 18: 487-495.
- de Lamirande E. et Gagnon C. The dark and bright sides of reactive oxygen species on sperm function. *The Male Gamete: From Basic Science to Clinical Applications*. Chapter 42. 1st edition, editor Claude Gagnon, Cache River Press, 1999: 455-476.
- de Lamirande E., Harakat A. et Gagnon C. Human sperm capacitation induced by biological fluids and progesterone, but not by NADH or NADPH, is associated with the production of superoxide anion. *J. Androl.* 1998; 19: 215-255.
- de Lamirande E., Jiang H., Zini A. et coll. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev. Reprod.* 1997a; 2: 48-54.
- de Lamirande E., Leclerc P. et Gagnon C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol. Hum. Reprod.* 1997b; 3: 175-194.
- De Jonge C. The clinical value of sperm nuclear DNA assessment. *Hum. Fertil.* 2002; 5: 51-53.
- De-Xiang X., Han-Ming S., Qi-Xing Z. et coll. The association among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma. *Mut. Research.* 2003; 534: 155-163.
- Doba T., Burton G.W. et Ingold K.U. Antioxydant and co-antioxydant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1985; 835: 298-303.
- Donnelly E.T., McClure N. et Lewis S.E. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. *Fertil. Steril.* 1999a; 72: 484-495.
- Donnelly E.T., McClure N. et Lewis S.E. The effect of ascorbate and alpha-tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis.* 1999b; 14: 505-512.
- Drews U. *Atlas d'embryologie*. Flammarion médecine science. 1998: 38-40.
- Duran E.H., Gurgan T., Gunalp S. et coll. A logistic regression model including DNA status and morphology of spermatozoa for predicting of fertilization in vitro. *Hum. Reprod.* 1998; 13: 1235-1239.
- Eddy E.M. Male germ cell gene expression. *Recent. Prog. Horm. Res.* 2002; 57: 103-128.
- Elzanaty S., Richthoff J., Malm J. et Giwercman A. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Hum. Reprod.* 2002; 17: 2904-2911.

Evenson, D.P., Larson K.L. et Jost L.K. 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.

Fernandez J.L., Muriel L., Rivero M.T. et coll. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J. Androl.* 2003; 24: 59-66.

Ford W.C., Whittington K. et Williams A.C. Reactive oxygen species in human sperm suspensions: production by leukocytes and the generation of NADPH to protect sperm against their effects. *Int. J. Androl.* 1997; 20: 44-49.

Ford W.C. et Whittington K. Debate: Is antioxidant therapy a promising strategy to improve human reproduction? Antioxidant treatment for male subfertility: a promise that remains unfulfilled. *Hum. Reprod.* 1998; 13: 1416-1419.

Fox S.I. *Human Physiology*, 1996, fifth edition, WCB Publishers, Dubuque, IA, USA, 704p.

Fraga C.G., Motchnik P.A., Shigenaga M.K. et coll. Acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991; 88: 11003-11006.

Fraga C.G., Motchnik P.A., Wyrobek A.J. et coll. Smoking and low antioxidants levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat. Res.* 1996; 351: 199-203.

Fuentes-Mascorro G., Serrano H. et Rosado A. Sperm chromatin. *Arch. Androl.* 2000; 45: 215-225.

Fujii J., Iuchi Y., Matsuki S. et Ishii T. Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. *Asian J. Androl.* 2003; 5: 231-242.

Gavella M. et Lipovac V. NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men. *Arch. Androl.* 1992; 28: 135-141.

Gavella M., Lipovac V. et Sverko V. Superoxide anion production and some sperm-specific enzyme activities in infertile men. *Androl.* 1995; 27: 7-12

Gavrieli Y., Sherman Y. et Ben-Sasson S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell. Biol.* 1992; 119: 493-501.

Geva E., Bartoov B., Zabludovsky N. et coll. The effect of antioxidant treatment on human spermatozoa and fertilization rate in an in vitro fertilization program. *Fertil. Steril.* 1996; 66: 430-434.

Gil-Guzman E., Ollero M., Lopez M.C. et coll. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum. Reprod.* 2001; 16: 1922-1930.

Gomez E., Buckingham D.W., Brindle J. et coll. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative. *J. Androl.* 1996; 17: 276-287.

- Goodman Gilman A., Hardman J.G et Limbird L.E. The pharmacological basis of therapeutics. 9th Edition. McGraw Hill, Nashville, Tennessee, 1996, 1905p.
- Gorczyca W., Traganos F., Jesionowska H. et Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp. Cell. Res.* 1993; 207: 202-205.
- Greaves R., Trotter L., Brennecke S. et coll. A simple high-pressure liquid chromatography cotinine assay: validation of smoking status in pregnant women. *Ann. Clin. Biochem.* 2001; 38: 333-338.
- Griveau J.F. et Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int. J. Androl.* 1997; 20: 61-69.
- Guérin J.F. et Benchaïd M. Assays for assessment of sperm DNA integrity: relationship with fertility and conceptus quality. *Gynecol. Obstet. Fertil.* 2004; 32: 799-802.
- Haines G., Marples B., Daniel P. et Morris I. DNA damage in human and mouse spermatozoa after in vitro-irradiation assessed by the COMET assay. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1998; 444: 79-91.
- Hall, P.F., Crosman, K. et Robaire, B. Testicular steroid synthesis: Organisation and regulation. *The Physiology of Reproduction. Second Edition*, Raven Press, 1994: 1335-1362.
- Halliwell B. et Gutteridge J.M.C. Free radicals in biology and medicine. Éditeurs: Clarendon Press, Oxford, 1989: 372-390.
- Hasegawa M., Zhang Y., Niibe H., et coll. Resistance of differentiating spermatogonia to radiation-induced apoptosis and loss in p53-deficient mice. *Radiat. Res.* 1998; 149: 263-270.
- Hecht N.B. The making of a spermatozoa: a molecular perspective. *Dev. Genet.* 1995; 16: 95-105.
- Hecht N.B. Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. *Bioessays.* 1998; 20: 555-561.
- Henkel R., Ichikawa T., Sanchez R. et coll. Differentiation of ejaculates showing reactive oxygen species production by spermatozoa or leukocytes. *Androl.* 1997; 29: 295-301.
- Herbert, D.C., Supakar, P.C. et Roy, A.K. Male Reproduction. *Reprod. Toxicol. Second Edition*, Raven Press, 1995: 3-21.
- Hindshaw D.B., Sklar L.A., Bohl B. et coll. Cytoskeletal and morphologic impact of cellular oxidant injury. *Am. J. Pathol.* 1986; 123: 454-464.
- Hirsh A. Male subfertility. *BJM.* 2003; 327: 669-672.
- Holland M.K., Alvarez J.C. et Storey B.T. Production of superoxide and activity of superoxide dismutase in rabbit epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 1982; 27: 1109-1118.

Host E., Lindenberg S. et Smidt-Jensen S. DNA strand breaks in human spermatozoa: correlation with fertilization in vitro in oligozoospermic men and in men with unexplained infertility. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 2000a; 79: 189-193.

Host E., Lindenberg S. et Smidt-Jensen S. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 2000b; 79: 559-563.

Hughes C.M., Lewis S.E., McKelvey-Martin V.J. et coll. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Mol. Reprod. Dev.* 1996; 2: 613-619.

Hughes C.M., Lewis S.E., McKelvey-Martin V.J. et Thompson W. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. *Hum. Reprod.* 1998; 13: 1240-1247.

Huszar G., Sbracia M., Vigue L. et coll. Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biol. Reprod.* 1997; 56: 1020-1024.

Irvine D.S., Twigg J.P., Gordon E.L. et coll. DNA integrity in human spermatozoa: relationship with semen quality. *J. Androl.* 2000; 21: 33-44.

Iwanier K. et Zachara B.A. Selenium supplementation enhances the element concentration in blood and seminal fluid but does not change the spermatozoal quality characteristics in subfertile men. *J. Androl.* 1995; 16: 441-447.

Iwasaki A. et Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa in of infertile patients. *Fertil. Steril.* 1992; 57: 409-416.

Jeulin C., Soufir J.C., Weber P. et coll. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res.* 1989; 24: 185-196.

Jones R. et Mann T. Lipid peroxidation in spermatozoa. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 1973; 184: 103-107.

Jones R. et Mann T. Lipid peroxides in spermatozoa; formation, role of plasmalogen, and physiological significance. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1976; 193: 317-333.

Jones R., Mann T. et Sherins R.J. Adverse effects of peroxidized lipid on human spermatozoa. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 1978; 201: 413-417.

Jones R., Mann T. et Sherins R.J. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal effects of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil. Steril.* 1979; 31: 531-537.

Kehrer JP et Lund LG. Cellular reducing equivalents and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 1994; 17: 65-75.

- Keskes-Ammar L., Feki-Chakroun N., Rebai T, et coll. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. *Arch. Androl.* 2003; 49: 83-94.
- Kessopoulou E., Powers H.J., Sharma K.K. et coll. A double-blind randomised placebo cross-over controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. *Fertil. Steril.* 1995; 64: 825-831.
- Kessopoulou E., Tomdison M.J., Barrat C.R.L., Bolton A.F. et Cooke D.D. Origin of reactive oxygen species in human semen: spermatozoa or leukocytes? *J. Reprod. Fertil.* 1993; 94: 463-470.
- Klaude M., Ericksson S., Nygren J et Ahnstrom G. The comet assay: mechanism and technical considerations. *Mutat. Res.* 1996; 363: 89-96.
- Kobayashi T., Miyazuki T., Natori M. et Nozawa S. Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. *Hum. Reprod.* 1991; 6: 987-991.
- Kodama H., Yamaguchi R., Fukada J. et coll. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil. Steril.* 1997; 68: 519-524.
- Koh Y.H., Yoon S.J. et Park J.W. Lipid peroxidation product mediated DNA damage and mutagenicity. *J. Biochem. Mol. Biol.* 1997; 30: 188-193.
- Kosower N.S. et Kosower E.M. Glutathione and cell membrane thiol status. *Functions of Glutathione. Biochemical, Physiological and Clinical Aspects.* Raven, New York: 307-316.
- Kovalski N.N., de Lamirande E. et Gagnon C. Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibits sperm motility: protective effect of seminal plasma and scavengers. *Fertil. Steril.* 1992; 58: 809-816.
- Kunzle R., Mueller M.D., Hanggi W. et coll. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil. Steril.* 2003; 79: 287-291.
- Kurpisz M., Miesel R., Sanocka D. et Jedrzejczak P. Seminal plasma can be a predictive factor for male infertility. *Hum. Reprod.* 1996; 11: 1223-1226.
- Lee J., Richburg J.H., Younkin S.C. et Boekelheide K. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endo.* 1997; 138: 2081-2088.
- Lei X.G., Ross D.A., Parks J.E. et Combs G.F. Effects of dietary selenium and vitamin E concentrations on phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase expression in reproductive tissues of pubertal maturing male rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 1997; 59: 195-206.
- Lenzi A., Gandini L. et Picardo M. A rationale for glutathione therapy. *Hum. Reprod.* 1998;13:1419-1422.

- Lenzi A., Picardo M., Gandini L. et coll. Glutathione treatment of dyspermia: effect on the lipoperoxidation process. *Hum. Reprod.* 1994; 9: 2044-2050.
- Levy R. et Seifer-Aknin I. Place de l'apoptose au cours de la spermatogenèse et dans le sperme éjaculé: relations avec la fécondation. *Ann. Biol. Clin.* 2001; 59: 531-543.
- Loh H.S. et Wilson C.W. Vitamin C: plasma and taste threshold circadian rhythms, their relationship to plasma cortisol. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 1973; 43: 355-362.
- Lopes S., Jurisicova A., Sun J.G. et Casper R. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 1998; 13: 896-900.
- Maas D.H.A., Storey B.T. et Mastroianni L. Hydrogen ion and carbon dioxide content of oviductal fluid of the Rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Fertil. Steril.* 1977; 28: 281-285.
- MacLeod J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *Am. J. Physiol.* 1943; 138: 512-518.
- Maione B., Pittoggi C., Achene L. et coll. Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. *DNA Cell. Biol.* 1997; 16: 1087-1097.
- Malallah Y.A. et Zissis N.P. Effect of minocycline on the sperm count and activity in infertile men with high pus cell count in their seminal fluid. *J. Chemother.* 1992; 4: 286-289.
- Manicardi G.C., Bianchi P.G., Pantano S. et coll. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A₃ accessibility. *Biol. Reprod.* 1995; 52: 864-867.
- Manicardi G.C., Tombacco A., Bizzaro D. et coll. DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assays. *Histochem. J.* 1998; 30: 33-39.
- Martin-Du Pan R.C. et Sakkas D. Are antioxidants useful in the treatment of male infertility? *Hum. Reprod.* 1998; 13: 2984-2985.
- Matsuda Y., Seki N., Utsugi-Takeuchi T. et coll. X-ray and mitomycin C (MMC) induced chromosome aberrations in spermiogenic germ cells and the repair capacity of mouse eggs for the x-ray and MMC damage. *Muta. Res.* 1989; 211: 65-75.
- Mazzilli F., Rossi T., Marchesini M. et coll. Superoxide anion in human semen related to seminal parameters and clinical aspects. *Fertil. Steril.* 1994; 62: 862-868.
- McPherson S.M. et Longo F.J. Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur. J. Histochem.* 1993a; 37: 109-128.
- McPherson S.M. et Longo F.J. Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomérase II. *Dev. Biol.* 1993b; 158: 122-130.

- Meister A. et Anderson M.E. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 1983; 52: 711-760.
- Mizuno K., Hirata S., Hoshi K. et coll. Analysis of the phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase mRNA in the rat spermatozoon and effect of selenium deficiency on the mRNA. *Biol. Trace Elem. Res.* 2000; 74: 71-79.
- Moilanen J. et Hovatta O. Excretion of alpha-tocopherol into human seminal plasma after oral administration. *Andrologia.* 1995; 27: 133-136.
- Nielsen F., Mikkelsen B.B., Nielsen J.B. et coll. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin. Chem.* 1997; 43: 1209-1214.
- Nissen H.P. et Kreysel H.W. Superoxide dismutase in human semen. *Klin. Wochenschr.* 1983; 61: 63-65.
- Ochsendorf F.R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum. Reprod. Update.* 1999; 5: 399-420.
- Ochsendorf F.R., Buhl R., Bästlein A. et coll. Glutathione in spermatozoa and seminal plasma of infertile men. *Hum. Reprod.* 1998; 13: 353-359.
- Oldereid N.B., Thomassen Y. et Purvis K. Selenium in human male reproductive organs. *Hum. Reprod.* 1998; 13: 2172-2176.
- Ollero M., Gil-Guzman E., Lopez M. et coll. Characterisation of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis of male infertility. *Hum. Reprod.* 2001; 16: 1912-1921.
- Omu A.E., Fatinikun T., Mannazhath N. et coll. Significance of simultaneous determination of serum and seminal plasma alpha-tocopherol and retinol in infertile men by high-performance liquid chromatography. *Androl.* 1999; 31: 347-354.
- Orgebin-Crist M-C. Maturation of spermatozoa in the rabbit epididymis: fertilising ability and embryonic mortality in does inseminated with epididymal spermatozoa. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 1967; 7: 373-379.
- Parinaud J., Le Lannou D., Vieitez G., et coll. Enhancement of motility by treating spermatozoa with an antioxidant solution (Sperm-Fit) following ejaculation. *Hum. Reprod.* 1997; 12: 2434-2436.
- Pasqualotto F.F., Sharma R.K. Nelson D.R. et coll. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertil. Steril.* 2000; 73: 459-464.
- Plante M., de Lamirande E. et Gagnon C. Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertil. Steril.* 1994; 62: 387-393.

- Rao B., Soyufir J.C., Martin M. et David G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gam. Res.* 1989; 24: 127-134.
- Rolf C., Cooper T.G., Yeung C.H. et coll. Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoasthenozoospermia with high-dose vitamin C and vitamin E: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Hum. Reprod.* 1999; 14: 1028-1033.
- Rotruck J.T., Pope A.L., Ganther H.E. et coll. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science.* 1973; 179: 588-590.
- Roveri A., Maiorino M., Nisii C. et Ursini F. Purification and characterization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase from rat testis mitochondrial membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1994; 1208: 211-221.
- Roy A.C., Karunanithy R. et Ratnam S.S. Lack of correlation of selenium level in human semen with sperm count/motility. *Arch. Androl.* 1990; 25: 59-62.
- Rümelin A., Fauth U. et Halmagyi M. Determination of ascorbic acid in plasma and urine by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Clin. Chem. Lab. Med.* 1999; 37: 533-536.
- Said T., Paasch U., Glander H. et Agarwal A. Role of caspases in male infertility. *Hum. Reprod. Update.* 2004; 10: 39-51.
- Sakkas D., Mariethoz E., Manicardi G.C. et coll. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev. Reprod.* 1999; 4:31-37.
- Sakkas D., Moffat O., Manicardi G.C. et coll.. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol. Reprod.* 2002; 66: 1061-1067.
- Sakkas D., Urner F., Bianchi P.G. et coll. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 1996; 11: 837-843.
- Saleh R.A., Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J. Androl.* 2002; 23: 737-52.
- Saleh R.A., Agarwal A., Kandirali E. et coll. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human sperm. *J. Androl.* 2002a; 78: 1215-1224.
- Saleh R.A., Agarwal A., Sharma R.K. et coll. Effects of cigarette smoking on levels of oxidative stress in infertile men. *Fertil. Steril.* 2002b; 78: 491-499.
- Scott R., MacPherson A., Yates R.W. et coll. The effect of oral selenium supplementation on human sperm motility. *Br. J. Urol.* 1998; 82: 76-80.
- Selley M.L., Lacey M.J., Bartlett M.R. et coll. Content of significant amounts of a cytotoxic end-product of lipid peroxidation in human semen. *J. Reprod. Fert.* 1991; 92: 291-298.

- Sepaniak S., Forges T. et Monnier-Barbarino P. Consequences of cigarette smoking on male fertility. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)*. 2005; 34: 102-111.
- Sepaniak S., Forges T. Fontaine B. et coll. Negative impact of cigarette smoking on male fertility : from spermatozoa to the offspring. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)*. 2004; 33: 384-390.
- Sergerie M., Ouhilal S., Bissonnette F. et coll. Lack of association between smoking and DNA fragmentation in the spermatozoa of normal men. *Hum. Reprod.* 2000; 15: 1314-1321.
- Sharma R. et Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urol.* 1996; 48: 835-850.
- Sharlip I.D., Jarow J.P., Belker A.M. et coll. Best practice policies for male infertility. *Fertil. Steril.* 2002; 77: 873-882.
- Sharpe R.M. Regulation of spermatogenesis. *The physiology of reproduction*. Raven Press, 1994: 1363-1434.
- Shen H.M., Chia S-E., Ni Z-Y. et coll. Detection of oxidative DNA damages in human sperm and the association with cigarette smoking. *Reprod. Endo.* 1997; 11: 675-680.
- Shen H.M., Chia S.E. et Ong C.N. Evaluation of oxidative DNA damage in human sperm and its association with male infertility. *J. Androl.* 1999; 20: 18-23.
- Shen H.M. et Ong C-N. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 28: 529-536.
- Shen Q., Leonard J.L. et Newburger P.E. Structure and function of the selenium translation element in the 3'-untranslated region of human cellular glutathione peroxidase mRNA. *RNA*. 1995; 1: 519-525.
- Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 1993; 215: 213-219.
- Sikka S.C., Rajasekaran M. et Hellstrom W.J.G. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *J. Androl.* 1995; 16: 464-468.
- Singh N.P. et Stephens R. X-ray-induced DNA double-strand breaks in human sperm. *Mutagenesis*. 1998; 13: 75-79.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R. et Schneider E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 1988; 175: 184-191.
- Sinha Hikim A.P. et Swerdloff R.S. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev. Reprod.* 1999; 4: 38-47.
- Spano M., Bonde J.P., Hjollund HI. Et coll. Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertil. Steril.* 2000; 73: 43-50.

Steele E.K., McClure N. et Lewis S. A comparison of the morphology of testicular, epididymal, and ejaculated sperm from fertile men and men with obstructive azoospermia. *Fertil. Steril.* 2000; 73: 1099-1103.

Stevens A. et Lowe J. *Histologie humaine*. Traduction française de la 2^{ème} édition anglaise. Éditeurs: De Boeck université. 1997, 408p.

Suleiman S.A., Ali M.E., Zaki Z.M. et coll. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J. Androl.* 1996; 17: 530-537.

Sun J.G., Jurisicova A. et Casper R.F. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol. Reprod.* 1997; 56: 602-607.

Takasaki N., Tonami H., Simizu A. et coll. Semen selenium and infertility. *Bull Osaka. Med. School.* 1987; 33: 87-96.

Tejada I., Mitchell J.C., Norman A. et coll. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil. Steril.* 1984; 42: 87-91.

Thibault C. et Levasseur M.C. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Éditeurs: Ellipses. Paris, 2001, 928p.

Thiele J.J., Friesleben H.J., Fuchs J. et Ochsendorf F.R. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma; determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. *Hum. Reprod.* 1995; 10: 110-115.

Thomas J., Fishel S.B., Hall J.A. et coll. Increased polymorphonuclear granulocytes in seminal plasma in relation to sperm morphology. *Hum. Reprod.* 1997; 12: 2418-2421.

Tomlinson M.J., Barratt C.L. et Cooke I.D. Prospective study of leukocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility. *Fertil. Steril.* 1993; 60: 1069-1075.

Tomlinson M.J., White A., Barratt C.L.R. et coll. The removal of morphologically abnormal sperm forms by phagocytosis: a positive role for seminal leukocytes? *Hum. Reprod.* 1992; 7: 517-522.

Twigg J., Fulton N., Gomez E. et coll. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum. Reprod.* 1998; 13: 1429-1436.

Ursini F., Heim S., Kiess M. et coll. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science.* 1999; 285: 1393-1396.

Vernet P., Aitken R.J. et Drevet J.R. Antioxidant strategies in the epididymis. *Mol. Cell. Endo.* 2004; 216: 31-39.

Vézina D., Maufette F., Roberts K.D. et Bleau G. Selenium-vitamin E supplementation in infertile men. Effects on semen parameters and micronutrient levels and distribution. *Biol. Trace Elem. Res.* 1996; 53: 65-83.

- Vinatier D., Dufour P., Subtil D. Apoptosis: a programmed cell death involved in ovarian and uterine physiology. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod Biol.* 1996; 67: 85-102.
- Vine M.F. Smoking and male reproduction: a review. *Int. J. Androl.* 1996; 19: 323-337.
- Wallace E., Cooper G.W. et Calvin H.I. Effects of selenium deficiency on the shape and arrangement of rodent sperm mitochondria. *Gamete Res.* 1983; 4: 389-399.
- Ward W.S. et Coffey D.S. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol. Reprod.* 1991; 44: 569-574.
- Watanabe T. et Endo A. Effects of selenium deficiency on sperm morphology and spermatocyte chromosomes in mice. *Mutat. Res.* 1991; 262: 93-99.
- World Health Organization (1999). WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th edn, Cambridge University Press, Cambridge, 32-68.
- Whittington K. et Ford W.C. Relative contribution of leukocytes and of spermatozoa to reactive oxygen species production in human sperm suspensions. *Int. J. Androl.* 1999; 22: 229-235.
- Windsor D.P., White I.G., Selley M.L. et Swan M.A. Effects of the lipid peroxidation product (E)-4-hydroxy-2-nonenal on ram sperm function. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 99: 359-366.
- Wouters-Tyrou, D., Martinage, A., Chevaillier, P. et coll. Nuclear basic proteins in spermatogenesis. *Biochimie.* 1998; 80: 117-128.
- Xu B., Chia S.-E., Tsakok M. et coll. Trace elements in blood and seminal plasma and their relationship to sperm quality. *Reprod. Toxicol.* 1993; 7: 613-618.
- Yanagimachi R. Is an animal model needed for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and other assisted reproduction technologies? *Hum. Reprod.* 1995; 10: 2525-2526.
- Zakowski J.J. et Tappel A.L. Purification and properties of rat liver mitochondrial glutathione peroxidase. *Biochem. Biophys. Acta.* 1978; 526 :65-76.
- Zini A., de Lamirande E. et Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int. J. Androl.* 1993; 16: 183-188.
- Zitzmann M., Rolf C., Nordhoff V. et coll. Male smokers have a decreased success rate for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* 2003; 79: 32-36.

ANNEXES I-XII

Annexe I: L'effet d'un supplément diététique en vitamine E et sélénium sur le volume du sperme en fonction du nombre de mois de traitement.

Placebo	Volume du sperme (mL)									
	t-0a*	t-0b*	T-0**	T-1†	T-2†	T-3†	T-4†	A-1††	T-0**	T-1†
PM-001	3,6	4,5	4,1	3,7	4,1	5,2	3,2	4,2		
PM-005	1,2	1,6	1,4	1,0	(1,0)	(1,1)	1,0	1,3		
PM-008	3,2	2,7	3,0	3,8	3,6	1,0	3,2	3,2		
PM-009	4,0	1,2	2,6	3,2	3,4	2,0	3,2	2,6		
PM-010	3,2	3,8	3,5	4,8	3,6	3,0	3,4	3,6		
PM-015	2,0	3,2	2,6	2,6	1,8	2,4	4,2	2,6		
PM-016	2,1	2,2	2,2	2,6	1,3	-	-	-		
PM-017	2,2	2,0	2,1	1,5	1,3	1,7	1,6	1,2		
PM-018	2,1	3,2	2,7	3,2	2,2	2,7	3,2	3,6		
PM-019	3,2	4,4	3,8	4,2	4,8	3,4	2,8	2,7		
PM-023	4,6	5,2	4,9	4,2	3,5	4,2	3,8	3,6		
PM-025	4,6	4,2	4,4	4,4	5,6	4,6	5,6	4,4		
Moyenne	3,0	3,2	3,1	3,3	3,0	2,8	3,2	3,0		
Écart-type	1,1	1,3	1,0	1,2	1,5	1,4	1,2	1,1		
Supplément	t-0a*	t-0b*	T-0**	T-1†	T-2†	T-3†	T-4†	A-1††	T-0**	T-1†
PM-002	3,6	2,2	2,9	3,2	2,8	4,8	3,0	2,4		
PM-003	2,5	1,4	2,0	1,6	2,0	2,2	2,5	2,2		
PM-004	4,8	7,2	6,0	3,0	4,4	3,6	-	-		
PM-007	1,8	1,2	1,5	1,4	1,0	2,1	4,1	-		
PM-011	3,4	3,4	3,4	3,0	3,0	4,1	-	-		
PM-013	2,3	1,7	2,0	1,4	1,6	-	-	-		
PM-014	2,6	4,1	3,4	3,2	2,2	2,8	3,2	2,8		
PM-020	1,7	1,8	1,8	2,8	2,1	1,6	1,2	2,6		
PM-021	4,6	3,7	4,2	5,2	3,9	4,2	3,2	4,4		
PM-022	2,2	2,4	2,3	1,9	2,8	2,2	3,6	2,2		
PM-024	2,2	1,6	1,9	2,4	2,6	2,3	1,6	3,6		
Moyenne	2,9	2,8	2,8	2,6	2,6	3,0	2,8	2,9		
Écart-type	1,1	1,8	1,3	1,1	1,0	1,1	1,0	0,8		

* visites de contrôle 1 et 2; ** moyenne des visites de contrôle; † (n) mois de traitement; †† 1^{er} mois d'arrêt de traitement; - valeur non obtenue; () valeurs non incluses dans les analyses statistiques.

Annexe II: L'effet d'un supplément diététique en vitamine E et sélénium sur la numération des spermatozoïdes en fonction du nombre de mois de traitement.

Placebo	Numération des spermatozoïdes (x 10 ⁶ /mL)							
	t-0a*	t-0b*	T-0**	T-1†	T-2†	T-3†	T-4†	A-1††
PM-001	66,0	40,0	53,0	47,0	92,0	82,0	38,0	67,0
PM-005	57,0	52,0	54,5	33,0	(19,5)	(55,0)	108,0	92,0
PM-008	39,0	90,0	64,5	63,0	60,0	120,0	85,0	71,0
PM-009	8,0	3,5	5,8	6,0	3,0	8,0	4,8	5,0
PM-010	10,0	10,5	10,3	9,0	17,0	10,3	18,8	10,3
PM-015	54,0	66,0	60,0	96,0	98,0	90,0	88,0	41,0
PM-016	124,0	126,0	125,0	132,0	69,0	-	-	-
PM-017	6,0	13,0	9,5	3,5	4,75	4,0	5,0	3,75
PM-018	74,0	66,0	70,0	62,0	57,0	52,0	79,0	65,0
PM-019	51,0	68,0	59,5	39,0	61,0	44,0	22,0	46,0
PM-023	42,0	52,0	47,0	58,0	56,0	50,0	61,0	36,0
PM-025	46,0	41,0	43,5	42,0	38,0	17,0	36,0	30,0
Moyenne	48,1	52,3	50,8	44,0	46,0	48,4	49,6	42,5
Écart-type	32,8	34,9	34,1	28,1	32,6	37,6	36,3	29,2
Supplément	t-0a*	t-0b*	T-0**	T-1†	T-2†	T-3†	T-4†	A-1††
PM-002	142,0	150,0	146,0	94,0	110,0	128,0	178,0	192,0
PM-003	214,0	46,0	130,0	120,0	106,0	122,0	158,0	148,0
PM-004	18,0	8,0	13,0	17,0	24,0	21,5	-	-
PM-007	33,0	24,0	28,5	29,0	36,0	135,0	126,0	-
PM-011	19,0	13,0	16,0	12,0	13,0	9,5	-	-
PM-013	19,5	15,0	17,3	7,5	8,3	-	-	-
PM-014	31,0	86,0	58,5	88,0	34,0	56,0	63,0	70,0
PM-020	58,0	71,0	64,5	70,0	80,0	113,0	63,0	80,0
PM-021	32,0	51,0	41,5	54,0	24,0	38,0	41,0	38,0
PM-022	33,0	14,0	23,5	22,0	26,0	43,0	75,0	39,0
PM-024	21,0	9,0	15,0	21,0	7,0	21,0	15,0	22,0
Moyenne	56,4	44,3	50,3	48,6	42,6	68,7	89,9	84,1
Écart-type	63,2	44,1	46,9	38,8	37,9	50,0	57,8	63,2

* visites de contrôle 1 et 2; ** moyenne des visites de contrôle; † 1^{er} mois de traitement; †† 1^{er} mois d'arrêt de traitement; - valeur non obtenue; () valeurs non incluses dans les analyses statistiques.

Annexe III: L'effet d'un supplément diététique en vitamine E et sélénium sur le pourcentage de motilité des spermatozoïdes à 30 minutes en fonction du nombre de mois de traitement.

Placebo	Motilité des spermatozoïdes à 30 minutes (% grade a + b)									
	t-0a*	t-0b*	T-0**	T-1†	T-2†	T-3†	T-4†	A-1††		
PM-001	45,0	43,0	44,0	58,0	76,0	59,0	49,0	58,0		
PM-005	44,0	53,0	48,5	47,0	(33,0)	(63,0)	62,0	48,0		
PM-008	63,0	63,0	63,0	66,0	67,0	63,0	76,0	62,0		
PM-009	13,0	14,0	13,5	14,0	7,0	14,0	10,0	9,0		
PM-010	40,0	36,0	38,0	49,0	51,0	55,0	53,0	34,0		
PM-015	33,0	44,0	38,5	63,0	81,0	81,0	88,0	73,0		
PM-016	47,0	52,0	49,5	53,0	65,0	-	-	-		
PM-017	8,0	13,0	10,5	29,0	20,0	18,0	26,0	43,0		
PM-018	55,0	51,0	53,0	64,0	65,0	68,0	69,0	68,0		
PM-019	64,0	65,0	64,5	69,0	72,0	47,0	39,0	62,0		
PM-023	64,0	67,0	65,5	59,0	60,0	64,0	67,0	67,0		
PM-025	55,0	43,0	49,0	47,0	56,0	45,0	55,0	33,0		
Moyenne	44,3	45,3	44,8	51,5	54,4	52,5	54,0	50,6		
Écart-type	18,6	17,7	17,9	16,1	23,0	20,5	22,5	19,4		
Supplément	t-0a*	t-0b*	T-0**	T-1†	T-2†	T-3†	T-4†	A-1††		
PM-002	59,0	59,0	59,0	67,0	66,0	64,0	68,0	71,0		
PM-003	57,0	48,0	52,5	63,0	61,0	56,0	64,0	69,0		
PM-004	40,0	43,0	41,5	40,0	55,0	54,0	-	-		
PM-007	20,0	17,0	18,5	24,0	48,0	62,0	50,0	-		
PM-011	47,0	35,0	41,0	27,0	39,0	34,00	-	-		
PM-013	19,0	23,0	21,0	25,0	10,0	-	-	-		
PM-014	44,0	59,0	51,5	51,0	28,0	49,0	50,0	67,0		
PM-020	68,0	48,0	58,0	72,0	58,0	52,0	50,0	56,0		
PM-021	55,0	44,0	49,5	42,0	26,0	22,0	50,0	40,0		
PM-022	66,0	56,0	61,0	67,0	52,0	58,0	64,0	69,0		
PM-024	64,0	62,0	63,0	26,0	58,0	48,0	52,0	67,0		
Moyenne	49,0	44,9	47,0	45,8	45,5	49,9	56,0	62,7		
Écart-type	17,1	14,8	15,3	19,0	17,6	12,9	7,9	11,1		

* visites de contrôle 1 et 2; ** moyenne des visites de contrôle; † 1^{er} mois de traitement; †† 1^{er} mois d'arrêt de traitement; - valeur non obtenue; () valeurs non incluses dans les analyses statistiques.

Annexe IV: L'effet d'un supplément diététique en vitamine E et sélénium sur le pourcentage de motilité des spermatozoïdes à 2 heures en fonction du nombre de mois de traitement.

Motilité des spermatozoïdes à 2 heures (% grade a + b)									
Placebo	t-0a*	t-0b*	T-0**	T-1†	T-2†	T-3†	T-4†	A-1††	
PM-001	25,0	38,0	31,5	27,0	48,0	29,0	28,0	35,0	
PM-005	28,0	49,0	38,5	41,0	(39,0)	(37,0)	24,0	32,0	
PM-008	50,0	50,0	50,0	37,0	32,0	51,0	53,0	41,0	
PM-009	2,0	7,0	4,5	0	0	13,0	1,0	1,0	
PM-010	22,0	30,0	26,0	14,0	44,0	35,0	47,0	52,0	
PM-015	8,0	44,0	26,0	42,0	46,0	33,0	28,0	50,0	
PM-016	42,0	50,0	46,0	47,0	43,0	-	-	-	
PM-017	7,0	11,0	9,0	10,0	2,0	8,0	4,0	12,0	
PM-018	27,0	28,0	27,5	57,0	35,0	49,0	54,0	39,0	
PM-019	48,0	50,0	49,0	44,0	42,0	27,0	29,0	36,0	
PM-023	22,0	30,0	26,0	20,0	28,0	60,0	52,0	44,0	
PM-025	20,0	21,0	20,5	41,0	42,0	37,0	42,0	29,0	
Moyenne	25,1	34,0	29,5	31,7	33,4	34,5	32,9	33,7	
Écart-type	15,5	15,4	14,5	17,3	16,2	15,5	18,7	15,4	
Supplément	t-0a*	t-0b*	T-0**	T-1†	T-2†	T-3†	T-4†	A-1††	
PM-002	57,0	49,0	53,0	69,0	49,0	53,0	58,0	66,0	
PM-003	55,0	5,0	30,0	33,0	57,0	49,0	62,0	44,0	
PM-004	28,0	17,0	22,5	34,0	37,0	52,0	-	-	
PM-007	4,0	8,0	6,0	25,0	23,0	40,0	25,0	-	
PM-011	24,0	30,0	27,0	21,0	30,0	20,0	-	-	
PM-013	10,0	18,0	14,0	15,0	8,0	-	-	-	
PM-014	27,0	33,0	30,0	42,0	15,0	44,0	27,0	54,0	
PM-020	31,0	32,0	31,5	43,0	43,0	32,0	23,0	47,0	
PM-021	7,0	12,0	9,5	5,0	1,0	0	16,0	34,0	
PM-022	55,0	36,0	45,5	43,0	38,0	33,0	57,0	34,0	
PM-024	23,0	44,0	33,5	4,0	40,0	34,0	27,0	58,0	
Moyenne	29,2	25,8	27,5	30,4	31,0	35,7	36,9	48,1	
Écart-type	19,2	14,7	14,3	19,1	17,5	16,2	18,7	12,0	

* visites de contrôle 1 et 2; ** moyenne des visites de contrôle; † (n) mois de traitement; †† 1^{er} mois d'arrêt de traitement; - valeur non obtenue; () valeurs non incluses dans les analyses statistiques.

Annexe V: L'effet d'un supplément diététique en vitamine E et sélénium sur le pourcentage de motilité des spermatozoïdes à 6 heures en fonction du nombre de mois de traitement.

Motilité des spermatozoïdes à 6 heures (% grade a + b)									
Placebo	t-0a*	t-0b*	T-0**	T-1†	T-2†	T-3†	T-4†	A-1††	
PM-001	0	8,0	4,0	7,0	21,0	13,0	12,0	8,0	
PM-005	24,0	20,0	22,0	0	(0)	(2,0)	5,0	11,0	
PM-008	34,0	34,0	34,0	26,0	17,0	15,0	24,0	26,0	
PM-009	0	0	0,0	0	0	8,0	0	0	
PM-010	0	5,0	2,5	13,0	20,0	0	21,0	26,0	
PM-015	0	12,0	6,0	4,0	7,0	9,0	6,0	14,0	
PM-016	39,0	39,0	39,0	36,0	36,0	-	-	-	
PM-017	2,0	5,0	3,5	0	0	0	0	0	
PM-018	8,0	12,0	10,0	9,0	3,0	15,0	14,0	2,0	
PM-019	1,0	31,0	16,0	3,0	1,0	1,0	16,0	20,0	
PM-023	11,0	8,0	9,5	4,0	4,0	32,0	26,0	12,0	
PM-025	2,0	8,0	5,0	21,0	13,0	6,0	18,0	14,0	
Moyenne	10,1	15,2	12,6	10,3	10,2	9,2	12,9	12,1	
Écart-type	14,2	12,8	12,8	11,6	11,4	9,5	9,2	9,3	
Supplément	t-0a*	t-0b*	T-0**	T-1†	T-2†	T-3†	T-4†	A-1††	
PM-002	17,0	4,0	10,5	27,0	3,0	17,0	44,0	52,0	
PM-003	19,0	0	9,5	5,0	47,0	6,0	10,0	14,0	
PM-004	0	16,0	8,0	3,0	16,0	44,0	-	-	
PM-007	0	0	0,0	1,0	3,0	3,0	7,0	-	
PM-011	2,0	22,0	12,0	7,0	0	15,0	-	-	
PM-013	1,0	2,0	1,5	10,0	8,0	-	-	-	
PM-014	2,0	14,0	8,0	12,0	15,0	37,0	0	9,0	
PM-020	8,0	7,0	7,5	3,0	1,0	2,0	10,0	14,0	
PM-021	0	0	0,0	1,0	0	0	4,0	2,0	
PM-022	18,0	12,0	15,0	6,0	11,0	4,0	22,0	12,0	
PM-024	0	10,0	5,0	0	0	18,0	1,0	33,0	
Moyenne	6,1	7,9	7,0	6,8	9,5	14,6	12,3	19,4	
Écart-type	8,0	7,5	4,9	7,7	13,8	15,2	14,6	17,2	

* visites de contrôle 1 et 2; ** moyenne des visites de contrôle; † (n) mois de traitement; †† 1^{er} mois d'arrêt de traitement; - valeur non obtenue; () valeurs non incluses dans les analyses statistiques.

Annexe VI: L'effet d'un supplément diététique en vitamine E et sélénium sur le pourcentage de spermatozoïdes normaux en fonction du nombre de mois de traitement.

Placebo	Spermatozoïdes normaux (%)							
	t-0a*	t-0b*	T-0**	T-1†	T-2†	T-3†	T-4†	A-1††
PM-001	50,5	55,8	53,2	66,3	63,9	56,5	65,3	58,5
PM-005	52,3	67,3	59,8	67,8	(67,5)	(67,7)	37,0	58,0
PM-008	66,8	65,8	66,3	57,3	65,5	67,0	55,7	65,8
PM-009	13,0	20,5	16,8	19,0	11,5	11,1	10,0	9,2
PM-010	52,8	49,3	51,1	56,8	49,0	51,4	39,5	49,0
PM-015	44,8	39,5	42,2	49,0	45,5	44,8	39,0	44,8
PM-016	58,3	59,0	58,7	61,5	62,5	-	-	-
PM-017	20,3	24,8	22,6	35,8	21,2	25,5	46,0	37,0
PM-018	45,8	36,2	41,0	43,8	41,8	48,5	35,0	48,5
PM-019	36,3	34,8	35,6	34,5	34,5	37,3	28,0	28,0
PM-023	54,8	38,3	46,6	43,5	44,8	54,0	56,8	44,0
PM-025	36,5	39,5	38,0	42,8	34,3	38,3	35,0	41,0
Moyenne	44,4	44,2	44,3	48,2	45,2	45,6	40,7	44,0
Écart-type	15,6	15,2	14,8	14,5	17,9	17,0	15,2	15,7
Supplément	t-0a*	t-0b*	T-0**	T-1†	T-2†	T-3†	T-4†	A-1††
PM-002	56,2	58,8	57,5	60,8	54,3	60,3	51,2	65,0
PM-003	37,8	55,5	46,7	47,0	41,0	49,5	52,0	50,3
PM-004	48,3	58,8	53,6	56,8	52,5	57,5	-	-
PM-007	34,3	44,0	39,2	44,3	51,8	46,5	36,8	-
PM-011	39,0	35,0	37,0	38,3	42,3	33,8	-	-
PM-013	34,8	31,5	33,2	18,0	24,0	-	-	-
PM-014	45,5	43,3	44,4	42,8	44,0	49,3	41,3	33,8
PM-020	46,0	50,3	48,2	57,0	55,3	29,5	51,5	51,0
PM-021	21,0	12,8	16,9	15,3	12,1	45,5	18,0	21,5
PM-022	16,5	21,7	19,1	40,3	45,9	32,3	22,5	31,5
PM-024	40,3	54,9	47,6	49,8	49,0	46,5	43,0	54,2
Moyenne	38,2	42,4	40,3	42,8	42,9	45,1	39,5	43,9
Écart-type	11,6	15,5	13,1	14,8	13,5	10,3	13,2	15,3

* visites de contrôle 1 et 2; ** moyenne des visites de contrôle; † (n) mois de traitement; †† 1^{er} mois d'arrêt de traitement; - valeur non obtenue; () valeurs non incluses dans les analyses statistiques.

Annexe VII: L'effet d'un supplément diététique en vitamine E et sélénium sur la concentration en leucocytes en fonction du nombre de mois de traitement.

Placebo	Concentration en leucocytes (x 10 ⁶ /mL)													
	t-0a*	t-0b*	T-0**	T-1†	T-2†	T-3†	T-4†	A-1††	T-0**	T-1†	T-2†	T-3†	T-4†	A-1††
PM-001	0,67	0,50	0,59	0,12	0,31	0,00	0,19	0,00	0,59	0,12	0,31	0,00	0,19	0,00
PM-005	0,29	0,26	0,28	0,00	(2,40)	(3,71)	0,27	0,77	0,28	0,00	(2,40)	(3,71)	0,27	0,77
PM-008	0,10	0,00	0,05	0,16	0,00	0,00	0,73	0,00	0,10	0,16	0,00	0,00	0,73	0,00
PM-009	0,58	0,20	0,39	0,80	0,44	0,56	0,07	0,60	0,58	0,20	0,44	0,56	0,07	0,60
PM-010	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
PM-015	0,27	0,33	0,30	0,00	0,00	0,00	0,22	0,00	0,27	0,33	0,00	0,00	0,22	0,00
PM-016	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-	-	0,00	0,00	0,00	-	-	-
PM-017	0,14	0,00	0,07	0,13	0,05	0,03	0,00	0,00	0,14	0,00	0,05	0,03	0,00	0,00
PM-018	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PM-019	0,13	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,11	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,11	0,00
PM-023	0,63	0,00	0,32	0,73	0,00	0,00	0,31	0,27	0,63	0,00	0,00	0,00	0,31	0,27
PM-025	0,06	0,21	0,13	0,21	1,33	0,00	0,18	0,08	0,06	0,21	1,33	0,00	0,18	0,08
Moyenne	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2
Écart-type	0,3	0,2	0,2	0,3	0,4	1,1	0,2	0,3	0,3	0,4	1,1	0,2	0,2	0,3
Supplément	t-0a*	t-0b*	T-0**	T-1†	T-2†	T-3†	T-4†	A-1††	T-0**	T-1†	T-2†	T-3†	T-4†	A-1††
PM-002	0,71	0,25	0,48	0,00	0,55	0,32	0,30	0,48	0,71	0,00	0,55	0,32	0,30	0,48
PM-003	0,71	0,12	0,42	0,20	1,86	0,00	0,00	0,74	0,71	0,20	1,86	0,00	0,00	0,74
PM-004	0,32	0,02	0,17	0,04	0,12	0,11	-	-	0,32	0,04	0,12	0,11	-	-
PM-007	0,17	0,12	0,15	0,22	0,09	1,01	0,63	-	0,17	0,22	0,09	1,01	0,63	-
PM-011	1,52	0,62	1,07	1,17	0,98	0,93	-	-	1,52	1,17	0,98	0,93	-	-
PM-013	0,24	0,04	0,14	0,26	0,04	-	-	-	0,24	0,26	0,04	-	-	-
PM-014	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,09	0,00	0,00
PM-020	0,58	0,00	0,29	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,58	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00
PM-021	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PM-022	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PM-024	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Moyenne	0,4	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2	0,1	0,2	0,4	0,2	0,3	0,2	0,1	0,2
Écart-type	0,5	0,2	0,3	0,3	0,6	0,4	0,2	0,3	0,6	0,3	0,6	0,4	0,2	0,3

* visites de contrôle 1 et 2; ** moyenne des visites de contrôle; † (n) mois de traitement; †† 1^{er} mois d'arrêt de traitement; - valeur non obtenue; () valeurs non incluses dans les analyses statistiques.

Annexe VIII: L'effet d'un supplément diététique en vitamine E et sélénium sur la concentration en cellules immatures en fonction du nombre de mois de traitement.

Concentration en cellules immatures ($\times 10^6/\text{mL}$)									
Placebo	t-0a*	t-0b*	T-0**	T-1†	T-2†	T-3†	T-4†	A-1††	
PM-001	1,65	1,30	1,48	1,88	3,68	4,31	2,66	4,86	
PM-005	0,71	0,65	0,68	0,33	(0,68)	(2,89)	12,15	1,23	
PM-008	0,88	1,58	1,23	2,52	3,30	4,80	5,34	1,60	
PM-009	4,84	1,33	3,09	7,38	11,84	28,83	10,52	15,66	
PM-010	0,36	0,97	0,67	0,45	0,55	0,07	3,29	0,46	
PM-015	0,95	5,45	3,20	2,40	1,47	1,35	17,82	0,31	
PM-016	2,17	2,52	2,35	0,33	0,86	-	-	-	
PM-017	6,25	1,00	3,63	0,83	3,79	0,40	0,15	0,08	
PM-018	0,93	0,33	0,63	0,47	0,29	0,26	4,15	0,16	
PM-019	1,79	1,19	1,49	1,07	4,88	1,43	0,81	1,38	
PM-023	0,63	0,10	0,37	3,77	0,56	0,13	0,15	0,63	
PM-025	2,59	2,56	2,58	0,74	8,65	0,81	1,80	1,43	
Moyenne	2,0	1,6	1,8	1,8	3,4	4,1	5,3	2,5	
Écart-type	1,8	1,4	1,1	2,1	3,6	8,4	5,7	4,6	
Supplément	t-0a*	t-0b*	T-0**	T-1†	T-2†	T-3†	T-4†	A-1††	
PM-002	2,13	1,75	1,94	4,00	2,20	9,60	11,27	6,24	
PM-003	7,85	2,07	4,96	10,00	15,64	2,14	1,58	0,56	
PM-004	2,52	0,26	1,39	0,64	1,68	1,54	-	-	
PM-007	2,64	2,52	2,58	1,23	0,63	9,11	18,59	-	
PM-011	1,05	0,85	0,95	2,13	1,46	4,09	-	-	
PM-013	1,12	0,49	0,81	2,06	0,29	-	-	-	
PM-014	0,85	3,01	1,93	2,42	0,51	4,95	0,47	1,05	
PM-020	1,02	0,36	0,69	0,00	0,80	16,95	0,16	0,60	
PM-021	2,56	2,30	2,43	3,38	1,10	1,46	2,67	2,19	
PM-022	1,40	0,28	0,84	0,39	0,48	0,57	7,38	0,29	
PM-024	1,73	0,38	1,01	0,95	0,23	0,53	0,56	1,49	
Moyenne	2,3	1,3	1,8	2,5	2,3	5,1	5,3	1,8	
Écart-type	2,0	1,0	1,3	2,8	4,5	5,3	6,6	2,1	

* visites de contrôle 1 et 2; ** moyenne des visites de contrôle; † (n) mois de traitement; †† 1^{er} mois d'arrêt de traitement; - valeur non obtenue; () valeurs non incluses dans les analyses statistiques.

Annexe IX: L'effet d'un supplément diététique en vitamine E et sélénium sur la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, évaluée par cytométrie en flux, en fonction du nombre de mois de traitement.

Fragmentation de l'ADN avec PI (Unité de fluorescence; médiane)									
Placebo	t-0a*	t-0b*	T-0**	T-1†	T-2†	T-3†	T-4†	A-1††	
PM-001	4,83	3,48	4,16	6,93	5,55	3,44	3,98	4,40	
PM-005	2,50	2,69	2,60	2,60	(3,74)	(11,72)	2,80	3,24	
PM-008	2,94	2,07	2,51	1,88	2,63	2,66	1,80	1,74	
PM-009	3,49	2,39	2,94	4,53	2,29	1,55	2,23	1,84	
PM-010	2,35	2,37	2,36	1,38	1,78	3,09	2,94	2,76	
PM-015	5,92	7,03	6,48	7,23	10,11	7,70	6,37	7,56	
PM-017	4,88	4,63	4,76	7,12	5,73	10,00	4,57	10,65	
PM-019	3,72	3,34	3,53	3,62	3,98	3,67	5,44	3,79	
PM-023	2,50	3,72	3,11	6,31	4,16	3,40	2,67	6,41	
PM-025	4,68	8,57	6,62	5,55	5,52	7,31	5,56	9,63	
Moyenne	3,78	4,03	3,91	4,72	4,55	5,45	3,84	5,20	
Écart-type	1,24	2,16	1,58	2,24	2,40	3,47	1,58	3,20	
Supplément	t-0a*	t-0b*	T-0**	T-1†	T-2†	T-3†	T-4†	A-1††	
PM-002	4,94	4,04	4,49	4,11	8,80	4,85	3,34	4,82	
PM-003	8,16	7,78	7,97	6,66	5,57	4,11	3,22	4,38	
PM-004	1,61	2,42	2,02	2,26	4,15	2,79	-	-	
PM-007	2,11	2,51	2,31	2,47	2,48	2,66	3,08	-	
PM-011	6,30	4,99	5,65	8,06	6,11	4,68	-	-	
PM-013	2,20	2,61	2,41	2,43	2,32	-	-	-	
PM-014	12,47	3,73	8,10	14,59	8,20	9,26	7,57	5,19	
PM-020	3,47	2,71	3,09	3,82	3,76	3,93	3,26	4,35	
PM-021	7,39	6,39	6,89	7,45	6,69	7,34	8,66	6,32	
PM-022	7,98	9,56	8,77	8,59	11,34	8,28	7,54	7,32	
PM-024	6,36	5,26	5,81	6,96	5,92	4,99	7,62	6,33	
Moyenne	5,73	4,73	5,23	6,13	5,94	5,29	5,54	5,53	
Écart-type	3,29	2,37	2,52	3,68	2,76	2,26	2,50	1,14	

* visites de contrôle 1 et 2; ** moyenne des visites de contrôle; † (n) mois de traitement; †† 1^{er} mois d'arrêt de traitement; - valeur non obtenue; () valeurs non incluses dans les analyses statistiques.

Annexe X: L'effet d'un supplément diététique en vitamine E et sélénium sur la concentration en malondialdéhyde en fonction du nombre de mois de traitement.

Placebo	Concentration de MDA (uM)										
	t-0a*	t-0b*	T-0**	T-1†	T-2†	T-3†	T-4†	A-1††	T-3†	T-4†	A-1††
PM-001	1,23	1,05	1,14	0,88	1,45	1,21	1,27	1,83	1,21	1,45	1,27
PM-005	0,93	2,42	2,13	0,92	(1,21)	(0,91)	2,82	1,65	2,82	2,82	2,82
PM-008	1,56	1,05	1,31	1,10	1,72	1,52	2,12	2,38	1,52	2,12	2,38
PM-009	1,27	0,96	1,12	0,90	0,92	1,03	1,46	1,38	1,03	1,46	1,38
PM-010	1,53	1,48	1,50	0,89	1,25	0,68	1,43	1,61	0,68	1,43	1,61
PM-015	0,90	0,95	0,92	1,32	0,71	0,65	0,83	2,16	0,65	0,83	2,16
PM-016	1,10	1,22	1,16	0,96	0,79	-	-	-	-	-	-
PM-017	1,20	1,09	1,15	1,10	0,95	0,78	1,33	1,08	0,78	1,33	1,08
PM-018	1,35	1,02	1,18	2,56	0,85	0,84	1,37	0,88	0,84	1,37	0,88
PM-019	1,29	1,28	1,28	0,92	1,05	1,47	1,98	1,08	1,47	1,98	1,08
PM-023	0,81	0,72	0,77	1,30	1,44	1,01	1,03	0,94	1,01	1,03	0,94
PM-025	1,20	1,27	1,24	1,80	1,55	1,92	2,30	2,50	1,92	2,30	2,50
Moyenne	1,20	1,21	1,24	1,22	1,16	1,09	1,63	1,59	1,09	1,16	1,63
Écart-type	0,23	0,43	0,33	0,50	0,33	0,40	0,60	0,58	0,40	0,33	0,60
Supplément	t-0a*	t-0b*	T-0**	T-1†	T-2†	T-3†	T-4†	A-1††	T-3†	T-4†	A-1††
PM-002	1,74	0,90	1,32	0,82	1,05	0,87	1,37	1,31	0,87	1,37	1,31
PM-003	1,44	1,17	1,30	1,26	1,22	1,04	2,55	1,48	1,04	2,55	1,48
PM-004	1,12	0,98	1,05	1,00	1,10	0,95	-	-	0,95	-	-
PM-007	0,79	1,47	0,13	0,68	0,91	0,76	1,28	-	0,76	1,28	-
PM-011	1,05	1,30	1,17	0,76	1,15	1,03	-	-	1,03	-	-
PM-013	0,83	1,04	0,93	0,93	0,76	-	-	-	-	-	-
PM-014	0,83	1,01	0,92	0,77	0,88	0,79	1,74	1,07	0,79	1,74	1,07
PM-020	1,18	0,78	0,98	0,70	0,83	1,37	1,09	0,92	1,37	1,09	0,92
PM-021	2,15	0,97	1,96	0,77	0,84	1,37	0,97	1,18	1,37	0,97	1,18
PM-022	1,88	1,90	1,89	3,83	1,35	2,69	1,77	1,83	1,35	1,77	1,83
PM-024	3,46	2,24	2,85	4,15	3,76	2,86	2,90	2,63	2,86	2,90	2,63
Moyenne	1,50	1,25	1,32	1,43	1,26	1,37	1,71	1,49	1,37	1,71	1,49
Écart-type	0,80	0,45	0,71	1,28	0,85	0,77	0,69	0,58	0,77	0,69	0,58

* visites de contrôle 1 et 2; ** moyenne des visites de contrôle; † (n) mois de traitement; †† premier mois d'arrêt de traitement; - valeur non obtenue; () valeurs non incluses dans les analyses statistiques.

Annexe XI: L'effet d'un supplément diététique en vitamine E et sélénium sur la concentration dans le sperme en vitamine C en fonction du nombre de mois de traitement.

Placebo	Concentration en vitamine C dans le sperme (µg/mL)									
	t-0a*	t-0b*	T-0**	T-1†	T-2†	T-3†	T-4†	A-1††	T-3†	A-1††
PM-001	-	50,01	50,01	71,62	65,90	36,60	69,12	43,85	(66,26)	43,85
PM-005	-	26,30	26,30	22,14	(-)	48,01	48,01	32,58	80,98	32,58
PM-008	108,21	89,62	98,92	124,50	113,37	93,84	93,84	73,19	151,54	73,19
PM-009	172,98	152,90	162,94	161,01	182,64	159,86	159,86	113,86	62,96	113,86
PM-010	82,87	63,34	73,11	53,72	51,19	49,59	49,59	28,29	94,66	28,29
PM-015	93,59	41,49	67,54	94,35	67,63	36,24	36,24	21,53	-	21,53
PM-016	44,24	78,29	61,27	34,67	53,00	-	-	-	61,59	-
PM-017	113,78	155,52	134,65	77,94	77,51	97,55	97,55	58,57	51,39	58,57
PM-018	79,50	79,44	79,47	73,67	69,56	54,84	54,84	95,18	93,65	95,18
PM-019	60,93	51,61	56,27	26,48	51,68	109,79	109,79	103,13	109,84	103,13
PM-023	115,25	93,25	104,25	117,41	96,16	112,15	112,15	122,21	43,52	122,21
PM-025	57,98	49,30	53,64	48,17	54,93	44,65	44,65	26,93	77,54	26,93
Moyenne	92,93	77,59	80,70	75,47	80,32	79,60	79,60	65,39	33,46	65,39
Écart-type	37,23	41,02	38,61	42,63	39,20	38,29	38,29	37,84	-	37,84
Supplément	t-0a*	t-0b*	T-0**	T-1†	T-2†	T-3†	T-4†	A-1††	T-3†	A-1††
PM-002	-	90,16	90,16	98,89	98,15	89,88	103,70	116,59	103,48	116,59
PM-003	109,00	99,32	104,16	98,97	42,27	96,08	96,08	47,85	16,55	47,85
PM-004	-	22,83	22,83	34,34	40,08	-	-	-	132,91	-
PM-007	-	106,79	106,79	120,55	85,36	106,57	106,57	-	40,01	-
PM-011	27,89	28,33	28,11	48,50	5,60	-	-	-	-	-
PM-013	28,91	33,82	31,36	31,10	28,59	64,17	64,17	71,36	89,87	71,36
PM-014	88,38	91,40	89,89	104,39	89,87	82,80	82,80	82,12	77,79	82,12
PM-020	56,66	43,33	49,99	72,34	62,15	37,17	37,17	34,29	23,79	34,29
PM-021	18,17	18,15	18,16	11,72	52,56	58,56	58,56	82,51	99,88	82,51
PM-022	87,07	99,70	93,39	90,28	99,88	84,49	84,49	82,51	138,32	82,51
PM-024	132,22	142,69	137,45	128,62	202,27	70,31	70,31	147,85	74,55	147,85
Moyenne	68,54	70,59	70,21	76,34	73,34	82,97	82,97	83,22	42,23	83,22
Écart-type	41,97	42,32	41,21	39,33	52,52	22,10	22,10	38,90	-	38,90

* visites de contrôle I et 2; ** moyenne des visites de contrôle; † (n) mois de traitement; †† 1^{er} mois d'arrêt de traitement; - valeur non obtenue; () valeurs non incluses dans les analyses statistiques.

Annexe XII: Évolution de la concentration sérique de cotinine en fonction du nombre de mois de traitement chez les sujets non-fumeurs et fumeurs.

Placebo	Concentration en cotinine (ng/mL)									
	t-0a*	t-0b*	T-0**	T-1†	T-2†	T-3†	T-4†	A-1††	T-0**	t-0b*
PM-001	3,23	4,80	4,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PM-005	10,05	0,00	5,03	0,00	(0,00)	(0,00)	6,06	0,00	0,00	0,00
PM-008	73,98	131,67	102,83	178,84	174,26	103,06	126,63	85,92	0,00	0,00
PM-009	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,68	0,00	0,00
PM-010	229,53	340,40	284,97	299,21	304,83	109,01	283,49	249,36	0,00	0,00
PM-015	0,00	0,00	0,00	8,21	6,97	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PM-016	199,89	294,89	247,39	282,27	226,16	-	-	-	0,00	0,00
PM-017	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PM-018	0,00	0,00	0,00	4,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PM-019	0,00	0,00	0,00	7,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PM-023	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PM-025	115,67	109,87	112,77	106,54	110,29	103,86	106,40	73,78	0,00	0,00
Moyenne	52,70	73,47	63,08	73,95	68,54	28,72	47,51	37,43	0,00	0,00
Écart-type	84,36	123,40	103,57	115,63	108,83	49,21	91,07	77,20	0,00	0,00
Supplément	t-0a*	t-0b*	T-0**	T-1†	T-2†	T-3†	T-4†	A-1††	T-0**	t-0b*
PM-002	413,95	321,09	367,52	267,94	342,08	85,05	54,22	0,00	0,00	0,00
PM-003	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PM-004	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-	0,00	0,00
PM-007	11,02	0,00	5,51	16,40	0,00	0,00	0,00	-	0,00	0,00
PM-011	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-	0,00	0,00
PM-013	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-	-	0,00	0,00
PM-014	0,00	0,00	0,00	0,58	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PM-020	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PM-021	0,00	0,00	0,00	0,00	5,95	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PM-022	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PM-024	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Moyenne	38,63	29,19	33,91	25,90	31,64	8,51	6,78	0,00	0,00	0,00
Écart-type	124,52	96,81	110,66	80,42	102,98	26,90	19,17	0,00	0,00	0,00

* visites de contrôle 1 et 2; ** moyenne des visites de contrôle; † (n) mois de traitement; †† 1^{er} mois d'arrêt de traitement; - valeur non obtenue; () valeurs non incluses dans les analyses statistiques.

