

**UNIVERSITÉ LILLE - NORD DE FRANCE
UNIVERSITÉ DROIT ET SANTÉ DE LILLE 2**

École Doctorale Biologie-Santé (ED446)

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE 2

Spécialité : Biologie du Développement et de la Reproduction

Présentée par

Julien SIGALA

**QUALITÉ DU PROTÉOME DU SPERMATOZOÏDE HUMAIN
ET INFERTILITÉ**

Soutenue publiquement le 8 décembre 2016 devant le Jury composé de :

Mme le Pr. Sylviane HENNEBICQ	Rapporteur
Mme le Pr. Catherine METZLER-GUILLEMAIN	Rapporteur
Mme le Pr. Nathalie RIVES	Examineur
Mme le Dr. Ariane DE AGOSTINI	Examineur
Mme le Dr. Valérie MITCHELL	Co-directeur de Thèse
Mr le Dr. Nicolas SERGEANT	Co-directeur de Thèse

Remerciements

A Madame le Professeur Sylviane HENNEBICQ.

Je souhaite vous remercier à plusieurs égards. Merci tout d'abord d'avoir accepté d'être rapporteur de ma Thèse et d'avoir accepté de juger ce travail. Merci également pour votre participation tout au long de ces 3 années de Thèse. Votre contribution, à la fois bienveillante et pertinente, a permis de mettre l'accent sur les points forts et faibles, mais surtout d'apporter systématiquement des solutions concrètes pour faire avancer ce travail. J'espère que le résultat final sera à la hauteur de vos attentes. Je voudrais également vous remercier pour vos enseignements lors du Master 2 Professionnel au cours duquel j'ai particulièrement apprécié vos qualités didactiques et humaines, alors que je n'en étais encore qu'aux balbutiements de cette discipline. Merci enfin de la confiance que vous m'avez apporté récemment. Il n'a vraiment pas été facile pour moi de décliner le poste que vous m'avez proposé. Cela aurait été un grand plaisir à la fois professionnel et personnel que de venir travailler avec vous et votre équipe.

A Madame le Professeur Catherine METZLER-GUILLEMAIN.

Je n'ai pas encore la chance de vous connaître directement. Tout d'abord merci de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail. Merci d'avoir accepté d'être rapporteur de cette Thèse. Vos connaissances tant dans le domaine médical de la Reproduction d'un grand Centre d'AMP, que dans celui de la cellule spermatique vont nous permettre de potentialiser ce travail en apportant un regard neuf et extérieur. J'espère qu'il sera à la hauteur de vos attentes.

A Madame le Professeur Nathalie RIVES.

Au cours de ces 3 années de Thèse, j'ai eu à plusieurs reprises l'occasion d'apprécier votre esprit critique, vos capacités d'analyse et vos qualités humaines. Vos conseils m'ont été d'une

aide précieuse dans la poursuite et l'aboutissement de ce travail. Je suis également admirateur de la clarté avec laquelle vous prodiguez vos enseignements ainsi que vos présentations scientifiques. Vous me pardonnerez l'expression, Professeur, mais pour moi vous représentez « la force tranquille ». C'est un grand plaisir de travailler avec vous et d'échanger sur des sujets variés de notre discipline. J'ai l'impression de repartir à chaque fois grandi de nos discussions. Je vous remercie chaleureusement de faire partie de ce Jury qui permettra, j'en suis convaincu, d'apporter à nouveau un regard critique sur ce travail et de potentialiser les perspectives.

A Madame le Docteur Ariane DE AGOSTINI.

Tout d'abord merci de l'honneur que vous me faites en acceptant d'évaluer le contenu de ce travail. Vos nombreuses connaissances sur la biochimie de la cellule et en particulier de la cellule spermatique seront d'une importance majeure pour analyser ce travail. J'espère qu'il sera à la hauteur de vos attentes.

A Madame le Docteur Valérie MITCHELL.

Avant toute chose, je voudrais vous remercier. Pas seulement de m'avoir guidé et soutenu tout au long de cette Thèse, mais pour la totalité des 4 années passées dans votre Service. Merci pour votre disponibilité, pour votre soutien et pour cette envie que vous savez transmettre de toujours faire au mieux. J'ai particulièrement apprécié votre rigueur scientifique, vos larges connaissances fondamentales et vos grandes qualités humaines. Merci tout simplement d'avoir cru en moi quand d'autres auraient baissé les bras. D'avoir toujours joué la carte de la transparence même quand la situation était compliquée et de m'avoir transmis le goût de la sérénité en toutes circonstances. Nous nous sommes parfois sentis bien seuls dans notre conquête de ce poste Hospitalo-Universitaire. Nous avons échoué juste au pied du podium, et encore, parce qu'on nous a changé les règles du jeu en dernière minute. Il me reste cependant un bagage très riche de ces 4 années Lilloises et de cette Thèse. J'ai énormément progressé à vos côtés, dans tous les aspects de ma vie professionnelle, qu'elle soit Hospitalière ou Universitaire. Soyez assurée de toute mon estime et de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Nicolas SERGEANT.

Nous avons commencé en discutant rugby au début de mon Master 2 Recherche. Nous finissons 4 ans après par ce travail de Thèse d'Université. Tout a été fluide et simple avec toi depuis le début. Tu as vu en moi un vrai professionnel dès le départ, pas seulement l'étudiant débutant la recherche que j'étais. Tes conseils ont toujours été pertinents. Tu arrives systématiquement à relever le positif du travail qui a été fait. Le domaine de la recherche est un monde complexe, mais en peu de temps tu m'as transmis toute la passion que tu développes au quotidien. Cela a été un réel plaisir de réaliser ces quatre années de recherches avec toi. Ton cheval de bataille, c'est le cerveau et le neurone, mais tu t'es parfaitement adapté à ce sujet si particulier qui est « le cerveau de l'homme ». Nous en avons souvent plaisanté, mais changer de tissu n'est pas forcément chose aisée, pourtant tu t'es pris au jeu à 100 %. Je pense que cette collaboration entre l'EA 4308 et l'UMR-S 1172 a été bénéfique sur toute la ligne, et nous a permis d'enrichir pleinement ce projet. Merci pour ta bonne humeur quotidienne, ton implication et ton analyse fine de ce travail, ton expérience professionnelle très riche et ta disponibilité systématique. Sois assuré de toute mon estime et de ma sincère reconnaissance.

A Fanny JUMEAU.

Cette Thèse, elle est là grâce à ton travail, mais aussi grâce à la formation et à la patience dont tu as fait preuve au cours de nos deux années de recherches communes. Merci pour ta bonne humeur et ton élan quotidien. Cela a été un vrai plaisir de partager ces moments avec toi et d'avoir été ton « junior ». Soit certaine de mon amitié forte et sincère. J'espère que tu pourras perdurer dans cette discipline que tu affectionnes tant.

A l'ensemble du Service d'AMP clinico-biologique du CHRU de Lille.

Une belle équipe, rigoureuse, qui sait se serrer les coudes quand nécessaire, mais avec qui on passe également de beaux moments de convivialité et de rigolades. J'ai passé d'excellents moments avec chacun d'entre vous. Je garde de vous et de ces 4 années un très bon souvenir. Un grand merci en particulier à Brigitte LEROY-MARTIN, qui m'a soutenu et motivé en

toutes circonstances, même les moins faciles. Un grand merci à Christine DECANTER pour tout le temps qu'elle a passé en dehors de ses activités pour m'aider à progresser dans l'art subtil de la publication. Merci pour ta patience, il t'en a fallu. Je souhaite également remercier ici le Professeur Claude-Alain MAURAGE pour son investissement dans la partie Universitaire de mon travail, pour sa disponibilité et son entrain à toujours essayer de trouver des solutions. Enfin, une mention spéciale à Laura KELLER : comme il existe des coups de cœurs littéraires, je parlerais de coup de cœur professionnel. Si l'occasion nous est donnée de retravailler un jour ensemble, je suis preneur !!!

A l'UMR-S 1172 et à l'équipe « Alzheimer et Tauopathies » en particulier.

Merci pour votre collaboration, votre formation, votre encadrement pendant ces quatre années de M2R et de Thèse d'Université. Malgré ma présence parfois en pointillée, vous avez toujours eu le sourire, toujours trouvé du temps à m'accorder. Grâce à vous, j'ai même eu le privilège de renouer avec les repas du Restaurant Universitaire ; cela m'a rappelé mes années fac. Une belle équipe. Un grand merci à Luc BUEE et à Bernard SABLONNIERE pour leurs qualités humaines, leur disponibilité chaque fois que cela a été nécessaire et pour m'avoir permis de mener cette Thèse jusqu'au bout. Une dédicace particulière à Hélène et Sabiha, qui ont découvert le monde secret du spermatozoïde en m'aidant dans mes travaux, et surtout à mes co-Thésards Alban, Anthony et Coline : au top, tout simplement. Toujours contents, motivés, disponibles et le mot pour rire. De (trop courts) super moments passés avec vous trois.

Au service de Biostatistiques du CHRU de Lille

Merci pour votre participation, votre disponibilité, votre accueil chaleureux et votre réactivité. Quelques soit les deadlines, vous vous êtes toujours arrangés pour rendre les résultats en temps et en heure. Malgré les (nombreux) rajouts de calculs, vous avez toujours réagi avec sourire et efficacité. Nous avons parfois l'impression de ne pas parler la même langue, mais vos efforts et votre intérêt pour chacun des sujets que j'ai eu à traiter avec vous a fait qu'au final, cela a toujours été simple. Un grand merci pour votre participation et tout le travail effectué pour ce manuscrit.

A mes nouveaux collègues du Service d'AMP de Calais

Je me suis souvent surpris, en parlant de mon nouveau Service et de mes nouveaux collègues, à parler du monde des Bisounours. Difficile de trouver un Service avec une ambiance de travail à la fois si sérieuse, professionnelle et amicale. Je suis passé dans beaucoup de Laboratoires et Services, et il est rare de trouver un aussi bon équilibre. Qui disait qu'on ne pouvait pas avoir le beurre et l'argent du beurre... ?

A mes parents,

Ne cherchez pas les meilleurs parents du monde. C'est moi qui les ai. Comme ils savent déjà tout l'amour que je leur porte, je ne vais pas tuer un arbre de plus. J'espère juste leur ressembler le plus possible.

A ma sœur,

Tu as mis du temps à trouver ta place, mais là ça y est. Te voir enfin épanouie dans ton travail, après tous les efforts que tu as fournis et les nombreuses villes que tu as visitées, c'est une juste récompense. C'est une chance unique d'avoir une petite sœur. Tu compteras toujours énormément à mes yeux. Et grâce à toi, Jenn et moi n'écouteront plus jamais les Aristochats de la même manière 😊.

A ma famille,

Qui compte beaucoup pour moi et sur qui je suis certain de toujours pouvoir m'appuyer. Je n'ai qu'un regret, c'est de ne pas pouvoir en profiter assez. Et puis les choses ont bien changé depuis la soutenance de ma Thèse d'exercice. La nouvelle génération étant arrivée, il va falloir également servir de modèle. Et essayer de donner autant de moments de joie que ceux que notre famille a pu nous procurer. Voilà un défi compliqué. Mais comme l'a dit Bénabar, « le bonheur, ça ne se trouve pas en lingots, mais en petite monnaie ».

A ma belle-famille,

Un accueil chaleureux, d'excellents moments agréables en famille. Vous êtes entrés dans ma vie récemment, mais tout a toujours été facile avec vous. Continuons de construire cette belle histoire. Mon prochain objectif ? Apprendre le rugby à mon neveu.

A tous mes amis,

Il faudrait une Thèse entière pour à peine survoler tous les moments heureux auxquels vous avez contribué et qui ont enrichi ma vie. Merci pour votre gentillesse, votre présence, vos coups de gueules, votre simplicité. Les Catalans, les Pharma, les Bisontins, les Lillois, les Dunkerquois, les rugbymen Marcquois, les « amis d'amis » qui sont devenus à la longue de supers amis, les « reproducteurs » à travers la France, les étrangers (même les Anglais, si si... enfin... en dehors des périodes des VI nations et coupe du monde) et tous les autres... D'où que vous soyez, où que vous habitiez, sachez que je pense à chacun d'entre vous et que vous occupez tous une place chère dans ma mémoire et dans mon cœur. On dit loin des yeux, loin du cœur. Foutaise. Une amitié solide, c'est pour la vie.

Une spéciale dédicace à Fronti Beach...

A Cédric, Antoine, Ivan et Céline.

Vous êtes partis beaucoup trop tôt... Vraiment beaucoup trop tôt...

A Angus et Sherlock.

A Jenn,

Le meilleur étant toujours pour la fin.

Un début pas toujours facile, des décisions de couples parfois difficiles à prendre comme par exemple tout récemment... et pourtant, on est toujours là. C'est peut être ça, la véritable force de notre amour : commencer dans l'épreuve mais perdurer avec le temps et se renforcer d'année en année. C'est tout le malheur que je nous souhaite. Tu es une femme extraordinaire.

Certains diraient que tu es une femme de caractère 😊, moi je vois en toi une femme aux multiples passions, extrêmement conviviale et généreuse à la fois pour ta famille et pour tes amis. Sans parler de ton amour pour les animaux. Ce sont toutes ces raisons qui font de toi ce que tu es et qui font que je t'aime autant. Merci de m'avoir supporté tout au long de ces 3 années de Thèse et surtout lors de la dernière ligne droite qu'est la rédaction. Merci pour les corrections. Le reste qui n'est pas dit ici n'appartient qu'à nous.

RÉSUMÉ

QUALITÉ DU PROTÉOME DU SPERMATOZOÏDE HUMAIN ET INFERTILITÉ

La mobilité est une fonction clé de la qualité fécondante et de sélection des spermatozoïdes des techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP). Nous manquons cependant d'information des mécanismes moléculaires contrôlant cette mobilité. Ce travail de Thèse est articulé autour de 2 protéines d'intérêts impliquées dans la mobilité spermatique : la protéine Tau (Tubule-associated unit) associée à la polymérisation des microtubules dans le neurone, et la protéine d'ancrage aux kinases A4 (AKAP4), protéine majeure de la gaine fibreuse du flagelle spermatique, connue pour son implication dans la mobilité spermatique.

Très peu d'études traitent de la protéine Tau dans l'appareil génital masculin, et aucune chez l'homme. Dans une première partie de ce travail, nous avons analysé l'expression de la protéine Tau dans le spermatozoïde et le testicule humain par une approche immunohistochimique. La protéine Tau est localisée dans la pièce intermédiaire du flagelle du spermatozoïde, et dans le spermatocyte et la spermatide dans le testicule. Les rôles potentiels de la protéine Tau durant la spermatogenèse sont discutés dans une revue de la littérature.

Les avancées dans le domaine de la protéomique permettent aujourd'hui d'étudier le protéome du spermatozoïde et de ses compartiments cellulaires de façon hautement résolutive. Le protéome global du spermatozoïde a été étudié chez des hommes consultant le centre de procréation assistée du CHRU de Lille. Il a permis de définir un groupe de spermatozoïdes présentant majoritairement des protéines de haut poids moléculaire et un groupe présentant une protéolyse aux dépens des protéines de haut poids moléculaire. L'AKAP4 a été identifiée parmi les protéines de hauts poids moléculaire. Nous avons étudié, quantifié le profil d'expression de l'AKAP4 en Western Blot dans le sperme d'hommes venant effectuer un spermogramme et corréler les données biochimiques du protéome et de l'AKAP4 au spermogramme. Le rôle de l'AKAP4 comme marqueur prédictif en AMP est ensuite abordé. Les données clinico-biologiques des tentatives d'AMP au CHRU de Lille ont été confrontées aux données quantitatives du protéome global et de l'AKAP4.

Les protéines Tau et AKAP4 sont des protéines d'intérêts dans la prise en charge de l'homme infertile. L'AKAP4 pourrait être proposée comme biomarqueur dans la prise en charge en AMP.

ABSTRACT

HUMAN SPERM PROTEOME QUALITY AND INFERTILITY

Motility is a key function of the fertilizing quality and the selection of sperm for assisted reproductive technology (ART). However, we lack information on molecular mechanisms controlling this mobility. This thesis is structured around 2 proteins of interest involved in sperm mobility: Tau (tubule-associated unit) associated with microtubule polymerization in the neuron, and the A-kinase anchoring protein 4 (AKAP4), the main protein of the fibrous sheath of the sperm's flagellum, known for its involvement in sperm motility.

Very few studies focus on the Tau protein in the male reproductive system, and none in humans. In the first part of this work, we analysed the expression of the Tau protein in the sperm and human testis through an immuno-histo-chemical approach. The Tau protein is localized in the intermediate part of the sperm flagellum and in the spermatocyte and spermatid in the testis. The potential roles of the Tau protein during spermatogenesis are discussed in a review of the literature.

Advances in the field of proteomics now allow the study the proteome of sperm and its cellular compartments in a highly-resolutive way. The global sperm proteome was studied in men visiting the assisted reproduction center of Lille University Hospital. This has led to a group of sperm with predominantly high molecular weight proteins being identified as well as a group having proteolysis at the expense of high molecular weight proteins. The AKAP4 was identified among the high molecular weight proteins. We studied, quantified the profile of AKAP4 expression by Western Blot in the sperm of men undergoing a semen analysis and correlated the biochemical data of the proteome and AKAP4 to the semen analysis. The role of AKAP4 as a predictive marker of ART success is then discussed. Clinical and biological data of ART attempts at the Lille University Hospital were compared with quantitative data of the global proteome and AKAP4.

Tau protein and AKAP4 are proteins of interest in the management of infertile men. The AKAP4 could be proposed as a biomarker in ART treatments.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	1
ABSTRACT	2
TABLE DES MATIÈRES	3
TABLE DES FIGURES	6
TABLEAUX	7
ABRÉVIATIONS	8
PRÉSENTATION DU MANUSCRIT	11
INTRODUCTION	12
1 LE SPERMATOZOÏDE	13
1.1 La spermatogenèse	13
1.2 Structure générale du spermatozoïde	13
1.3 La tête.....	14
1.4 Le flagelle	18
1.5 La mobilité du spermatozoïde	22
2 ANALYSES ET SÉLECTION DES SPERMATOZOÏDES	27
2.1 Analyse des paramètres spermatiques.....	27
2.2 Techniques de sélection/préparation des spermatozoïdes	37
3 LE PROTÉOME DU SPERMATOZOÏDE	43
3.1 L'approche protéomique	43
3.2 Le protéome global du spermatozoïde humain	46
3.3 Le protéome du spermatozoïde humain par compartiments cellulaires	49
3.4 Le protéome du spermatozoïde chez l'animal.....	54
4 LES BIOMARQUEURS PROTÉIQUES DE LA MOBILITE	55
4.1 Les protéines spermatiques de la mobilité	55
4.2 Les protéines AKAPs.....	58
4.3 La protéine Tau	65

5	PROTÉOMIQUE DU SPERMATOZOÏDE ET AMP	69
5.1	Les techniques de l'AMP	70
5.2	Etudes protéomiques différentielles chez des hommes infertiles et AMP	72
6	LES OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	83
 <i>MATÉRIEL ET MÉTHODES</i>		85
OBJECTIF 1		86
	Prélèvement de matériel biologique.....	86
	Analyses morpho-histologiques.....	86
	Revue de la littérature	89
OBJECTIFS 2 et 3		91
	Prélèvement de matériel biologique et extraction des protéines	91
	Réalisation du profil du protéome global des spermatozoïdes.....	92
	Calcul d'un index de qualité du protéome global	92
	Profil d'expression et quantification de la protéine AKAP4.....	93
	Plan Expérimental de l'étude clinico-biologique du protéome global via le SPQI et de l'AKAP4 comme biomarqueurs potentiels en AMP.....	95
 <i>TRAVAUX DE THÈSE</i>		102
	Articles 1 & 2.....	104
	Article 3 <i>en soumission</i>	130
	Brevet d'invention, <i>extention du brevet initial</i>	166
	Article 4 <i>en préparation</i>	169
 <i>DISCUSSION GÉNÉRALE</i>		204
	Etude de la protéine Tau testiculaire et spermatique chez l'homme.....	205
	La place de la protéomique du spermatozoïde dans l'AMP.....	206
	Profil protéique spermatique global et protéolyse	207
	Impact de la protéolyse de l'AKAP4 sur la mobilité spermatique.....	209
	Dégradation tardive versus absence précoce de l'AKAP4, un impact différent	210
	Quel rôle pour la pro-AKAP4 et l'AKAP4 humaines dans la mobilité ?	211
	La protéolyse en lien avec une autre protéine de la mobilité	212

La place du SPQI et de l'AKAP4 comme biomarqueurs de réussite en AMP	212
Evaluation statistique des effectifs.....	214
La protéomique un bon outil en devenir pour l'AMP.....	215
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	217
BIBLIOGRAPHIE	222
ANNEXES.....	246
Curriculum vitae	247
Publications 2013-2016.....	255
Communications orales 2013-2016	256
Communications affichées 2013-2016.....	257

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : La spermatogenèse	14
Figure 2 : Représentation schématique d'un spermatozoïde	16
Figure 3 : Représentation schématique de l'ultra-structure du flagelle d'un spermatozoïde	19
Figure 4 : Structure de l'axonème d'un spermatozoïde	20
Figure 5 : Mécanisme de mouvement du flagelle des spermatozoïdes.....	23
Figure 6 : Représentation schématique des voies considérées comme impliquées dans la régulation de la mobilité des spermatozoïdes chez les mammifères	26
Figure 7 : Agrégation de spermatozoïdes immobiles.....	29
Figure 8 : Cellule de comptage pour numération spermatique	30
Figure 9 : Aspect des spermatozoïdes sur frottis après coloration à l'éosine-nigrosine	31
Figure 10 : Analyse des spermatozoïdes sur frottis	32
Figure 11 : Compte-rendu d'un spermogramme-spermocytogramme.....	35
Figure 12 : Principes de sélection des spermatozoïdes	38
Figure 13 : Techniques non-conventionnelles de sélection/préparation des spermatozoïdes.....	41
Figure 14 : Méthodologies protéomiques	45
Figure 15 : Distribution fonctionnelle des protéines spermatiques.....	48
Figure 16 : Structure d'une protéine AKAP en lien avec la PKA	59
Figure 17 : Protéine AKAP4 et son précurseur	62
Figure 18 : Immuno-localisation en microscopie électronique de la protéine AKAP4	63
Figure 19 : Agrégation de la protéine Tau et dégénérescence neuronale	67
Figure 20 : Technique d'ICSI.	72
Figure 21 : Localisation des zones de la protéine Tau ciblées par différents anticorps.....	88
Figure 22 : Schématisation de la méthodologie générale des objectifs 2 et 3.....	94
Figure 23 : Le Sperm Proteome Quality Index (SPQI) calculé à partir du gel 1D-SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie	95
Figure 24 : Constitution des groupes et répartition des patients en sous-groupes	99
Figure 25 : Evaluation de la fécondation d'un ovocyte et du clivage précoce	101

TABLEAUX

Tableau 1 : Les valeurs normales de référence selon l'OMS 2010.....	36
Tableau 2 : Les différentes études de protéomique comparative effectuées chez des patients infertiles	74

ABRÉVIATIONS

- 1 ou 2D** : 1 ou 2-dimensional
- 2DE** : 2-dimensional gel electrophoresis
- ADN** : acide désoxyribonucléique
- AKAP** (protéine) et **akap** (gène) : A-kinase anchor protein
- AMP** : assistance médicale à la procréation
- AMPe** : adénosine monophosphate cyclique
- ARN** : acide ribonucléique
- ARNm** : ARN messenger
- ART** : assisted reproductive technology
- ATP** : adénosine triphosphate
- BMI** : body mass index
- Ca²⁺** : ions calcium
- CABYR** : calcium-binding tyrosine phosphorylation regulated
- CECOS** : centre d'étude et de congélation des oeufs et du sperme
- CHRU** : centre hospitalier régional universitaire
- Cter** : C-terminal
- DAPI** : 4',6-diamidino-2-phénylindole
- DIGE** : differential in gel electrophoresis
- EA** : équipe d'accueil
- ELISA** : enzyme-linked immunosorbent assay
- FCS** : fausse-couche spontanée
- FIV** : fécondation *in vitro*
- GAPDH** : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
- GAPDS** : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase-S
- GD** : gradient density
- GO** : gene ontology
- GPI** : glycosylphosphatidylinositol
- GTPase** : guanosine triphosphatase
- HK1** : hexokinase 1
- HMW** : high molecular weight

HSP : heat shock protein
IAM : index d'anomalies multiples
ICSI : intracytoplasmique sperm injection
IHC : immunohistochimie
IIU : insémination intra-utérine
IM : immobile
IMSI : intracytoplasmic morphologically selected sperm injection
KO : knock out
LC : liquid chromatography
LDS : lithium dodecyl sulfate
LMW : low molecular weight
M2 : métaphase 2
MALDI : matrix assisted laser desorption/ionization
MAP : microtubules associated protein
miRNA : micro ARN
MS : mass spectrometry
MS/MS : mass spectrometry en tandem
NP : non progressive
Nter : N-terminal
ODF : outer dense fiber
OMS : organisation mondiale de la santé
P1 : protamine 1
P2 : protamine 2
PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis
PBS : phosphate buffered saline
PC : pièce connective
PHF : paires hélicoïdales de filaments
PI : pièce intermédiaire
PKA : protéine kinase A
PMM : potentiel de membrane mitochondrial
POLG : polymérase γ
PP : pièce principale
PR : progressive
RI : sous-unité régulatrice 1

RII : sous-unité régulatrice 2

ROS : reactive oxygen species

SDS : sodium dodecyl sulfate

SEMGIpre : pré-séminogeline I

SEMGIpre : pré-séminogeline II

SPQI : sperm proteome quality index

SWC : swim-up conventionnel

SWD : swim-up direct

Tau : tubule-associated unit

TBS : tris-buffered saline

TMT : tandem mass tag

UMR : unité mixte de recherche

PRÉSENTATION DU MANUSCRIT

L'objectif général de ce travail de Thèse était triple. Dans un premier temps, évaluer et quantifier le profil d'expression de l'AKAP4 et de ses produits, et les confronter aux paramètres spermatiques conventionnels du spermogramme-spermocytogramme. Dans un deuxième temps, nous avons tenté de déterminer la valeur prédictive d'un index de qualité du protéome spermatique et de la protéine AKAP4 sur le succès en Assistance Médicale à la Procréation lors de tentatives d'inséminations intra-utérines et de fécondation *in vitro*. Enfin, notre travail s'est porté sur l'étude et le rôle de la protéine Tau dans le testicule et le spermatozoïde humain.

La première partie de ce manuscrit, l'introduction, est une revue de la littérature reprenant les notions fondamentales nécessaires à la compréhension du sujet.

Les trois objectifs seront présentés en fin d'introduction, suivis d'un rappel de la méthodologie globale mise en place pour répondre aux différentes questions posées dans ce manuscrit.

Les travaux de Thèse seront abordés sous la forme de quatre articles scientifiques. Les 2 premiers ont été publiés, le troisième soumis et le quatrième est en préparation. Chaque article sera discuté une première fois dans ce chapitre.

La discussion générale reprendra le fil conducteur de l'ensemble du projet de notre équipe, en discutant les différents points présentés dans ce travail.

La conclusion ouvrira à de nouvelles perspectives pour la suite de ce travail.

Enfin, les annexes contiennent les articles sous leur forme publiée, ainsi que les autres publications et communications orales et affichées réalisées au cours de ces 3 années de Thèse.

INTRODUCTION

1 LE SPERMATOZOÏDE

1.1 La spermatogenèse

La spermatogenèse est un phénomène dynamique qui débute dans les testicules au moment de la puberté. À cette période, les cordons sexuels se perméabilisent puis se transforment en tubes séminifères. Les tubes séminifères sont constitués par un épithélium composé de 2 populations cellulaires distinctes : les cellules de Sertoli (cellules somatiques), et les cellules germinales à différents stades de division et de différenciation (figure 1). La spermatogenèse se découpe en 3 étapes distinctes : mitose, méiose et spermiogenèse. Elle englobe la totalité des divisions des cellules germinales et du développement des gamètes, de la spermatogonie diploïde (cellule germinale primordiale) au gamète haploïde : le spermatozoïde. La division des cellules germinales débute avec la prolifération par mitose des spermatogonies, situées en périphérie des tubes séminifères sur la membrane basale. Elle progresse en direction de la lumière des tubes, les cellules germinales subissant les 2 divisions méiotiques donnant lieu successivement aux stades intermédiaires de spermatocyte I (spermatocyte primaire), de spermatocyte II (spermatocyte secondaire) et enfin, de spermatide. La formation du spermatozoïde mature résulte de la différenciation haploïde des spermatides. Cette phase, appelée spermiogenèse, est un processus long et très spécialisé présentant 8 étapes chez l'homme. Au cours de la spermiogenèse, la cellule change de morphologie avec un allongement du noyau. La chromatine nucléaire se compacte de façon à préserver l'intégrité de l'acide désoxyribonucléique (ADN).

1.2 Structure générale du spermatozoïde

Le spermatozoïde humain est une cellule hautement spécialisée. Il se compose de 2 parties : une tête et un flagelle (figure 2). Le lien entre la tête et le flagelle est assuré par une pièce connective/collet. La tête, d'une taille de 5 μm par 3 μm , se divise elle-même en 2 parties, (1) le noyau dont la chromatine est très condensée par les protamines et (2) l'acrosome, vésicule riche en enzymes indispensables à la fécondation, recouvrant les deux tiers antérieurs du noyau (Auger & Eustache, 2000) (figure 2). Le flagelle est une structure de 60 μm environ qui comprend un axonème central et qui peut être subdivisé en quatre parties : la pièce connective (PC), la pièce intermédiaire (PI), la pièce principale (PP) et la pièce terminale (figure 2).

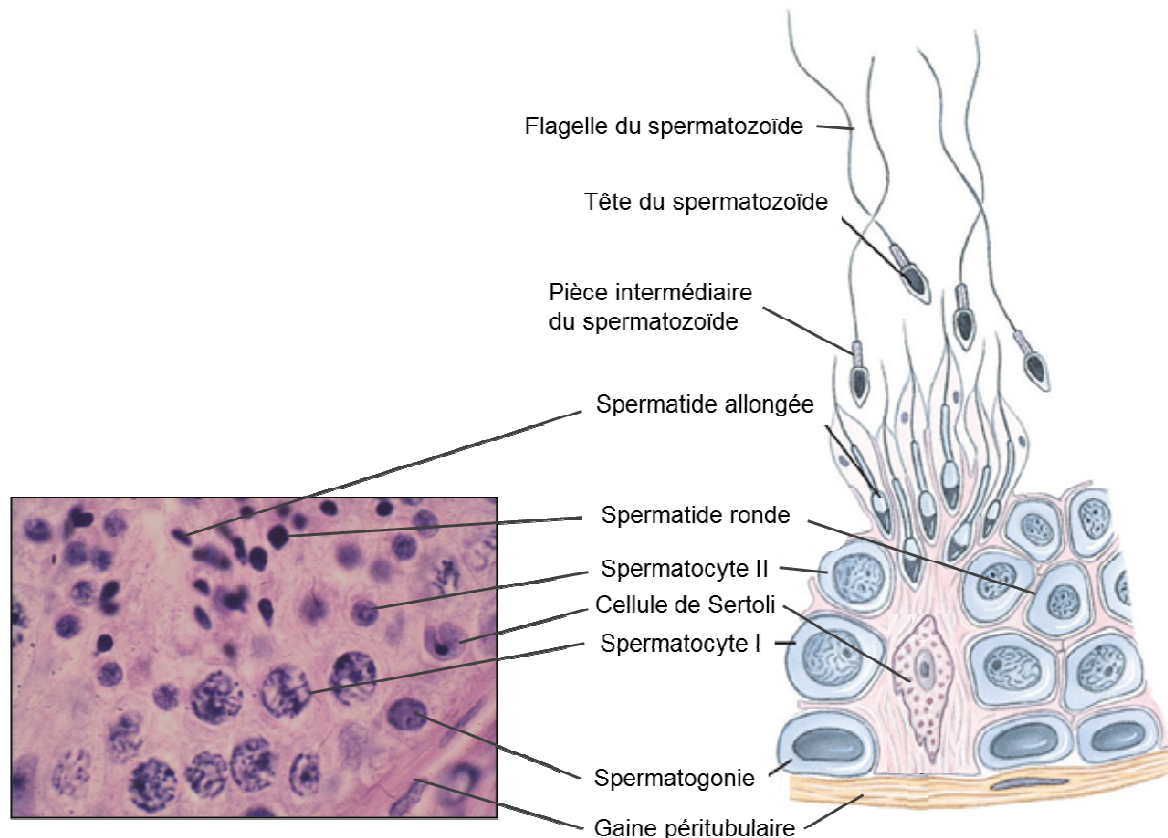


Figure 1 : La spermatogenèse. Observation des différentes divisions des cellules germinales et du développement des gamètes sur une coupe de tube séminifère du testicule humain. Avec l'autorisation du Département d'Histologie de la Faculté de Médecine de Lille. Adapté de ©De Boeck University, 2007.

1.3 La tête

1.3.1 L'acrosome

L'acrosome est une vésicule d'origine golgienne composée d'enzymes hydrolytiques, d'où un pH acide mis en évidence par la coloration à l'acridine orange (Abou-Haila & Tulsiani, 2000; Moreno & Alvarado, 2006). Il comporte une membrane externe située sous la membrane plasmique spermatique et une membrane interne qui recouvre la membrane nucléaire. Les 2 membranes internes et externes sont continues et renferment un espace qui contient les enzymes hydrolytiques. Sa position antérieure au noyau est essentielle. En effet, après avoir remonté les voies génitales féminines, le spermatozoïde traverse les cellules du cumulus entourant l'ovocyte. Il s'ensuit la réaction acrosomique ou exocytose de l'acrosome.

L'exocytose de l'acrosome est un événement dépendant du calcium, réalisé à partir de plusieurs points de fusion de la membrane externe avec la membrane plasmique accolée,

ainsi que de l'interaction d'une paire spécifique de protéines appelées SNARE (pour *soluble NSF-attachment protein receptors*) (Kierszenbaum, 2000). Les points de fusion formés permettent à la membrane acrosomique interne d'être exposée, ainsi que la dispersion des enzymes contenues dans l'acrosome (notamment la hyaluronidase et la pro-acrosine) qui sont cruciales pour la digestion et la pénétration de la matrice extracellulaire de l'ovocyte (Harper *et al.*, 2008). La pro-acrosine est une enzyme inactive. De nombreux clivages engendrent sa forme active, l'acrosine (Zahn *et al.*, 2002). L'acrosine est une endoprotéase « trypsin-like » dont l'activité est la protéolyse de la zone pellucide, membrane composée de glycoprotéines qui entoure l'ovocyte. (Klemm *et al.*, 1991; Oh-Oka *et al.*, 2001; Ferrer *et al.*, 2012). Les hyaluronidases génèrent la rupture des ponts d'acide hyaluronique existant au niveau du cumulus et de la zone pellucide de l'ovocyte (Martin-DeLeon, 2011).

La réaction acrosomique est un processus d'exocytose considérée comme la principale condition préalable à la pénétration des spermatozoïdes à travers la zone pellucide. Cependant, la nature des inducteurs de la réaction acrosomique reste une question non résolue (Tosti & Ménézo, 2016).

1.3.2 Le noyau

1.3.2.1 La chromatine

La chromatine du spermatozoïde subit un remodelage crucial au cours de la dernière étape de la spermatogenèse, appelée spermiogenèse, qui comprend une élimination en 2 étapes de 90 à 95 % des histones communes à toutes les cellules : remplacement des histones par 2 protéines de transition (T1 et T2), puis par des protamines. Il existe 2 formes de protamines : la protamine 1 (P1) et la protamine 2 (P2). La forme P2 est spécifique des spermatozoïdes humain, murin et équin. Les protamines sont de petites molécules d'environ 17 kDa chargées négativement en raison de la forte teneur en arginine (Ward & Coffey, 1991; Balhorn, 2007; Carrell *et al.*, 2007). Leur pH basique (point isoélectrique supérieur à 11) sert à neutraliser les charges négatives de l'ADN afin de permettre l'hypercompaction de la chromatine. Son déséquilibre engendre une anomalie de compaction de la chromatine, un défaut morphologique de la tête du spermatozoïde et un arrêt du développement embryonnaire. La compaction de la chromatine entraîne une répression quasi-complète de la transcription à l'intérieur du spermatozoïde. Un des objectifs de cette compaction est donc de protéger le

génomique paternel en le rendant inaccessible aux nucléases (Wykes & Krawetz, 2003; Oliva, 2006; de Mateo *et al.*, 2009; Oliva & Castillo, 2011a).

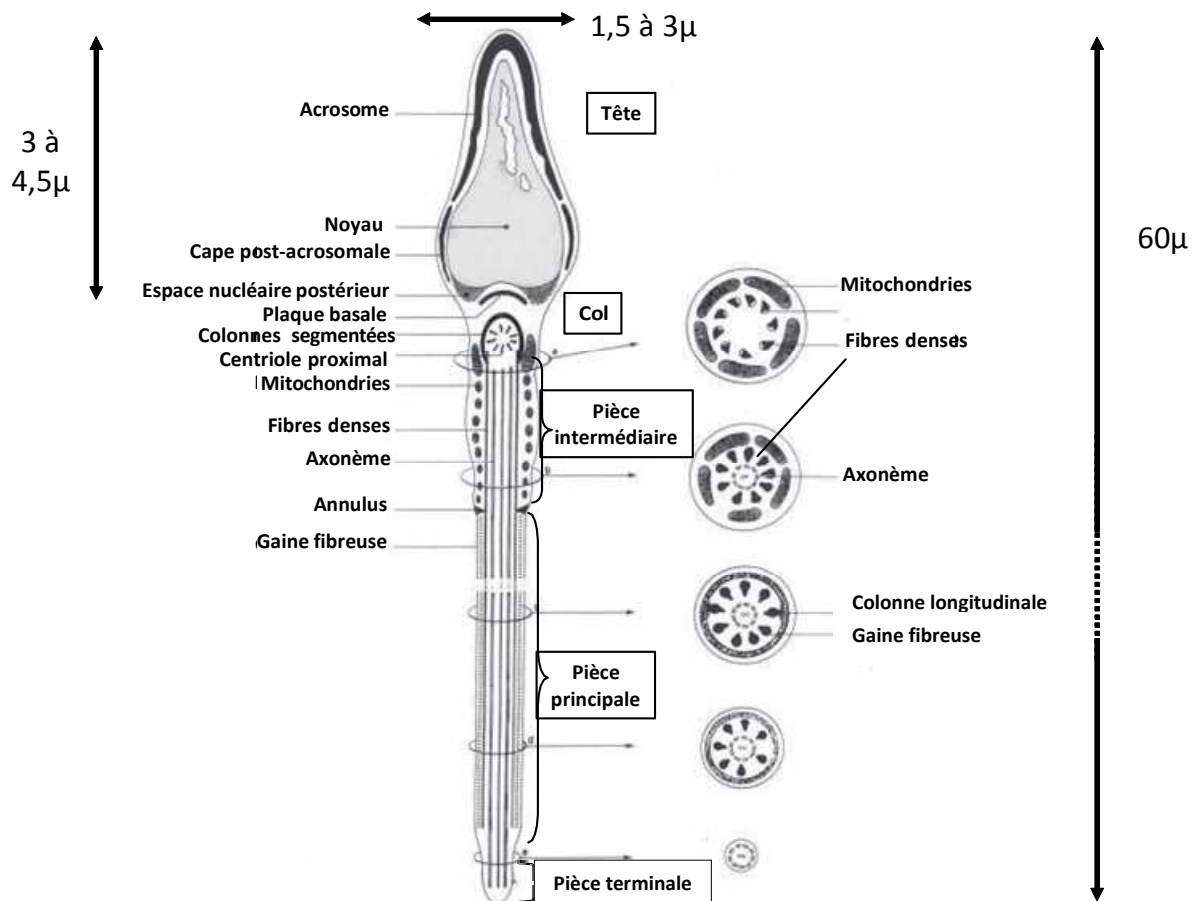


Figure 2 : Représentation schématique d'un spermatozoïde.
D'après Cohen-Bacrie, 2008.

En fin de méiose, une vague d'acétylation induit le recrutement des 2 protéines T1 et T2, l'incorporation des variants testiculaires des histones, une modification des marques épigénétiques et enfin l'intégration d'une proportion égale de P1 et P2 (Brewer *et al.*, 2002; Oliva & Castillo, 2011a). Leur ratio P1/P2 est constant. Une expression anormale des protamines est rare chez les hommes présentant une fertilité normale, mais relativement courante (10 à 20 %) chez les patients souffrant d'une infertilité d'origine masculine (Aoki *et al.*, 2006b). Les niveaux de protamination sont hétérogènes au sein d'un éjaculat. Cependant, des anomalies qui entraînent une mauvaise protamination globale sont habituellement associées à une diminution de la qualité du spermatozoïde, y compris un risque accru de malformations épigénétiques (Aoki *et al.*, 2006a).

La conservation de 5-10 % des histones au cours de la protamination amène à s'interroger sur le rôle biologique potentiel de ces histones résiduelles (Carrell *et al.*, 2007). L'hypothèse que les marquages épigénétiques des histones jouent un rôle dans les fonctions du spermatozoïde normal, peut-être après la régulation du génome paternel après fécondation, a été récemment avancée (Carrell *et al.*, 2016).

1.3.2.2 L'ARN

La transcription cesse au cours de la spermatogenèse au stade de spermatide ronde. En effet, aucune activité transcriptionnelle dans le spermatozoïde éjaculé n'a été constatée lors d'expériences d'incorporation d'uridine radiomarquée (Grunewald *et al.*, 2005). Les transcrits d'acide ribonucléique (ARN) sont soit dégradés, soit retenus dans les ribonucléoprotéines pour une utilisation future dans le développement du spermatozoïde ou de l'embryon. Il est démontré que le spermatozoïde contient un pool d'ARN messager (ARNm) pas ou peu traduits, ainsi que de petits ARN non codants (Sendler *et al.*, 2013). Ostermeier et collaborateurs ont été les premiers à rapporter la conservation d'ARN codants et non-codants dans les spermatozoïdes matures (Ostermeier *et al.*, 2005). Cette observation a été confirmée depuis par plusieurs équipes (Carrell *et al.*, 2016), et les types d'ARN identifiés incluent maintenant pratiquement toutes les classes de petits micro-ARN (miRNA), de petits ARN interférents (siRNA), de petits ARN nucléolaires (snoRNA), et ARN interagissant avec piwi (piRNA), ainsi que de longs ARN non-codants (lnRNA) (Sendler *et al.*, 2013).

Grâce aux avancées de la protéomique, des données récentes mettraient pourtant en évidence des protéines ribosomales (de Mateo *et al.*, 2011), ce qui suggérerait une activité traductionnelle probablement restreinte dans le spermatozoïde et aussi une transcription possible dans les mitochondries, comme dans les cellules somatiques (Gur & Breitbart, 2008).

D'autres hypothèses divergent : ce pool d'ARNm et de petits ARN non codants serait une réserve d'ARN délivrée à l'ovocyte lors de la fécondation dans le but de soutenir les premières heures de vie du zygote (Kumar *et al.*, 2013). Ainsi, certaines équipes envisagent ce pool d'ARN comme un nouveau marqueur de qualité du spermatozoïde et proposent donc son séquençage (Hamatani, 2011; Li & Zhou, 2012). Par exemple, le miRNA34c a été rapporté comme étant le miRNA le plus abondant dans les spermatozoïdes d'hommes fertiles, mais il a également déjà été signalé comme étant impliqué dans le clivage embryonnaire (Liu *et al.*, 2012).

1.4 Le flagelle

Dans la PI et la PP, l'axonème est entouré de fibres denses. Spécifiquement dans la PI, axonème et fibres denses sont recouverts par une gaine composée de mitochondries productrices d'énergie, disposées en hélice. Dans la PP, l'hélice mitochondriale fait place à une gaine fibreuse qui entoure l'axonème et les fibres denses. Le cytosquelette se désorganise progressivement dans la pièce terminale.

1.4.1 La pièce connective

La pièce connective est une partie courte contenant les colonnes segmentées et qui est le point d'articulation entre la tête du spermatozoïde et le flagelle. À partir des restes du centriole distal, l'axonème se prolonge sur toute la longueur des quatre subdivisions du flagelle pour se désorganiser progressivement dans la partie terminale. L'axonème est constitué d'un anneau de neuf doublets périphériques de microtubules entourant un doublet central (figure 3 et 4). Il s'agit d'une conformation 9+2. Chaque doublet de microtubule est composé d'un tubule A, de treize protofilaments disposés parallèlement, accolé à un tubule B incomplet, soit dix à onze protofilaments. Les protofilaments sont composés d'hétérodimères de α et β -tubuline. Par ailleurs, les bras de dynéine internes et externes partent périodiquement de chacun des neuf doublets extérieurs en fonction de la séquence peptidique au niveau du tubule A et sont chargés de générer la force motrice du flagelle (Raff *et al.*, 2008). L'activité adénosine triphosphatasique (ATPasique) de la dynéine est induite par phosphorylation (Turner, 2006). Les bras de dynéine ne sont pas tous activés en même temps, permettant ainsi la courbure du flagelle (figure 5). Ils glissent le long des microtubules, ce qui induit le mouvement périodique et oscillatoire du flagelle. Leur déphosphorylation par une voie dépendante de la calmoduline renverse alors le système. De plus, l'axonème comprend neuf ponts radiaires provenant chacun d'un des neuf doublets de microtubules périphériques, qui se projettent vers le doublet central de façon hélicoïdale (Turner, 2006).

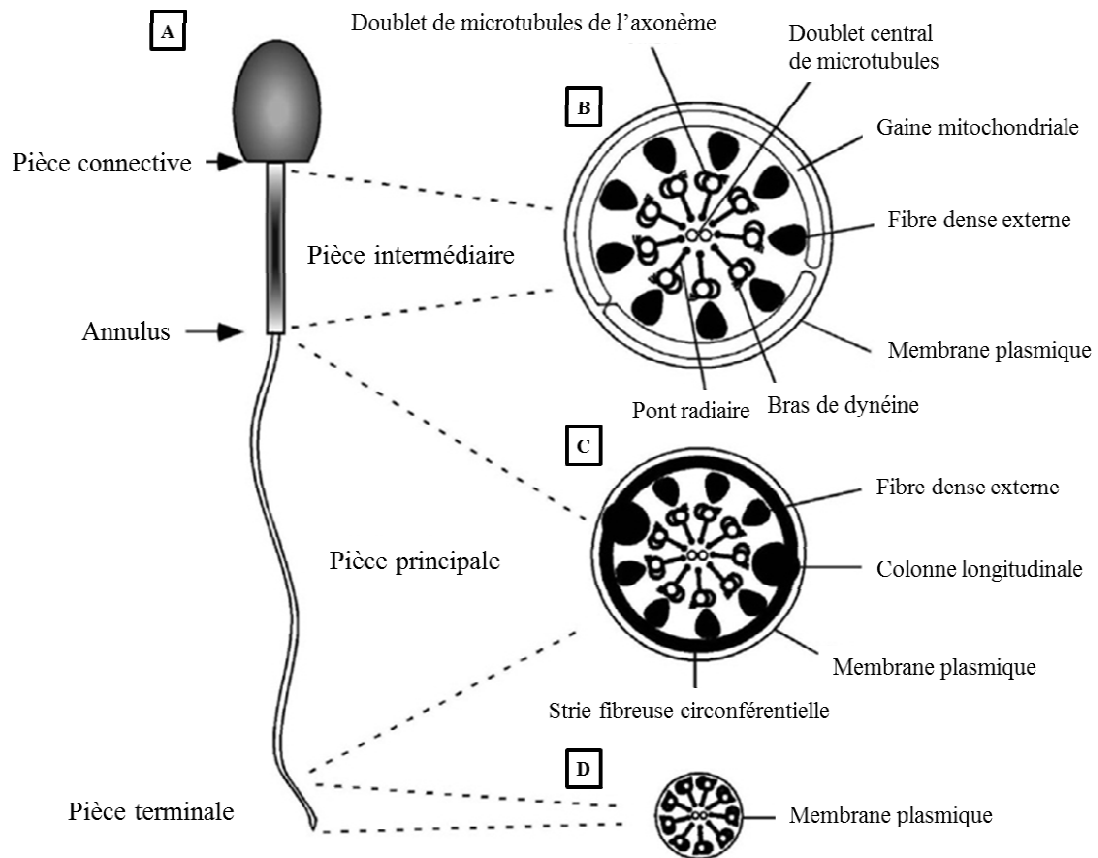


Figure 3 : Représentation schématique de l'ultra-structure du flagelle d'un spermatozoïde. (A) le spermatozoïde est divisé en quatre domaines: la pièce connective, la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale ; (B) Coupe transversale schématique de la pièce intermédiaire ; (C) Coupe transversale schématique de la pièce principale ; (D) Coupe transversale schématique de la pièce terminale. D'après Turner, 2006.

1.4.2 La pièce intermédiaire

La PI qui suit représente environ un quart à un tiers de la longueur du flagelle. Le centre est constitué d'une part par la présence de neuf fibres denses externes qui entourent chacune les neuf doublets de microtubules de l'axonème, et d'autre part par la gaine mitochondriale qui entoure les fibres denses externes et l'axonème (figure 3). Les fibres denses externes sont présentes dans la PI et dans la PP. La gaine mitochondriale en revanche est exclusive à la PI. L'annulus marque la fin de la PI et le début de la prochaine composante flagellaire, la PP. À partir de l'annulus, la pièce principale se prolonge sur environ deux tiers de la longueur du flagelle.

Les fibres denses assurent la liaison entre l'axonème et la pièce connective du centriole pour recouvrir ensuite l'axonème sur toute sa longueur. Leur structure élastique confère une

protection à l'axonème lors de son transit dans les voies génitales masculines et féminines (Shao *et al.*, 1998).

La gaine mitochondriale est composée de mitochondries disposées en hélice (dix à quinze tours de spires) autour de l'axonème (figure 3). Cette hélice mitochondriale intervient à différents niveaux. Son rôle premier est la production énergétique. Le glucose pénètre dans la mitochondrie et intègre 2 voies métaboliques génératrices d'ATP : le cycle de l'acide citrique et la phosphorylation oxydative (Piomboni *et al.*, 2012). Deuxièmement, la mitochondrie est une réserve d'ions calcium (Ca^{2+}) qui est un modulateur de l'hyperactivation du mouvement flagellaire, de la capacitation et la réaction acrosomique (Pereira *et al.*, 2016). Les mitochondries interviennent donc dans la voie métabolique calcique. Enfin, les mitochondries sont les premières pourvoyeuses d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour *reactive oxygen species*). À certaines concentrations, les ROS sont d'une extrême importance à la fonction des spermatozoïdes (Agarwal *et al.*, 2003; Ford, 2004). À l'inverse une quantité trop importante de ROS conduit à la peroxydation des lipides membranaires, réduisant la fluidité membranaire et la mobilité spermatique. Les ROS peuvent également induire des dommages à l'ADN.

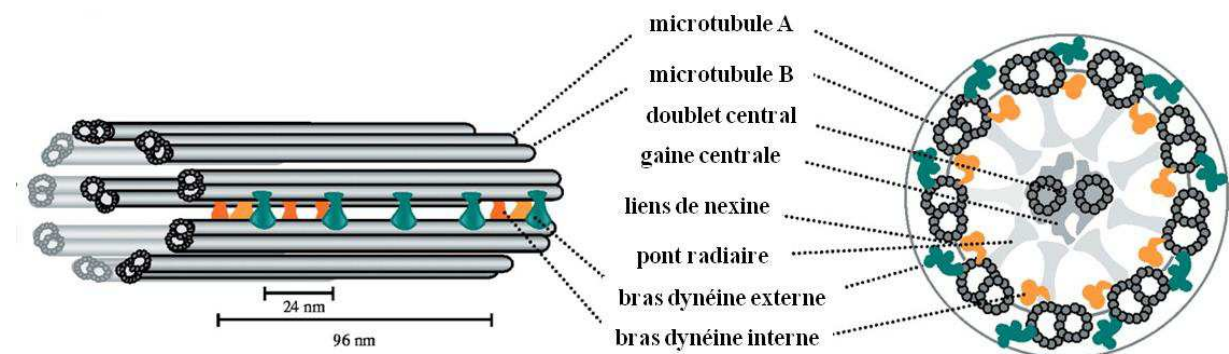


Figure 4 : Structure de l'axonème d'un spermatozoïde. Neuf doublets de microtubules (microtubules A et B) entourent deux microtubules centraux (paire centrale), qui sont entourés par la gaine centrale. Les microtubules sont interconnectés par des liens de nexine, des ponts radiaux et des bras de dynéine interne et externe. D'après Ibanez-tallon *et al.*, 2003.

1.4.3 La pièce principale

Au début de la PP, une gaine fibreuse entoure les fibres denses et l'axonème auquel elle est reliée par 2 colonnes longitudinales ventrales et dorsales attachées aux doublets de microtubules 3 et 8 (figure 3). Les 2 colonnes longitudinales de la gaine fibreuse remplacent 2 des fibres denses externes, réduisant ainsi leur nombre de neuf à sept. Les colonnes de la gaine fibreuse courent sur toute la longueur de la PP et sont stabilisées par des stries fibreuses circonférentielles qui entourent les fibres denses externes. La gaine fibreuse est la seule structure exclusive à la PP. Vers la fin de la PP, les fibres denses externes et la gaine fibreuse s'amincissent et puis s'arrêtent.

La gaine fibreuse contient de nombreuses protéines impliquées dans différentes voies de signalisation telle l'activation de la voie de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), qui joue un rôle majeur dans la réponse cellulaire et en particulier la mobilité spermatique. En effet, l'activation de la voie de l'AMPC entraîne la phosphorylation de protéines cibles par l'intermédiaire de la protéine kinase A (PKA). Parmi les protéines de la gaine fibreuse, il faut noter les protéines AKAPs (pour *A-kinase anchor protein*), protéines majoritaires de constitution de la gaine fibreuse. Les AKAPs sont des protéines d'ancrage qui se lient à la PKA via 2 domaines de liaison (Brown *et al.*, 2003; Eddy *et al.*, 2003). La phosphorylation des résidus tyrosines de ces AKAPs permet de contrôler le glissement de la gaine fibreuse et de l'axonème et donc de réguler la mobilité spermatique (Carrera *et al.*, 1996; Turner *et al.*, 1999).

La ropporine est également une protéine de la gaine fibreuse. Elle est exprimée sur la surface interne de la gaine fibreuse. La ropporine est une protéine de liaison à la rhophiline, spécifique du spermatozoïde. La liaison de la rhophiline à la Rho-guanosine triphosphatase (GTPase) entraîne l'activité kinase/phosphatase de cette dernière. La ropporine possède un domaine de liaison à la PKA présentant une séquence homologue à celui des AKAPs. Cette donnée suggère que la ropporine pourrait également se lier à la PKA et ainsi l'activer (Fujita *et al.*, 2000).

Les enzymes glycolytiques hexokinase 1 (HK1) et glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) présentent chacune une isoforme spécifique du testicule et sont exprimées au niveau de la gaine fibreuse. La glycolyse permet la production d'ATP indépendamment de la voie oxydative mitochondriale requise pour le mouvement flagellaire

(Turner, 2006). Ainsi, ces 2 enzymes jouent un rôle prédominant dans la mobilité spermatique (Eddy *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2008b).

1.4.4 La pièce terminale

La pièce terminale ne contient plus que l'axonème entouré par la membrane plasmique (figure 3).

1.5 La mobilité du spermatozoïde

La mobilité des spermatozoïdes dépend fortement de plusieurs voies métaboliques et de mécanismes de régulation.

1.5.1 Les bases structurelles et moléculaires de la mobilité spermatique

La capacité de mobilité est acquise par les spermatozoïdes lors de leur passage à travers l'épididyme. Les spermatozoïdes présentent 2 types de mobilité, activées et soutenues par différents stimuli (Pereira *et al.*, 2016). La mobilité progressive, développée dans le tractus génital féminin, permet aux spermatozoïdes de se détacher du plasma séminal dans le vagin et de progresser activement dans l'utérus. Ensuite, les spermatozoïdes présentent une mobilité dite hyperactivée, développée après capacitation dans le tractus génital féminin supérieur et essentielle pour le pouvoir fécondant des spermatozoïdes. Ce dernier type de mobilité se caractérise par un rythme plus vigoureux et moins symétrique du flagelle, entraînant un mouvement progressif et en « coup de fouet ». Ce mouvement semble être important pour le détachement du spermatozoïde de l'épithélium de l'utérus, ainsi que pour la progression mécanique à travers le cumulus oophorus et la zone pellucide entourant l'ovocyte. Le déplacement du spermatozoïde se caractérise par un mouvement du flagelle asymétrique et rythmique en trois dimensions.

Comme vu précédemment, la pièce principale du flagelle est constituée d'une structure cytosquelettique organisée avec un axonème entouré de 9 fibres denses externes et d'une gaine fibreuse. À l'inverse, dans la pièce intermédiaire du flagelle, la gaine fibreuse est remplacée par une gaine mitochondriale qui fournit une partie de l'énergie nécessaire au mouvement du flagelle. Le glissement réciproque de chaque paire de microtubules, provenant

de l'ancrage séquentiel des bras de dynéine sur le doublet voisin et la génération d'une force de glissement ATP-dépendante, aboutit finalement à la formation de courbes de direction alternée et à une propagation de l'oscillation le long du flagelle (figure 5). La liaison des microtubules à la gaine fibreuse rigide et la présence de fibres denses externes asymétriques évite les mouvements plans, ce qui confère une forme hélicoïdale en trois dimensions au mouvement de propagation flagellaire (figure 5). L'énergie nécessaire pour soutenir un tel processus est fournie par l'ATP, hydrolysé par la dynéine-ATPase, qui permet de générer la force de glissement des microtubules. Le glissement des microtubules dépend des taux d'AMPc et la vitesse du glissement est dépendante de l'ATP.

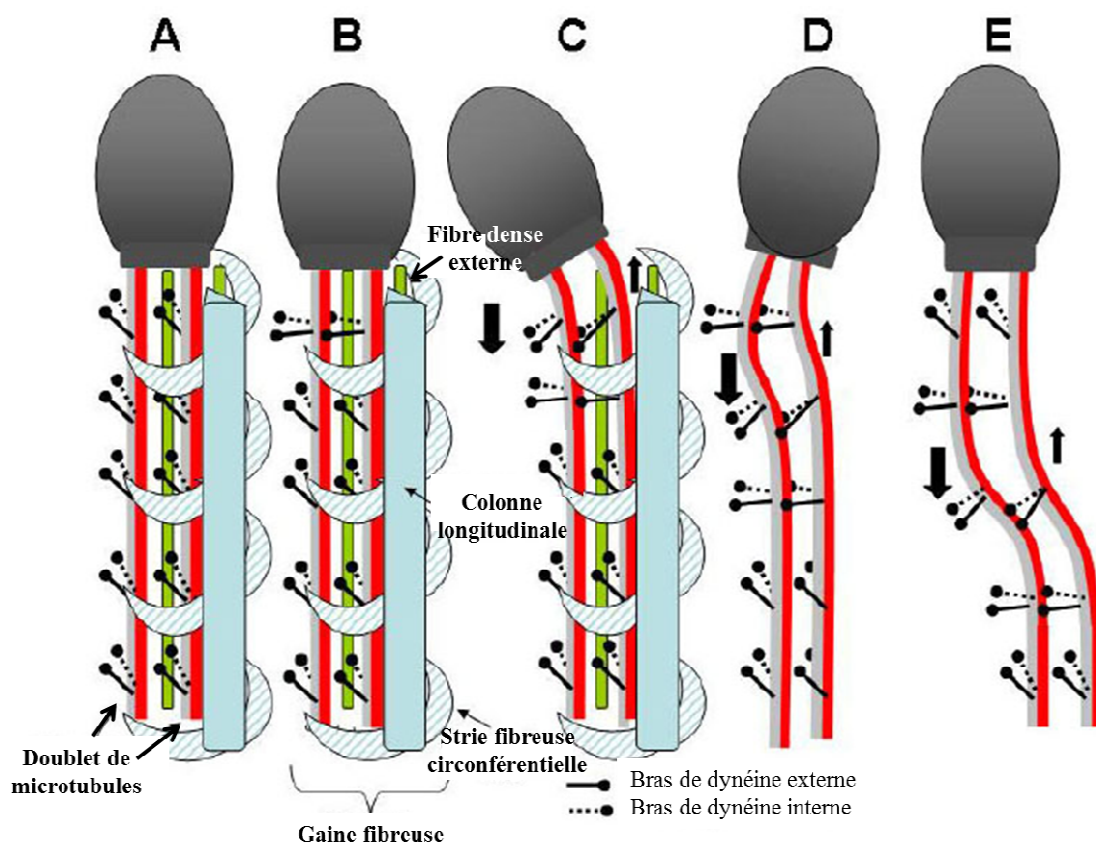


Figure 5 : Mécanisme de mouvement du flagelle des spermatozoïdes sur la base du glissement réciproque de 2 couples adjacents de microtubules et de l'ancrage des microtubules à la gaine fibreuse. Coupe longitudinale du spermatozoïde humain. Sont représentés : 2 doublets adjacents de microtubules (en gris et rouge), la gaine fibreuse comprenant des fibres denses externes (en vert) et une colonne longitudinale, ainsi que des stries fibreuses circonférentielles (rayures bleues claires). A-E : coulissement réciproque séquentiel des 2 doublets adjacents de microtubules dans la pièce principale des spermatozoïdes. Pour mieux apprécier le mouvement de glissement, les figures D et E ont été représentées sans la gaine fibreuse, les fibres denses externes, la colonne longitudinale, ni les stries fibreuses circonférentielles.

D'après Luconi *et al.*, 2011.

1.5.2 Initiation et maintien de la mobilité du spermatozoïde

On sait relativement peu de choses sur les mécanismes moléculaires qui contrôlent ce processus. Le flagelle des spermatozoïdes est une structure très complexe avec plusieurs composants moléculaires, responsables de son assemblage, de sa composition et de ses fonctions. La composition moléculaire du flagelle humain n'est pas encore complètement comprise et ce qui est connu provient principalement de l'étude de modèles tels que la souris (Tamowski *et al.*, 2010), les invertébrés marins et des protistes (Inaba, 2003).

Ohtake et collaborateurs se sont intéressés en 1976 (Ohtake, 1976) au rôle du pH intracellulaire, montrant une association entre la consommation d'oxygène et une alcalinisation. D'autres études ont appuyé cette hypothèse, démontrant qu'un pH acide agit en inhibant l'hydrolyse de l'ATP. Or c'est l'hydrolyse de l'ATP qui fournit de l'énergie par oxydation mitochondriale des acides gras, et ce phénomène est rapidement initié lorsque le cytoplasme spermatique est alcalinisé (Shapiro *et al.*, 1985). Il a été observé chez les mammifères que l'alcalinisation intracellulaire provoque le mouvement des spermatozoïdes (Babcock *et al.*, 1983), probablement par un mécanisme lié à l'activation de la dynéine (Nakajima *et al.*, 2005).

Parallèlement à l'alcalinisation, des mécanismes variés ont été proposés pour expliquer l'activation de la mobilité spermatique chez les mammifères au moment de l'éjaculation. La voie PKA et la voie du calcium sont 2 voies métaboliques importantes impliquées dans la régulation de la mobilité des spermatozoïdes (Darszon *et al.*, 2001, 2006; Pereira *et al.*, 2016) (figure 6). Ces voies comprennent des ions calcium, les adénylyl cyclases, les ions bicarbonates, les différents canaux de membrane et des événements de phosphorylation. Tous sont responsables de l'acquisition des compétences qui permettront aux spermatozoïdes de féconder l'ovocyte, à savoir la capacitation, l'hyperactivité, et la réaction acrosomique (figure 6).

L'un des principaux facteurs impliqués dans la régulation du mouvement des spermatozoïdes est l'augmentation d'AMPc intracellulaire, via la voie de signalisation de la PKA (Jones & Murdoch, 1996). Les changements d'AMPc jouent les médiateurs avec les protéines régulatrices associées à l'axonème (Aitken, 2000). En particulier, la phosphorylation des protéines axonémales joue un rôle crucial dans la régulation de la mobilité. De ce fait, la

phosphorylation des protéines AMPc-dépendante a été proposée comme un mécanisme central déclencheur de la mobilité (Carr & Acott, 1989).

Le maintien de la mobilité des spermatozoïdes est également dépendant de la présence de calcium, bien que cela ne semble pas être un facteur physiologique associé à la quiescence des spermatozoïdes, mais est plutôt associé à une augmentation de la teneur en AMPc (Aitken, 2000; Pereira *et al.*, 2016). Récemment, il a été montré chez l'homme et certains mammifères que la mobilité des spermatozoïdes est régulée par l'homéostasie ionique, qui est à son tour sous le contrôle direct des canaux ioniques (figure 6), et notamment par une hyperpolarisation de la membrane plasmique induite par potassium (Miller *et al.*, 2015). Chez les mammifères, bien que les spermatozoïdes éjaculés soient mobiles, leur capacité à féconder un ovocyte est réduite. Ce phénomène de mobilité réduite change après l'élimination de facteurs inhibiteurs tels que les glycoprotéines de surface, certaines protéines du plasma séminal et la diminution du cholestérol membranaire. Cet état final du spermatozoïde activé est connu comme étant l'hyperactivation, phase de haute énergie avec des mouvements flagellaires puissants (Lishko *et al.*, 2012). Il est clair que la mobilité des spermatozoïdes est un processus qui répond aux signaux de l'environnement extérieur, et cela inclut également des produits sécrétés par l'ovocyte. Chez les espèces non mammifères, les facteurs libérés par l'ovocyte, tels que le facteur d'initiation de la mobilité spermatique, modulent la mobilité des spermatozoïdes, alors que chez les mammifères, la progestérone et certains composants non identifiés des cellules du cumulus ont été reconnus comme responsables de l'hyperactivation spermatique (Quill & Garbers 2002).

Pour son activation, le spermatozoïde nécessite un approvisionnement adéquat en énergie à partir d'événements biochimiques intracellulaires tels que l'oxydation des substrats énergétiques, la phosphorylation des protéines et la conversion de l'énergie chimique en énergie mécanique. La phosphorylation oxydative mitochondriale et la glycolyse sont les principales voies métaboliques qui génèrent cette source d'énergie, sous la forme d'ATP (Ferramosca & Zara, 2014). Les mitochondries de la pièce intermédiaire tout d'abord, produisent de l'énergie par l'intermédiaire de la phosphorylation oxydative de substrats respiratoires (Yeung *et al.*, 1996). Des corrélations entre le potentiel de membrane mitochondrial (PMM), la mobilité progressive et le succès de fécondation *in vitro* (FIV) ont été rapportés (Marchetti *et al.*, 2004; 2010). Cependant, bien que ce type de production énergétique ait longtemps été considéré comme la source principale d'ATP, une production

locale d'énergie (pièce principale) a également été caractérisée via une voie glycolytique alternative. Ce phénomène est principalement impliqué dans le maintien de la mobilité

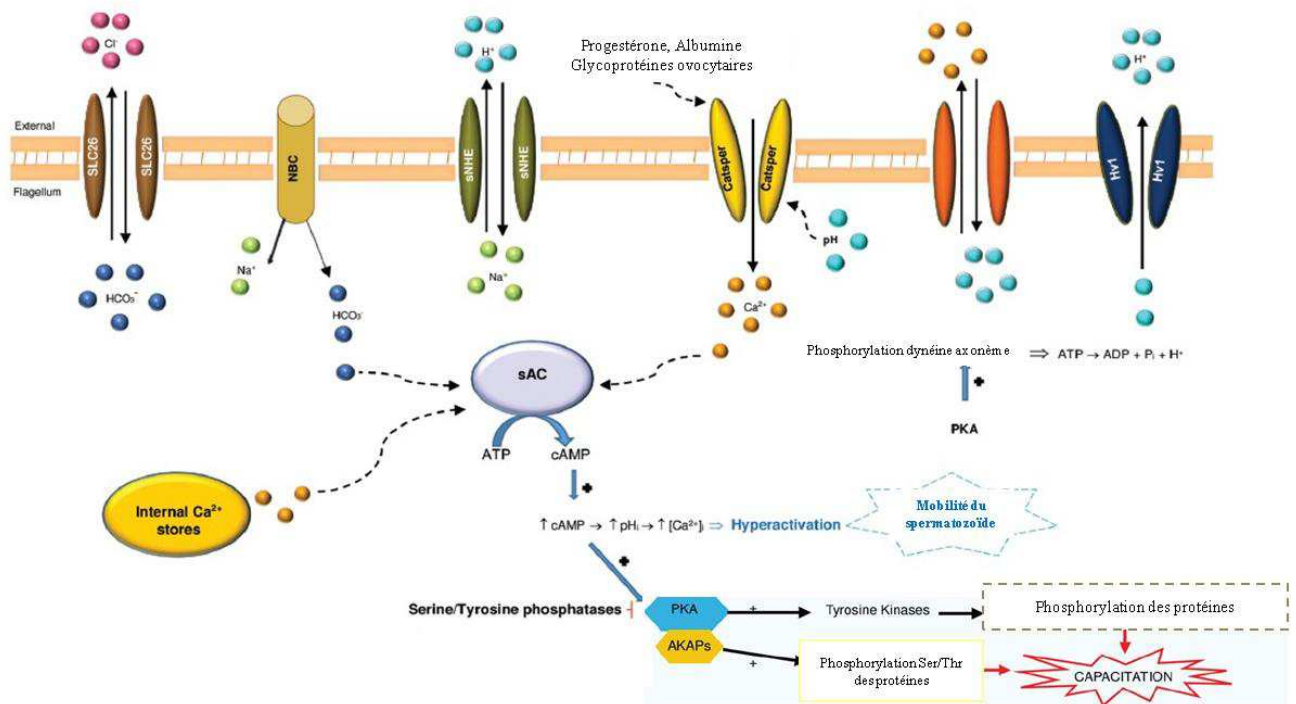


Figure 6 : Représentation schématique des voies considérées comme impliquées dans la régulation de la mobilité des spermatozoïdes chez les mammifères.

D'après Pereira *et al.*, 2016.

ADP : adenosine diphosphate; *AKAPs* : A-kinase anchor proteins; *cAMP* : cyclic adenosine monophosphate; *ATP* : adenosine triphosphate; Ca^{2+} : ions calcium; *CatSper* : cation channel of sperm; *Hv1* : proton channel; *NBC* : Na^+/HCO_3^- co-transporter; *pHi* : intracellular pH; *PKA* : protein kinase A; *sAC* : adenylyl cyclase; *Ser* : serine; *SLC26* : HCO_3^-/Cl^- transporter; *sNHE* : Na^+/H^+ exchanger; *Thr* : threonine.

hyperactivée (Fraser & Quinn, 1981). Fait intéressant, les isoformes de l'enzyme glycolytique spécifique des spermatozoïdes, la GAPDH et, dans une moindre mesure l'HK1, ont été caractérisées et trouvées associées à la gaine fibreuse (Welch *et al.*, 1992; Travis *et al.*, 1998). Ainsi, la gaine fibreuse représente une structure fonctionnelle permettant l'intégration d'enzymes glycolytiques et de molécules de signalisation impliquées dans la mobilité des spermatozoïdes. L'utilisation de l'énergie fournie par glycolysation est facilitée par l'emplacement des enzymes glycolytiques le long de la gaine fibreuse (Kim *et al.*, 2007).

D'autres facteurs majeurs interviennent également et affectent la mobilité des spermatozoïdes (Pereira *et al.*, 2016). On peut citer par exemple le rôle des ROS dans l'acquisition et le contrôle de la mobilité spermatique. Les ROS, telles que l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxyde nitrique (NO^-), sont des molécules chimiquement

réactives résultant de la consommation d'oxygène. À certaines concentrations, les ROS sont d'une importance essentielle à la fonction des spermatozoïdes (Agarwal *et al.*, 2003; Ford, 2004). La voie de l'AMPc/PKA est notamment dépendante de ROS (Ford, 2004; de Lamirande & O'Flaherty, 2008). Cependant, lorsque la production de ROS est accrue ou lorsque les défenses antioxydantes sont réduites, un déséquilibre se produit entre la production de ROS et l'aptitude du système biologique à réparer les dommages provoqués. On parle alors de stress oxydatif, qui est délétère pour la mobilité. De plus, en dehors de l'influence directe sur la mobilité des spermatozoïdes, l'augmentation des ROS est également liée à une augmentation des dommages à l'ADN (Gomez *et al.*, 1998; Twigg *et al.*, 1998). Parallèlement, d'autres facteurs comme le contrôle du volume de la cellule et de l'osmolarité sont également essentiels pour la mobilité des spermatozoïdes. Des défauts dans les mécanismes de régulation du volume et de l'absorption des osmolytes épидидymaires provoquent une augmentation anormale du volume de la tête du spermatozoïde et une angulation du flagelle. Ces modifications conduisent à une altération de la mobilité progressive, qui impacte sur la fertilité (Cooper & Yeung, 2003). Enfin, une modulation particulière du comportement des spermatozoïdes est également déclenchée lors de leur passage par différents compartiments des voies féminines, en particulier en termes de composition protéique, de glycosylation et d'hydratation de la glaire cervicale (Druart, 2012). De plus, les micronutriments contenus dans le plasma séminal peuvent également jouer un rôle important dans l'induction de la mobilité des spermatozoïdes (Macchia *et al.*, 2010).

2 ANALYSES ET SÉLECTION DES SPERMATOZOÏDES

2.1 Analyse des paramètres spermatiques

2.1.1 Analyse conventionnelle du sperme

L'analyse du sperme est effectuée afin d'évaluer les troubles de la fertilité, avec ou sans symptômes de déficience androgénique. La qualité de l'analyse dépend de la façon et du lieu du recueil, ainsi que des méthodes utilisées. Comme il existe 2 causes, biologiques et analytiques, pouvant entraîner des variations de la qualité du sperme, la normalisation des procédures pour la collecte et l'analyse de sperme est essentielle pour rendre comparables les résultats de différents laboratoires. Un nombre minimum de spermatozoïdes doit être évalué pour obtenir des valeurs acceptables, que ce soit pour l'évaluation du nombre de

spermatozoïdes, ou les pourcentages de spermatozoïdes mobiles, viables et morphologiquement normaux (Cooper *et al.*, 2010).

2.1.1.1 Le spermogramme

Les patients doivent observer une période d'abstinence entre 48 heures et 7 jours. L'échantillon doit être recueilli par masturbation dans un récipient stérile à large ouverture, sous la forme d'un cylindre gradué. L'examen de l'éjaculat doit être effectué selon les référentiels en vigueur. Pour la France, 2 référentiels principaux sont disponibles, le référentiel de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (World Health Organization, 2010) et le cahier Bioforma N°42 (Cahier de formation Bioforma. Exploration de la fonction de reproduction/versant masculin. 2009).

Evaluation macroscopique

Un éjaculat normal présente un aspect homogène gris opalescent et se liquéfie normalement à température ambiante en 20 min. Afin de réaliser les différentes analyses du spermogramme et du spermocytogramme de manière homogène, l'éjaculat liquéfié doit être bien mélangé avant de commencer les manipulations.

Le volume, la viscosité et le pH sont caractérisés en premier lieu. Le volume est le reflet d'un bon fonctionnement des glandes annexes. La viscosité dépend du mélange des sécrétions prostatiques et des vésicules séminales. Le pH est le témoin d'un bon équilibre des sécrétions des glandes et des voies génitales.

Evaluation microscopique initiale

Pour cette étape, un faible volume de sperme (par exemple 20 μ l) est placé entre une lame et une lamelle de taille appropriée (par exemple, 22 x 22 mm). Cette manipulation permet d'obtenir une profondeur suffisante pour analyser sans restriction le mouvement des spermatozoïdes en trois dimensions (d'autres volumes de sperme et de tailles de lamelles peuvent être utilisés).

❖ L'agrégation et l'agglutination des spermatozoïdes

L'agrégation (figure 7), c'est-à-dire l'adhérence de spermatozoïdes immobiles à des débris ou à d'autres éléments de l'éjaculat, ou l'adhérence de spermatozoïdes mobiles à des cellules non-

spermatozoïdes, doit être distinguée de l'agglutination des spermatozoïdes mobiles les uns avec les autres. Seule l'agglutination dans l'échantillon de sperme frais est prise en compte et évocatrice de la présence d'anticorps anti-spermatozoïdes.

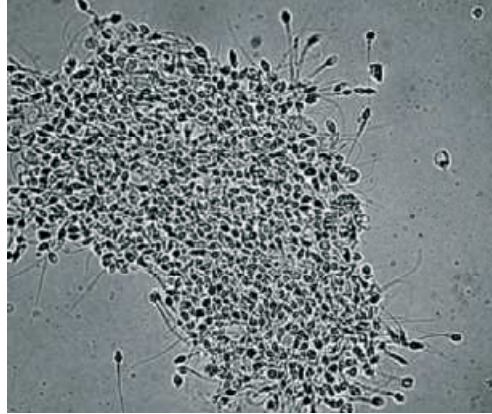


Figure 7 : Agrégation de spermatozoïdes immobiles.

Cahier de formation Bioforma. Exploration de la fonction de reproduction / versant masculin. 2009.

❖ *Les cellules*

En plus de spermatozoïdes, l'éjaculat contient des cellules épithéliales du tractus uro-génital et des cellules dites cellules rondes (cellules de la spermatogenèse et leucocytes).

Evaluation microscopique approfondie

❖ *La mobilité des spermatozoïdes*

La mobilité des spermatozoïdes est un paramètre essentiel pour l'évaluation du pouvoir fécondant du spermatozoïde. Cette opération est effectuée à température ambiante (20-24°C) ou à 37°C, dans un délai de 60 min après recueil, entre lame et lamelle (cf. ci-dessus) à un grossissement x200 ou x400. La qualité de la mobilité est exprimée en pourcentage de spermatozoïdes mobiles divisés en 3 catégories :

- Mobilité progressive (PR) : déplacement actif avec une trajectoire linéaire ou aléatoire.
- Mobilité non progressive (NP) : mobilité en cercle restreint ou aucun déplacement avec des oscillations de la tête sur place et/ou de simples mouvements flagellaires.
- Immobile (IM) : aucun déplacement, tête et flagelle immobiles.

La subdivision des spermatozoïdes progressifs en 2 sous-catégories « mobiles rapides et progressifs » ou type [a], et « mobiles lents ou faiblement progressifs » ou type [b] est souvent effectuée dans les laboratoires, bien qu'il soit difficile pour les évaluateurs d'analyser les vitesses avec précision (Cooper & Yeung, 2006). Il existe également des systèmes d'analyses assistés par ordinateurs (de type système CASA, pour *computer-assisted sperm analysis*) qui permettent une analyse automatique, répétitive et précise d'un échantillon de sperme. Cependant, peu de laboratoires possèdent ce type d'appareillage pour évaluer la mobilité.

❖ *La numération des spermatozoïdes et cellules rondes*

La numération des spermatozoïdes est déterminée dans une cellule de comptage, après dilution appropriée dans une solution de fixation des cellules (figure 8). Seuls les spermatozoïdes intacts, avec une tête et un flagelle, sont comptabilisés. Idéalement, le nombre minimum de spermatozoïdes comptés dans la cellule devrait être de 400, ce qui permet d'assurer une erreur de comptage de 5 % pour la valeur estimée. En pratique quotidienne, ce chiffre est plutôt de 100 à 200.

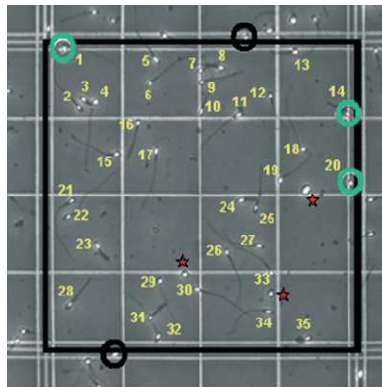


Figure 8 : Cellule de comptage pour numération spermatique.

Cahier de formation Bioforma. Exploration de la fonction de reproduction / versant masculin. 2009.

❖ *La vitalité*

Elle permet d'évaluer la proportion de spermatozoïdes vivants et morts dans l'éjaculat via une double coloration éosine-nigrosine. La membrane plasmique des spermatozoïdes morts étant perméable, ces derniers présentent une coloration rose en comparaison des vivants qui ne prennent pas le colorant (figure 9).

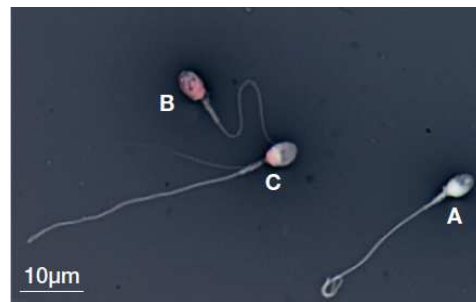


Figure 9 : Aspect des spermatozoïdes sur frottis après coloration à l'éosine-nigrosine. (A) spermatozoïde vivant. (B) et (C) spermatozoïdes morts. Cahier de formation Bioforma. Exploration de la fonction de reproduction / versant masculin. 2009.

2.1.1.2 Le spermocytogramme

La morphologie du spermatozoïde est un autre paramètre essentiel pour l'évaluation de la qualité spermatique. La morphologie des spermatozoïdes est évaluée à partir d'un frottis de spermatozoïdes séchés à l'air, fixés et colorés. Les procédures de coloration de Papanicolaou modifiée, Shorr & Diffquik recommandées par l'OMS (World Health Organization, 2010) fournissent une coloration adéquate pour les spermatozoïdes et permettent une certaine différenciation des cellules rondes.

Le spermocytogramme consiste à établir le pourcentage de spermatozoïdes typiques (ou normaux) et atypiques (ou anormaux) (figure 10). Un spermatozoïde est dit normal quand (Auger & Eustache, 2000) :

- la tête a un contour très régulier ovalaire avec un grand axe mesurant 5 µm et un petit axe mesurant 3 µm (rapport grand axe/petit axe = 1,66 ; pouvant fluctuer entre 1,33 et 2).
- l'acrosome doit couvrir 40 à 70 % de la surface de la tête, avoir un contour régulier et une texture homogène.
- la pièce intermédiaire mesure de 1,5 à 2 fois la longueur de la tête, a un diamètre de 0,6 à 0,8 µm, et son grand axe est dans le prolongement du grand axe de la tête.
- la pièce principale mesure environ 45 µm pour un diamètre de 0,4 à 0,5 µm, et est développée avec un contour régulier et un aspect homogène.

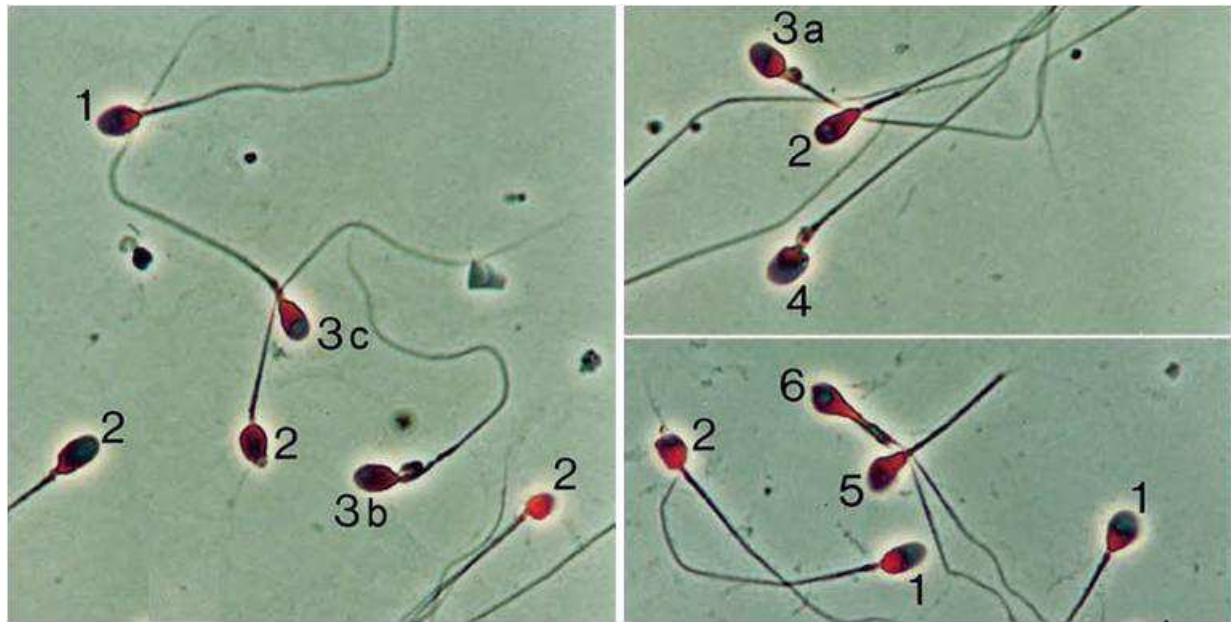


Figure 10 : Analyse des spermatozoïdes sur frottis après coloration de Papanicolaou au microscope à contraste de phase. Spermatozoïdes présentant (1) une tête normale, (2) une forme ou taille de la tête anormale, (3a) une gouttelette cytoplasmique, (3b) un défaut de la pièce intermédiaire, (3c) un excès de cytoplasme résiduel. Spermatozoïdes présentant à la fois (4) des anomalies de la tête et de la pièce intermédiaire, (5) des anomalies de la tête et du flagelle, (6) des anomalies de la tête, de la pièce intermédiaire et du flagelle. D'après Nieschlag, 2010.

Plusieurs classifications ont été établies puis ont évolué au fil du temps. En France, 2 classifications principales coexistent : la classification de David modifiée (Auger & Eustache, 2000) et la classification de Kruger (World Health Organization, 2010).

❖ *La classification de David modifiée*

L'analyse doit être effectuée au minimum sur 100 spermatozoïdes, classés pour fournir une évaluation correcte du pourcentage de spermatozoïdes typiques et du profil des différentes atypies. En cas de quantité insuffisante de spermatozoïdes, le décompte peut être fait à partir de 50 spermatozoïdes, mais cette particularité doit être interprétée dans la conclusion biologique. Elle recense plusieurs anomalies en dehors des spermatozoïdes morphologiquement normaux :

- 7 anomalies de la tête :
 - *Allongée* : le grand axe de la tête est plus long que la normale.
 - *Amincie* : le petit axe de la tête est plus petit que la normale.

- *Microcéphale* : le grand et le petit axe de la tête sont plus courts que la normale.
 - *Macrocéphale* : le grand et le petit axe de la tête sont plus grands que la normale.
 - *Multiplés* : plus d'une tête par spermatozoïde.
 - *Acrosome anormal ou absent* : surface occupée < 40 %, ou > 70 % de la surface totale de la tête, ou absence totale d'acrosome.
 - *Base anormale ou absente* : toute irrégularité de courbe non régulière de cette partie de la tête doit être recensée.
- 3 anomalies de la pièce intermédiaire :
 - *Grêle* : diamètre \leq au diamètre de la pièce principale dans sa partie initiale.
 - *Angulée* : le flagelle n'est pas dans l'axe de la tête ou angle net entre pièce intermédiaire/tête ou pièce intermédiaire/pièce principale.
 - *Reste cytoplasmique* : anomalie si surface > 1/3 de la surface d'une tête normale.
 - 5 anomalies de la pièce principale :
 - *Absente* : pas de flagelle.
 - *Ecourtée* : flagelle plus court.
 - *De calibre irrégulier* : flagelle présentant des parties plus fines.
 - *Enroulée* : flagelle enroulé sur lui-même ou autour de la tête.
 - *Multiplés* : plusieurs flagelles.

Au final, un index d'anomalies multiples (IAM) est établi. Cet index correspond au rapport du nombre total d'anomalies recensées sur le nombre total de spermatozoïdes anormaux. L'IAM est donc un indicateur du nombre moyen d'anomalies associées par spermatozoïde anormal.

❖ *La classification de Kruger*

Cette classification est en accord avec un certain nombre de points de la classification de David modifiée, notamment sur le fait d'analyser toutes les anomalies des spermatozoïdes. De plus, la description des spermatozoïdes typiques et atypiques comme expliquée ci-dessus est également utilisable pour décrire les anomalies dans la classification de Kruger, les anomalies annotées étant les mêmes. L'absence totale d'anomalie définit le spermatozoïde typique

(normal). Les différences de classification se font au niveau de l'interprétation. La classification de Kruger recense une seule anomalie, par ordre d'importance (alors que celle de David modifié prend en compte toutes les anomalies observées) : acrosome > tête > pièce intermédiaire > flagelle.

La classification de Kruger distingue ensuite 3 groupes en fonction des pourcentages de formes typiques :

- formes typiques > 14 % : groupe à sperme normal.
- formes typiques comprises entre 4 et 14 % : groupe à bon pronostic de grossesse.
- formes typiques < 4 % : groupe à mauvais pronostic de grossesse.

SPERMOGRAMME du 18/01/2012

Délai d'abstinence	3 jours		
Volume:	3,30 mL (N>1,5ml)	Viscosité:	Normale
pH:	7,8 (N >= 7,2)		
Numération			
Spermatozoïdes :	180,0000 millions / ml	soit pour l'éjaculat	594,0000 millions
	(N>=15 millions / ml)		(N>=39 millions / éjaculat)
Cellules :	0,40 millions / ml	(N<1 million/ml)	
Polynucléaires :	millions / ml	(N<1 million/ml)	
Mobilité			
%	à 1 heure	à 4 heures	
progressifs (a)	35 %	0 %	(N : a+b >= 32% a+b+c >= 40%)
peu progressifs (b)	25 %	5 %	
non progressifs (c)	5 %	45 %	
immobiles (d)	35 %	50 %	
Vitalité :	76% de formes vivantes	(N>=58%)	
Agglutinats:	absents	Agrégats:	absents

SPERMOCYTOGRAMME

Sur 100 spermatozoïdes Typiques : **63%** Atypiques : **37%**
 IAM : **1,27** (Classification de David modifiée)

Tête	Pièce intermédiaire	Flagelle
Allongée 0	Reste cytoplasmique 1/1	Absent 1/1
Amincie 0	Grèle 1/1	Ecourté 0
Microcéphale 0	Angulation 4/1	Calibre irrég. 0
Macrocéphale 0		Enroulé 3
Têtes multiples 1/1		Multiple 3/1
Base anormale 8/6		
Acrosome malformé 25/7		

Figure 11 : Compte-rendu d'un spermogramme-spermocytogramme.

Avec l'accord de l'Institut de Biologie de la Reproduction-Spermiologie-CECOS du CHRU de Lille.

CECOS : centre d'étude et de congélation des oeufs et du sperme; *CHRU* : centre hospitalier régional universitaire; *IAM* : indice d'anomalies multiples; *irrég* : irrégulier.

2.1.2 Les critères de l'OMS

Tableau 1 : Les valeurs normales de référence selon l'OMS 2010 (World Health Organization, 2010).

NP : spermatozoïdes non progressifs ; *OMS* : organisation mondiale de la santé ; *PR* : spermatozoïdes progressifs.

Paramètres spermatiques	Valeurs normales de références (OMS 2010)
Volume	≥ 1,5 mL
Numération des spermatozoïdes	≥ 15 millions/mL ≥ 39 millions/éjaculat
Numération des cellules rondes	≤ 1 million/mL
Numération des polynucléaires	≤ 1 million/mL
Mobilité	PR ≥ 32 % ; PR+NP ≥ 40 %
Vitalité	≥ 58 %
Formes typiques	> 4 % (classification de Kruger)

2.1.3 Les limites des analyses conventionnelles

Les analyses conventionnelles du sperme restent un outil de choix dans l'évaluation en routine des facteurs de fertilité masculine (World Health Organization, 2010). Cependant, bien que cette évaluation de base fournisse des informations précieuses, l'utilité clinique des résultats des analyses conventionnelles est sévèrement limitée par plusieurs facteurs importants. Ces facteurs, comme la variabilité inhérente d'un éjaculat à l'autre ou les corrélations imprécises entre les analyses du sperme (Barazani *et al.*, 2014) ne reflètent pas toujours le potentiel de reproduction. D'autres outils de contrôle supplémentaires, tels que l'évaluation des dommages à l'ADN spermatique ou du stress oxydatif, peuvent être inclus dans l'analyse de routine afin d'apporter des informations supplémentaires sur la qualité du prélèvement spermatique et de son pouvoir fécondant (de Mateo *et al.*, 2007; Oliva & Castillo, 2011b; Behrouzi *et al.*, 2013; Hamada *et al.*, 2013; Intasqui *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2013; Aitken *et al.*, 2014). Cependant, malgré l'efficacité prouvée de ces outils complémentaires, il reste encore de nombreux échecs de procréation chez des patients présentant pourtant un bilan de dépistage correct. Le domaine en pleine expansion des techniques dites « omiques » telles que la

génomique, épigénomique, transcriptomique, protéomique et métabolomique promet de fournir des indications sur les mécanismes moléculaires de base de la production et de la maturation spermatique, ainsi que dans la pathogenèse de l'infertilité masculine (Jodar *et al.*, 2016; Carrell *et al.*, 2016). En particulier, la protéomique permet de mieux comprendre la composition en protéines des spermatozoïdes, les différentes voies cellulaires nécessaires au fonctionnement normal des spermatozoïdes et celles qui ont la plus grande implication biologique dans la fertilité ou l'infertilité masculine. La caractérisation des altérations protéiques spermatiques dans différents phénotypes d'infertilité devrait permettre, à terme, d'identifier des biomarqueurs spécifiques pouvant aider le diagnostic, le pronostic et le traitement de l'infertilité masculine.

2.2 Techniques de sélection/préparation des spermatozoïdes

Les techniques de séparation des spermatozoïdes visent à reproduire les étapes de sélection qui s'opèrent lors du trajet naturel dans le tractus génital féminin. Cette séparation permet notamment de séparer les spermatozoïdes du plasma séminal, qui contient des facteurs décapacitants, et de récupérer les spermatozoïdes dans un milieu permettant la capacitation. Les techniques de séparation permettent d'éliminer de façon plus moins complète les débris cellulaires, les spermatozoïdes morts ou immobiles et d'autres cellules contenues dans le sperme. Ces techniques permettent également d'éliminer les agents infectieux, hormis les germes intracellulaires ou ceux qui se fixent sur les spermatozoïdes.

2.2.1 Les techniques conventionnelles du tri des spermatozoïdes

Les procédés conventionnels de tri des spermatozoïdes impliquent plusieurs étapes de lavage et de centrifugation. Les techniques de séparation les plus couramment utilisées en assistance médicale à la procréation (AMP) sont la centrifugation sur gradient de densité (GD) et la technique de migration ascendante ou swim-up : swim-up conventionnel (SWC) et swim-up direct (SWD) (figure 12).

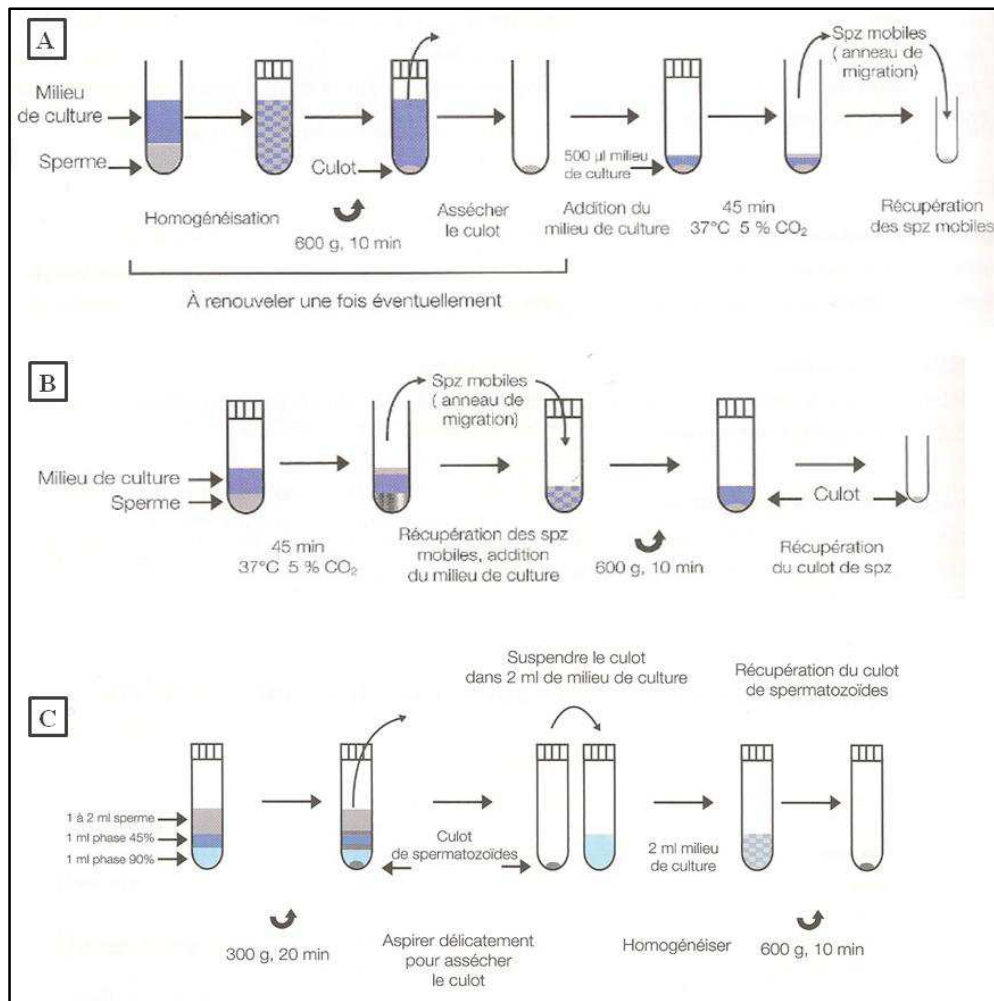


Figure 12 : Principes de sélection des spermatozoïdes. Techniques de migration ascendante ou swim-up (A) à partir d'un culot de spermatozoïdes ou (B) directement à partir du sperme éjaculé. (C) Technique du gradient de densité.

Cahier de formation Bioforma. Exploration de la fonction de reproduction / versant masculin. 2009.

Le principe de la méthode du GD est de sélectionner les spermatozoïdes en fonction de leur densité. Le sperme éjaculé est déposé au-dessus d'une solution colloïdale de particules de silice recouvertes de silane et dont l'osmolarité est ajustée avec des polysucres (peu toxiques). Après centrifugation, les spermatozoïdes migrent plus ou moins profondément dans ce milieu en fonction de leur densité. Les phases supérieures contiennent le plasma séminal, les cellules rondes et les spermatozoïdes morts ou anormaux. Cette technique peut impliquer soit un gradient continu soit un gradient discontinu. En pratique, on utilise généralement un gradient 2 couches : une couche à 90 % de la solution mère et une couche à 45 %. Cette méthode est la plus adaptée lorsque des échantillons spermatiques ont une concentration faible en spermatozoïdes car le taux de récupération est élevé (Henkel & Schill, 2003).

Les méthodes swim-up (SWC et SWD) reposent sur la capacité des spermatozoïdes mobiles à nager depuis le culot d'un tube jusque dans la partie supérieure constituée d'un milieu capacitant. La principale différence entre le SWC et le SWD est que le SWC implique une étape de centrifugation avant superposition du culot avec le milieu capacitant. Dans le SWD, le sperme entier est superposé d'emblée avec le milieu capacitant. La partie supérieure du milieu qui contient les spermatozoïdes les plus mobiles est recueillie après un temps déterminé de migration (30 min à 1 h), puis concentrée par centrifugation (Henkel & Schill, 2003).

Un inconvénient notable des techniques de GD et de SWC est qu'elles ont tendance à générer des ROS au cours des étapes de centrifugation. Comme précisé préalablement dans ce manuscrit, les ROS se sont révélées potentiellement nuisibles aux fonctions spermatiques par l'intermédiaire d'adduits oxydés à l'ADN et de fragmentation de l'ADN (Aitken & Clarkson, 1988). Dans les échantillons spermatiques d'individus en bonne santé, il n'y a pas de différence significative rapportée des niveaux de ROS ou du PMM entre les préparations par SWC et par GD. Cependant, les spermatozoïdes traités par GD présentent un taux de fragmentation de l'ADN plus élevé (Ghaleno *et al.*, 2014). Par ailleurs, le SWC affiche des niveaux significativement plus élevés de peroxyde d'hydrogène et d'anions superoxydes par rapport au SWD (Ghaleno *et al.*, 2014), tandis que ce dernier présente le plus bas PMM et la plus faible mobilité par rapport à la fois au GD et au SWC (Ghaleno *et al.*, 2014). Le SWD implique de nombreuses couches de cellules, ce qui peut rendre difficile l'accès des spermatozoïdes des couches inférieures dans le milieu de culture (Ghaleno *et al.*, 2014). Cela pourrait expliquer le faible PMM trouvé dans les échantillons traités par SWD, car il y existe une association entre la fonction mitochondriale et la mobilité (Marchetti *et al.*, 2002). Les différences de types et de niveaux de ROS entre SWC et SWD peuvent être attribuées aux étapes de lavage et de centrifugation impliquées dans la SWC qui élimine le plasma séminal. En effet, le plasma séminal contient des antioxydants, et peut également augmenter l'activité de la superoxyde dismutase, qui convertit l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (Ghaleno *et al.*, 2014). En outre, la centrifugation diminue la récupération des spermatozoïdes dans les échantillons avec une faible concentration de spermatozoïdes. Même si ces techniques se sont avérées efficaces pour la sélection de spermatozoïdes mobiles et morphologiquement normaux, elles ne parviennent pas à prendre en compte d'autres paramètres qui peuvent être utilisés pour la sélection du sperme dans la fécondation naturelle,

telles que l'intégrité de l'ADN, la maturation de la membrane, l'ultrastructure et l'apoptose (Henkel, 2012; Ghaleno *et al.*, 2014).

2.2.2 Les techniques non conventionnelles

2.2.2.1 Potentiel Zeta

Le potentiel Zeta, ou potentiel électrocinétique, est la charge à travers la membrane plasmique des spermatozoïdes matures. Elle est d'environ -16 mV à -20 mV (Henkel, 2012). Cette charge négative est utilisée pour séparer les spermatozoïdes matures en leur permettant d'adhérer à un tube de centrifugeuse chargé positivement (Said & Land, 2011). Après quelques minutes, le tube est centrifugé pour éliminer les spermatozoïdes et les particules qui n'adhèrent pas à la surface du verre.

2.2.2.2 Système du tri cellulaire magnétique

Le tri cellulaire magnétique (MACS pour *magnetic-activated cell sorting*) sélectionne les spermatozoïdes qui ne présentent pas de signes d'apoptose précoce (figure 13). Un indicateur d'apoptose précoce du spermatozoïde est la présence de la phosphatidylsérine sur la membrane plasmique. Le MACS utilise des microbilles paramagnétiques conjuguées à de l'Annexine V pour lier les spermatozoïdes présentant la phosphatidylsérine (Vermees *et al.*, 1995; Said & Land, 2011). Les spermatozoïdes liés aux microbilles sont ensuite placés dans une colonne où un champ magnétique est appliqué. Les spermatozoïdes non liés aux billes sont élués à travers la colonne, laissant les spermatozoïdes apoptotiques derrière (Said & Land, 2011). Le MACS doit être réalisé après avoir effectué une méthode de préparation du sperme conventionnelle, ou après un simple lavage afin d'éliminer les facteurs contaminants présents dans le sperme entier.

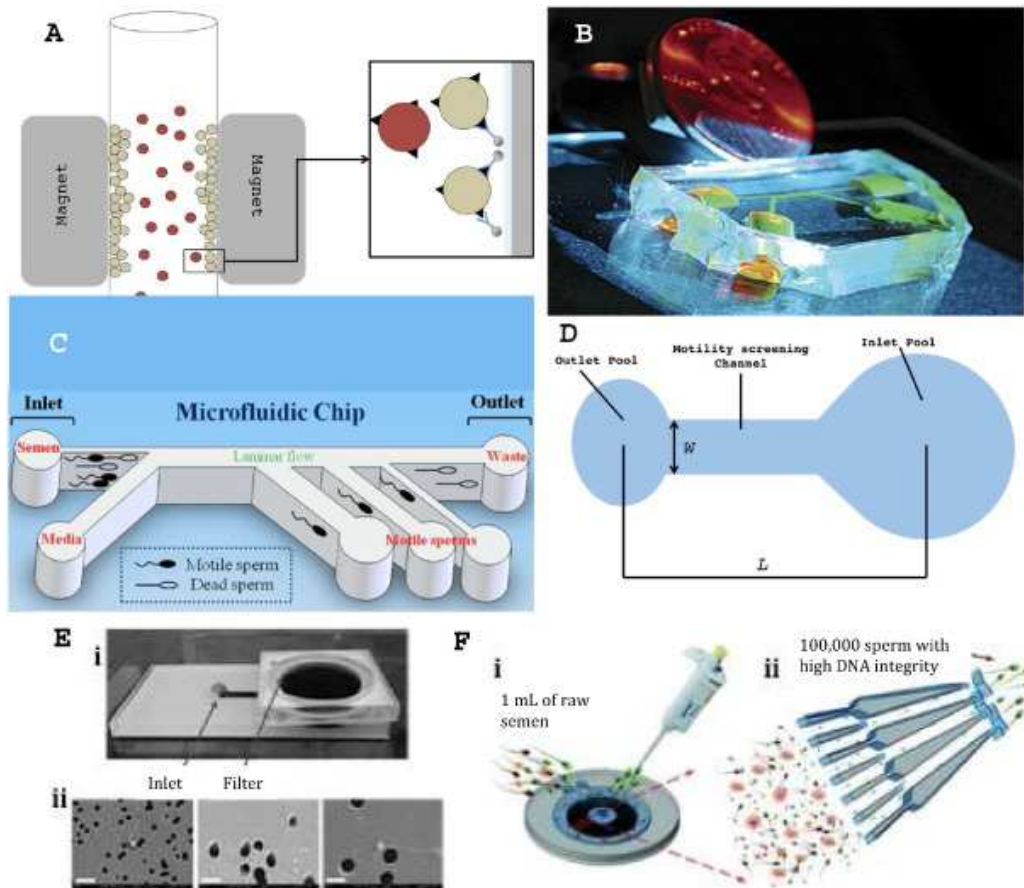


Figure 13 : Techniques non-conventionnelles de sélection/préparation des spermatozoïdes. (A) Le tri cellulaire magnétique (MACS pour *magnetic-activated cell sorting*). (B, C, D, E et F) Tri des spermatozoïdes par différents dispositifs microfluidiques. D'après Rappa *et al.*, 2016.

2.2.2.3 Tri des spermatozoïdes basé sur la liaison à l'acide hyaluronique

Les sites de liaison à l'acide hyaluronique sur la membrane plasmique spermatique sont un indicateur de la maturité des spermatozoïdes (Huszar *et al.*, 2003). Les cellules du cumulus autour de l'ovocyte contiennent de l'acide hyaluronique dans leur matrice extracellulaire, ne permettant qu'aux spermatozoïdes matures de s'y lier, puis de pénétrer afin de réussir la fécondation (Cherr *et al.*, 2001; Huszar *et al.*, 2007). Il existe 2 méthodes pour sélectionner les spermatozoïdes liés à l'acide hyaluronique : l'injection physiologique intracytoplasmique de spermatozoïdes (PICSI, pour *physiological intracytoplasmic sperm injection*), et la procédure Sperm Slow. Les 2 méthodes nécessitent une préparation de spermatozoïdes par lavage du sperme ou par centrifugation.

2.2.2.4 Tri des spermatozoïdes par électrophorèse

Le tri par électrophorèse (Microflow CS-10) est une technologie basée sur le choix des spermatozoïdes en fonction de leur charge de surface. Les spermatozoïdes matures normaux ont une charge négative, créée par la protéine CD52 exprimée à leur surface, qui est une protéine membranaire ancrée par glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Fleming *et al.*, 2008). L'appareil d'électrophorèse est constitué d'une cassette, où un échantillon de sperme est placé dans une chambre, une tension est appliquée. Les spermatozoïdes morphologiquement normaux et chargés négativement se déplacent à travers une membrane de polycarbonate de 5 µm en direction de l'électrode positive, laissant les spermatozoïdes immatures et les leucocytes (Ainsworth, 2005; Fleming *et al.*, 2008).

2.2.2.5 Motile sperm organelle morphology examination (MSOME)

Le MSOME est une analyse morphologique de spermatozoïdes mobiles isolés, en temps réel et à fort grossissement. L'appareillage nécessaire est constitué d'un microscope à contraste interférentiel de Normarski qui permet d'obtenir un grossissement jusqu'à x6600 (Bartoov *et al.*, 2002). L'analyse s'est initialement focalisée sur l'évaluation de la morphologie de l'acrosome, de la cape post-acrosomique, de la pièce intermédiaire, des mitochondries et du noyau telle que décrite par Bartoov et collaborateurs en 2002. Aujourd'hui c'est essentiellement le noyau qui est étudié pour détecter la présence et la taille de vacuoles et essayer d'évaluer leur impact en AMP (Perdrix & Rives, 2013).

2.2.2.6 Biréfringence

La biréfringence est une caractéristique basée sur la façon dont la lumière passe à travers le compartiment protoplasmique du spermatozoïde et peut être utilisée pour détecter des anomalies (Magli *et al.*, 2012b). Les spermatozoïdes avec des caractéristiques différentes dans le protoplasme auront des modèles différents de biréfringence, qui peut être une biréfringence totale ou partielle (Petersen *et al.*, 2011; Magli *et al.*, 2012a).

2.2.2.7 Tri des spermatozoïdes par microfluidique

Les technologies microfluidiques sont apparues comme une nouvelle alternative aux méthodes classiques, avec plus de contrôle pour trier précisément les cellules dans de petits volumes (figure 13). Les applications de ces technologies à la médecine de la reproduction et

à la cryobiologie ont été récemment étudiées (Asghar *et al.*, 2014a). Les méthodologies de tri des spermatozoïdes basées sur les procédures microfluidiques sont une option intéressante puisque ces techniques éliminent les étapes de centrifugation dommageables. Les dispositifs microfluidiques utilisent des micro-canaux pour trier les spermatozoïdes sur la base de la mobilité et de la morphologie (Kricka *et al.*, 1993; Cho *et al.*, 2003; Schuster *et al.*, 2003; Asghar *et al.*, 2014b).

3 LE PROTÉOME DU SPERMATOZOÏDE

3.1 L'approche protéomique

La protéomique vise à fournir une analyse systématique de toutes les protéines d'un tissu ou d'une cellule, et à définir leurs niveaux d'expression par rapport à un état fonctionnel dans un système biologique (Domon & Aebersold, 2006; Cox & Mann, 2007). L'analyse protéomique repose essentiellement sur quelques étapes de base : (1) extraction des protéines ou peptides de l'échantillon, (2) réduction de la complexité de l'extraction protéique ou peptidique, (3) identification des protéines ou peptides par utilisation de la spectrométrie de masse (MS pour *mass spectrometry*) et de la bioinformatique. Après l'extraction protéique, la réduction de la complexité de l'extrait peut être réalisée en utilisant 2 approches alternatives (Oliva *et al.*, 2009): (i) la séparation des protéines par différentes approches (électrophorèse, chromatographie, etc...) suivie de la digestion des protéines en peptides, et (ii) la digestion initiale de protéines pour générer des peptides et la séparation de peptides (de Mateo *et al.*, 2013; Codina *et al.*, 2015) (figure 14). Plusieurs stratégies d'identification protéiques ont été développées à l'échelle globale, les plus communes étant détaillées dans ce chapitre.

Le développement de la méthode utilisant la séparation des protéines et la MS a ouvert plusieurs possibilités dans l'identification et l'analyse d'un grand nombre de protéines. En effet, l'effet combinatoire de l'électrophorèse bidimensionnelle (2DE pour *2-dimensional gel electrophoresis*) et de la MS s'est révélé être un outil d'analyse important pour la caractérisation complète des protéines à partir de mélanges complexes d'extraits de tissus, de cellules ou de fractions subcellulaires. Deux approches différentes ont été couramment employées pour étudier le protéome des cellules spermatiques en utilisant la MS : (1) séparation 2D (*2-dimensional*) des protéines suivie d'une digestion trypsique (ou enzymatique), isolation des peptides et une analyse assistée par matrice et désorption/ionisation laser (MALDI pour *matrix assisted laser desorption/ionization*), ou

chromatographie liquide (LC pour *liquid chromatography*) couplée à la MS en tandem (LC-MS/MS) ; (2) digestion initiale des protéines pour production de peptides, suivie d'une analyse par LC-MS/MS (Baker & Aitken, 2009; Oliva *et al.*, 2009).

La 2DE est une technique de séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique et de leur masse moléculaire. Cependant, cette méthode présente plusieurs inconvénients. En raison de la faible sensibilité de la 2DE, la détection de protéines rares ou présentes en faible quantité est difficile, et l'isolation de l'échantillon en différentes fractions subcellulaires est essentielle pour réduire la complexité des mélanges protéiques avant analyse 2DE (Fernandez-Gomez *et al.*, 2014). Pour contourner ce problème, il a été développé l'électrophorèse 2D-DIGE (pour *differential in-gel electrophoresis*) où les échantillons protéiques à analyser sont marqués avec des fluorochromes différents possédant la même masse mais ayant des longueurs d'onde d'excitation et d'émission différentes. Ainsi, 2 échantillons marqués avec des fluorochromes différents vont être mélangés et séparés sur un même gel. Cette technique permet notamment l'identification des protéines de faible abondance.

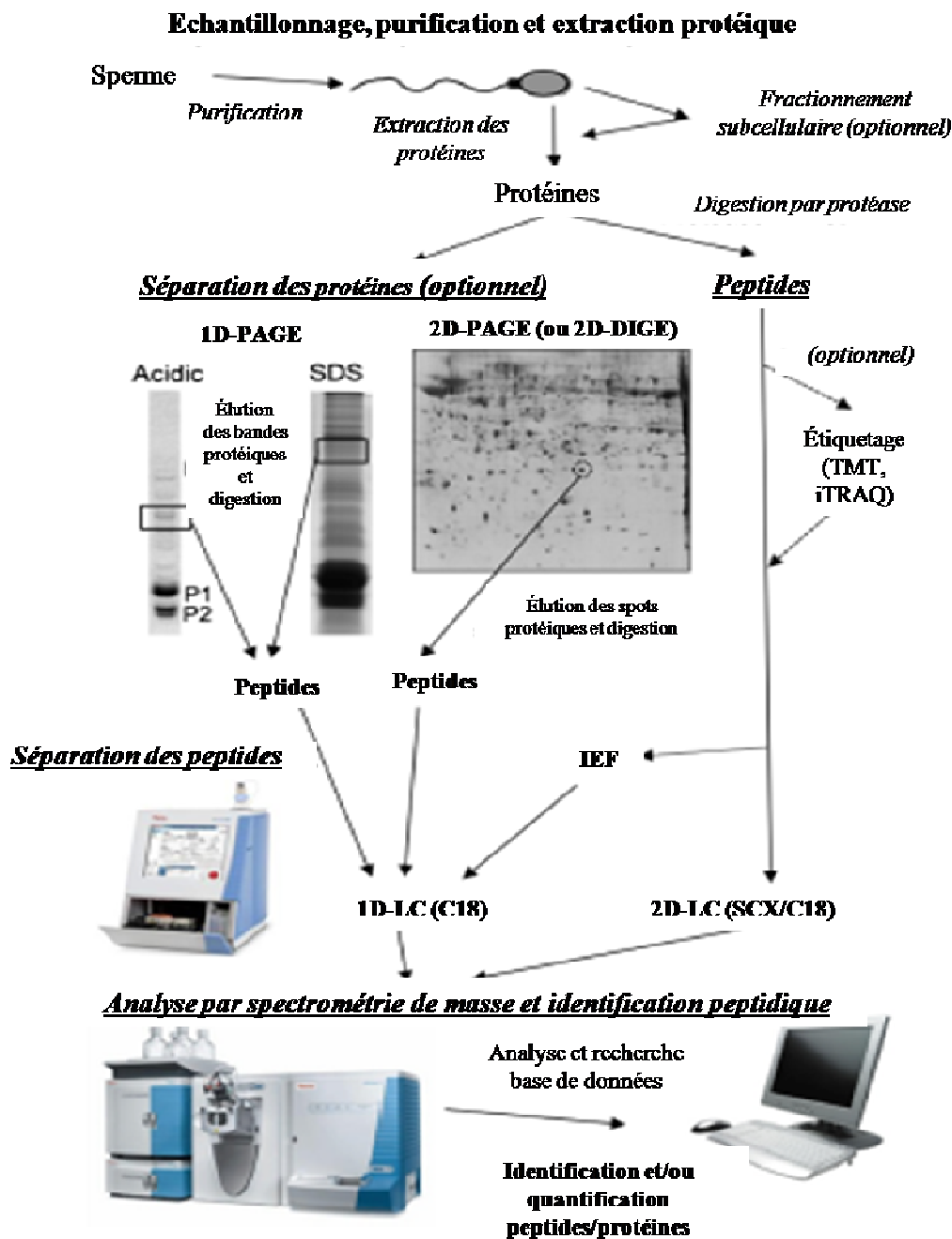


Figure 14 : Méthodologies protéomiques. La première étape dans une étude protéomique implique la collecte de l'échantillon, la purification et l'extraction des protéines (en haut). Les protéines extraites peuvent alors soit être séparées par des systèmes d'électrophorèse, soit être directement digérées en peptides. Dans l'option de séparation des protéines, les bandes ou les spots protéiques obtenus doivent être élués du gel et digérés en peptides. Les mélanges peptidiques peuvent ensuite être séparés en utilisant différentes alternatives et enfin être analysés par spectrométrie de masse (en bas) conduisant à l'identification précise des peptides et des protéines correspondantes.

D'après Carrell *et al.*, 2016.

1D ou *2D* : 1 or 2-dimensional; *DIGE* : differential in-gel electrophoresis; *IEF* : isoelectric focusing; *iTRAQ* : isobaric tags for relative and absolute quantitation; *LC* : liquid chromatography; *PAGE* : polyacrylamide gel electrophoresis; *SDS* : sodium dodecyl sulfate; *TMT* : tandem mass tag.

Un autre aspect important de cette méthodologie est le développement de l'outil analytique de la MS. Il s'agit d'une technique bien adaptée à l'étude biologique des spermatozoïdes et des protéines impliquées dans des processus biologiques spécifiques (Findlay & Swanson, 2010; Hamada *et al.*, 2013). Le principe de la MS réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z), permettant l'identification des protéines ou des peptides. La spectrométrie de masse permet de caractériser la structure chimique des molécules en les fragmentant. Le spectromètre fournit ainsi des spectres expérimentaux qui sont des représentations, sous forme de séries de pics, de la présence de ces différents fragments. Un algorithme établi par ordinateur compare ensuite les spectres de masse générés pour identifier la protéine d'origine en la retrouvant dans une banque (Findlay & Swanson, 2010; Hamada *et al.*, 2013). Les protéines ainsi identifiées sont ensuite triées, via une analyse *Gene Ontology* (GO). GO est une base de données qui vise à fournir des informations biologiques sur l'implication de gènes ou de protéines. L'analyse GO permet d'interroger les bases de données et d'associer aux protéines identifiées leur(s) localisation(s) cellulaire(s), leur(s) fonction(s) biologique(s) et moléculaire(s) (Gilany *et al.*, 2011). Plusieurs études ont catégorisé le protéome du sperme humain basé sur les termes d'annotation GO. De plus, il a été clairement observé que la plupart des protéines ont été cataloguées dans des classifications différentes dans GO, puisqu'une protéine peut avoir de multiples fonctions et peut être localisée dans plusieurs compartiments cellulaires (Batruch *et al.*, 2012; Milardi *et al.*, 2013).

3.2 Le protéome global du spermatozoïde humain

L'étude sur les protéines du sperme a été initiée par Friedrich Miescher avec la découverte de la protamine dans le sperme de saumon (Miescher, 1874). Au début des années 90, les premiers travaux étudiant les protéines du spermatozoïde humain se sont basés sur la 2DE. Cependant, le nombre de spots protéiques distingués sur des résultats 2D est relativement faible. Par exemple, Naaby-Hansen a obtenu une carte électrophorétique du spermatozoïde humain d'environ 260 protéines acides et neutres distinctes (Naaby-Hansen, 1990). Ces premiers résultats ont remis en cause le rôle de ces protéines spermatique, le spermatozoïde étant considéré traditionnellement comme une cellule silencieuse sur le plan transcriptionnel et traductionnel. À partir de là, il a été clair que le spermatozoïde présentait d'autres fonctions au-delà de la simple transmission du patrimoine génétique paternel à l'ovocyte.

La première analyse approfondie du protéome spermatique humain sur la base d'une approche LC-MS a permis de révéler 1760 protéines, bien que les protéines identifiées n'aient pas été précisées (Johnston *et al.*, 2005). Dans une autre étude, utilisant des strips d'amplitude restreinte de point isoélectrique et des gels 2D multiples, 3872 spots protéiques distincts ont été visualisés par les auteurs, qui ont également émis l'hypothèse que ce nombre pourrait être beaucoup plus élevé (Li *et al.*, 2007). Similairement, avec l'utilisation de la technique LC-MS/MS, Baker et collaborateurs ont identifié 1056 produits géniques du spermatozoïde mature humain (Baker *et al.*, 2007). Cependant, le rapport le plus vaste à ce jour sur l'identification des protéines de spermatozoïde mature humain a été établi après utilisation d'une technique de MS de pointe et d'une plate-forme de protéomique optimisée (Wang *et al.*, 2013a). Un total de 4675 protéines individuelles a été identifié avec succès, montrant un profil protéique complexe impliqué notamment dans le métabolisme énergétique, la transduction du signal, le cytosquelette.

Une compilation récente exhaustive de toutes les études protéomiques fournies par la littérature scientifique sur le spermatozoïde humain a conduit à la génération d'une liste de 6198 protéines différentes identifiées dans le spermatozoïde mature normal éjaculé humain (Amaral *et al.*, 2014a), dont une grande partie (environ 30 %) est connue pour être exprimée au niveau testiculaire. La comparaison de ces protéines avec les protéines hypothétiquement impliquées dans les voies fonctionnelles connues du spermatozoïde a indiqué qu'environ 78 % des protéines du sperme ont déjà été identifiées. En utilisant cette logique, il a été conclu que le protéome complet du sperme humain comprend au moins 7500 protéines différentes (Amaral *et al.*, 2014a). L'exploration des données du protéome spermatique a confirmé beaucoup des voies fonctionnelles attendues, y compris le métabolisme, l'apoptose et le trafic membranaire (Amaral *et al.*, 2014a; Paiva *et al.*, 2015). Mais elle a également identifié de nombreuses protéines inattendues telles que celles impliquées dans le métabolisme de l'ARN, la régulation de la traduction, les ribosomes, les peroxysomes et un grand nombre de protéines avec une fonction épigénétique potentielle (Amaral *et al.*, 2014a; Castillo *et al.*, 2014). Le travail de Martínez-Heredia et collaborateurs (Martínez-Heredia *et al.*, 2006) a permis de catégoriser 98 protéines sur la base de leur rôle fonctionnel. La répartition est la suivante (figure 15) : production d'énergie (23 %) ; transcription, synthèse des protéines, transport, repliement et turnover (23 %) ; cycle cellulaire, apoptose et stress oxydatif (10 %) ; transduction de signal (8 %) ; cytosquelette, flagelle et mouvement des cellules (10 %) ; reconnaissance des cellules (7 %) ; métabolisme (6 %) ; fonction inconnue (11 %).

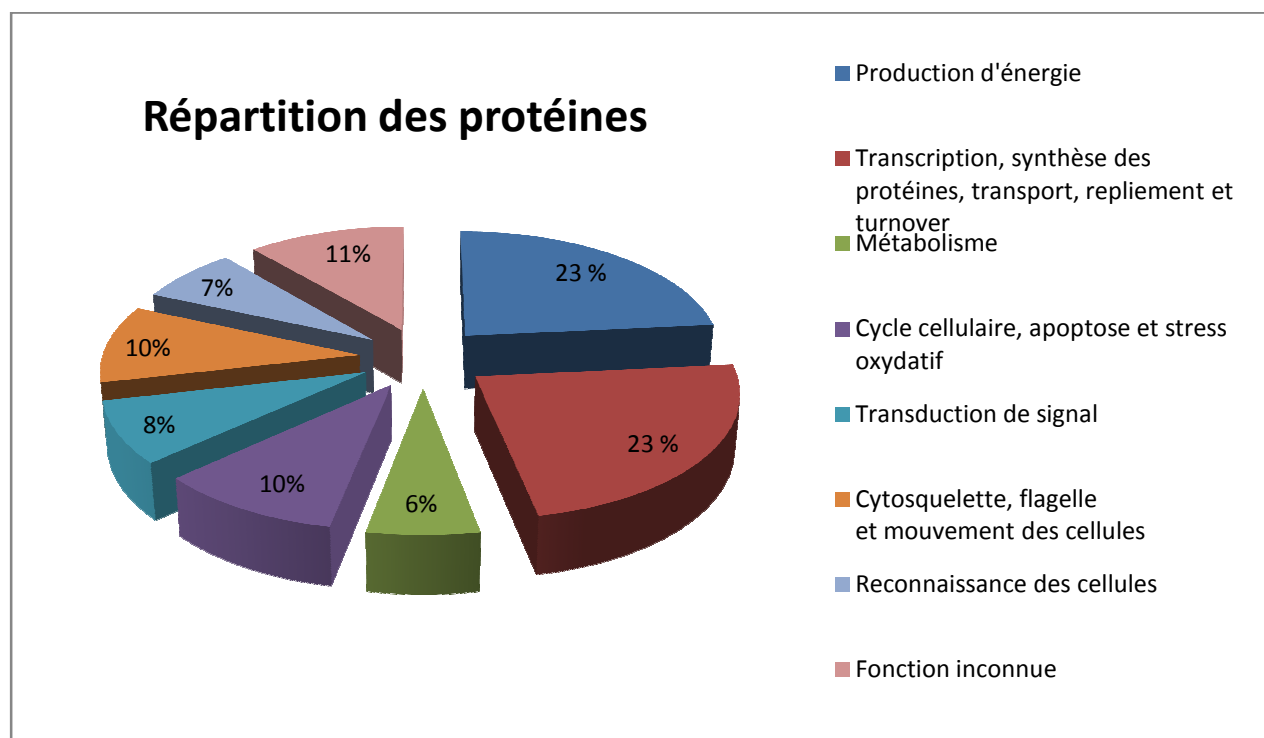


Figure 15 : Distribution fonctionnelle des protéines spermiques isolées à partir des gels de 2DE et identifiées par MS dans des échantillons normozoospermiques humains. D'après Martínez-Heredia *et al.*, 2006.

2DE : 2-dimentional gel electrophoresis; *MS* : mass spectrometry.

En outre, les modifications post-traductionnelles de protéines contrôlent la fonction des spermatozoïdes et sont d'un grand intérêt pour l'étude de la fertilité masculine. Cependant, les modifications post-traductionnelles augmentent la difficulté d'analyse des échantillons protéiques. Quelques études ont appliqué des méthodes complémentaires pour la séparation des protéines du spermatozoïde et ont effectué une analyse protéomique pour identifier les protéines avec modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, S-nitrosation, SUMOylation, N-glycosylation ou lysine-acétylation (Ficarro *et al.*, 2003; Lefièvre *et al.*, 2007; Vigodner *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013b; Sun *et al.*, 2014).

3.3 Le protéome du spermatozoïde humain par compartiments cellulaires

Plusieurs équipes ont étudié les protéines qui constituent le protéome du spermatozoïde humain normal (Baker *et al.*, 2007; de Mateo *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2011; Amaral *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013a).

3.3.1 Les protéines de surface membranaire

La membrane du spermatozoïde enveloppe des structures très hétérogènes telles que la tête du spermatozoïde, la pièce intermédiaire et les pièces principale et terminale du flagelle. Les protéines structurales de cette membrane jouent un rôle-clé en termes de fécondation lors de la rencontre entre le spermatozoïde et l'ovocyte. Les protéines membranaires de surface subissent un remodelage complexe au cours du transit épидidymaire, de même que lors des événements de type capacitation, de liaison à la zone pellucide ou de l'exocytose de l'acrosome (Brewis & Gadella, 2010). La membrane plasmique est organisée en plusieurs domaines distincts, chacun ayant une composition et une fonction propre. Cela est rendu possible grâce à l'insertion de protéines testiculaires spécifiques, ainsi que par l'addition de protéines sécrétoires originaires des glandes annexes lors du passage dans le tractus reproducteur masculin (Belleannee *et al.*, 2011).

3.3.1.1 Protéines de surface membranaire du spermatozoïde liant l'ovocyte

La composition biochimique de la membrane plasmique spermatique est connue pour jouer un rôle clé dans la régulation de la reconnaissance et de l'adhésion entre spermatozoïde et ovocyte, ainsi que dans la fécondation (O'Rand 1979). Un grand nombre d'études ont permis d'identifier plusieurs de ces protéines membranaires comme des récepteurs potentiels pour la liaison à la zone pellucide. On trouve des récepteurs tyrosine-kinase (Burks *et al.*, 1995), des protéines kinases (Roten *et al.*, 1990), des intégrines (Glander *et al.*, 1996), des protéines de la matrice extracellulaire telles que la vitronectine, la fibronectine et la laminine (Glander *et al.*, 1996; Wennemuth *et al.*, 2001), la PH-20 avec une activité hyaluronidase connue (Sabeur *et al.*, 1997), les proto-oncogènes tels que c-myc et c-ras (Naz *et al.*, 1991, 1992), et la protéine SP17 (pour *sperm protein*) (Lea *et al.*, 1997). Il a également été rapporté, sur la membrane des spermatozoïdes humains, la présence de protéines appartenant à la famille des métalloprotéase/désintégrine/cysteine-rich (MDC), comme la MDC transmembranaire (tMDC) I (cryritestin) (Frayne & Hall, 1998) et la tMDC III (ADAM 18) (Frayne *et al.*, 2002)

ainsi que leurs rôle dans la liaison à la membrane plasmique de l'ovocyte. Similairement, la protéine de liaison de l'acide sialique (SABP pour *sialic acid-binding protein*) jouerait un rôle critique sur la capacitation *in vitro* des spermatozoïdes humains (Banerjee & Chowdhury, 1995). Récemment, la protéine spermatique NYDSP8 (*human testis specific protein-8*) « GPI anchored » a été identifiée et il a été souligné que sa libération lors de l'interaction spermatozoïde-ovocyte provoque une libération de calcium, qui à son tour conduit à la réaction acrosomique (Yin *et al.*, 2009).

Parallèlement, des données récentes indiquent que les protéines de choc thermique (HSP pour *heat shock protein*), y compris les HSP60, 70, et 90, migrent à la surface des spermatozoïdes et subissent une phosphorylation au cours de la capacitation puisque seuls les spermatozoïdes ayant une tyrosine phosphorylée sont en mesure de se lier à la zone pellucide (ZP) (Baker, 2006). Une nouvelle protéine testiculaire membre de la famille HSP70, connue sous le nom HSPA2, a été identifiée dans les spermatozoïdes humains matures. Elle est exprimée dans la membrane plasmique du spermatozoïde en coordination avec HSPA5 (Naaby-Hansen & Herr, 2010). Sur la base d'études d'hommes oligoteratozoospermiques qui présentent un faible niveau d'expression de HSPA2 (Cedenho *et al.*, 2006), il a été proposé que la protéine HSPA2 humaine puisse être utilisée comme marqueur de maturité du spermatozoïde (Ergur *et al.*, 2002). Cette protéine peut également jouer un rôle secondaire dans le remodelage de la membrane plasmique au cours de la spermatogenèse (Huszar *et al.*, 2000), en facilitant la formation de sites de liaison à la zone pellucide. La proposition d'utiliser la HSPA2 comme biomarqueur prend encore plus d'importance suite à un travail récent qui a identifié cette protéine comme un composant majeur des spermatozoïdes et décrit une expression différentielle entre des spermatozoïdes subissant un stress oxydatif et des spermatozoïdes normaux (Sharma *et al.*, 2013).

3.3.1.2 Protéines de surface membranaire dans la contraception immunologique masculine

La plupart des études sur la composition protéique de la membrane du spermatozoïde humain ont été centrées sur l'identification de différents antigènes de surface impliqués dans l'infertilité immunologique et leur utilisation future comme mesures contraceptives (Bohring & Krause, 1999; Bhande & Naz, 2007). Environ 18 antigènes membranaires ont été isolés et identifiés lors de l'utilisation d'anticorps anti-spermatozoïdes du plasma séminal de patients infertiles par Bohring et collaborateurs (Bohring *et al.*, 2001). En 2001, Shetty et

collaborateurs ont isolé 8 protéines de surface spermatique susceptibles de jouer un rôle de contraceptifs immunologiques (Shetty *et al.*, 2001). En 2004, Rajeev et collaborateurs ont comparé les profils de protéines membranaires de spermatozoïdes entre des hommes fertiles et infertiles (Rajeev, 2004). Cette étude a abouti à la validation d'un antigène spermatique associé à la fertilité de 57 kDa.

3.3.1.3 Protéines de surface membranaire chez les patients infertiles

Par la suite, des recherches ont été menées chez des patients infertiles pour établir le niveau d'expression de ces protéines de surface. Dans un rapport établi sur des patients présentant une globozoospermie, 2 protéines membranaires de l'acrosome, la protéine SPAM1 (pour *sperm adhesion molecule 1*) et la protéine SPANX (pour *sperm protein associated with the nucleus on the X chromosome*), ont été retrouvées en quantité diminuée dans les spermatozoïdes à tête ronde (Liao *et al.*, 2009). De même, dans une autre étude, la protéine annexine 5, présente dans la membrane plasmique du spermatozoïde humain, était détectée à un taux diminué dans les échantillons de patients infertiles (Xu *et al.*, 2012). Similairement, dans des échantillons de spermatozoïdes soumis à stress oxydatif, la protéine SPACA4 (pour *sperm acrosome associated protein 4*) était sur-exprimée (Allen *et al.*, 1993).

Ces études isolées ont permis de documenter certains aspects fonctionnels de quelques protéines de surface spermatique. Cependant, des travaux approfondis restent nécessaires sur l'identification d'antigènes de surface à pertinence clinique, sur les interactions moléculaires qui définissent les fonctions de domaines spécifiques, et sur la nature des changements induits par la capacitation dans la composition et l'activité de la membrane (Mohanty *et al.*, 2015). Un récent exemple très intéressant a été l'identification d'un modèle commun des protéines de surface du spermatozoïde avec celui des cellules souches embryonnaires (Gu *et al.*, 2011).

3.3.2 Les protéines nucléaires

En raison de l'importance épigénétique des protamines et des histones, l'une des premières études sur les protéines nucléaires spermatiques chez l'homme a permis de détecter la P1, la P2 et l'histone H2B spécifique du testicule (Yoshii *et al.*, 2005). L'étude la plus poussée dans le domaine de la protéomique nucléaire spermatique a été celle effectuée par de Mateo et collaborateurs qui a permis de générer un catalogue de 403 protéines, dont un sous-ensemble de 159 protéines localisées dans le noyau selon les bases de données UniProt et GO (de Mateo

et al., 2011). Ce grand nombre de protéines de la chromatine étaient inattendues, car les connaissances scientifiques préalables laissaient penser que les protéines nucléaires étaient constituées presque entièrement de protamines et d'une fraction mineure d'histones retenus (Carrell *et al.*, 2016). Dans cette étude, les histones formaient la plus grande famille de protéines détectées (9,7 % soit 39 des 403 protéines totales) et ont également représenté la plus grande proportion des protéines nucléaires (24,5 % soit 39 des 159 protéines nucléaires). Les protéines ribosomiques constituaient la deuxième plus grande famille de protéines identifiées. D'autres protéines ont également été mises en évidence comme des sous-unités du protéasome, la famille des protéines SPANX, des cytokératines, et certains éléments de l'enveloppe nucléaire, tels que la lamina nucléaire (LAMA5 [pour *laminin subunit alpha 5*], BANF1 [pour *barrier-to-autointegration factor 1*], BANF2 [pour *barrier-to-autointegration factor 2*] et SYNE1 [pour *spectrin repeat containing nuclear envelope protein 1*]), le complexe des pores nucléaires ainsi que des composantes du cycle de RAN (NUP37 [pour *nucleoporin 37*], RAN [pour *ras-related nuclear*] et RCC1 [pour *regulator of chromosome condensation 1*]). La nouvelle famille de protéines identifiées comme SPANX est notamment retrouvée dans la tête du spermatozoïde, ce qui est cohérent avec leur identification actuelle dans le noyau isolé du spermatozoïde humain (Salemi *et al.*, 2004; Westbrook *et al.*, 2006; Hansen *et al.*, 2010). Il est d'ailleurs à noter que les gènes SPANX ont été considérés comme possible candidats de l'infertilité masculine (Hansen *et al.*, 2010).

Une compilation systématique du protéome nucléaire spermatique humain et de la chromatine associée a permis de démontrer la présence de pas moins de 581 protéines différentes (Castillo *et al.*, 2014). Parmi les protéines nucléaires, 56 % auraient une activité épigénétique potentielle et seraient impliquées dans au moins une des fonctions suivantes: organisation des chromosomes, assemblage du complexe protéine-ADN, compaction de l'ADN, expression génique, transcription, modification de la chromatine, et modification des histones.

3.3.3 Les protéines mitochondriales

L'absence de transcription et de traduction protéique dans les mitochondries comme pour une cellule somatique reste encore un mystère (Baker, 2011). Cependant, l'utilisation de chloramphénicol, un inhibiteur spécifique de la traduction mitochondriale, tel que décrit par Gur a permis d'inhiber la production de 22 protéines spermatiques dont notamment le récepteur IZUMO impliqué dans la fusion du spermatozoïde-ovocyte (Gur, 2006). Ces

protéines sont essentiellement impliquées dans la capacitation des spermatozoïdes. De plus, il a été statué qu'un spermatozoïde mature est capable de traduire l'ARNm nucléaire grâce aux ribosomes mitochondriaux (Gur & Breitbart, 2008). Des études similaires de protéomique différentielle effectuées par Zhao et collaborateurs ont révélé 44 protéines qui présentaient une diminution de leur expression dans les spermatozoïdes traités par D-chloramphénicol en comparaison de spermatozoïdes capités (Zhao *et al.*, 2009). Parmi ces 44 protéines, 26 étaient impliquées dans des processus essentiels pour l'interaction spermatozoïde-ovocyte.

Un rapport récent décrit une petite activité de synthèse protéique des mitochondries spermatiques chez les mammifères, qui comprend principalement : complexes I, II, III, IV et V de la chaîne de transport d'électrons ; les transporteurs d'électrons cytochrome c et ubiquinone; acyl-CoA synthase; translocateur de nucléotides à adénine; carnitine acyl-transférase; protéine de transport mitochondrial de la carnitine/acylcarnitine; uniport calcique mitochondrial; pore de transition de perméabilité et les protéines découplantes mitochondriales (Amaral *et al.*, 2013). Certaines études préalables ont rapporté l'expression de 3 protéines mitochondriales dans le spermatozoïde humain, la cytochrome c oxydase (COX) I et VIc, et la protéine POLG (polymérase γ) (Amaral *et al.*, 2007; Sousa *et al.*, 2011). En fait, l'analyse protéomique comparative réalisée chez des patients présentant une asthénozoospermie a révélé une altération significative de l'expression de plusieurs protéines mitochondriales spermatiques (Amaral *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007; Martinez-Heredia *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2009; Siva *et al.*, 2010; Parte *et al.*, 2012).

Ces changements dans le profil d'expression suggèrent la participation de diverses protéines mitochondriales dans la régulation des fonctions du spermatozoïde telles que la mobilité (Zhao *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2009) et la capacitation (Shivaji *et al.*, 2009).

3.3.4 Les protéines du flagelle

L'évaluation protéomique des zones subcellulaires du spermatozoïde humain a gagné en importance ces dernières années. L'équipe d'Amara et collaborateurs a pu isoler et identifier les peptides du flagelle par LC et MS, après obtention de fractions de flagelles par l'intermédiaire d'une sonication suivie d'une ultracentrifugation en gradient de saccharose (Amaral *et al.*, 2013). Environ 1049 protéines ont été détectées, dont plus de la moitié n'avaient pas été décrites au préalable dans le spermatozoïde humain. Ces protéines du

flagelle ont été subdivisées en 2 groupes principaux selon leur fonction : les protéines liées au métabolisme et à la production d'énergie (26 %) et les protéines liées à la structure du flagelle et à la mobilité (11 %). Dans une autre étude, il a été mis en avant la présence de 721 protéines présentes exclusivement dans le flagelle parmi un total de 1429 protéines identifiées, le reste étant 521 protéines exclusivement retrouvées au niveau de la tête, et 159 protéines se trouvant dans les 2 fractions subcellulaires (Baker *et al.*, 2013).

3.3.5 Rôle fonctionnel des différentes protéines spermatiques

La majorité des études sur la protéomique du spermatozoïde a isolé et identifié différentes protéines. Cependant, la complexité d'organisation de ces protéines ainsi que leur fonction physiologique n'ont globalement pas été démêlées. L'évaluation de la fonction physiologique, lorsqu'elle a été recherchée, a généralement été effectuée soit en comparant le profil d'expression différentiel de la protéine avec des patients infertiles, soit en utilisant la base de GO (Mohanty *et al.*, 2015).

3.4 Le protéome du spermatozoïde chez l'animal

Des études protéomiques du spermatozoïde ont également été réalisées sur des modèles animaux de différentes espèces. Ces études ont fourni des informations complémentaires sur les mécanismes moléculaires et sur les cibles candidates qui régulent la fonctionnalité du spermatozoïde. La plupart de ces études ont utilisé la souris comme modèle animal. Cependant, d'autres espèces ont également été utilisées, telles que *C. elegans*, drosophile, abeille mellifère, ascidien, criquet, rat, sanglier, taureau et singe (Codina *et al.*, 2015). L'étude de la drosophile a été informative pour l'étude de la spermatogenèse. La caractérisation du protéome spermatique de la drosophile (Dorus *et al.*, 2006; Wasbrough *et al.*, 2010) a fait progresser notre compréhension de la génomique évolutive de la forme et de la fonction du spermatozoïde. De plus, la comparaison des protéomes spermatiques de la drosophile et de la souris a mis en évidence une conservation fonctionnelle entre les deux espèces (Wasbrough *et al.*, 2010). La comparaison du protéome spermatique du macaque Rhesus avec le protéome humain présente également un intérêt (Skerget *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2015). Cette comparaison a mis en avant que les différences de mobilité des spermatozoïdes entre les deux espèces (les macaques Rhesus produisent des spermatozoïdes à mobilité plus élevée) reposent sur une sélection positive chez les Rhesus de gènes hautement associés aux mitochondries et à

l'axonème (Zhou *et al.*, 2015). La caractérisation du protéome spermatique de différentes espèces animales et les comparaisons inter-espèces contribuent à une meilleure compréhension de l'évolution de ce protéome, et de son adaptation aux contraintes de sélection. Ces études fournissent également des informations précieuses sur les protéines cibles potentielles dans le cadre du traitement de l'infertilité ou sur les candidats contraceptifs potentiels.

4 LES BIOMARQUEURS PROTÉIQUES DE LA MOBILITE

4.1 Les protéines spermatiques de la mobilité

4.1.1 Protéomique dans l'étude de la mobilité spermatique

La mobilité est considérée comme une fonction clé de la bonne qualité du spermatozoïde puisque les spermatozoïdes ont la nécessité de se déplacer au travers de l'appareil reproducteur féminin pour arriver sur le site de la fécondation. Partant du constat que les spermatozoïdes mobiles et immobiles coexistent quasi systématiquement dans les prélèvements spermatiques, les professionnels de l'infertilité utilisent la mobilité comme critère essentiel de sélection des spermatozoïdes pour les techniques d'assistance médicale à la procréation (i.e. les spermatozoïdes avec une meilleure mobilité sont utilisés préférentiellement).

Malgré l'importance de ce paramètre, le monde scientifique manque encore d'information sur la base moléculaire de la mobilité des spermatozoïdes et nous ne disposons toujours pas de modèle complet de la myriade de mécanismes moléculaires contrôlant cette mobilité. Il est clair que la mobilité est assurée par le flagelle des spermatozoïdes, en particulier grâce au coulisement actif des microtubules entraînés par les bras de dynéine de l'axonème, lors de l'activation de la dynéine ATPase. La recherche de protéines impliquées dans le fonctionnement ou la régulation des microtubules pourrait donc représenter un axe de recherche intéressant. La protéine Tau en particulier, qui joue un rôle crucial dans l'assemblage des dimères α/β de tubulines et la stabilisation des microtubules neuronaux, a été longuement étudiée dans les maladies neurodégénératives. Par ailleurs, il a longtemps été supposé qu'au moins 2 voies de signalisation sont impliquées dans la régulation de la mobilité des spermatozoïdes chez les mammifères: la voie de l'AMPC/PKA et la voie de signalisation du calcium (Turner, 2006). De plus, les données issues de modèles de souris knockout ont

décrit clairement que plusieurs protéines sont nécessaires au bon fonctionnement du flagelle spermatique (Escalier, 2006; Inaba, 2011). Plus récemment, de nouvelles stratégies ont été appliquées pour étudier la mobilité des spermatozoïdes. Celles-ci incluent, par exemple, l'utilisation de patch-clamp et la modélisation mathématique pour déchiffrer la signalisation du calcium flagellaire (Kirichok & Lishko, 2011; Olson *et al.*, 2011), l'utilisation de l'imagerie et de la simulation de la mécanique des fluides du spermatozoïde en mouvement pour révéler l'influence réelle de la viscosité des milieux sur la mobilité des spermatozoïdes (Kirkman-Brown & Smith, 2011) et l'utilisation d'outils de détection d'interactions protéine-protéine pour étudier le rôle des protéines spécifiques de la mobilité des spermatozoïdes (Fardilha *et al.*, 2011).

En permettant la détection simultanée de milliers de protéines dans le même temps, les technologies protéomiques constituent des outils efficaces pour aider à révéler les mécanismes moléculaires de régulation, et la mobilité des spermatozoïdes n'est pas une exception (Oliva *et al.*, 2008, 2009). En fait, divers groupes ont utilisé des approches par MS pour comparer le protéome spermatique d'individus asthénozoospermiques avec celui de témoins normozoospermiques (Zhao *et al.*, 2007; Martinez-Heredia *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2009; Siva *et al.*, 2010; Parte *et al.*, 2012). En colligeant les résultats obtenus dans les références mentionnées ci-dessus, Amaral et collaborateurs ont récemment décrit que 109 protéines spécifiques ont jusqu'à présent été détectées à des niveaux modifiés dans les échantillons de spermatozoïdes présentant une mobilité diminuée (Amaral *et al.*, 2014a). Il convient de mentionner que la plupart des protéines différentielles appartiennent au cytosquelette ou ont des fonctions métaboliques. Cependant, il convient de souligner que ces études ont été réalisées en utilisant des techniques protéomiques relativement peu sensibles par rapport aux approches plus récentes. De plus, dans certaines de ces études, les critères d'identification des protéines n'ont pas été indiqués et la possibilité d'identifications de faux positifs ne peut être donc exclue.

Des techniques protéomiques à débit plus élevé, avec une plus grande puissance de détection, sont actuellement disponibles. En effet, l'utilisation de la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) dans les études de protéomique descriptive a révélé que le protéome du spermatozoïde humain se révèle beaucoup plus complexe que préalablement imaginé (Oliva & Dixon, 1991; Visconti *et al.*, 2002; Balhorn, 2007; Baker, 2011; de Mateo *et al.*, 2011; Jodar *et al.*, 2011; Oliva & Castillo, 2011b; de Mateo *et al.*, 2011). Le domaine de la protéomique quantitative est également en progrès constant, et

l'utilisation de stratégies de marquage isobariques (comme les *tandem mass tag*; TMT) ont été appliquées pour étudier les altérations du protéome dans des cellules somatiques distinctes (de Mateo *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2013a; Azpiazu *et al.*, 2014; Castillo *et al.*, 2014).

4.1.2 Protéines du spermatozoïde impliquées dans l'initiation et la régulation de la mobilité

Théoriquement, le problème de l'identification des protéines spermatiques impliquées dans la mobilité pourrait être résolu assez simplement en inhibant la mobilité, mais cette approche n'est pas toujours exempte d'ambiguïtés. L'inhibition de la mobilité des spermatozoïdes n'est pas nécessairement due à l'effet d'une seule protéine et peut impliquer une cascade de protéines.

Dans une étude pilote visant à caractériser les protéines associées à l'infertilité masculine liée à la mobilité des spermatozoïdes, 10 protéines exprimées à des niveaux différents ont été identifiées, à savoir : inhibiteur de dissociation de la ρ -guanosine diphosphate 1 (ρ GDI 1), protéine de fibre dense externe (ODF), isocitrate déshydrogénase sous-unités α , phosphoglycérate mutase 2, triosephosphate isomérase, glutamate oxaloacétate transaminase 1, l'anhydrase carbonique II, pré-séminogéline I (SEMGIpre), GLUL (pour *glutamate-ammonia ligase*), et sous-unité régulatrice 7 de la protéase 26S (Zhao *et al.*, 2007). Les protéines ρ GDI 1 et ODF sont associées à la structure du spermatozoïde. L'absence de protéines ODF résulterait en la formation de flagelles non fonctionnels (Chemes *et al.*, 1987). La sur-expression de l'ODF dans cette étude peut donc être considérée comme un marqueur biologique de l'infertilité masculine. Chez les patients présentant une globozoospermie, un faible niveau d'expression de l'ODF2 des spermatozoïdes à tête ronde causerait une fragmentation du flagelle conduisant à une mobilité réduite (Liao *et al.*, 2009). Les protéines ODF pourraient donc être nécessaires au maintien des propriétés élastiques du flagelle et pourraient fournir une résistance aux tensions, résistance nécessaire pour protéger le flagelle contre les forces de cisaillement rencontrées lors du transport épидидymaire et surtout éjaculatoire (Baltz *et al.*, 1990; Petersen *et al.*, 1999). Une augmentation de la séminogéline et de ses formes précurseurs SEMGIpre et SEMGIIpre, a été détectée chez les patients infertiles normozoospermiques (Xu *et al.*, 2012). La séminogéline a la capacité d'inhiber les fonctions majeures du spermatozoïde telles que la mobilité (Robert & Gagnon, 1996) et la capacitation (de Lamirande *et al.*, 2001). De même, une diminution de certains composants de l'axonème, tels que les protéines tektin et la dynéine, s'est révélée être la cause d'immobilité spermatique (Muratori *et al.*, 2009).

Deux autres protéines, liées à la structure de la gaine fibreuse du spermatozoïde humain et spécifiques du testicule, ont été identifiées : l'AKAP3 et la calcium-binding tyrosine phosphorylation regulated (CABYR) (Naaby-Hansen, 2012). Les protéines de la famille des AKAPs et des CABYR sont associées à plusieurs complexes multiprotéiques tels que la sous-unité régulatrice de type 2 (RII) de la protéine kinase A, qui à son tour régule l'alimentation en énergie nécessaire pour le mouvement du flagelle. En effet, dans les études de Xu et collaborateurs (Xu *et al.*, 2012) la protéine AKAP4, protéine prédominante dans la gaine fibreuse du flagelle spermatique, a montré jouer un rôle-clé dans la régulation de mobilité (Miki *et al.*, 2002) et est diminuée chez les patients infertiles.

4.2 Les protéines AKAPs

Les protéines AKAPs forment un groupe de protéines de structures diverses ayant comme fonction commune de se lier à la sous-unité régulatrice de la PKA et de confiner l'holoenzyme à des emplacements distincts dans la cellule. Grâce à cette distribution subcellulaire spécifique et compartimentées de la PKA et d'autres enzymes, la famille des AKAPs est responsable de l'organisation de signaux en cascade, en assurant la coordination des événements sensibles à l'AMPc et leur intégration avec d'autres signaux intracellulaires.

4.2.1 Structure et fonction des protéines AKAPs

4.2.1.1 Domaine de fixation à la PKA

Toutes les protéines de la famille des AKAPs présentent une hélice amphipathique d'environ 14 à 18 résidus qui leur permet de se lier à la séquence de dimérisation N-terminale des sous-unités régulatrices de la PKA (Carr *et al.*, 1991). La protéine PKA étant une enzyme tétramérique omniprésente composée de 2 sous-unités catalytiques C, maintenues dans un état inactif en se liant aux 2 sous-unités régulatrices de type I (RI) ou de type II (RII) (figure 16). Bien que la majorité des AKAPs se lie spécifiquement à RII (Carnegie & Scott, 2003), des AKAPs de fixation spécifique à RI ont également été identifiées (Angelo & Rubin, 1998). Très peu d'AKAPs, comme par exemple les protéines AKAP3 et AKAP4, présentent une double affinité de liaison pour les 2 sous-unités régulatrices de la PKA. La signalisation initiée par les complexes AKAP-PKA de type II et de type I a été mise en évidence grâce à la

conception bio-informatique de peptides antagonistes spécifiques des séquences d'ancrage de la sous-unité RII- (Alto *et al.*, 2003) et de la sous-unité RI- (Burns-Hamuro *et al.*, 2003).

4.2.1.2 Compartimentalisation et séquence de localisation

La structure unique du spermatozoïde résulte d'une compartimentalisation des différentes fonctions de la cellule : reconnaissance de l'ovocyte par la surface de la tête, empaquetage de la chromatine dans la tête, production d'énergie dans la pièce intermédiaire, mobilité générée par l'ensemble du flagelle. De nombreuses fonctions compartimentées du spermatozoïde sont régulées par l'AMPc et, à ce jour, plusieurs AKAPs ont été localisées dans différents compartiments subcellulaires tels que la membrane plasmique, le Golgi, le centrosome, le noyau, les mitochondries et le cytosol (Luconi *et al.*, 2011). Les AKAPs organisent dans ces compartiments des complexes moléculaires ciblés, mettant en relation la production d'AMPc, les kinases, les phosphatases et les substrats.

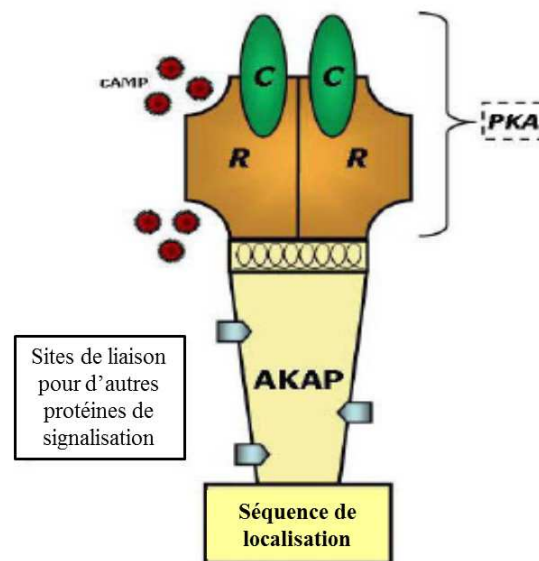






Figure 16 : Structure d'une protéine AKAP en lien avec la PKA. Les AKAPs présentent une structure similaire, caractérisée par une hélice amphi-pathique dans le domaine de liaison à la PKA, une séquence cible spécifique, et un certain nombre de sites de liaison pour d'autres protéines de signalisation.

D'après Luconi *et al.*, 2011.

AKAP : A-kinase anchor protein ; *C* : sous-unité catalytique;  *cAMP* : cyclic adenosine phosphate;  hélice amphi-pathique de l'AKAP;  *PKA* : protein kinase A; *R* : sous-unité régulatrice;  sites de liaison pour d'autres protéines de signalisation.

4.2.1.3 Complexe moléculaire AKAP-PKA-AMPC

Le phénomène de compartimentalisation des composants du système AKAP-PKA-AMPC (comme l'adénylyl cyclase, les phosphodiesterases et la PKA) est rendu possible notamment par l'existence d'une boucle de rétroaction en réponse à un stimulus ciblé. En effet, l'activité de stimulation de l'adénylyl cyclase dans les complexes AKAPs entraîne une production rapide et localisée de l'AMPC, activant la PKA sans effet sur les PKA des autres compartiments, qui à son tour phosphoryle ses substrats, initiateurs d'une cascade de signalisation ciblée (Dessauer, 2009). Parmi ces substrats, la PKA stimulée active d'une part les phosphodiesterases et phosphatases ancrées par AKAP et inactive d'autre part l'adénylyl cyclase ancrée par AKAP en inhibant la phosphorylation (Dessauer, 2009).

Les complexes de signalisation contenant la PKA sont donc établis dans différents microenvironnements de la cellule de sorte que les protéines puissent être phosphorylées d'une manière cloisonnée. Les AKAPs compartimentent la phosphorylation des protéines en ancrant les sous-unités régulatrices de la PKA à différentes structures cellulaires (Colledge & Scott, 1999; Moss & Gerton, 2001). Les AKAPs positionnent ainsi la PKA à proximité immédiate de ses molécules effectrices et de ses cibles, ce qui facilite la propagation localisée des signaux de seconds messagers. Cependant, pour placer la PKA dans diverses localisations cellulaires les AKAPs doivent elles-mêmes être ciblées correctement. Des séquences de localisation caractéristiques ont été identifiées chez certaines AKAPs qui déterminent la localisation d'une AKAP à un organelle subcellulaire ou à une structure spécifique (Li *et al.*, 1996).

4.2.2 Les AKAPs dans les cellules germinales et le spermatozoïde

Les AKAPs jouent un rôle important dans les 2 systèmes de reproduction, féminin et masculin, en particulier au cours du processus de gamétogenèse. Certaines de ces AKAPs sont communes aux cellules somatiques, mais d'autres sont spécifiquement exprimées dans les gamètes mâles ou femelles et peuvent présenter des variations d'épissage par rapport aux AKAPs somatiques (Luconi *et al.*, 2011).

L'expression de différentes isoformes AKAPs a été détectée dans les cellules germinales mâles au cours de la spermatogenèse, ainsi que dans les spermatozoïdes matures (Eddy *et al.*, 2003; Luconi *et al.*, 2011). Dans le gamète mâle, les AKAPs sont impliquées à la fois dans le

bon déroulement de la spermatogenèse et dans l'activation de fonctions du spermatozoïde mature telles que le développement et le maintien de la mobilité spermatique. On peut citer par exemple les AKAP3 et AKAP4 qui contribuent fortement à la mobilité. Ces 2 protéines sont transcrites et synthétisées pendant la spermatogenèse au moment de la maturation post-méiotique des spermatides en spermatozoïdes. Elles sont exprimées uniquement aux stades de spermatide et de spermatozoïde, et localisées au niveau de la gaine fibreuse de la pièce principale du flagelle.

Les spermatozoïdes matures sont des cellules extrêmement spécialisées, incapables d'effectuer la transcription du gène et la synthèse des protéines. Dans ce contexte particulier, la réponse cellulaire à des stimuli ne peut pas être assurée par la synthèse de nouvelles protéines. Elle repose entièrement sur des cascades rapides de signalisation intracellulaire, basée sur des modifications post-traductionnelles des seconds messagers, tels que la phosphorylation /déphosphorylation de protéines. La compartimentalisation de la signalisation par des protéines telles que les AKAPs devient un mécanisme pivot pour différencier les cascades initiées par différents stimuli, mais qui sont propagées par les mêmes seconds messagers présents dans la cellule.

4.2.2.1 La protéine AKAP4

Plusieurs AKAPs ont été identifiées dans les cellules germinales et le spermatozoïde (Nipper *et al.*, 2006). Parmi elles, la protéine AKAP4 (précédemment nommée AKAP82) a été la première AKAP à être décrite comme associée au flagelle des spermatozoïdes (Carrera *et al.*, 1994). C'est une protéine hautement conservée d'environ 82 kDa qui a été caractérisée chez la souris (Carrera *et al.*, 1994; Fulcher *et al.*, 1995), les bovins (Moss *et al.*, 1999) et les spermatozoïdes humains (Turner *et al.*, 1998). Elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur d'environ 97 kDa (acides aminés 1-854) au stade de spermatide ronde, la pro-AKAP4, et transportée dans le flagelle en développement (Johnson *et al.*, 1997). La pro-AKAP4 est ensuite transformée en protéine AKAP4 complète mature (acides aminés 189-854) dans les spermatides à noyau condensé (figure 17). Les protéines de la gaine fibreuse synthétisées dans le corps de la spermatide pourraient être véhiculées jusqu'à l'axonème sous la forme d'un complexe avec le précurseur incompetent pro-AKAP4. Une fois clivée en forme active, l'AKAP4 conduirait l'assemblage correct de la gaine fibreuse (Johnson *et al.*, 1997). De plus, une petite quantité du pro-domaine (acides aminés 1-188) reste détectable, mais son rôle n'est pas connu (Nipper *et al.*, 2006). Il a été suggéré que le rôle du pro-

domaine de la pro-AKAP4 est de garder la protéine à l'état soluble durant son transport depuis le corps de la cellule jusqu'au flagelle en développement, où il est assemblé en complexe insoluble (Johnson *et al.*, 1997).

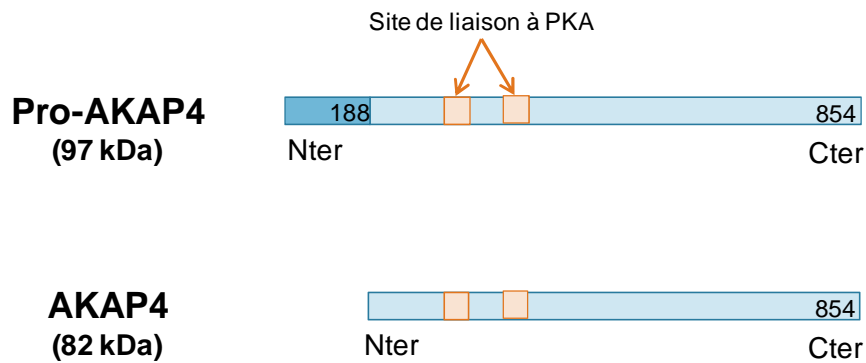


Figure 17 : Protéine AKAP4 et son précurseur.

Dans le spermatozoïde mature de souris, la protéine AKAP4 est un composant majeur de la gaine fibreuse, localisée sur toute la longueur de la pièce principale du flagelle, y compris les colonnes longitudinales et stries fibreuses circonférentielles (figure 18). La pro-AKAP4 quant à elle est détectée dans les spermatides à noyau condensé et dans le flagelle en élongation, mais pas dans le spermatozoïde mature murin (Johnson *et al.*, 1997). Par ailleurs, une protéine de 109 kDa a également été mise en évidence dans le spermatozoïde mature. Il s'agit en fait d'une forme phosphorylée de la pro-AKAP4 qui persiste dans le spermatozoïde mature, localisée uniquement au niveau proximal de la pièce principale. Chez l'homme, Carrera et collaborateurs ont démontré que 2 protéines respectivement de 97 et 82 kDa étaient les homologues des pro-AKAP4 (97 kDa) et AKAP4 (82 kDa) de souris (Carrera *et al.*, 1996).

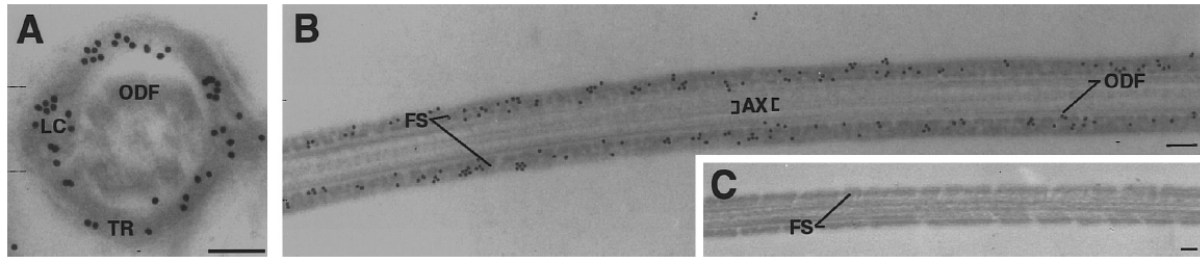


Figure 18 : Immuno-localisation en microscopie électronique de la protéine AKAP4. Présence de la protéine dans une section transversale (A) et une section longitudinale (B) de spermatozoïdes matures de souris. L'immuno-réactivité de l'AKAP4 a été détectée sur toute la gaine fibreuse (FS pour *fibrous sheath*), y compris dans les colonnes longitudinales (LC pour *longitudinal columns*) et les stries fibreuses circonférentielles (TR pour *transverse ribs*). Aucun immuno-marquage n'a été détecté dans les fibres extérieures denses (ODF pour *outer dense fibrers*) ou l'axonème (AX pour *axoneme*). Les sections de contrôle préparées avec du sérum de lapin (C) ne présentaient aucun marquage non spécifique. Echelle = 0,2 mm. D'après Johnson *et al.*, 1997.

Une corrélation entre le degré de transformation de la pro-AKAP4 en AKAP4 et l'augmentation de la mobilité a été avancée (Turner *et al.*, 1999). En effet, les spermatozoïdes humains présentent un ratio AKAP4/pro-AKAP4 moins élevé que d'autres espèces qui montrent également une meilleure mobilité spermatique. Toutefois, cette relation n'a jamais été validée, puisqu'aucune différence n'a été détectée entre les quantités relatives de pro-AKAP4 et AKAP4 dans des échantillons de spermatozoïdes capités humains (Turner *et al.*, 1999). De plus, une diminution de la mobilité observée après cryoconservation et décongélation de spermatozoïdes équins n'est pas associée à une diminution de liaison de l'AKAP4 et de la PKA dans le flagelle (Turner *et al.*, 1999, 2005).

Au cours de la capacitation spermatique, l'AKAP4 et la pro-AKAP4 sont activement phosphorylées au niveau des tyrosines, bien que cet effet ne semble pas être associé à une augmentation de la mobilité (Turner *et al.*, 1999). En effet, comme la capacitation est associée à une hypermobilité, il a été supposé que cette phosphorylation entraîne un changement de mobilité. Cependant, aucune preuve n'a pu être mise en avant concernant l'association entre la phosphorylation des tyrosines des AKAP4 ou pro-AKAP4 et des différences significatives de mobilité chez hommes normozoospermiques. La phosphorylation des tyrosines des AKAP4-pro-AKAP4 étant une modification qui intervient au cours de la capacitation, c'est-à-dire largement après l'assemblage de la gaine fibreuse, il a été avancé que le rôle de cette phosphorylation pourrait plutôt être d'influencer le degré de fixation de ces 2 protéines à d'autres enzymes de signalisation (Turner *et al.*, 1999).

Le gène codant pour l'AKAP4 se situe à l'extrémité proximale du chromosome X (Xp11.2) chez la souris (Carrera *et al.*, 1994) et dans la région synténique chez l'homme (Turner *et al.*, 1998). Par conséquent, les défauts éventuels du gène sont hérités de la mère.

4.2.2.2 Modèles animaux pour la protéine AKAP4

La perturbation ciblée du gène *akap4* par la méthode CRE/loxP donne lieu à des défauts du flagelle des spermatozoïdes et de la mobilité (Moretti *et al.*, 2007). Les souris *knock-out* (KO) pour la protéine AKAP4 produisent un nombre normal de spermatozoïdes, mais ces derniers ne parviennent pas à développer de mobilité progressive. Ils présentent un flagelle raccourci et une quantité réduite, voire une absence, de protéines dont les fonctions sont normalement associées et coordonnées par l'AKAP4 comme la RII alpha, l'AKAP3 et la GAPDH. Ainsi, l'absence de l'AKAP4 donne lieu à une structure et une fonction flagellaire modifiées. Les défauts structurels sont très spécifiques. Les composants du cytosquelette, comme l'axonème et les fibres denses externes, sont correctement formés étant donné que leur assemblage lors du développement du flagelle est indépendant de la gaine fibreuse. À l'inverse, la gaine fibreuse, dont l'AKAP4 est le composant principal, est incomplète, entraînant la formation d'une pièce principale plus fine et d'un flagelle plus court avec une structure amorphe. Cette structure modifiée n'est plus en mesure de recruter correctement ni d'orchestrer la signalisation sous-jacente à la mobilité du spermatozoïde.

4.2.2.3 AKAP4 et mobilité spermatique

Outre son rôle dans la conduite de l'assemblage du flagelle au cours de la spermatogenèse, la protéine AKAP4 est indispensable au développement et à l'entretien de la mobilité des spermatozoïdes. La coordination des aptitudes de l'AKAP4 avec l'AKAP3 est essentielle pour recruter et organiser différentes enzymes en une plate-forme de signalisation de la gaine fibreuse. Plusieurs kinases, des phosphatases et des phosphodiesterases ainsi que les protéines du cytosquelette contribuent à la transduction correcte d'une cascade de signalisation de la mobilité et ont été décrites pour interagir de manière coordonnée et être activées par la plate-forme AKAP3-AKAP4. En particulier, au cours de la capacitation, l'activité de l'AKAP3 et AKAP4 peut être régulée par la phosphorylation d'acides aminés spécifiques. Quelques-uns de ces sites de phosphorylation ont été cartographiés et correspondent essentiellement à des résidus tyrosine et sérine (Ficarro *et al.*, 2003; Platt *et al.*, 2009). Un des sites de phosphorylation correspond notamment au site de liaison de la PKA.

4.2.2.4 Défection génétique de l'AKAP4 et asthénozoospermie

L'AKAP4 étant impliquée dans la mobilité des spermatozoïdes, des anomalies du gène de codage ou des modifications post-traductionnelles qui affectent les fonctions de la pro-AKAP4 et de l'AKAP4 (telles que le clivage protéolytique, la phosphorylation induite par la capacitation) pourraient être présentes chez les patients présentant des déficiences de mobilité spermatique d'origine génétique. Ces anomalies génétiques du spermatozoïde affectent les structures flagellaires et résultent en une asthénozoospermie. Ces anomalies comprennent : 1-le flagelle court (« moignon »), caractérisé par la longueur réduite du flagelle et des défauts dans les structures flagellaires ; 2- le syndrome des cils immobiles ou dyskinésie ciliaire, caractérisé par l'absence des bras de dynéine ; 3- la dysplasie de la gaine fibreuse, y compris toutes les anomalies de cette structure résultant à la formation d'un flagelle anormal et d'une gaine fibreuse sévèrement malformée ; 4- le flagelle détaché, caractérisé par des flagelles sans tête ; 5- l'axonème de type 9+0 ou l'absence d'axonème, en l'absence du couple central de microtubules ou de la totalité de l'axonème (Luconi *et al.*, 2011).

Ces anomalies génétiques sont probablement secondaires à des défauts non identifiés à ce jour, puisqu'aucune modification quantitative ou qualitative de l'AKAP4 ou de la pro-AKAP4 n'a été mise en évidence dans les pathologies de dysplasie de la gaine fibreuse (Turner *et al.*, 2001) et du flagelle court (Baccetti, 2005). En effet, dans l'étude de Turner et collaborateurs, l'AKAP4 était localisée correctement dans la gaine fibreuse du flagelle amorphe et conservait la capacité d'interagir avec la PKA (Turner *et al.*, 2001). À noter que dans un cas de « moignon » flagellaire, aucune protéine AKAP4 n'a été détectée (Baccetti *et al.*, 2004). Le rôle de l'AKAP4 dans la dysplasie de la gaine fibreuse reste donc peu clair et l'hypothèse d'une origine multi génique a été suggérée par la présence de délétions partielles dans les gènes *akap3* et *akap4* et par l'absence de protéine AKAP4 dans la gaine fibreuse dans une étude de cas (Baccetti, 2005; Baccetti *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2015).

4.3 La protéine Tau (tubule-associated unit)

4.3.1 Constitution et localisations

La protéine Tau a été l'une des premières protéines identifiées comme constituant de polymérisation et de stabilisation des microtubules et elle appartient à la famille des protéines associées aux microtubules (MAPs) caractérisée par Weingarten et collaborateurs en 1975

(Weingarten *et al.*, 1975). Elle a été découverte dans le cerveau porcin par Drubin et Kirschner alors à la recherche de promoteurs de l'assemblage de la tubuline dans les microtubules. Tau est une protéine cytosolique dont le gène est localisé sur le bras long du chromosome 17, au niveau 17q21 (Goedert *et al.*, 1988) et possède 16 exons. Une grande majorité des études de recherche traitant de la protéine Tau a été réalisée sur le cerveau. Cependant, quelques études ont également été réalisées chez l'homme et chez l'animal sur d'autres tissus. La protéine Tau est détectée dans le cerveau, le cœur, le muscle, le poumon, le rein, le pancréas et le foie (Kenner *et al.*, 1994; Gu *et al.*, 1996; Vanier *et al.*, 1998). Son expression dans l'appareil reproducteur mâle est également rapportée (Ashman *et al.*, 1992; Gu *et al.*, 1996; Inoue *et al.*, 2014; Sigala *et al.*, 2014). Dans le testicule de souris, la protéine Tau est exprimée dans l'épithélium séminifère depuis le stade spermatogonie jusqu'au stade spermatide (Inoue *et al.*, 2014). Dans le testicule du bovin, elle a été localisée au stade spermatide (Ashman *et al.*, 1992). Chez l'homme son expression a été rapportée dans le testicule et le spermatozoïde éjaculé (Sigala *et al.*, 2014). Dans le testicule humain, la protéine Tau est exprimée dans le cytoplasme du spermatocyte et de la spermatide en élongation. Dans le spermatozoïde éjaculé, elle est exprimée dans la pièce intermédiaire du flagelle.

4.3.2 Rôles de la protéine Tau

Dans le neurone, la fonction principale de la protéine Tau est d'assurer l'assemblage des dimères α/β de tubulines (Cárdenas *et al.*, 2012) et la stabilisation des microtubules en empêchant leur dépolymérisation (Brandt *et al.*, 2005; Dolan & Johnson, 2010) (figure 19). Une balance entre liaison et détachement de Tau aux microtubules est nécessaire pour un fonctionnement normal du neurone (Tassan & Le Goff, 2004). Plus généralement, la dynamique des microtubules est nécessaire pour la réorganisation rapide du cytosquelette, la plasticité synaptique, la mitose, la mobilité cellulaire, la fonction ciliaire (Erickson & O'Brien, 1992; Etienne-Manneville, 2010).

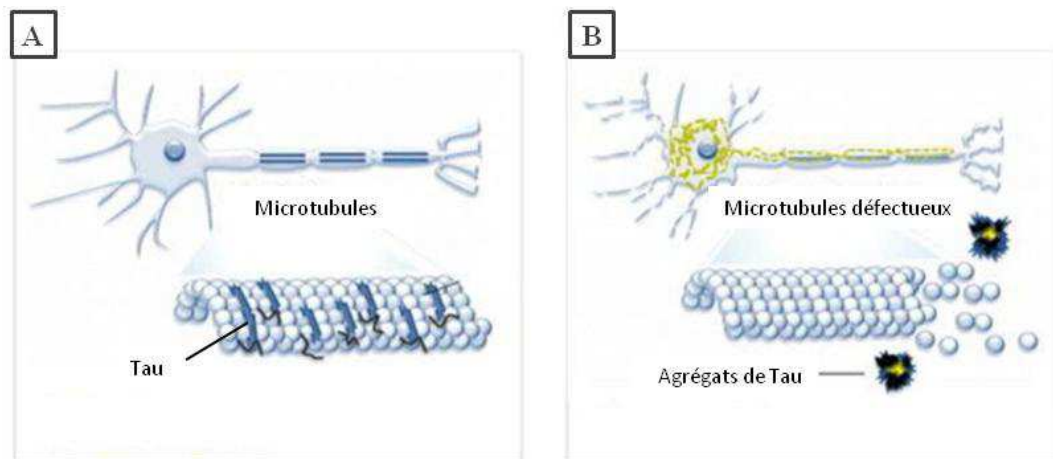


Figure 19 : Agrégation de la protéine Tau et dégénérescence neuronale. (A) Dans le neurone sain, la protéine Tau stabilise les microtubules favorisant la croissance axonale et le transport des vésicules synaptiques. (B) En cas de défaillance de la protéine Tau (formation d'agrégats), cela entraîne une dépolymérisation des microtubules. D'après Lim *et al.*, 2014.

Tau : tubule-associated unit.

4.3.3 Rôle(s) putatif(s) de la protéine Tau au niveau testiculaire

4.3.3.1 Polymérisation des microtubules et phosphorylation

L'activité biologique de la protéine Tau dépend en partie de son état de phosphorylation, qui peut influencer son affinité pour les microtubules (Liao *et al.*, 1998; Sontag, 1999; Cárdenas *et al.*, 2012). La phosphorylation représente la modification post-traductionnelle principale de la protéine Tau. Elle a pour conséquence un détachement et une déstabilisation des microtubules (Cleveland *et al.*, 1977a, 1977b; Lindwall & Cole, 1984; Drubin *et al.*, 1986; Biernat *et al.*, 1993; Bramblett *et al.*, 1993). L'équilibre phosphorylation-déphosphorylation de la protéine est assuré par la balance des activités de nombreuses kinases et phosphatases (Billingsley & Kincaid, 1997; Liao *et al.*, 1998; Sontag, 1999). Pas moins de 85 sites de phosphorylation ont déjà été identifiés sur la protéine Tau (Buée *et al.*, 2000; Sergeant *et al.*, 2008). Une phosphorylation anormale ou une hyperphosphorylation entraînent une dissociation des microtubules (Billingsley & Kincaid, 1997) et s'associent à la formation d'agrégats filamenteux de Tau appelés paires hélicoïdales de filaments (PHF). Les PHF sont connus pour être responsables de la dégénérescence des neurones et de désordres neurologiques (Goedert *et al.*, 1988). Le concept de protéines Tau pathologiques est lié à l'hyperphosphorylation anormale conduisant à l'accumulation des PHF (Sergeant *et al.*, 1995).

Dans le testicule de souris, les sites de phosphorylation physiologiques de la protéine Tau ont récemment été mis en évidence dans le cytoplasme des spermatocytes (Inoue *et al.*, 2014). Au cours de la méiose, la phosphorylation de Tau coïnciderait avec une diminution de l'acétylation de la tubuline (Inoue *et al.*, 2014). L'acétylation est une modification de la tubuline, synonyme de polymérisation. Dans le testicule, la phosphorylation de Tau pourrait donc être impliquée dans la stabilité du fuseau mitotique au cours de la division méiotique des cellules germinales. La ségrégation chromosomique au cours de la méiose est contrôlée par l'allongement et la rétraction de fuseaux microtubulaires, nécessaires à l'attachement des kinétochores des chromosomes durant la métaphase (Walczak & Heald, 2008; Kitajima *et al.*, 2011). Ces fuseaux, principalement composés de microtubules, sont contrôlés par des MAPs. La phosphorylation de la protéine Tau pourrait être impliquée dans les mouvements d'extension et de rétraction des microtubules au cours de la méiose (Inoue *et al.*, 2014). Les erreurs de ségrégation survenant pendant la méiose sont à l'origine d'aberrations chromosomiques, ayant pour impact la transmission éventuelle à l'enfant d'anomalies chromosomiques pouvant être responsables de malformations. De nouveaux travaux sont nécessaires pour déterminer si des altérations pathologiques de la phosphorylation de la protéine Tau pourraient ou non contribuer aux erreurs de ségrégation des chromosomes.

4.3.3.2 Polarité cellulaire

L'acquisition de la polarité cellulaire est essentielle au fonctionnement d'une cellule, notamment des cellules épithéliales (Müsch, 2004), des neurones (Lalli, 2014) et des cellules spermatiques (Sperry, 2012).

La spermatogenèse chez les mammifères est caractérisée par d'importants changements cellulaires permettant la transformation d'une cellule ronde non polarisée (spermatogonie) en une cellule polarisée et mobile (spermatozoïde). L'acquisition de la polarité cellulaire est indispensable à la formation d'un spermatozoïde fécondant. Au stade spermatide, l'appareil de Golgi se déplace d'un côté du noyau alors que les centrioles migrent en direction opposée. La présence de l'acrosome au pôle apical et du flagelle à l'extrémité opposée attestent de la polarité du spermatozoïde (Sperry, 2012).

Similairement, l'une des caractéristiques morphologiques des neurones est leur structure polarisée. Durant ce processus de polarisation, l'action coordonnée d'un certain nombre de molécules, dont les MAPs, régule le réseau de microtubules du cytosquelette pour le maintien

et le développement des compartiments axonal et somatodendritique (Kempf *et al.*, 1996; Arimura & Kaibuchi, 2007). Au cours de l'allongement d'un neurone, la protéine Tau s'isole progressivement dans l'axone et la protéine MAP2 migre dans la partie dendritique en formation. En régulant l'assemblage des microtubules, les protéines Tau et MAP2 exercent un rôle sur la polarité cellulaire du neurone (Dehmelt & Halpain, 2005).

L'expression de la protéine MAP2 a également été mise en évidence dans les cellules somatiques et germinales du testicule de rat (Loveland *et al.*, 1999). Il existe donc des similitudes morphologiques et fonctionnelles entre le neurone et les cellules germinales, notamment sur la polarité. D'autres protéines jouant un rôle dans la polarité cellulaire, comme les MARKs (pour *microtubules affinity-regulating kinases*), viennent conforter l'analogie entre le système neuronal et le système testiculaire (Tassan & Le Goff, 2004). Les MARKs ont été découvertes dans le cerveau pour leur rôle dans la phosphorylation de Tau (Drewes *et al.*, 1997). Les MARKs ont également été identifiées dans le testicule, notamment dans les cellules de Sertoli et les cellules germinales au stade spermatide (Tang *et al.*, 2013).

Au total, il est possible d'émettre l'hypothèse d'un rôle de la protéine Tau sur la polarité des cellules germinales à travers la régulation des microtubules de l'épithélium séminifère.

5 PROTÉOMIQUE DU SPERMATOZOÏDE ET AMP

Le spermatozoïde peut être aisément analysé en protéomique car c'est une cellule facilement accessible et purifiable (Oliva *et al.*, 2009). Cependant, la quantité de protéines spermatiques peut constituer un facteur limitant, en particulier dans les anomalies du nombre (oligozoospermies). C'est pourquoi, la plupart des études sont effectuées sur des éjaculats poolés de spermatozoïdes.

Plusieurs études ont étudié le profil protéique des spermatozoïdes afin de détecter des biomarqueurs potentiels pouvant aider à la détection de déficience physiologique des spermatozoïdes, et de développer des outils de diagnostic pour les couples infertiles. Ces études se sont principalement concentrées sur l'évaluation des anomalies de la fertilité masculine (Martinez-Heredia *et al.*, 2008), ainsi que sur les échecs de fécondation des techniques d'AMP (Pixton, 2004) et sur les comparaisons entre patients fertiles et infertiles (Thacker *et al.*, 2011).

5.1 Les techniques de l'AMP

L'AMP comprend diverses possibilités de traitements et de techniques, qui peuvent être différenciés par des contrôles plus ou moins stricts du processus de fécondation et par le degré d'invasivité (Cissen *et al.*, 2016). La qualité du sperme, et notamment la mobilité spermatique, est un élément décisionnel clé du choix de la technique utilisée.

5.1.1 L'insémination intra-utérine

L'insémination intra-utérine (IIU) est une technique d'AMP qui permet de traiter l'infertilité, qui est fréquemment utilisée pour les couples présentant une hypofertilité masculine (Goverde *et al.*, 2000; Cohlen, 2005). Dans les IIU, un faible volume de spermatozoïdes préparés par gradient de densité ou par migration ascendante (swim-up), suivi d'un lavage capacitant, est remplacé dans la cavité utérine par voie trans-cervicale en période péri-ovulatoire. L'intérêt de cette procédure est de contourner l'obstacle que représentent le col et la glaire cervicale et de positionner les spermatozoïdes au plus près de l'ovocyte libéré. De plus, le lavage du sperme et la sélection de spermatozoïdes mobiles (via la préparation du sperme) permettent d'accroître les chances de fécondation en permettant d'augmenter la quantité de spermatozoïdes mobiles présents dans l'utérus (Duran *et al.*, 2002). L'IIU peut être réalisée avec ou sans hyperstimulation ovarienne (OH pour *ovarian hyperstimulation*). Cette dernière permet d'augmenter éventuellement le nombre d'ovocytes disponibles sur le site de conception. Il a également été suggéré que l'OH permettrait de surmonter les troubles subtils de l'ovulation qui ne peuvent pas être détectés par des examens de routine (Zikopoulos *et al.*, 2005). L'OH est obtenue par l'administration de médicaments tels que les anti-estrogènes (par exemple le citrate de clomifène) ou les gonadotrophines, parfois combinés avec des analogues de la GnRH (pour *gonadotropin releasing hormone*) ou, plus récemment, des antagonistes de la GnRH (Cantineau & Cohlen, 2007).

Dans les cycles naturels, la montée de l'hormone lutéinisante pré-ovulatoire (LH, pour *luteinizing hormone*) est le meilleur indicateur de l'ovulation (World Health Organization, 2010). L'ovulation se produit 35 à 38 h après le début de la montée de LH dans le sang (Testart & Frydman, 1982; Hoff *et al.*, 1983). Dans les cycles stimulés, les chances de timing adéquat sont augmentées par l'administration de gonadotrophine chorionique humaine (hCG, pour *hormone chorionique gonadotrope*), qui déclenche l'ovulation. Afin de déterminer à quel moment réaliser l'injection d'hCG, le diamètre du plus grand follicule (principalement

16-18 mm) est déterminé par des mesures échographiques. Il a été établi que le plus grand follicule est le celui le plus susceptible de rompre et que la rupture interviendra environ 38 h après l'injection de hCG (Andersen *et al.*, 1995; Martinez *et al.*, 1991).. Par conséquent, le moment le plus favorable au remplacement des spermatozoïdes dans la cavité utérine est environ 35 à 45 h après l'administration de hCG.

5.1.2 La fécondation *in vitro* avec ou sans micromanipulation des spermatozoïdes

D'autres techniques, plus invasives et coûteuses, du traitement de l'infertilité existent pour les couples présentant une hypofertilité masculine. Il s'agit de la FIV conventionnelle et de la FIV avec injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI, pour *intracytoplasmic sperm injection*). Les 2 méthodes utilisent l'hyperstimulation ovarienne contrôlée (COH), qui poursuit trois objectifs principaux: la suppression de l'activité hypophysaire, la stimulation de la croissance folliculaire multiple et l'induction de l'ovulation. La suppression de l'activité hypophysaire, par un agoniste ou un antagoniste de la GnRH, empêche l'ovulation prématurée et permet la collecte minutée d'ovocytes matures. L'hormone folliculo-stimulante (FSH, pour *follicle stimulating hormone*), parfois combinée avec la LH, est utilisée pour stimuler la croissance de follicules multiples. L'ovulation est induite par hCG ou par un agoniste de la GnRH et est indiquée lorsque plusieurs follicules de 16 mm ou plus sont présents à l'échographie. Le moment optimal pour l'induction de l'ovulation reste incertain, et d'autres études sont nécessaires pour explorer le moment le plus adéquat qui permet de récupérer un maximum d'ovocytes matures (Tarlatzis *et al.*, 2006; Mochtar *et al.*, 2011).

La récupération des ovocytes est effectuée environ 36 h après l'administration de hCG ou de l'agoniste de la GnRH. Au cours de la technique de FIV, les ovocytes récupérés et les spermatozoïdes préparés sont mis en contact dans du milieu de culture pour obtenir la fécondation. Au cours de la technique d'ICSI, un seul spermatozoïde sélectionné (de morphologie typique de préférence) est injecté directement dans le cytoplasme d'un ovocyte mature (figure 20). L'opération est répétée pour la totalité des ovocytes matures récupérés. Le but de l'ICSI est de surmonter une défaillance spermatique potentielle (anomalies de la mobilité, de la morphologie et/ou du processus de capacitation du spermatozoïde injecté, mais aussi des défaillances fonctionnelles et anatomiques des testicules, des épидидymes et des canaux déférents) et de faciliter l'activation de l'ovocyte afin d'initier la fécondation. Après fécondation, les ovocytes fécondés par l'une ou l'autre des 2 techniques sont mis en culture dans un milieu de croissance pendant 2 à 6 jours, et contrôlés au cours du développement

embryonnaire précoce. Sur la base de critères de qualités morphologiques et cinétiques, 1 ou 2 embryons sont transférés dans la cavité utérine et les embryons surnuméraires de bonne qualité sont cryoconservés. Une supplémentation de la phase lutéale avec de la progestérone ou de la hCG est nécessaire pour maintenir la stimulation de l'endomètre.



Figure 20 : Technique d'ICSI. Un ovocyte mature (M2) est maintenu en place par une pipette de contention (à gauche) pour l'injection d'un spermatozoïde à l'aide de la pipette d'injection (à droite).

Avec l'autorisation de l'Institut de Biologie de la Reproduction-Spermiologie-CECOS du CHRU de Lille.

CECOS : Centre d'Etude et de Conservation des œufs et du sperme ; *CHRU* : Centre Hospitalier Régional Universitaire ; *ICSI* : intracytoplasmic sperm injection ; *M2* : métaphase 2.

5.2 Etudes protéomiques différentielles chez des hommes infertiles et AMP

5.2.1 Protéines des spermatozoïdes de patients en AMP

Avant l'utilisation de la spectrométrie de masse, les études qui comparaient les changements potentiels de quantité de protéines spermatiques entre des patients et des témoins ont été en grande partie réalisées en utilisant (i) soit une technique de séparation électrophorétique associée à une détection par coloration en western blot, (ii) soit une technique par détection immunologique et quantification. Parmi les protéines du spermatozoïde humain les plus étudiées, on notera les protamines P1 et P2 (Chevaillier *et al.*, 1987; Belokopytova *et al.*, 1993; de Yebra *et al.*, 1998; Mengual *et al.*, 2003; Aoki, 2005; Torregrosa, 2006; Balhorn, 2007; Carrell *et al.*, 2007; de Mateo *et al.*, 2009). Le rapport normal entre la P1 et la P2 est d'environ 1. Des variations de ce ratio, que ce soit supérieures ou inférieures à 1, ont été notées chez de nombreux patients infertiles. De plus, plusieurs équipes ont également étudié le rapport des protamines chez des patients infertiles ayant bénéficié de traitements de FIV ou d'ICSI. Ces équipes ont montré l'existence d'une corrélation entre la présence d'une altération dans la teneur en protamine et le score de pénétration des spermatozoïdes, les taux de fécondation et les taux de grossesse (Khara *et al.*, 1997; Carrell & Liu, 2001; Aoki, 2005;

Aoki *et al.*, 2006a; de Mateo *et al.*, 2009; Castillo *et al.*, 2011; Simon *et al.*, 2011). La protéomique a également révélé que le contenu du noyau en protamines diffère entre les patients fertiles et infertiles, suggérant que les spermatozoïdes de ces derniers doivent avoir une diminution de l'intégrité de l'ADN nucléaire, avec un risque plus important de dommage oxydatifs (de Yebra *et al.*, 1993).

Dans l'une des premières études traitant de la protéomique spermatique dans l'AMP, les auteurs ont comparé le protéome des spermatozoïdes d'un patient en échec de FIV (indication masculine) aux protéomes spermatiques provenant de donneurs fertiles. Ayant combiné les techniques de 2DE avec digestion dans le gel et d'identification des peptides par MS, cette comparaison a abouti à l'identification de 4 protéines différentielles (Pixton, 2004). Dans une étude similaire, en augmentant la sensibilité technique par l'utilisation de la détection par fluorescence des protéines (2D-DIGE), 3 patients FIV ont été comparés à 3 témoins. Douze protéines différentielles ont été identifiées (Frapsauce *et al.*, 2009). De façon intéressante, 2 de ces protéines différentielles identifiées sont connues pour avoir un rôle dans l'interaction gamétique (Frapsauce *et al.*, 2014). Des échantillons de spermatozoïdes issus de patients normozoospermiques utilisés dans le cadre d'inséminations artificielles, avec des succès de reproduction divergeant, ont également été soumis à l'étude (Xu *et al.*, 2012). Les protéines identifiées représentent une petite fraction du protéome de sperme impliquant une contribution limitée à comprendre le potentiel du protéome en fonction des spermatozoïdes et le succès de la FIV.

Plus récemment, 2 études ont utilisé les techniques de l'étiquetage des peptides par Tandem Mass Tag™ (TMT, Life Technologies) et l'identification des protéines par LC-MS/MS pour comparer les protéomes spermatiques de patients normozoospermiques ayant recours à une FIV à des contrôles. Le but de ces 2 études était d'identifier des biomarqueurs potentiels de réussite en FIV (Azpiazu *et al.*, 2014). Dans la première étude, les protéines de spermatozoïdes issues de 6 hommes constituant le groupe « grossesse clinique en FIV » et de 6 hommes du groupe « pas de grossesse clinique en FIV » ont été identifiées et quantifiées (Zhu *et al.*, 2013). Cette première étude a permis de d'observer 21 protéines sur-exprimées (x1,2) chez les patients du groupe « grossesse clinique en FIV ». La seconde étude a conduit à la détection de 31 protéines présentes en faible quantité et de 35 en quantité plus élevée dans le groupe « sans grossesse », en comparaison du groupe « grossesse » (Azpiazu *et al.*, 2014). Les protéines différentielles mises en évidence sont impliquées dans l'assemblage de la chromatine et le métabolisme des lipoprotéines.

Tableau 2 : Les différentes études de protéomique comparative effectuées sur des spermatozoïdes issus de patients infertiles.D'après Codina *et al.*, 2015.

ADN : acide desoxyribonucléique; *FIV* : fécondation in vitro; *IAD* : insémination avec donneur; *IUI* : insemination intra-utérine; *LC* : liquid chromatography; *MALDI* : matrix assisted laser desorption/ionization; *MS* : mass spectrometry; *MS/MS* : tandem mass spectrometry; *ROS* : reactive oxygen species; *TOF* : time-of-flight. *ZP* : zone pellucide.

Auteurs (année)	Nombre et type d'échantillons / patients	Préparation du sperme	Approche protéomique	Nombre protéines identifiées	Conclusions principales
Pixton <i>et al.</i> (2004)	1 patient FIV, 3 contrôles fertiles	Gradient 2 couches 90 % et 45 %	LC-MS/MS et MALDI-TOF MS	4	Première comparaison de protéomes spermatiques de qualités différentes. Identification de 4 protéines différenciellement exprimées
Zhao <i>et al.</i> (2007)	8 asthénozoospermiques, 8 contrôles fertiles	Gradient 1 couche 60 %	MALDI-TOF MS	10	Identification de 10 protéines différenciellement exprimées
Martinez-Heredia <i>et al.</i> (2008)	20 asthénozoospermiques, 10 contrôles fertiles	Gradient 1 couche 50 %	MALDI-TOF MS	17	Identification de 17 protéines différenciellement exprimées
Chan <i>et al.</i> (2009)	20 asthénozoospermiques, 20 contrôles fertiles	Gradient 1 couche 50 %	MALDI-TOF MS	12	Identification de 12 protéines différenciellement phosphorylées
Frapsauce <i>et al.</i> (2009)	3 patients FIV, 3 contrôles fertiles	Gradient 2 couches 90 % et 45 %	LC-MS/MS et MALDI-TOF MS	12	Identification de 12 protéines différenciellement exprimées
Liao <i>et al.</i> (2009)	1 globozoospermique (20 éjaculats), 12 donneurs fertiles	Gradient 1 couche 75 %	MALDI-TOF/TOF	35	Identification de 35 protéines différenciellement exprimées dans les spermatozoïdes à têtes rondes par rapport au sperme normal

Secciani et al. (2009)	120 normozoospermiques	Lavage ou swim-up, conditions capacitantes	MALDI-TOF MS et MS/MS	58	Identification de 29 protéines différemment exprimées entre les spermatozoïdes migrés et capacités, les spermatozoïdes capacités et les spermatozoïdes du sperme entier
Kriegel et al. (2009)	5 normozoospermiques, 2 diabétiques type 1, 2 obèses non-diabétiques	Gradient 2 couches 90 % et 50 %	MALDI-TOF/TOF	16	Identification respectivement de 7 et 9 protéines associées au diabète de type 1 et à l'obésité
Siva et al. (2010)	17 asthénozoospermiques, 20 normozoospermiques	Gradient 2 couches 70 % et 30 %	MALDI-MS/MS	75	Identification de 7 protéines présentes en quantités différentes
Thacker et al. (2011)	3 oligo-asthénozoospermiques, 1 donneur fertile	Non précisé	MALDI-TOF/TOF MS et LC-MS	4	Identification de 4 protéines présentes en quantités différentes
Paasch et al. (2011)	8 diabétiques type 1, 7 diabétiques type 2, 13 obèses non-diabétiques 21 normozoospermiques et en bonne santé	Gradient 2 couches 90 % et 50 %	MALDI-TOF/TOF MS et LC-MS/MS	42	Identification de 12 (diabétiques type 1), 71 (diabétiques type 2) et 13 (obèses non-diabétiques) protéines présentes en quantités différentes. Les composants du complexe protéique de l'Eppin sont augmentés dans les spermatozoïdes des 3 groupes de patients
Xu et al. (2012)	IIU : 10 normozoospermiques infertiles, 10 fertiles en bonne santé	Swim-up	MALDI-TOF MS	24	Identification de 24 protéines présentes en quantités différentes
Parte et al. (2012)	4 asthénozoospermiques sévères, 4 normozoospermiques	Lavage	LC-MS	66	Identification de 66 phosphoprotéines différemment régulées

Redgrove et al. (2012)	3 normozoospermiques avec une capacité réduite à se lier à la ZP, 3 donneurs fertiles normozoospermiques	Gradient 2 couches 90 % et 45 %	LC-MS/MS	7	Identification de 7 protéines présentes en quantités différentes dans des spermatozoïdes incapables de se lier à la ZP
Hamada et al. (2013)	31 ROS+ 21 ROS-	Lavage	LC-MS	37	Identification de 31 spots protéiques présents en quantité différentes (25 augmentés et 6 diminués)
Shen et al. (2013)	30 donneurs, 30 asthénozoospermiques	Gradient 1 couche 60 %	MALDI-TOF/TOF MS	15	Identification de 15 protéines présentes en quantités différentes
Behrouzi et al. (2013)	24 normozoospermiques, 34 sperme anormaux et/ou avec un taux d'ADN fragmenté élevé	Lavage	LC-MS/MS	55	Identification de 4 groupes de protéines corrélés avec la fragmentation de l'ADN et/ou la mobilité
Kichine et al. (2013)	3 patients avec une numération élevée	Lavage, sonication	LC-MS/MS	686	Variations interindividuelles significatives entre les profils protéiques de la tête des spermatozoïdes
Sharma et al. (2013)	31 ROS+ 21 ROS-	Lavage	LC-MS/MS	74	Identification de 15 protéines présentes en quantités différentes (10 augmentées et 5 diminuées)
Intasqui et al. (2013)	Normozoospermiques : 18 avec un taux d'ADN fragmenté faible et 18 avec un taux élevé	Gradient 2 couches 90 % et 45 %	LC-MS/MS	257	Identification de 71 (taux faible d'ADN fragmenté) et 23 (taux élevé d'ADN fragmenté) protéines présentes en quantités différentes
Zhu et al. (2013)	Normozoospermiques en FIV or IAD: 6 « grossesses » 6 « pas de grossesse »	Gradient 2 couches 90 % et 45 %	LC-MS/MS	2045	Identification de 21 protéines présentes en quantités différentes

Azpiazu et al. (2014)	Normozoospermiques en FIV : 16 « grossesses » 15 « pas de grossesse »	Gradient 2 couches 80 % et 40 %	LC-MS/MS	1717, 137 nouvelles	Identification de 64 protéines présentes en quantités différentes
Wang et al. (2014)	Congelés-décongelés vs sperme frais de 9 normozoospermiques	Gradient 1 couche 60 %	MALDI-TOF MS	27	Identification de 27 protéines présentes en quantités différentes
Pilatz et al. (2014)	8 épидидymaires, 10 fertiles en bonne santé	Swim-up	MALDI-TOF MS/MS	35	Identification de 35 protéines présentes en quantités différentes
Frapsauce et al. (2014)	FIV : 3 normozoospermiques infertiles, 3 contrôles fertiles	Gradient 2 couches 90 % et 45 %	MALDI-TOF MS or LC-MS/MS	12	Identification de 12 protéines présentes en quantités différentes
McReynolds et al. (2014)	12 normozoospermiques avec un bon (n=6) ou un mauvais (n=6) développement jusqu'au stade blastocyste	Gradient 1 couche 60 % puis swim-up	LC-MS/MS	49	Identification de 49 protéines présentes en quantités différentes dans les spermatozoïdes donnant lieu à un mauvais développement embryonnaire
Liu et al. (2014)	Asthénozoospermie associée à l'obésité et hommes en bonne santé	Gradient 1 couche 45 %	LC-MS/MS	1975	Identification de 127 protéines présentes en quantités différentes
Amaral et al. (2014)	Normozoospermiques vs athénozoospermiques ; sperme migré vs non-migré	Gradient 2 couches 80 % et 40 % ou swim-up	LC-MS/MS	1157 et 887	Altérations protéomiques équivalentes détectées dans les échantillons asthénozoospermiques et non-migrés

5.2.2 Protéines du spermatozoïde, gradient de densité et cryoconservation

D'autres travaux de protéomique différentielle ont porté sur l'analyse de spermatozoïdes préparés par les techniques couramment utilisées en AMP. Secciani et collaborateurs ont comparé le protéome de spermatozoïdes éjaculés d'individus normozoospermiques avec celui de spermatozoïdes capacités et de spermatozoïdes capacités après swim-up (Secciani *et al.*,

2009). Récemment, toujours à partir d'échantillons d'individus normozoospermiques, le profil protéique de spermatozoïdes congelés-décongelés a été comparé à celui d'échantillons frais (Wang *et al.*, 2014). Il a été suggéré que le dysfonctionnement des spermatozoïdes après cryoconservation pourrait être dû à la dégradation et la phosphorylation de protéines impliquées dans des fonctions essentielles à la fécondation telles que la mobilité, la viabilité, l'intégrité et la réaction de l'acrosome, la capacitation, le potentiel de membrane et la concentration de calcium intracellulaire. McReynolds et collaborateurs sont allés plus loin dans le processus des techniques d'AMP et ont étudié le protéome du spermatozoïde et sa relation avec le développement du blastocyste et le succès de la reproduction (McReynolds *et al.*, 2014).

5.2.3 Protéines du spermatozoïde et asthénozoospermie

D'autres études ont été réalisées dans le but d'identifier des altérations du protéome spermatique chez des patients présentant des anomalies au spermogramme-spermocytogramme. Cependant, la disponibilité d'une quantité minimale de protéines extraites est nécessaire pour permettre la réalisation d'une analyse protéomique des spermatozoïdes. L'altération spermatique qui a été la plus largement étudiée est l'asthénozoospermie. En effet, en plus de l'importance biologique d'identifier les protéines impliquées dans la mobilité, il est relativement aisé d'extraire une quantité suffisante de protéines spermatiques issues d'individus ne présentant que cette altération. À l'inverse, dans le cas d'échantillons oligozoospermiques, il est plus difficile d'obtenir des échantillons très purs et d'extraire suffisamment de protéines pour une analyse protéomique.

Une première étude visant à comparer le profil protéomique de huit patients asthénozoospermiques et de huit donneurs fertiles normozoospermiques a utilisé la technique de 2DE et MALDI-TOF (*time-of-flight*) (Zhao *et al.*, 2007). Les auteurs ont identifié 10 protéines exprimées en quantités différentes entre les 2 groupes de patients. Avec une approche similaire, Martinez-Heredia et collaborateurs ont identifié 7 protéines sur-exprimées et 10 sous-exprimées chez un plus grand nombre d'individus asthénozoospermiques (Martinez-Heredia *et al.*, 2008). Une troisième étude a caractérisé 7 protéines supplémentaires présentant des différences entre les 2 groupes (Siva *et al.*, 2010). Pour compléter ces premiers travaux, Amaral et collaborateurs ont récemment effectué 2 comparaisons indépendantes à haut-débit du protéome spermatique selon différentes mobilités : (i) échantillons asthénozoospermiques versus normozoospermiques et (ii) échantillons normozoospermiques

ayant eu une migration de type swim-up versus sans migration (Amaral *et al.*, 2014b). Sans surprise, des modifications protéomiques équivalentes affectant les protéines impliquées dans la mobilité des spermatozoïdes et dans la régulation de celle-ci ont été détectées dans les 2 groupes. Similairement, l'analyse d'échantillons spermatiques asthénozoospermiques associés à l'obésité a rapporté des altérations d'expression de protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette, la biogenèse vésiculaire, le métabolisme et la dégradation des protéines impliquées dans la spermiogenèse, et la mobilité des spermatozoïdes (Zhao *et al.*, 2007; Kriegel *et al.*, 2009; Paasch *et al.*, 2011).

Fait intéressant, une autre étude comparative entre le protéome spermatique du phénotype asthénozoospermie avec son transcriptome a révélé que l'effet sur la mobilité des spermatozoïdes n'est pas totalement en accord à des niveaux moléculaires différents (Shen *et al.*, 2013). Ce résultat met en évidence que des modifications post-traductionnelles, comme la N-glycosylation, peuvent jouer un rôle important dans la mobilité des spermatozoïdes. La phosphorylation est également une modification post-traductionnelle importante capable de réguler la mobilité des spermatozoïdes et qui a fait l'objet d'études protéomiques différentielles. Au départ, l'étude du phosphoprotéome spermatique a été réalisée par une approche 2DE et a abouti à l'identification de 10 protéines hyposphosphorylées dans les spermatozoïdes d'individus asthénozoospermiques. Ces premiers résultats ont permis d'attester du rôle crucial de cette modification post-traductionnelle dans la mobilité des spermatozoïdes (Chan *et al.*, 2009). Plus tard, l'utilisation de l'approche par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC pour *immobilized metal affinity chromatography*) pour un enrichissement en phosphoprotéines et leur analyse par LC-MS/MS a également révélé la présence d'une signature protéomique altérée dans les asthénozoospermies (Parte *et al.*, 2012).

En faisant le bilan de toutes les études protéomiques différentielles qui ont analysé les échantillons de spermatozoïdes d'individus asthénozoospermiques, nous pouvons noter qu'une grande partie des protéines en lien avec cette altération sont reliées au cytosquelette ou sont des enzymes ayant un rôle dans le métabolisme et la production d'énergie (Amaral *et al.*, 2014a).

5.2.4 Protéines du spermatozoïde et globozoospermie

D'autres études ont porté sur la recherche d'altérations protéomiques telles que la globozoospermie et oligoasthénozoospermie. Le protéome des spermatozoïdes à tête ronde

met en évidence que 35 protéines étaient présentes en quantités différentes, 9 sur-exprimées et 26 sous-exprimées, par rapport aux spermatozoïdes d'individus fertiles (Liao *et al.*, 2009). Ces protéines différenciellement exprimées seraient impliquées dans des processus cellulaires et dans des structures variées, notamment la spermatogenèse, le squelette de la cellule, le métabolisme et la mobilité des spermatozoïdes. Des résultats similaires ont été observés dans les spermatozoïdes de patients oligoasthénozoospermiques, présentant un protéome modifié (Thacker *et al.*, 2011). De plus, une étude de l'équipe d'Amaral et collaborateurs a détecté une incidence significativement plus élevée d'hétérozygotie des répétitions du motif CAG, une quantité plus importante d'ADN mitochondrial, et un pourcentage plus faible de spermatozoïdes exprimant la POLG et le TFAM (pour *mitochondrial transcription factor A*) dans les spermatozoïdes du groupe oligoasthénozoospermiques (Amaral *et al.*, 2007).

5.2.5 Protéines du spermatozoïde, espèces réactives de l'oxygène et ADN

Les formes variées de la morphologie des spermatozoïdes les rendent particulièrement sensibles au stress oxydatif (Codina *et al.*, 2015). Cette sensibilité s'explique en raison du nombre élevé de mitochondries générant des ROS, par la quantité limitée d'antioxydants cytoplasmiques et par le contenu lipidique de la membrane plasmique sensible à la peroxydation lipidique. Les ROS induisent des dommages de l'ADN et des protéines. La peroxydation lipidique et l'apoptose sont une des causes majeures de déficience des fonctions spermatiques (Aitken *et al.*, 2014). Par conséquent, établir la façon dont les ROS affectent le protéome des spermatozoïdes présente un intérêt réel (Hamada *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2013). Par exemple, dans l'étude de Sharma et collaborateurs, 10 protéines ont été notées comme étant sur-exprimées et 5 sous-exprimées chez des patients avec un taux élevé de ROS, suggérant ainsi que ces protéines jouent un rôle important dans la gestion du stress oxydatif.

Similairement, les dommages causés à l'ADN spermatique ont un effet délétère sur le fonctionnement normal du spermatozoïde et la quantification de ces atteintes est utilisée comme un marqueur important de la qualité spermatique. Par conséquent, certaines études se sont intéressées à l'analyse de l'impact des dommages de l'ADN spermatique sur le protéome du spermatozoïde (Behrouzi *et al.*, 2013; Intasqui *et al.*, 2013). Une enquête préliminaire a conduit à l'identification des 4 groupes principaux de protéines ayant une corrélation significative avec la fragmentation anormale de l'ADN et/ou la mobilité. Le premier groupe comprenait des protéines nucléaires telles que des isoformes du gène *spanx* et plusieurs types d'histones (Behrouzi *et al.*, 2013). Le deuxième groupe contenait des protéines de fonctions

mitochondriales et des protéines de stress oxydatif, y compris la ferritine mitochondriale, la SSBP (pour *single-stranded DNA-binding protein*), et plusieurs isoformes de peroxyrédoxines. Les 2 autres groupes de protéines sont liés à la mobilité des spermatozoïdes tels que des protéines de la structure microtubulaire du flagelle ou des protéines liées à la voie ubiquitine-protéasome. Instasqui et collaborateurs (Instasqui *et al.*, 2013) ont quant à eux identifié 71 protéines exclusives ou sur-exprimées chez les patients ayant un taux faible d'ADN fragmenté, et 23 protéines exclusives ou sur-exprimées exclusivement chez les patients ayant un taux élevé d'ADN fragmenté.

5.2.6 Protéines du spermatozoïde et varicocèle

Dans une étude protéomique assez récente et novatrice, des auteurs se sont intéressés aux profils protéiques différentiels chez des hommes avec et sans varicocèle à l'aide de la 2DE (Hosseinfar *et al.*, 2013). Quinze différences dans l'expression des protéines ont été identifiées sur les gels du groupe varicocèle par rapport au groupe témoin (1 spot manquant; 12 spots moins abondants, et 2 spots plus abondants). Les protéines HSP, les protéines mitochondriales et les protéines du cytosquelette sont les principales protéines affectées par la présence d'une varicocèle. En particulier, une sur-expression significative de HSP70 et HSP90 a été observée chez les patients atteints de varicocèle, résultat validé par la suite par immunoempreinte et immunocytochimie (Chan *et al.*, 2013). La même année, Zylbersztejn et collaborateurs ont observé que des protéines de régulation de l'apoptose étaient sur-exprimées dans les échantillons de sperme d'adolescents présentant une varicocèle et des altérations de la qualité spermatique (Zylbersztejn *et al.*, 2013). Par contre, dans les échantillons de sperme d'adolescents présentant une varicocèle mais sans altération de la qualité spermatique, ce sont des protéines de la spermatogenèse qui étaient sur-exprimées.

5.2.7 Protéines du spermatozoïde, diabète et maladies métaboliques

Les maladies métaboliques telles que le diabète ou l'obésité ont un effet néfaste sur le sperme, mais l'effet négatif sur la fertilité masculine est encore mal compris au niveau moléculaire. Deux études réalisées par le même groupe de chercheurs ont eu pour but de caractériser les altérations du profil protéique des spermatozoïdes provenant d'individus diabétiques et obèses (Kriegel *et al.*, 2009; Paasch *et al.*, 2011).

5.2.8 Conclusion

Il est cependant important de noter que certaines protéines ont été identifiées dans plusieurs études indépendantes traitant de protéomique différentielle, mais les résultats d'une étude à l'autre étaient parfois contradictoires. L'une des raisons de cette contradiction pourrait être la présence des modifications post-traductionnelles, avec des variants différents de la protéine détectée dans chacune des études. Une autre raison possible pour certains résultats contradictoires pourrait être les variations intra- et inter-individuelles présentes dans le protéome spermatique. Les résultats d'une analyse du protéome de la tête des spermatozoïdes suggèrent d'ailleurs qu'il existe une variation inter-individuelle importante dans les profils protéiques (Kichine *et al.*, 2013). Cependant, certaines protéines ont montré à l'inverse des niveaux d'expression constants, attestant de leur rôle essentiel au cours de la spermatogenèse.

Pour conclure, en dépit de la publication de nombreuses études comparatives et fonctionnelles sur la protéomique du spermatozoïde, fournissant des biomarqueurs putatifs pour la fertilité masculine, certains points demeurent obscurs. L'utilisation de techniques à débit très important, couplées à différentes options pour la protéomique différentielle devrait, à court ou moyen terme, éclaircir nombre de ces points afin de mieux comprendre le fonctionnement moléculaire du spermatozoïde.

6 LES OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Les avancées technologiques dans le domaine de la protéomique permettent aujourd'hui d'étudier le protéome du spermatozoïde et ses compartiments cellulaires de façon hautement résolutive. Un précédent travail de notre équipe sur l'étude du protéome spermatique global à l'échelle individuelle chez des hommes (n=161) venant effectuer un spermogramme dans le Centre d'AMP du Centre Hospitalier Régional Universitaire (CHRU) de Lille a permis de définir 2 groupes distincts de profils protéiques. Un groupe présentant une répartition homogène des protéines et un groupe pour lequel il a été observé une diminution des protéines de poids moléculaires supérieurs à 50 kDa au profit des protéines de bas poids moléculaires. Un index de qualité du protéome a été mis au point, le SPQI (pour Sperm Proteome Quality Index).

L'analyse en spectrométrie de masse a permis d'identifier les protéines de hauts poids moléculaires majoritaires protéolysées. Il s'agit principalement de la protéine AKAP4, protéine connue pour être localisée dans la gaine fibreuse du spermatozoïde et impliquée dans la mobilité spermatique.

Par ailleurs, la mise en évidence dans le protéome spermatique global de cette protéine en lien avec la mobilité, et la collaboration de notre travail de Thèse avec l'équipe « Alzheimer et Tauopathies » de l'UMR-S 1172, nous a permis d'élargir et d'enrichir le travail de recherche initialement prévu. Nous nous sommes donc intéressés à la protéine Tau. En effet, la protéine Tau fait partie de la famille des MAPs et joue un rôle dans la polymérisation de ces derniers. La protéine Tau est naturellement présente dans les neurones humains. Cependant, une localisation testiculaire, particulièrement dans la manchette des spermatozoïdes, a été démontrée. Au départ de ce travail, il n'y avait dans la littérature que très peu d'études traitant de l'expression de la protéine Tau dans les testicules ou les spermatozoïdes, et aucune chez l'homme. La première partie de ce travail de Thèse s'est focalisée sur l'étude de la protéine Tau dans le testicule et le spermatozoïde : cela correspond à l'**objectif 1**. La deuxième partie de ce travail a été réalisée dans le but de poursuivre le travail initial de notre équipe sur le protéome global spermatique et la protéine majoritairement protéolysée associée (AKAP4) ; cela correspond aux **objectifs 2 et 3**.

Ce travail est découpé en 3 objectifs :

- **Objectif 1 : Analyse de l'expression de la protéine Tau dans le testicule et le spermatozoïde humain.**

Dans une **première partie** de ce travail de Thèse nous avons analysé l'expression de la protéine Tau dans les spermatozoïdes et le testicule humain par une approche immunohistochimique (IHC). Nous avons cherché à savoir si cette protéine est présente à tous les stades de la spermatogenèse jusqu'au stade de spermatozoïde mature. Cela a permis notamment de localiser la protéine Tau associée aux microtubules dans le testicule et le spermatozoïde humain. Ce travail correspond à l'**article 1**. Suite à cette première publication, nous avons rédigé une revue de la littérature sur la protéine Tau testiculaire et spermatique. Ce travail correspond à l'**article 2**.

- **Objectif 2 : Quantifier le profil d'expression de l'AKAP4 en Western Blot et obtenir une donnée semi-quantitative dans le spermatozoïde humain.**

Dans un **premier temps de cette deuxième partie**, nous avons évalué le profil d'expression de l'AKAP4 en Western Blot afin d'obtenir une donnée semi-quantitative de cette protéine. Ce travail nous a permis d'enrichir la base de données et de réaliser une analyse par classification hiérarchique et un dendrogramme aux différentes bandes de l'AKAP4 et aux paramètres spermatiques. Ce travail correspond à l'**article 3 en soumission**.

- **Objectif 3 : Evaluer le protéome global et la protéine AKAP4 comme biomarqueur(s) prédictif(s) de succès en AMP.**

Dans un **deuxième temps de cette deuxième partie**, nous avons colligé les données spermatiques et clinico-biologiques des différentes tentatives d'AMP réalisées par la totalité des patients de notre échantillonnage (n = 253) à l'Institut de Biologie de la Reproduction-Spermiologie-CECOS de Lille. Ont été inclus dans cette base de données les résultats de tentatives d'IIU, de FIV et d'ICSI. La base de données a été constituée en utilisant le logiciel INFOFIV, utilisé conjointement par l'équipe clinico-biologique d'AMP du CHRU de Lille. Nous nous sommes ensuite servis de cette base exhaustive pour évaluer le potentiel du protéome global via le SPQI d'une part et de la protéine AKAP4 d'autre part, comme biomarqueur(s) prédictif(s) d'un succès lors d'une prise en charge en AMP. Ce travail correspond à l'**article 4 en préparation**.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

OBJECTIF 1 : Analyse de l'expression de la protéine Tau dans le testicule et le spermatozoïde humain.

Prélèvement de matériel biologique

Les échantillons testiculaires provenaient d'hommes pour lesquels une biopsie a été réalisée lors d'une prise en charge thérapeutique en AMP au CHRU de Lille. Ils ont été congelés dans la carboglace sur le site de prélèvement puis stockés à -80°C au centre des ressources biologiques (CRB) du CHRU. Le chirurgien andrologue a recueilli le consentement de chaque patient préalablement au prélèvement et à la conservation de ces tissus. L'attribution de prélèvement de testicule humain dans le cadre de notre travail de Thèse a fait l'objet d'une demande spécifique auprès du CRB.

Les échantillons de spermatozoïdes utilisés dans l'ensemble des études de cette Thèse proviennent de reliquats de sperme frais éjaculé, dans le cadre d'un bilan d'infertilité au laboratoire de Spermiologie du CHRU de Lille. Concernant ce premier objectif, le sperme recueilli a fait l'objet d'un protocole spécifique. Après une liquéfaction du sperme pendant 30 min à 37°C, un gradient de densité monocouche a été réalisé (50 % Puresperm, Nicadon ; 50 % Ferticult, Fertipro) afin de séparer les spermatozoïdes à la fois du plasma séminal et des autres cellules du sperme telles que les cellules rondes. La préparation a été centrifugée à 1400 g pendant 20 min à température ambiante. Le culot a été repris dans 1 mL de Tampon Tris Salin pH 7,4 (TBS 1X, pour *tris buffer saline*) et centrifugé à 1400 g pendant 10 min à température ambiante. Le culot a été suspendu dans 100 µL de TBS 1X avant d'être fixé pour une utilisation en immunohistochimie.

Analyses morpho-histologiques

Le travail a porté sur 2 échantillons différents qui n'ont pas été traités selon le même protocole : tissus testiculaires humains et spermatozoïdes éjaculés humains.

Tissu testiculaire humain

Les tissus ont été fixés dans le liquide de Bouin puis inclus en paraffine. Ils ont ensuite été découpés en sections d'une épaisseur de 6 µm à l'aide d'un microtome, puis déposés sur des lames superfrost et séchés une nuit.

Un déparaffinage préalable à la technique d'immunohistochimie a été réalisé en passant successivement les lames dans des bains de Toluène, d'alcool 95°, d'alcool iodé, d'alcool 70°, avant un rinçage à l'eau puis au TBS. Un démasquage antigénique par la chaleur dans un tampon citrate pH 6,0 puis un blocage des sites non spécifiques par incubation avec du sérum de chèvre (Vector[®], dilution au 1/100^{ème} dans du PBS 1X, pour *phosphate buffered saline*) ont été effectués. Concernant l'immunomarquage, plusieurs anticorps ciblant des zones différentes de la protéine Tau ont été utilisés. Les coupes de tissu testiculaire ont été marquées par (i) des anticorps monoclonaux comme l'anti-Tau5 (UMR-S 1172), l'anti-HT7 (Millipore) et l'anti-RD3 (Millipore) et par (ii) des anticorps polyclonaux comme l'anti-Cter1902 (UMR-S 1172). Le choix des anticorps utilisé dans cette étude a été fait en tenant compte des connaissances sur la structure de la protéine et des transcrits de Tau. En effet, le transcrit de Tau est soumis à un épissage alternatif principalement des exons 2, 3 et 10, donnant lieu à 6 isoformes distinctes de la protéine Tau. De plus, la phosphorylation représente la modification post-traductionnelle principale de la protéine Tau. Les 4 anticorps sont phospho-indépendants (le marquage ne dépend pas de l'état de phosphorylation de la protéine) et aucun ne cible les exons 2, 3 ou 10 soumis à l'épissage alternatif. La zone ciblée par chacun de ces 4 anticorps est représentée sur la figure 21.

Les antigènes d'intérêts ont systématiquement été révélés par 2 techniques différentes. Une première révélation en fluorescence a été faite à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (ALEXA fluor 488, Invitrogen, avec du DAPI, pour *4',6-diamidino-2-phénylindole*). La seconde révélation a été faite à l'aide d'un système biotine-streptavidine peroxydase et diaminobenzidine (DAB).

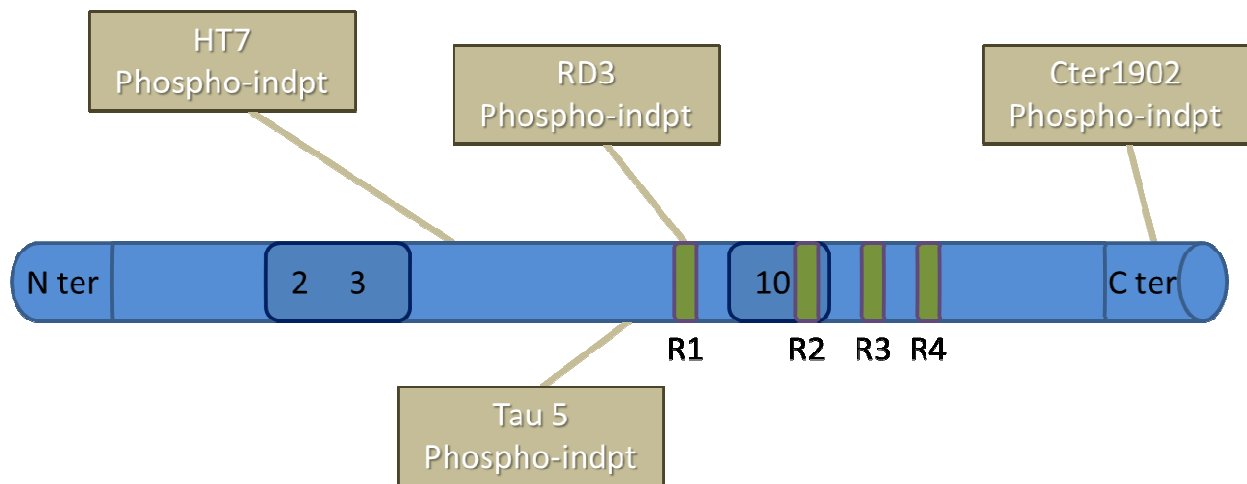


Figure 21 : Localisation des zones de la protéine Tau ciblées par différents anticorps. L'anticorps anti-HT7 se fixe en aval de l'exon 3 (épitope : acides aminés 159-163). L'anti-Tau5 se fixe en amont de la première séquence de répétition R1 (épitope : acides aminés 210-241) tandis que la zone de fixation de l'anti-RD3 est située directement sur cette séquence (épitope : acides aminés 209-224). L'anti-Cter1902 cible la partie C-terminale de la protéine Tau.

Les zones vertes correspondent aux séquences répétées de 18 acides aminés appelées R1 R2 R3 et R4. Les zones délimitées en bleu foncé correspondent à la localisation des exons 2, 3 et 10 soumis à épissage alternatif.

Cter : C-terminal; Indpt = indépendant ; Nter : N-terminal; R : séquences répétées.

Les lames à révélation par fluorescence ont été observées au microscope confocal inversé Zeiss LSM 710. Les lames à révélation par peroxydase ont été analysées au microscope conventionnel droit Axioplan Zeiss. Lors de ces observations, une attention particulière a également été portée sur la présence de chaque type cellulaire au sein des tubes séminifères. La distinction des cellules germinales comprenait (i) les spermatogonies (situées contre la gaine péritybulaire et à noyau condensé et nucléolé), (ii) les spermatocytes (gros noyaux dont la chromatine est sous forme d'amas grossiers, ou sous forme de fins filaments), (iii) les spermatides rondes (petit noyau dense) et (iv) la spermatide en allongement ou allongée (noyau présentant une forme allongée avec une chromatine fortement condensée).

Spermatozoïdes éjaculés humains

Les spermatozoïdes prélevés après gradient monocouche (50 % Puresperm, Nicadon ; 50 % Ferticult, Fertipro) ont été placés dans du paraformaldéhyde à 2 % en TBS pour être fixés. Après des temps d'incubation et de centrifugation, 1 goutte de suspension spermatique dans du TBS a été déposée sur lame superfrost, séchée à l'air libre puis stockée à 4°C. Les lames

ont ensuite été mises dans l'acétone puis au contact des anticorps. Similairement à l'immunomarquage du tissu testiculaire, différents anticorps mono- et polyclonaux ont été utilisés. Les frottis de spermatozoïdes ont été marqués par (i) l'anti-HT7 (Millipore), (ii) l'anti-RD3 (Millipore) et par (iii) l'anti-Cter1902 (UMR-S 1172). La zone ciblée par chacun de ces 3 anticorps est représentée sur la figure 21. Après une étape de déshydratation des lames dans des bains successifs d'alcool 70°, alcool 95° et alcool absolu, les lames ont été montées avec un milieu contenant du glycérol et du DAPI (DAPI II Counterstain, Abbott). L'observation des lames a été réalisée au microscope confocal inversé Zeiss LSM 710. Pour chaque lame, l'analyse du marquage par les anticorps a porté sur un minimum de 100 spermatozoïdes.

Revue de la littérature

Recherche bibliographique

Une recherche informatique exhaustive de la littérature a été réalisée pour identifier les articles traitant de la protéine Tau dans le spermatozoïde et le testicule humain. La recherche d'articles scientifiques de langue anglophone a été effectuée sur la base internationale de références d'articles biomédicaux Pubmed. La recherche a pris en considération toutes les publications de janvier 1975 (année de découverte de la protéine Tau) à septembre 2014 en utilisant les mots-clés suivants: sperm, tau protein, testis, epididymis, microtubules, human, spermatogenesis, spermiogenesis, manchette. Les listes de références des études incluses et des articles ont été extraites manuellement.

Sélection des études scientifiques.

Dans un premier temps, tous les résumés des articles potentiellement éligibles ont été lus afin de sélectionner les articles d'intérêts. Une lecture attentive des articles sélectionnés a ensuite été faite afin de déterminer la pertinence de leur inclusion dans cette revue de la littérature.

Rédaction de la revue

Au niveau neuronal, la littérature traitant de la protéine Tau est très riche. Cependant, de plus en plus de chercheurs s'intéressent à la protéine Tau non-neuronale et l'on observe un regain

d'intérêt récent concernant la protéine Tau dans d'autres tissus. Dans cette revue, nous avons souhaité présenter une vue d'ensemble de l'expression et de l'implication de la protéine et des ARN messagers Tau dans le testicule et le spermatozoïde. Il nous a semblé intéressant de réaliser une synthèse des connaissances actuelles de la protéine Tau non-neuronale ciblée aux niveaux testiculaire et spermatique.

OBJECTIFS 2 et 3: Evaluer le profil d'expression de l'AKAP4 en Western Blot et obtenir une donnée semi-quantitative dans le sperme humain. Evaluer le protéome global et la protéine AKAP4 comme biomarqueur(s) prédictif(s) de succès en AMP.

Pour une meilleure compréhension, la méthodologie générale des objectifs 2 et 3 a été schématisée sous forme simplifiée sur la figure 22 et décrite de manière plus exhaustive ci-dessous.

Prélèvement de matériel biologique et extraction des protéines

Les échantillons proviennent de reliquats de sperme frais éjaculé, dans le cadre d'un bilan d'infertilité au laboratoire de Spermiologie de l'Institut de Biologie de la Reproduction-Spermiologie-CECOS du CHRU de Lille. Les paramètres spermatiques (volume, numération, mobilité, vitalité) ont été analysés selon les critères de l'OMS (World Health Organization, 2010). L'évaluation de la morphologie spermatique a été réalisée selon la classification de David modifiée (Auger & Eustache, 2000).

Le protocole d'échantillonnage et d'extraction des protéines a été mis au point au cours du travail précédent par notre équipe. D'autres protocoles ont été testés au cours de ce travail, notamment en utilisant un tampon de lyse commercial comme le RIPA (Thermo Scientific, Etats-Unis) afin de standardiser la méthode. Cependant, la protéine d'intérêt est peu solubilisée dans ce tampon. L'utilisation du SDS est essentielle pour étudier l'AKAP4. Les résultats présentés dans cette Thèse ont été réalisés à partir du protocole original. Après liquéfaction du sperme (30 min à 37°C), les spermatozoïdes contenus dans le reliquat de sperme non utilisé pour le soin ont été séparés du plasma séminal et des cellules rondes par un gradient de densité monocouche (50 % Puresperm/50 % Fercult) et une centrifugation de 20 min à 350 g, à température ambiante. Le culot spermatique a été isolé et repris pour un lavage dans un tampon TBS. Après centrifugation (20 min à 350 g, température ambiante), les spermatozoïdes ont été remis en suspension dans 1 mL de TBS puis centrifugés 10 min à 350 g. Les spermatozoïdes ont été repris dans un tampon de lyse (20 mM Tris, 2 % SDS, 1 % Nucléase) puis transporté sans délai dans la glace à l'UMR-S 1172 et congelés à -80°C. Après la sélection des spermatozoïdes par gradient de densité, aucune cellule épithéliale ou ronde

n'a été détectée lors de l'évaluation microscopique du frottis coloré. Ces étapes correspondent à la partie « échantillonnage » de la figure 22.

Après décongélation, la lyse des spermatozoïdes a été réalisée sur glace à 40 Hz jusqu'à homogénéisation de l'échantillon. Le lysat a ensuite été centrifugé à 14000 g pendant 20 min à 4°C. Le surnageant, qui contient les protéines extraites, a été conservé à -80°C. Le contrôle de la qualité des protéines et l'analyse du protéome spermatique ont été effectués au laboratoire de recherche de l'UMR-S 1172. Les échantillons ont été conservés à -80°C sur site.

Réalisation du profil du protéome global des spermatozoïdes

Après la quantification des protéines (dosage de Bradford) des échantillons, le contrôle de la qualité des protéines spermatiques et du profil du protéome global a été réalisé par gel polyacrylamide 1D SDS-PAGE (pour *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) puis coloration au bleu de Coomassie ou à l'argent. Quinze microgrammes de protéines de chaque échantillon ont été individuellement repris dans un tampon LDS 2X (pour *lithium dodecyl sulfate*) (LDS Buffer, Agent Réducteur). La migration SDS-PAGE a été réalisée en condition dénaturante. Cette technique a permis d'apprécier le profil protéique global. Les échantillons spermatiques ne permettant pas l'utilisation de 15 µg de protéines ont été exclus à ce niveau de l'étude.

Calcul d'un index de qualité du protéome global

Suite à l'obtention du profil du protéome global spermatique, un index mathématique a été calculé, le SPQI. Les bandes majoritaires des hauts (80-110 kDa) et bas (15-30 kDa) poids moléculaires ont été utilisées pour définir 2 fenêtres d'analyse sur le gel (figure 23.A). Ces 2 fenêtres ont été définies de façon reproductible à l'aide des marqueurs de poids moléculaire utilisés systématiquement pour étalonner les gels. Chaque bande visualisée sur le gel a été définie comme un pic par le logiciel (figure 23.B). Pour chaque fenêtre, l'aire sous la courbe a été calculée (figure 23.C). L'intensité des bandes contenues dans ces 2 fenêtres a été quantifiée au moyen d'un logiciel (ImageJ). Un ratio a ensuite été calculé (bas poids moléculaires/hauts poids moléculaires) (figure 23.D) et reflète la qualité du profil protéique.

À partir de ce ratio, il a été défini le SPQI. Le SPQI de type A (ratio compris entre 1 et 2) reflète une répartition homogène des protéines, correspondant à un profil de protéome « non-protéolysé ». Le SPQI de type B (ratio inférieur à 1 ou supérieur à 2) montre une protéolyse partielle des protéines de haut poids moléculaire et correspond à un profil de protéome "protéolysé".

Profil d'expression et quantification de la protéine AKAP4

Le profil de l'expression de la protéine AKAP4 a été réalisé par Western Blot. Quinze microgrammes de protéines de chaque échantillon ont été repris en tampon LDS 2X et la migration SDS-PAGE a été réalisée en condition dénaturante. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de cellulose en condition liquide et l'anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt a permis d'apprécier son expression : AKAP4 Nter (pour *N-terminal*) (Ab56551, Abcam UK).

L'analyse quantitative du profil de l'expression de l'AKAP4 Nter a été réalisée via le logiciel ImageJ. La quantification a été faite pour différents poids moléculaires : 110 kDa, 100 kDa, 80 kDa, 60 kDa, 45 kDa, 35 kDa. Plusieurs ratios ont également été mesurés : ratio total AKAP/35-100 kDa ; ratio 110 kDa/35-100 kDa ; ratio 110 kDa/60 kDa ; ratio 110 kDa/60-45-35 kDa.

Toutes les étapes depuis la lyse des spermatozoïdes par sonication jusqu'au profil d'expression et la quantification de l'AKAP4 ci-après correspondent à la partie « analyse protéique des échantillons » de la figure 22.

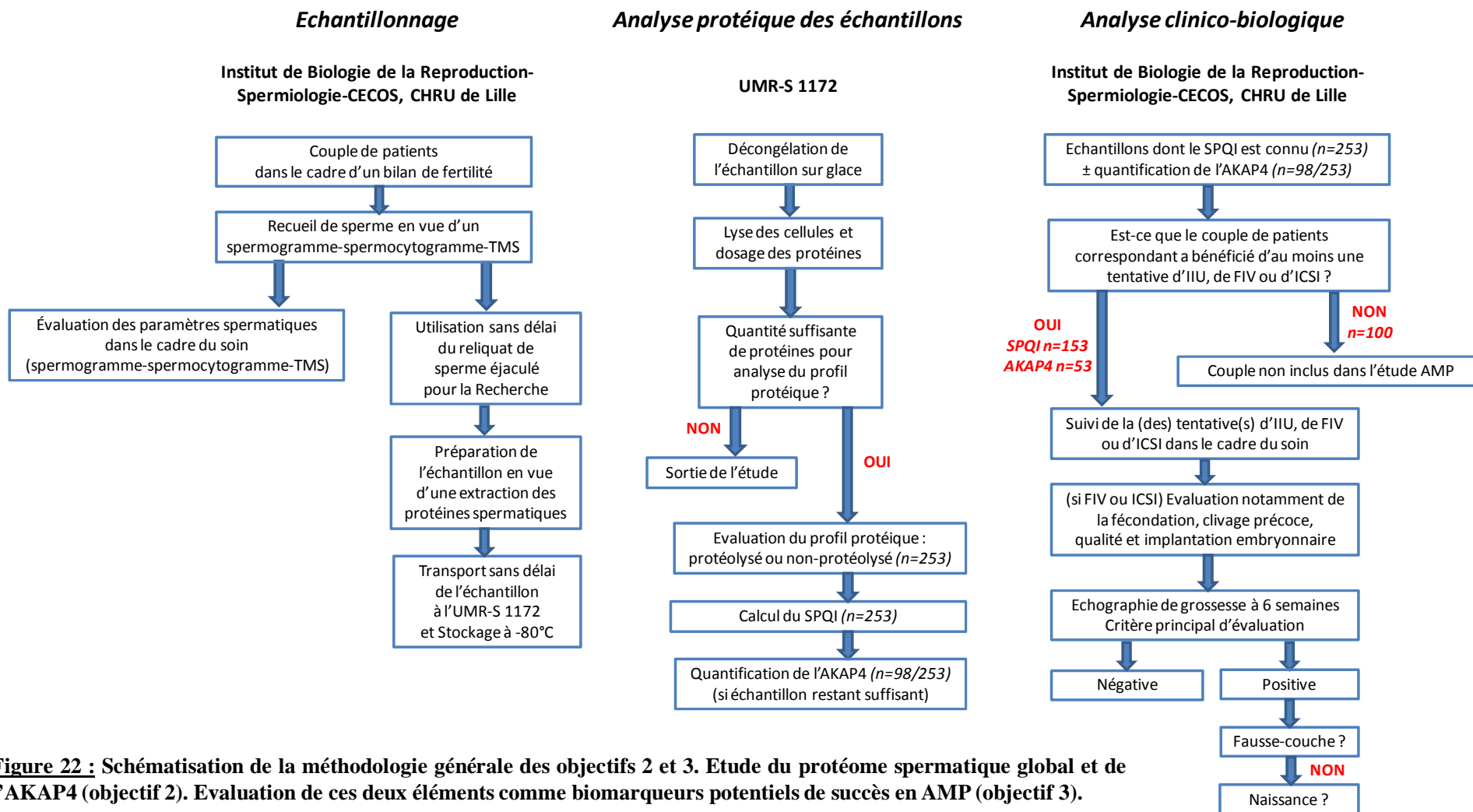


Figure 22 : Schématisation de la méthodologie générale des objectifs 2 et 3. Etude du protéome spermatique global et de l'AKAP4 (objectif 2). Evaluation de ces deux éléments comme biomarqueurs potentiels de succès en AMP (objectif 3).

AMP : assistance médicale à la procréation; AKAP : A--kinase anchor protein; CECOS : centre d'étude et de conservation des oeufs et du sperme; CHRU : centre hospitalier régional universitaire; IIU : insémination intra-utérine; FIV : fécondation in vitro; ICSI : intracytoplasmic sperm injection; SPQI : sperm proteome quality index; TMS : test de migration-survie; UMR : unité mixte de recherche.

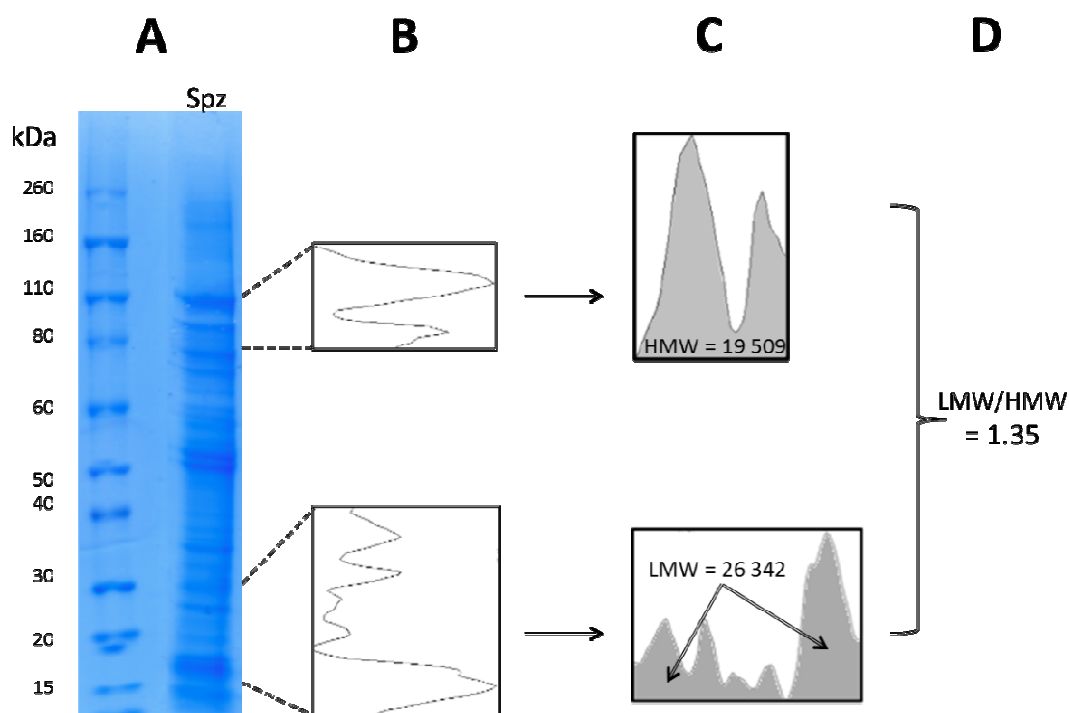


Figure 23 : Le Sperm Proteome Quality Index (SPQI) calculé à partir du gel 1D-SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie. (A) Le profil protéique spermatique est digitalisé et le bruit de fond éliminé avec le logiciel ImageJ. (B) Sélection des 2 fenêtres d'analyse entre 15 et 30 kDa (faible poids moléculaire, LMW) et entre 80 et 110 kDa (haut poids moléculaire, HMW). (C) L'aire sous la courbe (en gris) a été mesurée et quantifiée pour les HMW et les LMW. (D) Le ratio LMW/HMW a été calculé permettant de définir le SPQI.

D'après F. Jumeau, Thèse d'Université 2013.

ID : 1-dimensional; *HMW* : high molecular weight; *LMW*: low molecular weight; *PAGE* : polyacrylamide gel electrophoresis; *SDS* : sodium dodecyl sulfate; *SPQI* : sperm proteome quality index. *Spz* : spermatozoïde.

Plan Expérimental de l'étude clinico-biologique du protéome global via le SPQI et de l'AKAP4 comme biomarqueur(s) potentiel(s) en AMP

Il s'agit d'une étude de cohorte, prospective, monocentrique, observationnelle chez des couples pris en charge dans le Centre d'AMP du CHRU de Lille. Les couples ont été inclus lors de la réalisation d'un spermogramme-spermocytogramme effectué dans le cadre d'un bilan d'infertilité au Laboratoire de Spermologie du CHRU de Lille. Chaque homme inclus a bénéficié d'une analyse du protéome spermatique global sur les reliquats de sperme obtenus lors du spermogramme-spermocytogramme. Le SPQI a été calculé pour chaque échantillon. Au cours de cette étude, chaque couple a été susceptible de bénéficier d'une ou plusieurs des trois techniques d'AMP que sont l'IIU, la FIV ou l'ICSI, similairement au suivi habituel de

chaque couple pris en charge dans le cadre du soin au sein de notre Centre. Il s'agit d'une étude non interventionnelle, réalisée dans le parcours habituel du couple pris en charge en AMP à partir du reliquat de sperme habituellement détruit. Aucune intervention supplémentaire ni aucune modification du parcours n'ont été demandées au patient dans le cadre de cette étude, en dehors du consentement.

Selon le suivi du parcours de soin habituel, l'évaluation de la grossesse (clinique) a été effectuée par l'un des gynécologues de notre centre d'AMP par échographie à 6 semaines de la technique. Chez les patients bénéficiant de FIV ou d'ICSI, les paramètres embryonnaires ont été évalués similairement au suivi usuel de chaque patient pris en charge au sein de notre Centre. Enfin, le déroulement de la grossesse pour chaque couple a été suivi jusqu'à la naissance selon les dispositions légales. En effet, le suivi des grossesses jusqu'à accouchement fait partie du rapport officiel à fournir en fin d'année à l'Agence de la BioMédecine. Le cas échéant, tout arrêt de grossesse a également été signalé et enregistré. La partie « analyse clinico-biologique » de la figure 22 représente les actions principales et chronologiques de cette étude.

Critères d'inclusion et d'exclusion de la population étudiée

Les critères d'inclusion des couples dans cette étude ont été : couples de patients majeurs homme et femme, venant réaliser un spermogramme-spermocytogramme au Laboratoire de Spermiologie du CHRU de Lille dans le cadre d'un bilan d'infertilité du couple. Chaque couple devait être en mesure de bénéficier d'une prise en charge en AMP par IIU, FIV ou ICSI dans notre Centre, quel que soit le rang de la tentative (jusqu'à 6 tentatives d'IIU et 4 de FIV ou d'ICSI). Suite à l'analyse du reliquat de sperme, la quantité de protéines extraites devait être suffisante pour que l'étude du protéome global puisse être effectuée de manière standardisée. En effet, un minimum de 15 µg de protéines est nécessaire pour la réalisation de l'analyse du profil protéique spermatique global.

Les critères de non-inclusion ont été : les couples dont l'homme présentait une ou plusieurs anomalies au spermogramme-spermocytogramme définies selon les recommandations de l'OMS (World Health Organization, 2010) ne permettant pas d'obtenir au final un minimum de 15 µg de protéines dans l'échantillon spermatique. À cela s'ajoutent les couples dont l'un des membres se trouvait dans l'incapacité de recevoir une information éclairée, sous protection de la justice ou refusant de participer à la recherche.

Constitution de la base de données et des groupes de patients

Un total de 253 échantillons spermatiques des hommes issus de couples infertiles, dont le protéome global a été évalué, a été inclus dans ce travail. La base de données colligeant les données cliniques et biologiques a été constituée à partir du logiciel INFOFIV utilisé dans notre Centre d'AMP. Un tableau Excel a permis de rassembler la totalité des données biochimiques, cliniques et biologiques pour ces 253 patients. Parmi cette cohorte initiale, 153 couples ont eu recours à au moins une tentative d'IIU, de FIV ou d'ICSI à l'Institut de Biologie de la Reproduction-Spermiologie-CECOS du CHRU de Lille. Parmi ces 153 patients, la quantification de l'AKAP4 a pu être réalisée chez 53 d'entre eux (quantité de matériel restant suffisant pour réaliser cette analyse).

Dans cette étude, nous avons confronté les résultats des tentatives d'AMP entre les hommes issus de notre cohorte d'échantillons selon le profil « protéolysé » ou « non-protéolysé » soit du protéome spermatique (défini par le SQPI), soit de la protéine pro-AKAP4. Le choix de réaliser une partie de cette étude sur l'intégrité du précurseur de l'AKAP4 et non de l'AKAP4 elle-même fait suite aux premiers résultats obtenus de ce travail de Thèse (cf. article 3 de ce manuscrit). Les résultats ont été analysés en tout 3 fois, avec 3 cohortes distinctes de patients mais toutes issues des 153 échantillons de notre cohorte initiale et ayant bénéficié d'au moins une tentative d'AMP :

- Dans un premier temps, l'analyse des résultats d'AMP a été réalisée en se basant sur la qualité du protéome global via le SPQI. A été incluse la totalité des patients de notre cohorte initiale ayant fait au moins une tentative, soit n=153. Ce groupe est principalement constitué de patients normozoospermiques (77,7 %) ainsi que d'un certain nombre de patients présentant des altérations au spermogramme-spermocytogramme (22,3 %) telles que définies dans le manuel de laboratoire de l'organisation mondiale de la santé (World Health Organization, 2010). Ce groupe de patients a été nommé « total-SPQI».
- Dans un deuxième temps, la même analyse a été effectuée à nouveau en se basant sur la qualité du protéome global via le SPQI. Ont été inclus cette fois-ci uniquement les patients normozoospermiques de la cohorte initiale, soit n=119. Ce groupe de patients a été nommé « normo-SPQI».

- Enfin, les résultats d'AMP ont été analysés en se basant sur la quantification de la protéine pro-AKAP4 chez les 53 patients où la quantification a pu être réalisée. Ce groupe de patients a été nommé « normo-pro-AKAP4 ».

Le détail de la constitution des groupes et sous-groupes pour ces 3 analyses est détaillé dans la figure 24.

Critères d'évaluation

Le critère principal d'évaluation a été le **taux de grossesse clinique par transfert**. La grossesse clinique est définie par la présence, en échographie, d'un sac foetal avec rythme cardiaque à 6 semaines.

Les critères secondaires ont été :

- ❖ Le taux de **naissance vivante par transfert**, définie par l'accouchement d'un (ou plusieurs) enfant(s) vivant(s) à l'issue de la grossesse clinique.
- ❖ Le taux de **fausse-couche précoce par transfert**, définie par l'absence d'observation d'un sac foetal avec rythme cardiaque à l'échographie à 6 semaines suite à un taux de β -hcg minimum de 100 UI (pour unité internationale).
- ❖ Les **paramètres spermatiques**, évalués sur le même recueil de sperme que l'échantillon obtenu à partir du reliquat pour la recherche. Les paramètres suivants ont été évalués :
 - *La concentration spermatique :*

Le nombre de spermatozoïde a été déterminé à l'aide d'une cellule de comptage de type Malassez.

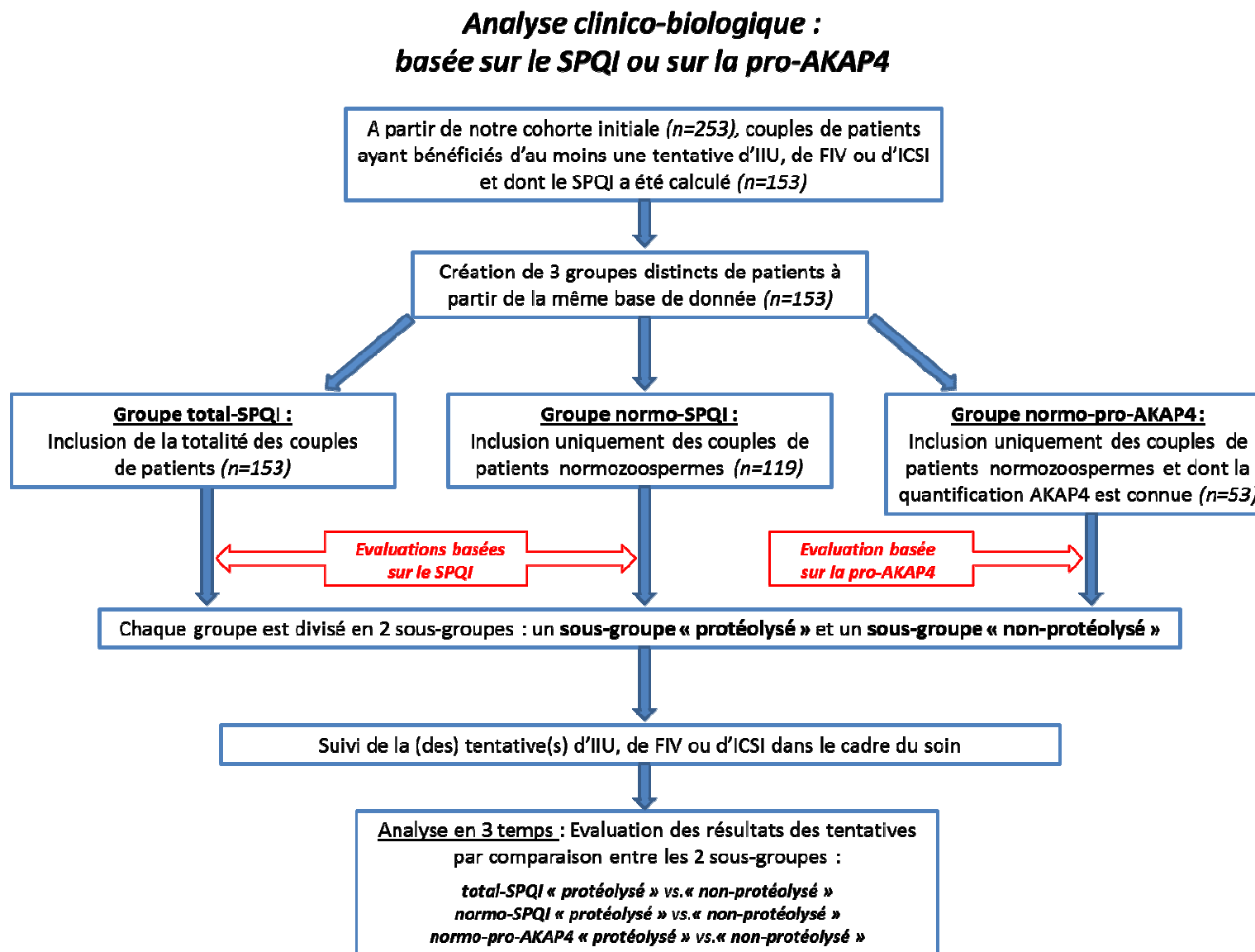


Figure 24 : Constitution des groupes et répartition des patients en sous-groupes pour l'évaluation du SPQI et de la pro-AKAP4 comme biomarqueurs de réussite en AMP.

AMP : assistance médicale à la procréation; *AKAP* : A-kinase anchor protein; *IUI* : insémination intra-utérine; *FIV* : fécondation in vitro; *ICSI* : intracytoplasmic sperm injection; *SPQI* : sperm proteome quality index.

Cf. page 99.

○ *La mobilité spermatique :*

Les pourcentages de spermatozoïdes de types progressifs, mobiles sur place et immobiles, ont été évalués au microscope (grossissement x400) à partir de 20 µl de sperme entier déposés entre une lame préalablement chauffée à 37°C et une lamelle de 22x22 mm.

○ *La morphologie spermatique :*

Le pourcentage de spermatozoïdes typiques défini selon la classification de David modifiée (Auger & Eustache, 2000) a été noté. Au moment de cette étude, le pourcentage de forme typique minimum requise pour que ce paramètre soit considéré normal était de 15 %. L'analyse a été effectuée sur un minimum de 100 spermatozoïdes, fixés et colorés sur lame (Harris-Schorr), au grossissement x1000.

❖ **Les paramètres du développement embryonnaire :**

Les paramètres embryonnaires ont été relevés au cours du développement précoce des embryons uniquement pour les couples bénéficiant d'une FIV ou d'une ICSI.

○ *Le taux de fécondation:*

La fécondation a été définie par l'observation au jour 1 (J1) (18 h après mise en fécondation) de 2 pronuclei (2PN) dans le cytoplasme de l'ovocyte (figure 25.A). Le taux de fécondation correspond au nombre de zygotes à 2PN sur le nombre d'ovocytes en métaphase 2 (M2).

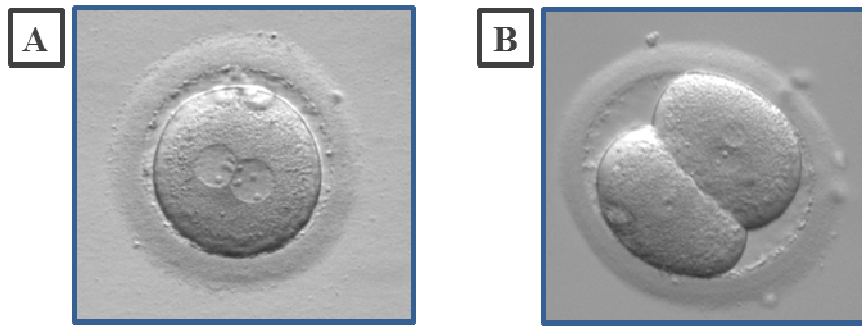


Figure 25 : Evaluation de la fécondation d'un ovocyte et du clivage précoce. (A) Observation d'un zygote à 2PN et 2 globules polaires (18 h après mise en fécondation). (B) Observation d'un embryon au stade de 2 cellules lors du clivage précoce (27 h après mise en fécondation).

Avec l'accord de l'Institut de Biologie de la Reproduction-Spermiologie-CECOS du CHRU de Lille.

2PN : 2 pronuclei ; *CECOS* : Centre d'Etude et de Conservation des œufs et du sperme ; *CHRU* : Centre Hospitalier Régional Universitaire.

○ *Le taux de clivage précoce :*

Le clivage précoce a été défini par l'observation à J1 (27 h après la mise en fécondation) d'un embryon à 2 cellules (figure 25.B). Le taux de clivage précoce correspond au nombre d'embryons à 2 cellules sur le nombre de zygotes à 2PN.

○ *La qualité et l'implantation embryonnaire :*

La qualité embryonnaire a été évaluée par le taux d'embryons « top qualité » à J2 (46 h après mise en fécondation) selon le consensus d'experts d'Istanbul (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology *et al.*, 2011). Le comité d'experts a établi 3 catégories d'embryons en fonction de leur morphologie, y compris le nombre et la taille des blastomères, leur degré de fragmentation et la présence de blastomères multinucléés. Les embryons de grade 1 doivent présenter 4 cellules à J2 ou 8 cellules à J3, régulières, de taille normale, aucun blastomère multinucléé et aucune fragmentation anucléée. Les embryons de grade 2 doivent présenter 4 cellules à J2 ou 8 cellules à J3, régulières, de taille normale, aucun blastomère multinucléé, et moins de 25 % de fragmentation anucléée. Les autres embryons sont de grade 3. Les embryons de grade 1 sont considérés comme étant la meilleure qualité avec le potentiel d'implantation le plus élevé.

Le taux d'implantation embryonnaire est défini par le rapport entre le nombre de sacs fœtaux avec rythme cardiaque vu en échographie à 6 semaines, et le nombre embryons replacés dans la cavité utérine de la patiente à J2 (1 à 3 embryons maximum).

TRAVAUX DE THÈSE

Le travail fourni au cours de cette Thèse ainsi que les résultats obtenus ont permis la publication de 2 articles (articles 1 et 2) et la préparation de 2 autres qui sont respectivement en soumission et en finalisation de rédaction (respectivement article 3 *en soumission* et article 4 *en préparation*). Une déclaration d'invention a également été validée au cours du précédent travail et consolidée au cours de celui-ci.

- 1 Article n°1 :** Immunodetection of Tau microtubule-associated protein in human sperm and testis.
- 2 Article n°2 :** La protéine microtubulaire Tau testiculaire : une place dans la spermatogenèse ?
- 3 Article n°3 *en soumission* :** Associations between progressive motility, the human sperm proteome and A-kinase anchor protein 4.
- 4 Brevet d'invention, *extention du brevet initial* :** Methods for determining human sperm quality.
- 5 Article n°4 *en préparation* :** Human sperm proteome profile and pro-A-kinase anchor protein 4 (pro-AKAP4), new tracks to enhance Assisted Reproduction Technologies (ART) outcomes.

Article 1

Immunodetection of Tau microtubule-associated protein in human sperm and testis.

Sigala J, Jumeau F, Caillet-Boudin ML, Sergeant N, Ballot C, Rigot J-M, Marcelli F, Tardivel M, Buée L, Mitchell V.

Asian Journal of Andrology, **2014**.

&

Article 2

La protéine microtubulaire Tau testiculaire : une place dans la spermatogenèse ?

Sigala J, Jumeau F, Buée L, Sergeant N, Mitchell V.

Morphology, **2015**.

La protéine Tau fait partie de la famille des MAPs et joue un rôle dans la polymérisation de ces derniers. Elle est naturellement présente dans les neurones humains, cependant, une localisation testiculaire, particulièrement dans la manchette (structure microtubulaire) des spermatozoïdes, a été démontrée chez l'animal. Au départ de ce travail de Thèse, il n'y avait dans la littérature que très peu d'études traitant de l'expression de la protéine Tau dans les testicules ou les spermatozoïdes, et aucune chez l'homme. Le travail de cette Thèse a été effectué en collaboration entre l'EA 4308 « Gamétogenèse et qualité du gamète » et l'équipe « Alzheimer et Tauopathies de l'UMR-S 1172 ». Deux éléments nous ont incités à nous intéresser à la protéine Tau au cours de ce travail. Premièrement, la protéine Tau présentait un intérêt de par son rôle essentiel dans la polymérisation/dépolymérisation des microtubules neuronaux. Les résultats prometteurs de notre équipe dans la thématique des biomarqueurs protéiques dans la fonction de mobilité (cf. article 3) et la richesse des spermatozoïdes en microtubules ont constitué un premier intérêt de la protéine Tau comme projet de recherche. Secondairement, l'expérience acquise par notre équipe au cours de mon Master 2 Recherche dont la thématique était principalement l'expression de la protéine et des ARNm Tau testiculaire a été le second élément de notre intérêt pour cette protéine. L'expression de la protéine Tau testiculaire ayant été établie dans de nombreux organes et le testicule chez l'animal, nous avons supposé que sa présence pouvait également être mise en évidence dans le testicule et le spermatozoïde humain. De plus, la littérature concernant l'expression et les rôles putatifs de la protéine Tau aux niveaux testiculaire et spermatique étant pauvre, nous avons fait le choix de réaliser une revue de la littérature sur le sujet.

Dans un premier temps, nous avons rapporté pour la première fois l'expression de la protéine Tau dans les spermatozoïdes et le testicule humain par une approche immunohistochimique. Notre travail met en évidence la présence de la protéine Tau dans le testicule humain aux stades de spermatocyte et de spermatide allongée. Il est également observé une expression de la protéine Tau au niveau de la pièce intermédiaire du spermatozoïde mature. Ce travail correspond à l'**article 1** (le format de parution a été positionné en annexe).

Suite à cette première publication, nous avons rédigé une revue de la littérature traitant de l'expression de la protéine Tau testiculaire et spermatique, de sa localisation et de ses fonctions. Ce travail correspond à l'**article 2** (le format de parution a été positionné en annexe).

Article 1

Immunoexpression of tau in human sperm and testis

Julien Sigala^{1,2}, Fanny Jumeau^{1,2}, Marie-Laure Caillet-Boudin², Nicolas Sergeant², Caroline Ballot¹, Jean-Marc Rigot^{1,3}, F. Marcelli³, Luc Buée^{2*} & Valérie Mitchell^{1*a}

¹EA 4308 Gamétogenèse et qualité du gamète et Institut de Biologie de la Reproduction-Spermiologie-CECOS, Hôpital Jeanne de Flandre, 59037 CHRU Lille

²U837 Inserm Alzheimer et Tauopathies, Place de Verdun, 59045 Lille cedex

³Andrologie, Hôpital Calmette, 59037 Lille cedex.

* These authors contributed equally to this work.

a : corresponding author : valerie.mitchell@chru-lille.fr

Tau, a cytosolic protein comprising four regions generating six isoforms, is naturally present in human neurons. Tau protein plays a pivotal role in controlling microtubule stability.¹ Hyperphosphorylation of tau impairs its ability to bind microtubules resulting in their disassembly and formation of tau aggregates during neurodegenerative diseases.^{2,3} Besides the nervous system, tau is expressed in peripheral tissues.⁴ In the male reproductive system, the tau research has earlier been focused solely on rodent and bovine testis.⁵ Herein, we have investigated the expression of tau in the human ejaculated sperm and testicular tissue by immunofluorescence and immunoenzymology, using a specific Tau antibody.

Data were obtained by 5 semen samples of normozoospermic men and by testicular biopsies taken from two men with normal spermatogenesis and suffering of obstructive azoospermia. Men were recruited by our andrological center and informed written consent was obtained. Briefly, washed, smeared sperm were incubated with normal goat serum, then with rabbit anti-C-terminus Tau⁶ diluted 1:1000 and revealed with goat anti-rabbit Alexa 488 (Molecular probes, Life technologies). Dewaxed 5µm-paraffin sections were microwaved and incubated with normal sheep or goat serum, then with rabbit anti-C-terminus of Tau diluted 1:1000. For

immunoenzymology, they were revealed with a 1:150 biotinylated sheep anti-rabbit immunoglobulin G and with an avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex (Vector Laboratories, AbCys, Paris, France). For immunofluorescence, they were revealed with fluorescent goat anti-rabbit Alexa 568 (Molecular probes, Life technologies). In control, the primary antibody was omitted. The slides were observed and images were acquired with a confocal Zeiss LSM710 microscope and an axioplan Zeiss microscope (Göttingen, Germany).

Tau immunostaining was detected in all smeared spermatozoa (**Figure 1a**). The Tau protein was located in the sperm midpiece. In testicular tissue, Tau immunoreactivity was observed in both spermatocytes and spermatids (**Figure 1b**). In spermatocytes, cytoplasmic fluorescent dots were located all around the nucleus (**Figure 1c**). In elongated spermatids, the immunolabeled zone was situated behind the nucleus (**Figure 1d**). No staining was observed in spermatozoa or in tissue sections of control samples lacking primary antibody (**Figure 1e** and **1f**).

Few studies have been conducted in the past decades to unfold the expression of tau in the reproductive tract. Two earlier eminent studies have reported the expression of tau in the rodent and bovine testis.^{4,5} In the human germ cells and spermatozoon, tau may participate in the composition of microtubule proteins. The main microtubule organizing center of the spermatozoon is the centrosome complex. It plays a role in sperm and zygote aster formation and bipolar mitotic apparatus.⁷ Dysfunctions of the centrosome complex will result in developmental abnormalities after fertilization. The epithelium of seminiferous tubules possesses a vast network of microtubules in particular into the manchette, the axoneme, and the mitotic and meiotic spindles of germ cells.⁸ The tau detection in human testicular tissue may indicate a role during the meiotic divisions of male germ cells and during the extension to spermatozoa. As suggested in tauopathies,⁹ some modifications of tau protein as aggregated, hyperphosphorylated, and ubiquinated tau might impair sperm microtubule function and transport. In conclusion, we hypothesize that tau might participate in the development of the sperm that may represent an additional protein for sperm function in the male fertility.

REFERENCES

1. Cárdenas AM, Ardiles AO, Barraza N, Baéz-Matus X, Caviedes P. Role of Tau protein in neuronal damage in Alzheimer's Disease and Down Syndrome. *Arch Med Res* 2012, 43: 645–654.
2. Billingsley M, Kincaid RL. Regulated phosphorylation and dephosphorylation of Tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem J* 1997, 323: 577–591.
3. Alonso A, Zaidi T, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98:6923-6928.
4. Gu Y, Oyama F, Ihara Y. Tau is widely expressed in rat tissues. *Journal of Neurochemistry* 1996, 67: 1235–1244.
5. Ashman JB, Hall ES, Eveleth J, Boekelheide K. Tau, the neuronal heat-stable microtubule-associated protein, is also present in the cross-linked microtubule network of the testicular spermatid manchette. *Biol Reprod* 1992, 46: 120–129.
6. Sergeant N, Sablonnière B, Schraen-Maschke S, Ghestem A, Maurage CA, Wattez A, Vermersch P, Delacourte A. Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 2001, 10:2143-2155.
7. Schatten H, Sun QY. The functional significance of centrosomes in mammalian meiosis, fertilization, development, nuclear transfer, and stem cell differentiation. *Environ Mol Mutagen* 2009, 50:620-636.
8. Kierszenbaum, AL, LL Tres. The Acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol* 2004, 67: 271–284.
9. Mandelkow EM, Mandelkow E. Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012, 2:a006247.

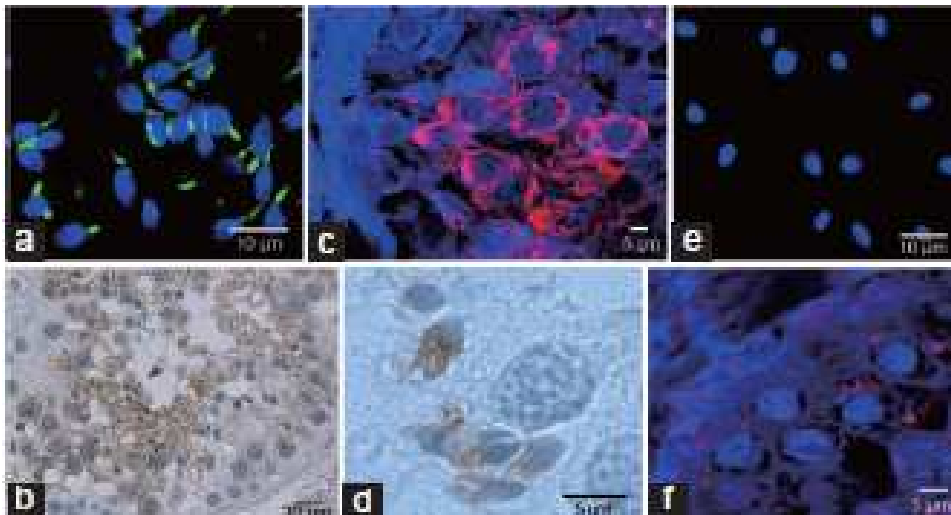


Figure 1: Micrographs of human ejaculated sperm and testicular tissue treated with anti-Tau antibody (**a-d**) and controls (**e** and **f**). (**a**) In spermatozoa, fluorescent Tau labelling is observed in the midpiece. (**b**) In testicular tissue, Tau immunoreactivity is observed in both spermatocytes and spermatids. (**c**) In spermatocytes, cytoplasmic fluorescent dots are located all around the nucleus. (**d**) In elongated spermatids, the immunolabelled zone is located behind the nucleus.

Article 2

La protéine microtubulaire Tau testiculaire : une place dans la spermatogenèse ?

The testicular microtubule-associated protein Tau: where, when during spermatogenesis?

J. Sigala^{a,b,c}, F. Jumeau^{b,d}, L. Buée^c, N. Sergeant^{c*}, V. Mitchell^{a,b*}

^a *Institut de Biologie de la Reproduction-Spermiologie-CECOS, Hôpital Jeanne de Flandre, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, avenue Eugène Avinée, 59037 Lille cedex, France.*

^b *EA 4308 Gamétogenèse et Qualité du Gamète.*

^c *INSERM UMR-S 1172 Alzheimer et Tauopathies, Place de Verdun, 59045 Lille cedex, France.*

^d *Laboratoire de Biologie de la Reproduction-CECOS, Centre Hospitalier Universitaire de Rouen, 1 rue de Germont, 76031 Rouen Cedex, France.*

** Ces auteurs ont participé de façon égalitaire à ce travail.*

Auteur correspondant : Valérie Mitchell, Institut de Biologie de la Reproduction-Spermiologie-CECOS, Hôpital Jeanne de Flandre, Avenue Eugène Avinée, 59037 Lille, France. (tél: +33 320445485 ; fax: +33 320445868 ; e-mail: valerie.mitchell@chru-lille.fr).

Résumé

La protéine Tau (Tubulin Associated Unit) est une phosphoprotéine qui fait partie de la famille des protéines associées aux microtubules (MAPs). Son rôle est lié à la polymérisation des microtubules. Elle est naturellement présente dans le cerveau, le coeur, le muscle, le poumon, le rein, le pancréas et le foie. La localisation de la protéine et des ARN messagers Tau a également été mise en évidence dans le testicule, organe riche en microtubules. Les microtubules sont essentiels dans la stabilisation de la forme cellulaire et dans les divisions cellulaires. Dans le testicule, la protéine Tau pourrait être impliquée dans les processus de divisions de la spermatogenèse en agissant sur la dynamique microtubulaire et la mise en place de la polarité du spermatozoïde.

Cette revue synthétise les connaissances actuelles de la localisation et des fonctions principales de la protéine Tau focalisée sur le testicule. La localisation et les rôles potentiels de la protéine Tau au cours de la spermatogenèse sont discutés en mettant l'accent sur les structures microtubulaires des tubes séminifères.

Mots clés: Tau, microtubule, testicule, spermatogenèse

Summary

The Tau protein (Tubulin Associated Unit) is a phosphoprotein of the microtubule-associated protein family (MAPs). Its role is the regulation of the microtubule polymerization. The Tau protein is naturally present in brain, heart, muscle, lung, kidney, pancreas and liver. An expression of Tau protein and RNA messengers was also highlighted in the testis that is a rich organ of microtubules. The role of the microtubules is essential in the stabilization of the cellular shape and in cell divisions. In the testis, Tau protein could be involved in the division process of the spermatogenesis by acting on the microtubular dynamics in the arrangement of the spermatozoon polarity.

This review synthesizes the current knowledge, the localization and the main functions of the Tau protein focused on the testis. The localization and the potential roles of the Tau protein during the spermatogenesis are discussed by emphasizing the link with the microtubular structures of seminiferous tubules.

Key words: Tau, microtubule, testis, spermatogenesis

Introduction

La protéine Tau (Tubulin Associated Unit) est une phosphoprotéine localisée majoritairement dans les neurones qui fait partie de la famille des protéines associées aux microtubules (MAPs). Largement décrite dans la littérature, cette protéine est nécessaire au bon fonctionnement microtubulaire neuronal. Le rôle principal de la protéine Tau est lié à la polymérisation des microtubules. Selon son niveau de phosphorylation, elle permet le développement ou, à l'inverse, prévient la formation de l'axone [45] et exerce un rôle sur la polarité cellulaire du neurone [7]. Des formes anormales hyperphosphorylées de la protéine Tau sont impliquées dans plusieurs maladies neurodégénératives, regroupées sous le terme de *tauopathies*, dont la maladie d'Alzheimer. Une expression non-neuronale de la protéine et des ARN messagers Tau a également été mise en évidence dans plusieurs organes et tissus, dont le testicule [2, 27, 30, 54].

La spermatogenèse est un phénomène dynamique qui débute dans les testicules au moment de la puberté. A cette période, les cordons sexuels se perméabilisent puis se transforment en tubes séminifères. Les tubes séminifères sont constitués par un épithélium composé de 2 populations cellulaires distinctes: les cellules de Sertoli (cellules somatiques) et les cellules germinales à différents stades de division et de différenciation (Figure 1). La spermatogenèse se découpe en 3 étapes distinctes : mitose, méiose et spermiogenèse. Elle englobe la totalité des divisions des cellules germinales et du développement des gamètes, de la spermatogonie diploïde (cellule germinale primordiale) au gamète haploïde : le spermatozoïde. La division des cellules germinales débute avec la prolifération par mitose des spermatogonies, situées en périphérie des tubes séminifères sur la membrane basale. Elle progresse en direction de la lumière des tubes, les cellules germinales subissant les 2 divisions méiotiques donnant lieu successivement aux stades intermédiaires de spermatocyte I (spermatocyte primaire), de spermatocyte II (spermatocyte secondaire) et enfin de spermatide. La formation du spermatozoïde mature résulte de la différenciation haploïde des spermatides. Cette phase, appelée spermiogenèse, est un processus long et très spécialisé présentant 16 étapes chez la souris et 8 chez l'homme [29]. Au cours de la spermiogenèse, la cellule change de morphologie avec un allongement du noyau. La forme prise par la cellule est espèce-spécifique (exemples : forme de crochet chez la souris, forme en raquette chez l'homme). La chromatine nucléaire se compacte de façon à préserver l'intégrité de l'ADN.

Le rôle du cytosquelette, particulièrement des microtubules, durant les événements cellulaires de la spermatogenèse est essentiel. Ces événements sont permis grâce à la nature dynamique des microtubules. Les microtubules sont des structures cylindriques polarisées du cytosquelette formées d' α -tubuline (extrémité (-)) et β -tubuline (extrémité (+)). Ils sont soumis à un phénomène d'instabilité dynamique. L'extrémité (+) du microtubule alterne des phases de croissance et de rétrécissement tandis que l'extrémité (-) est généralement ancrée à d'autres structures cellulaires. Le rôle des microtubules est indispensable dans la stabilisation de la forme cellulaire, la mitose, et le transport intracellulaire [23, 41, 42, 43, 57]. La polarité et la dynamique microtubulaire sont régulées par différents facteurs et protéines, notamment par les MAPs [8]. De ce fait, les testicules représentent une réelle source d'étude de MAPs, particulièrement de la protéine Tau, au cours de la spermatogenèse.

Au niveau testiculaire, l'épithélium des tubes séminifères est riche en microtubules [14]. Le rôle des microtubules est nécessaire au bon fonctionnement de la spermatogenèse [56]. Ils sont impliqués dans le maintien de la structure des cellules de Sertoli [49, 50], la méiose, la polarisation et la mobilité des cellules germinales, le transport des spermatides en élongation à travers l'épithélium seminifère au cours de la spermiogenèse [58]. En effet, les microtubules ont été mis en évidence dans les fuseaux mitotiques des spermatogonies, ainsi que dans les fuseaux méiotiques des spermatocytes I et II [48]. Au cours des divisions mitotiques et méiotiques, les microtubules participent au mouvement des chromosomes vers les pôles [21]. Ils sont également présents au stade spermatide notamment dans la manchette et dans l'axonème. L'absence ou l'existence d'anomalies de ces microtubules peut résulter en une baisse de la fertilité, voire une infertilité [29].

Dans cette revue, nous présentons une vue d'ensemble de l'expression et de l'implication de la protéine Tau dans le testicule. La littérature traitant de la protéine Tau neuronale est riche, mais les études portant sur cette protéine au niveau testiculaire sont peu nombreuses.

Structure et localisation de la protéine Tau

Structure

La protéine Tau a été l'une des premières MAPs caractérisée [63]. Elle a été découverte dans le cerveau de porc par cette équipe alors à la recherche de promoteurs de l'assemblage de la tubuline dans les microtubules.

Tau est une protéine cytosolique dont le gène est localisé sur le bras long du chromosome 17, au niveau 17q21 [24] et possède 16 exons (Figure 2). La protéine se découpe en quatre régions distinctes [41] :

- ❖ La région N-terminale riche en acide aminé acide, codée par les exons 1 à 5,
- ❖ La région riche en proline, codée par l'exon 7 et la première partie de l'exon 9,
- ❖ La région contenant les domaines de liaisons aux microtubules qui est codée par les exons 9 à 12. Cette région contient 3 ou 4 séquences répétées (R) de 18 acides aminés: R1, R2, R3 et R4. Chaque région est séparée par des séquences inter-répétition de 13 ou 14 acides aminés,
- ❖ La région C-terminale codée par l'exon 13.

Dans le neurone, la fonction principale de la protéine Tau est d'assurer l'assemblage des dimères α/β de tubulines [9] et la stabilisation des microtubules en empêchant leur dépolymérisation [6, 18]. Une balance entre liaison et détachement de Tau aux microtubules est nécessaire pour un fonctionnement normal du neurone [58]. Plus généralement, la dynamique des microtubules est nécessaire pour la réorganisation rapide du cytosquelette, la plasticité synaptique, la mitose, la mobilité cellulaire, la fonction ciliaire [22, 23].

Localisation

Chez l'homme et différentes espèces animales, la protéine Tau est détectée dans le cerveau, le coeur, le muscle, le poumon, le rein, le pancréas et le foie [27, 32, 61]. Son expression dans l'appareil reproducteur mâle est également rapportée [2, 27, 30, 54]. Dans le testicule de souris, la protéine Tau est exprimée dans l'épithélium séminifère depuis le stade spermatogonie jusqu'au stade spermatide [30]. Dans le testicule du bovin, elle a été localisée

au stade spermatide [2]. Chez l'homme et pour la première fois, nous avons rapporté son expression dans le testicule et le spermatozoïde éjaculé [54]. Dans le testicule humain, la protéine Tau est exprimée dans le cytoplasme du spermatocyte et de la spermatide en élongation (Figure 3). Dans le spermatozoïde éjaculé, elle est exprimée dans la pièce intermédiaire du flagelle (Figure 3).

Dans le testicule du bovin, la protéine Tau est exprimée au niveau de la manchette des spermatides [2]. La manchette est une structure microtubulaire transitoire qui se forme au cours de l'élongation nucléaire de la spermatide [34]. Elle est composée de microtubules et de MAPs. Le rôle de la manchette est le transport des protéines le long des microtubules, protéines essentielles pour la formation du flagelle, pour la forme du noyau et la condensation de la chromatine [33]. Une atteinte de la manchette au cours de la spermatogenèse est responsable de la formation de têtes spermatiques anormales [12, 44]. En perspective, la détection de la protéine Tau à cette étape de la spermatogenèse et dans la manchette chez l'homme pourrait être en faveur d'une action de la protéine lors de la mise en place de la manchette et de l'allongement en spermatozoïde.

Isoformes de la protéine Tau et épissage alternatif

La protéine Tau dans le testicule murin est détectée sous forme de 2 bandes majoritaires de 34 et 37 kDa, alors que l'épissage alternatif du transcrit primaire de Tau dans le cerveau produit six isoformes de poids moléculaire apparent entre 45 et 67 kDa [27]. Ces observations suggèrent la présence d'isoformes testiculaires différentes des isoformes neuronales [27]. L'isoforme Tau testiculaire pourrait correspondre à l'isoforme D mise en évidence dans le foie de souris [30, 32].

La sélection des 16 exons de Tau est régulée par un épissage alternatif, principalement des exons 2, 3 et 10 (Figure 2) [25]. Dans le cerveau humain adulte, l'épissage alternatif de ces trois exons donne lieu à la formation de six isoformes majeures codant des protéines de 352 à 441 acides aminés : 0N3R, 0N4R, 1N3R, 1N4R, 2N3R et 2N4R. Les isoformes Tau 0N excluent les exons 2 et 3, les Tau 1N possèdent l'exon 2 mais pas l'exon 3 et les Tau 2N présentent à la fois les exons 2 et 3 [46]. Les isoformes 3R possèdent 3 séquences répétées de liaison aux microtubules, tandis que les isoformes 4R en possèdent 4, du fait de l'inclusion de l'exon 10. Il existe également une isoforme de haut poids moléculaire appelée « big Tau »

correspondant à la forme 2N4R additionnées de 242 résidues codés par l'exon 4A [13, 26]. Cette forme est minoritaire dans le cerveau. Elle est présente essentiellement dans le système nerveux périphérique. La comparaison de l'épissage alternatif de Tau dans le testicule et le cerveau a été réalisée chez l'animal [27]. L'épissage alternatif de Tau semble être tissu-spécifique (Tableau 1). En effet, le testicule de rat comporte une majorité d'isoformes Tau 0N et une minorité de Tau 1N et 2N. Les isoformes 3R sont plus nombreuses que les 4R. L'isoforme « big Tau » (exon 4A+) est très minoritaire. En comparaison, le cortex cérébral de rat contient une quantité équivalente d'isoformes Tau 0N et 1N, et essentiellement les formes 4R. L'isoforme « big Tau » reste minoritaire. Au total dans le testicule, les exons 2, 3 et 10 semblent être le plus souvent épissés.

Rôle(s) putatif(s) de la protéine Tau au niveau testiculaire

Polymérisation des microtubules et phosphorylation

L'activité biologique de la protéine Tau dépend en partie de son état de phosphorylation, qui peut influencer son affinité pour les microtubules [9, 38, 55]. La phosphorylation représente la modification post-traductionnelle principale de la protéine Tau. Elle a pour conséquences un détachement et une déstabilisation des microtubules [3, 5, 10, 11, 20, 39]. L'équilibre phosphorylation-déphosphorylation de la protéine est assuré par la balance des activités de nombreuses kinases et phosphatases [38, 51, 55]. Pas moins de 85 sites de phosphorylation ont déjà été identifiés sur la protéine Tau [7, 28, 53]. Une phosphorylation anormale ou une hyperphosphorylation entraînent une dissociation des microtubules [4] et s'associent à la formation d'agrégats filamenteux de Tau appelés paires hélicoïdales de filaments (PHF). Les PHF sont responsables de la dégénérescence des neurones et de désordres neurologiques [24]. Le concept de protéines Tau pathologiques est lié à l'hyper et phosphorylation anormale conduisant à l'accumulation des PHF [52].

Dans le testicule de souris, les sites de phosphorylation physiologiques de la protéine Tau ont récemment été mis en évidence dans le cytoplasme des spermatocytes [30]. Au cours de la méiose, la phosphorylation de Tau coïnciderait avec une diminution de l'acétylation de la tubuline [30]. L'acétylation est une modification de la tubuline, synonyme de polymérisation. Dans le testicule, la phosphorylation de Tau pourrait donc être impliquée dans la stabilité du fuseau mitotique au cours de la division méiotique des cellules germinales. La ségrégation

chromosomique au cours de la méiose est contrôlée par l'allongement et la rétraction de fuseaux microtubulaires, nécessaires à l'attachement des kinétochores des chromosomes durant la métaphase [35, 62]. Ces fuseaux, principalement composés de microtubules, sont contrôlés par des MAPs. La phosphorylation de la protéine Tau pourrait être impliquée dans les mouvements d'extension et de rétraction des microtubules au cours de la méiose [30]. Les erreurs de ségrégation survenant pendant la méiose sont à l'origine d'aberrations chromosomiques, ayant pour impact la transmission éventuelle à l'enfant d'anomalies chromosomiques pouvant être responsables de malformations. De nouveaux travaux sont nécessaires pour déterminer si des altérations pathologiques de la phosphorylation de la protéine Tau pourraient ou non contribuer aux erreurs de ségrégation des chromosomes.

Polarité cellulaire

L'acquisition de la polarité cellulaire est essentielle au fonctionnement d'une cellule, notamment des cellules épithéliales [47], des neurones [36] et des cellules spermatiques [56].

La spermatogenèse chez les mammifères est caractérisée par d'importants changements cellulaires permettant la transformation d'une cellule ronde non polarisée (spermatogonie) en une cellule polarisée et mobile (spermatozoïde). L'acquisition de la polarité cellulaire est indispensable à la formation d'un spermatozoïde fécondant. Au stade spermatide, l'appareil de Golgi se déplace d'un côté du noyau alors que les centrioles migrent en direction opposée. La présence de l'acrosome au pôle apical et du flagelle à l'extrémité opposée attestent de la polarité du spermatozoïde [56].

Similairement, l'une des caractéristiques morphologiques des neurones est leur structure polarisée. Durant ce processus de polarisation, l'action coordonnée d'un certain nombre de molécules, dont les MAPs, régulent le réseau de microtubules du cytosquelette pour le maintien et le développement des compartiments axonal et somatodendritique [1, 31]. Au cours de l'allongement d'un neurone, la protéine Tau s'isole progressivement dans l'axone et la protéine MAP2 migre dans la partie dendritique en formation. En régulant l'assemblage des microtubules, les protéines Tau et MAP2 exercent un rôle sur la polarité cellulaire du neurone [16].

L'expression de la protéine MAP2 a également été mise en évidence dans les cellules somatiques et germinales du testicule de rat [40]. Il existe donc des similitudes

morphologiques et fonctionnelles entre le neurone et les cellules germinales, notamment sur la polarité. D'autres protéines jouant un rôle dans la polarité cellulaire, comme les MARKs (microtubules affinity-regulating kinases), viennent conforter l'analogie entre le système neuronal et testiculaire [59]. Les MARKs ont été découvertes dans le cerveau pour leur rôle dans la phosphorylation de Tau [19]. Les MARKs ont également été identifiées dans le testicule, notamment dans les cellules de Sertoli et les cellules germinales au stade spermatide [58].

Au total, de ce qui précède, il est possible d'émettre l'hypothèse d'un rôle de la protéine Tau sur la polarité des cellules germinales à travers la régulation des microtubules de l'épithélium séminifère.

Conclusion et perspectives

Chez l'homme, les connaissances de la protéine Tau au niveau testiculaire sont parcellaires. L'expression de la protéine et des ARNm Tau a été mise en évidence au niveau de l'épithélium séminifère dans les spermatocytes et les spermatides chez l'homme. La protéine est également exprimée dans le spermatozoïde humain éjaculé. Elle est localisée au niveau de la pièce intermédiaire du flagelle. Le rôle précis et l'impact de la protéine Tau testiculaire et spermatique ne sont pas connus, mais quelques hypothèses comme la stabilisation des microtubules au cours de la spermatogenèse et la participation à la polarité des cellules spermatiques peuvent être avancées.

De nouveaux travaux sont nécessaires pour comprendre les mécanismes et les rôles de la protéine Tau au sein du système de reproduction masculin au travers de modèles animaux. Les souris déficientes en protéine Tau présentent un développement normal, n'affichent pas d'anomalies histologiques cérébrales et sont capables de se reproduire [15, 17], suggérant que d'autres MAPs pourraient compenser la perte de la protéine Tau. A l'avenir, l'analyse de modèles transgéniques [37, 60] pourrait permettre d'étudier l'impact de la surexpression de Tau sur la spermatogenèse.

Conflit d'intérêt: Aucun conflit d'intérêt n'a été rapporté par les auteurs.

Remerciements: Les auteurs remercient le Dr Marie-Laure Caillet-Boudin ainsi que l'équipe *Alzheimer et Tauopathies* de l'UMR-S 1172 Inserm.

Références

- [1] Arimura N, Kaibuchi K. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci.* 2007 Mar;8(3):194–205.
- [2] Ashman JB, Hall ES, Eveleth J, Boekelheide K. Tau, the neuronal heat-stable microtubule-associated protein, is also present in the cross-linked microtubule network of the testicular spermatid manchette. *Biol Reprod.* 1992;46(1):120–9.
- [3] Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow E-M, Mandelkow E. Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: Distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron.* 1993 Jul;11(1):153–63.
- [4] Billingsley M, Kincaid R. Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem J.* 1997;323:577–91.
- [5] Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VMY. Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron.* 1993 Jun;10(6):1089–99.
- [6] Brandt R, Hundelt M, Shahani N. Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: mechanisms and models. *Biol Pathobiol Tau.* 2005 Jan 3;1739(2–3):331–54.
- [7] Buée L, Bussièrre T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev.* 2000 Aug;33(1):95–130.
- [8] Burbank KS, Mitchison TJ. Microtubule dynamic instability. *Curr Biol.* 2006;16(14):R516–R517.
- [9] Cárdenas AM, Ardiles AO, Barraza N, Baéz-Matus X, Caviedes P. Role of Tau Protein in Neuronal Damage in Alzheimer's Disease and Down Syndrome. *Arch Med Res.* 2012 Nov;43(8):645–54.
- [10] Cleveland DW, Hwo S-Y, Kirschner MW. Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol.* 1977 Oct 25;116(2):207–25.

- [11] Cleveland DW, Hwo S-Y, Kirschner MW. Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol.* 1977 Oct 25;116(2):227–47.
- [12] Cole A, Meistrich ML, Cherry LM, Trostle-Weige PK. Nuclear and manchette development in spermatids of normal and *azh/azh* mutant mice. *Biol Reprod.* 1988 Mar 1;38(2):385–401.
- [13] Couchie D, Mavilia C, Georgieff IS, Liem RK, Shelanski ML, Nunez J. Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci.* 1992;89(10):4378–81.
- [14] Dadoune JP, Demoulin A. Structure et fonctions du testicule. La reproduction chez les mammifères et l'homme. In: Thibault C, Levasseur M-C (Eds.), Paris: INRA éditions, 2001; 256.
- [15] Dawson HN, Ferreira A, Eyster MV, Ghoshal N, Binder LI, Vitek MP. Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from τ deficient mice. *J Cell Sci.* 2001;114(6):1179–87.
- [16] Dehmelt L, Halpain S. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* 2005;6(1):204.
- [17] Denk F, Wade-Martins R. Knock-out and transgenic mouse models of tauopathies. *Neurobiol Aging.* 2009 Jan; 30(1):1-13.
- [18] Dolan PJ, Johnson GV. The role of tau kinases in Alzheimer's disease. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2010;13(5):595.
- [19] Drewes G, Ebner A, Preuss U, Mandelkow EM, Mandelkow E. MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell.* 1997; 89 297–308.
- [20] Drubin D, Kobayashi S, Kirschner M. Association of tau protein with microtubules in living cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1986;466(1):257–68.
- [21] Ems-McClung SC, Walczak CE. Kinesin-13s in mitosis: Key players in the spatial and temporal organization of spindle microtubules. *Semin Cell Dev Biol.* 2010; 21:276–282.
- [22] Erickson HP, O'Brien ET. Microtubule Dynamic Instability and GTP Hydrolysis. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1992 Jun 1;21(1):145–66.
- [23] Etienne-Manneville S. From signaling pathways to microtubule dynamics: the key players. *Curr Opin Cell Biol.* 2010 Feb;22(1):104–11.

- [24] Goedert M, Wischik CM, Crowther RA, Walker JE, Klug A. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci.* 1988;85(11):4051–5.
- [25] Goedert M, Spillantini M., Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 1989;3(4):519–26.
- [26] Goedert M, Spillantini MG, Crowther RA. Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci.* 1992;89(5):1983–7.
- [27] Gu Y, Oyama F, Ihara Y. τ Is Widely Expressed in Rat Tissues. *J Neurochem.* 1996;67(3):1235–44.
- [28] Hanger D. <http://cnr.iop.kcl.ac.uk/hangerlab/tautable>.
- [29] Hermo L, Pelletier R-M, Cyr DG, Smith CE. Surfing the Wave, Cycle, Life History, and Genes/Proteins Expressed by Testicular Germ Cells. Part2: Changes in Spermatid Organelles Associated With Development of Spermatozoa. *Microscopy Research and technique* 2010;279–319.
- [30] Inoue H, Hiradate Y, Shirakata Y, Kanai K, Kosaka K, Gotoh A, et al. Site-specific phosphorylation of Tau protein is associated with deacetylation of microtubules in mouse spermatogenic cells during meiosis. *FEBS Lett.* 2014 May;588(11):2003–8.
- [31] Kempf M, Clement A, Faissner A, Lee G, Brandt R. Tau binds to the distal axon early in development of polarity in a microtubule-and microfilament-dependent manner. *J Neurosci.* 1996;16(18):5583–92.
- [32] Kenner L, El-Shabrawi Y, Hutter H, Forstner M, Zatloukal K, Hoefler G, et al. Expression of three- and four-repeat tau isoforms in mouse liver. *Hepatology.* 1994 Oct 1;20(4):1086–9.
- [33] Kierszenbaum AL. Intramanchette transport (IMT): Managing the making of the spermatid head, centrosome, and tail. *Mol Reprod Dev.* 2002 Sep;63(1):1–4.
- [34] Kierszenbaum AL, Tres LL. The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol.* 2004;67(4):271–84.

- [35] Kitajima TS, Ohsugi M, Ellenberg J. Complete Kinetochore Tracking Reveals Error-Prone Homologous Chromosome Biorientation in Mammalian Oocytes. *Cell*. 2011 Aug;146(4):568–81.
- [36] Lalli G. Regulation of neuronal polarity. *Exp Cell Res*. 2014 Nov 1;328(2):267-75.
- [37] Lee VM-Y, Kenyon TK, Trojanowski JQ. Transgenic animal models of tauopathies. *Biol Pathobiol Tau*. 2005 Jan 3;1739(2–3):251–9.
- [38] Liao H, Li Y, Brautigan DL, Gundersen GG. Protein Phosphatase 1 Is Targeted to Microtubules by the Microtubule-associated Protein Tau. *J Biol Chem*. 1998 Aug 21;273(34):21901–8.
- [39] Lindwall G, Cole RD. Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem*. 1984 Apr 25;259(8):5301–5.
- [40] Loveland KL, Herszfeld D, Chu B, Rames E, Christy E, Briggs LJ, et al. Novel Low Molecular Weight Microtubule-associated Protein-2 Isoforms Contain a Functional Nuclear Localization Sequence. *J Biol Chem*. 1999 Jul 2;274(27):19261–8.
- [41] Mandelkow E, Mandelkow E-M. Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 1995;7(1):72–81.
- [42] Mandelkow E-M, Mandelkow E. Biochemistry and Cell Biology of Tau Protein in Neurofibrillary Degeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Jul 1;2(7):a006247–a006247.
- [43] Meunier S, Vernos I. Microtubule assembly during mitosis - from distinct origins to distinct functions? *J Cell Sci*. 2012 Jun 15;125(12):2805–14.
- [44] Mochida K, Tres LL, Kierszenbaum AL. Structural and biochemical features of fractionated spermatid manchettes and sperm axonemes of the *Azh/Azh* mutant mouse. *Mol Reprod Dev*. 1999 Apr 1;52(4):434–44.
- [45] Morita T, Sobue K. Specification of Neuronal Polarity Regulated by Local Translation of CRMP2 and Tau via the mTOR-p70S6K Pathway. *J Biol Chem*. 2009 Oct 2;284(40):27734–45.
- [46] Morris M, Maeda S, Vossel K, Mucke L. The Many Faces of Tau. *Neuron*. 2011 May;70(3):410–26.
- [47] Musch A. Microtubule organization and function in epithelial cells. *Traffic*. 2004; 5:1–9.
- [48] O'Donnell L, O'Bryan MK. Microtubules and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2014 Jun;30:45-54.
- [49] Ravel C, Jaillard S. The Sertoli cell. *Morphologie*. 2011 Dec;95(311):151-8.

- [50] Redenbach DM, Vogl AW. Microtubule polarity in Sertoli cells: a model for microtubule-based spermatid transport. 1991. *Eur J Cell Biol.* 54, 277–290.
- [51] Reynolds CH, Garwood CJ, Wray S, Price C, Kellie S, Perera T, et al. Phosphorylation Regulates Tau Interactions with Src Homology 3 Domains of Phosphatidylinositol 3-Kinase, Phospholipase C 1, Grb2, and Src Family Kinases. *J Biol Chem.* 2008 Jun 27;283(26):18177–86.
- [52] Sergeant N, Bussière T, Vermersch P, Lejeune JP, Delacourte A. Isoelectric point differentiates PHF-tau from biopsy-derived human brain tau proteins. *NeuroReport* . 1995;6(16).
- [53] Sergeant N, Bretteville A, Hamdane M, Caillet-Boudin M-L, Grognet P, Bombois S, et al. Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev Proteomics.* 2008 Apr 1;5(2):207–24.
- [54] Sigala J, Jumeau F, Caillet-Boudin M-L, Sergeant N, Ballot C, Rigot J-M, et al. Immunodetection of Tau microtubule-associated protein in human sperm and testis. *Asian J Androl.* 2014 Nov-Dec;16(6):927-8.
- [55] Sontag E. Molecular Interactions among Protein Phosphatase 2A, Tau, and Microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies. *J Biol Chem.* 1999 Sep 3;274(36):25490–8.
- [56] Sperry AO. The dynamic cytoskeleton of the developing male germ cell. *Biol Cell.* 2012 May;104(5):297–305.
- [57] Su X, Ohi R, Pellman D. Move in for the kill: motile microtubule regulators. *Trends Cell Biol.* 2012 Nov;22(11):567–75.
- [58] Tang EI, Mruk DD, Cheng CY. MAP/microtubule affinity-regulating kinases, microtubule dynamics, and spermatogenesis. *J Endocrinol.* 2013 Apr 15;217(2):R13–R23.
- [59] Tassan JP & Le Goff X 2004 An overview of the KIN1/PAR-1/MARKkinase family. *Biology of the Cell* 96 193–199.
- [60] Van der Jeugd A, Blum D, Raison S, Eddarkaoui S, Buée L, D'Hooge R. Observations in THY-Tau22 mice that resemble behavioral and psychological signs and symptoms of dementia. *Behav Brain Res.* 2013 Apr;242:34–9.
- [61] Vanier M-T, Neuville P, Michalik L, Launay J-F. Expression of specific tau exons in normal and tumoral pancreatic acinar cells. *J Cell Sci.* 1998;111(10):1419–32.

- [62] Walczak CE, Heald R. Mechanisms of Mitotic Spindle Assembly and Function. In: Kwang W. Jeon, editor. International Review of Cytology. Academic Press; 2008. p. 111–58.
- [63] Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo S-Y, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. Proc Natl Acad Sci. 1975;72(5):1858–62.

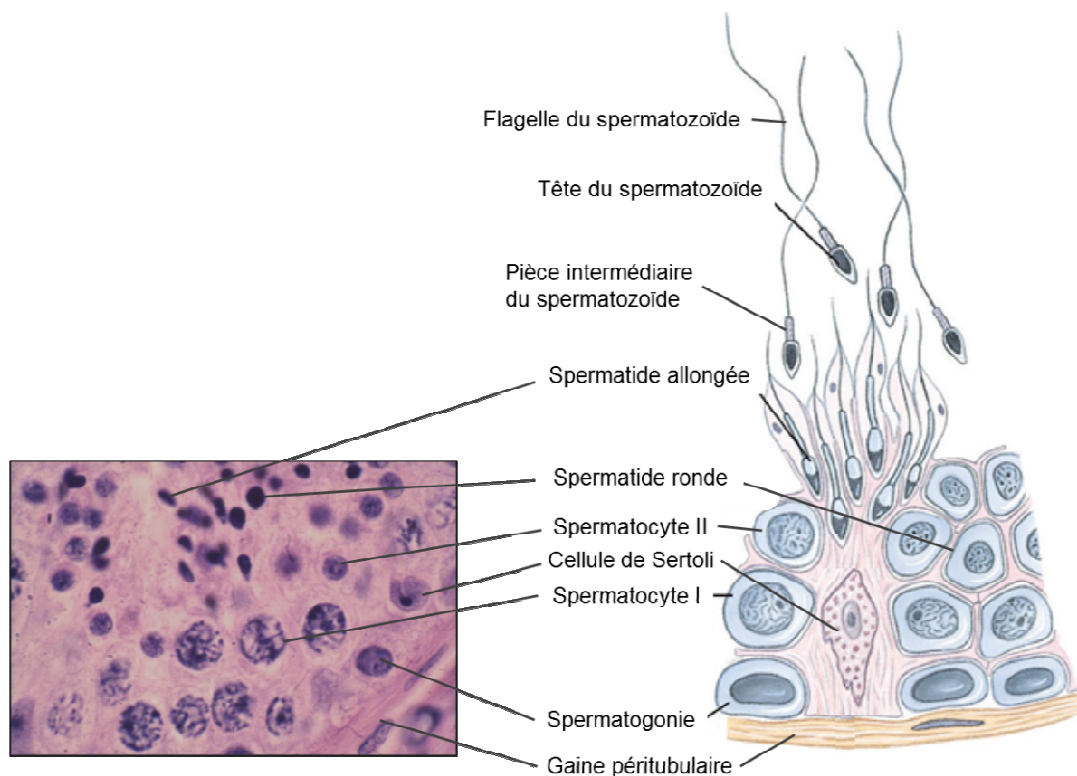


Figure 1: Structure du tube séminifère du testicule humain. Adapté de © De Boeck Université, 2007.

Figure 1: Structure of the seminiferous tubule in the human testis. Adapted from © De Boeck Université, 2007.

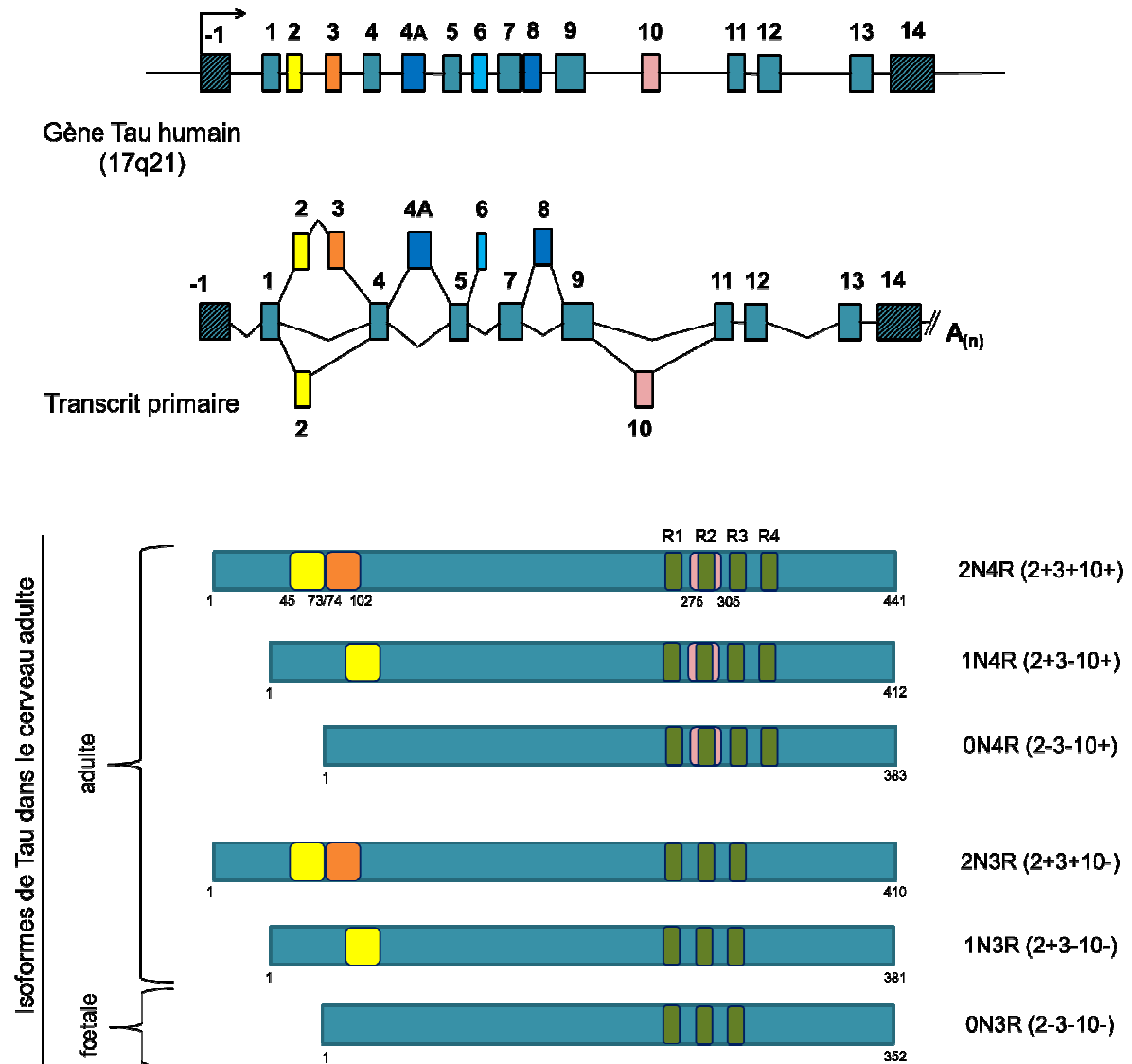


Figure 2: Représentation schématique du gène de la protéine Tau humaine, du transcrit primaire et des six isoformes majoritaires issues de l'épissage alternatif dans le cerveau adulte humain. Adapté de Sergeant *et al.* [53].

Figure 2: Schematic representation of the gene of human Tau protein, of the primary transcript and of the six main isoforms issued from the alternative splicing in the adult human brain. Adapted from Sergeant *et al.* [53].

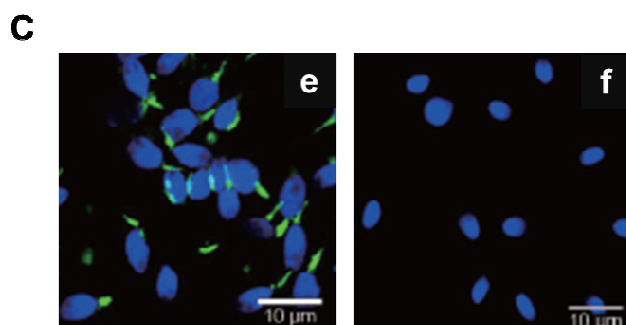
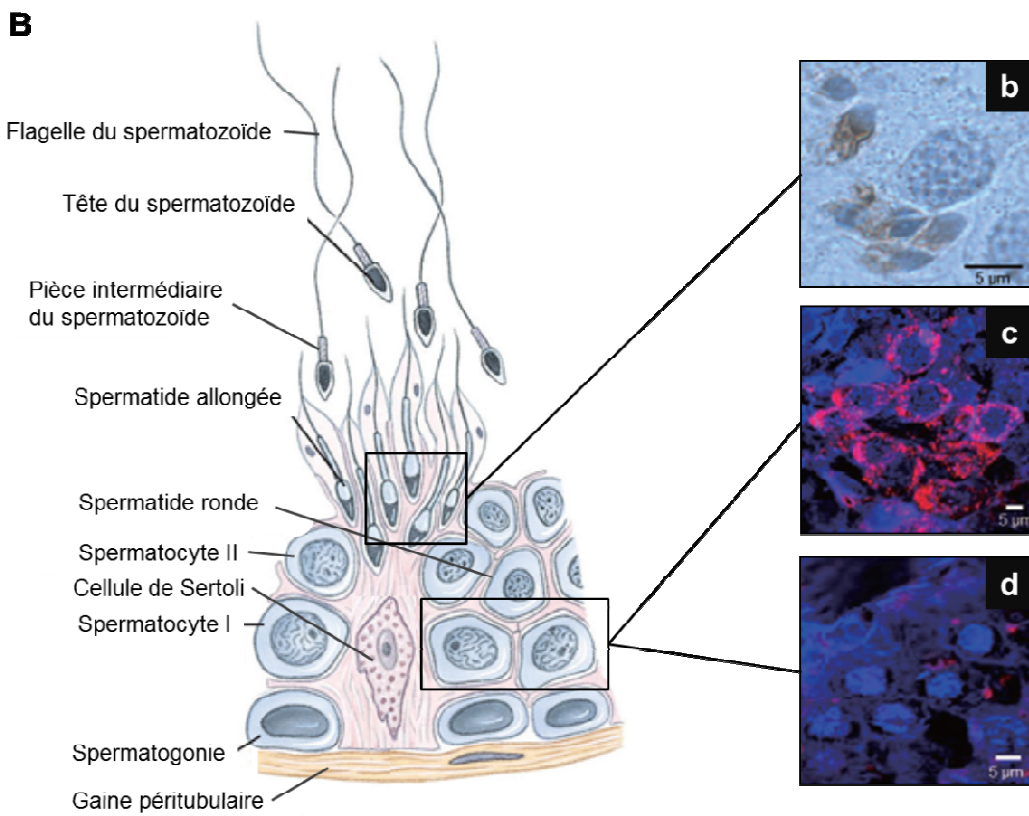
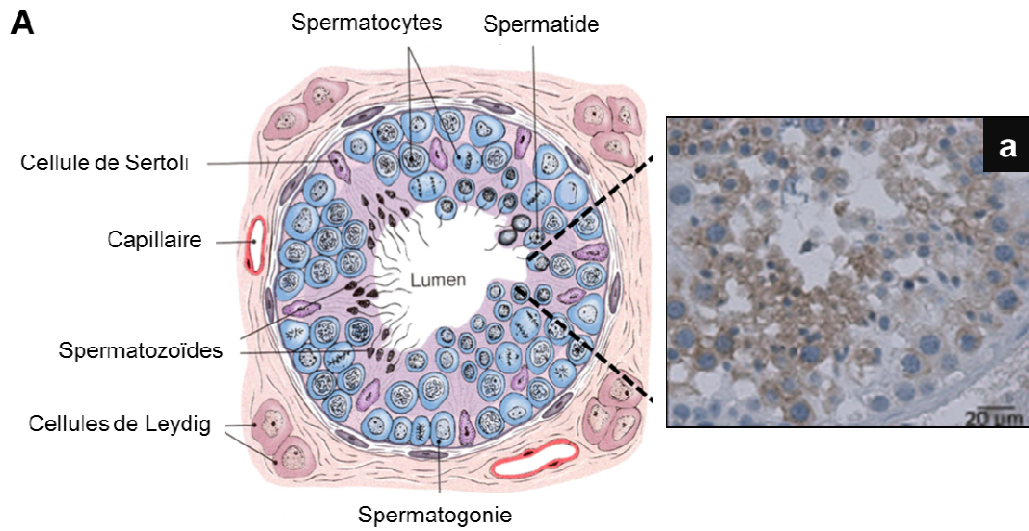


Figure 3: Tissu testiculaire humain (**A, B**) et spermatozoïdes éjaculés (**C**) traités avec un anticorps anti-Tau (**a-c, e**) et contrôles (**d, f**).

(**a**) Dans le tissu testiculaire, le marquage est observé aux stades spermatocyte et spermatide. (**b**) Dans les spermatides en élongation, le marquage se situe à l'arrière du noyau. (**c**) Dans les spermatocytes, le marquage fluorescent est cytoplasmique périnucléaire. (**e**) Dans les spermatozoïdes, le marquage fluorescent est observé dans la pièce intermédiaire. Adapté de Sigala *et al.* [54] et © De Boeck Université, 2007.

Figure 3: Micrographs of human testicular tissue (**A, B**) and ejaculated sperm (**C**) treated with anti-Tau antibody (**a-c, e**) and controls (**d, f**).

(**a**) In testicular tissue, Tau immunoreactivity is observed in both spermatocytes and spermatids. (**b**) In elongated spermatids, the immunolabelled zone is located behind the nucleus. (**c**) In spermatocytes, cytoplasmic fluorescent dots are located all around the nucleus. (**e**) In spermatozoa, fluorescent Tau labelling is observed in the midpiece. Adapted from Sigala *et al.* [54] and © De Boeck Université, 2007.

Tableau 1: Epissage alternatif des transcrits de Tau dans le testicule et le cortex cérébral de rat [27]. Les isoformes majoritaires sont inscrites en caractères gras.

Table 1: Alternative splicing of the Tau transcripts in the rat testis and cerebral cortex [27]. The principal isoformes are underlying in bold.

Exons soumis à l'épissage alternatif	Testicule rat	Cortex cérébral rat
Exons 2 et 3	0N	0N
	1N	1N
	2N	2N
Exon 10	3R	3R
	4R	4R
Exon 4A	4A-	4A-
	4A+	4A+

DISCUSSION Articles 1 et 2

Dans ce travail, nous avons rapporté l'expression de la protéine Tau, protéine associée aux microtubules, largement décrite dans la littérature, à la fois dans le testicule humain et dans le spermatozoïde humain mature. De plus, nous avons enrichi la littérature scientifique sur la protéine Tau en proposant une revue traitant de l'expression, de la localisation et des rôles putatifs de cette protéine dans le testicule et le spermatozoïde.

L'épithélium des tubes séminifères chez les mammifères possède un vaste réseau de microtubules, présents au niveau des cellules de Sertoli, des cellules spermatiques et des spermatozoïdes, notamment au niveau de la manchette, de l'axonème, et des fuseaux méiotiques et mitotiques (Ashman *et al.*, 1992). Les microtubules présentent des morphologies et des rôles différents (Ashman *et al.*, 1992). Au cours de l'élongation nucléaire au stade spermatide (Kierszenbaum & Tres, 2004), il se forme une structure transitoire : la manchette. Il s'agit d'une gaine composée de microtubules et de protéines associées aux microtubules. Les microtubules contenus dans la manchette apparaissent lorsque la spermatide commence à s'allonger et disparaissent avant la fin de l'élongation et de la condensation du noyau spermatique (Hermo *et al.*, 2010). Le cercle péri-nucléaire, dont la structure est identique à la manchette, entoure la base du noyau en élongation et joue un rôle dans la forme du noyau et la tête du spermatozoïde (Kierszenbaum & Tres, 2004). On remarque donc que l'allongement des spermatides est régulé par un vaste réseau de microtubules : axonème, manchette, cercle péri-centrique. Notre travail met en évidence la présence de la protéine Tau dans le testicule humain aux stades de spermatocyte et de spermatide allongée. Le marquage se situe à la périphérie des cellules. Ces résultats sont en accord avec ceux d'Ashman et collaborateurs (Ashman *et al.*, 1992) qui ont montré une localisation de la protéine Tau au niveau de la manchette des spermatides en élongation chez le bœuf. Si nous ne sommes pas en mesure d'affirmer avec autant de précision la localisation de la protéine dans les cellules spermatiques, nos résultats retrouvent la protéine à ce même stade de la spermatogenèse chez l'homme. La détection de la protéine Tau à cette étape de la spermatogenèse pourrait donc être en faveur d'une action de la protéine au moment de la mise en place de la manchette et de l'allongement du spermatozoïde. Or il a été montré qu'une formation défectueuse de la manchette est une cause d'infertilité (Mochida *et al.*, 1999). Chez les souris homozygotes pour la mutation « abnormal spermatozoon head shape » (azh), les spermatides allongées présentent une manchette anormale au niveau du cercle péri-nucléaire

et 100 % des têtes spermatiques sont de forme anormale. Dans le spermatozoïde mature, en revanche, la protéine est localisée dans la pièce intermédiaire. Ces résultats permettent d'envisager de poursuivre ce travail en microscopie électronique pour une analyse plus fine des spermatozoïdes et de la pièce intermédiaire en immunocytochimie.

Les hypothèses sur l'implication et le rôle de la protéine Tau suite à nos observations lors de ce travail doivent cependant être émises avec une certaine prudence. En effet, au cours d'un précédent travail de notre équipe sur la protéine Tau (Master 2 Recherche), nous avons eu recours à des souris KO *tau*, notamment pour évaluer la production spermatique et la mobilité des spermatozoïdes épидидymaires murins. En comparant la concentration et la mobilité en spermatozoïdes entre des souris wild-type, hétérozygote et KO *tau*, nous n'avons pas relevé de différence notable pour ces 2 paramètres entre les 3 catégories de souris. L'hypothèse que nous avons émise est que la protéine Tau au niveau testiculaire interviendrait assez peu dans la spermatogenèse. Cependant, nous ne pouvons pas non plus écarter la possibilité d'un système de compensation au niveau testiculaire en cas d'absence de protéine Tau. Des systèmes de compensation ont déjà été observés dans le spermatozoïde, notamment dans la manchette (Kierszenbaum *et al.*, 2003). Kierszenbaum et collaborateurs ont avancé que le fait de retrouver de F-actine dans la manchette suggère l'existence d'un mécanisme de transport de protéines concomitant, basé à la fois sur les microtubules et sur l'actine, qui permettrait d'assurer les « cargaisons de protéines » via l'IMT (pour *intramanchette transport*). Nous pouvons donc penser que l'absence de la protéine Tau puisse être compensée par un mécanisme secondaire ou de secours.

Les études sur la protéine Tau au niveau testiculaire sont très peu nombreuses dans la littérature. Nos travaux montrent que cette protéine est présente dans ce tissu. Ils pourraient donc être le point de départ d'études sur le rôle éventuel de la présence de Tau dans la spermatogenèse chez l'homme, même si nos premiers résultats n'ont pas permis d'en mettre en évidence.

Article 3

Associations between progressive motility, the human sperm proteome and A-kinase anchor protein 4

Jumeau F*, **Sigala J***, Fernandez-Gomez FJ, Carpentier C, Obriot H,
Eddarkaoui S, Duban-Deweer S, Hachani J, Rigot JM, Buée L,
Devos P, Béhal H, Sergeant N**, Mitchell V**.

* et** : ces auteurs ont respectivement contribué de façon égalitaire à ce travail.

Reprod Biomed Online, *en soumission*.

Au cours des travaux préliminaires de notre équipe, l'étude « sans a priori » du protéome global de 161 échantillons individuels de spermatozoïdes a permis de définir 2 profils protéiques distincts : un profil « non protéolysé » (protéome A) et un profil « protéolysé » (protéome B). La mobilité progressive des échantillons de spermatozoïdes présentant un profil A était significativement plus élevée que celle du protéome B, tout en restant dans les limites de normalité définies par l'OMS (World Health Organization, 2010). Un marqueur biologique qualitatif majoritaire a pu être mis en évidence par spectrométrie de masse en lien avec cette protéolyse : la protéine AKAP4. Cette protéine étant spécifique de la cellule spermatique, nous nous sommes focalisés en priorité sur cette protéine. Les premiers résultats ont donc montré que le protéome global du spermatozoïde humain était corroboré avec l'expression de l'AKAP4 et en corrélation avec la mobilité spermatique. Partant de ce constat, nous avons émis l'hypothèse que l'expression et la quantification de la protéine AKAP4 pourraient représenter un test d'évaluation complémentaire de la qualité spermatique chez les patients infertiles.

Pour répondre à cette question, nous avons exploité la cohorte de 161 échantillons dont le protéome global a été évalué au cours du travail précédent, afin de caractériser et quantifier les niveaux d'expression de l'AKAP4 par immunoempreinte. Une analyse de classification hiérarchique a ensuite été appliquée aux différents produits de l'AKAP4 ainsi qu'aux variables spermatiques.

L'analyse de l'expression de l'AKAP4 a montré des profils d'expression distincts, caractérisés principalement par des différences entre les produits de protéolyse. La protéine AKAP4 (85 kDa) et la pro-AKAP4 (110 kDa) ont été détectées dans tous les échantillons de sperme provenant du protéome A. Dans les échantillons de spermatozoïdes du protéome B, différents produits de dégradation ont été observés (35, 45 et 60 kDa). Après quantification, nous observons que la pro-AKAP4 est positivement corrélée avec la mobilité progressive des spermatozoïdes sélectionnés par gradient de densité ($p = 0,0464$), tandis que les fragments protéolytiques AKAP4 sont corrélés avec le nombre de spermatozoïdes.

Malgré de nombreuses observations d'importance, cette étude n'a pas permis de fournir une explication mécanistique de la protéolyse de l'AKAP4. Nos résultats ont mis en évidence que le protéome spermatique humain et la protéolyse de l'AKAP4 peuvent différer entre des individus. De plus, nous observons que ce n'est pas directement l'intégrité de la protéine AKAP4 qui est un indicateur positif de la mobilité spermatique mais celle de son précurseur,

la pro-AKAP4. Cela suggère que le protéome spermatique humain et l'expression de l'AKAP4/pro-AKAP4 pourraient contribuer à l'établissement d'un test moléculaire afin d'évaluer la qualité du spermatozoïde chez les patients infertiles. Ce travail correspond à **l'article 3**.

Associations between progressive motility, the human sperm proteome and A-kinase anchor protein 4

Jumeau F^{1,2,3*¥}, Sigala J^{1,2,3*}, Fernandez-Gomez FJ³, Carpentier C³, Eddarkaoui S³, Obriot H³, Duban-Deweert S⁴, Hachani J⁴, Rigot JM^{1,5}, Buée L³, Devos P⁶, Béhal H⁶, Sergeant N^{3**}, Mitchell V^{1,2**}

¹ University of Lille, EA 4308 - GQG – Gametogenesis and gamete quality, F-59000 Lille, France

² CHU Lille, Reproductive Biology – Spermiology – CECOS Institute, F-59000 Lille, France

³ University of Lille, INSERM, CHU Lille, UMR-S 1172, Alzheimer & Tauopathies, F-59000 Lille, France

⁴ University of Artois, EA 2465 - LBHE Blood-Brain Barrier Laboratory, F-62307 Lens, France

⁵ CHU Lille, Andrology Department, F-59000 Lille, France

⁶ University of Lille, CHU Lille, EA 2694 - Santé publique: épidémiologie et qualité des soins, F-59000 Lille, France

¥ Present address: Reproductive Biology Laboratory - CECOS, Rouen University Hospital, Rouen University, F-76031 Rouen, France.

Corresponding author:

valerie.mitchell@chru-lille.fr

*: these authors should be regarded as joint first authors

** : these authors contributed equally to the present work.

Short title: AKAP4 and human sperm motility

Abstract

This study was designed to investigate whether sperm parameters are related to the sperm proteome and the processing of A-kinase anchor protein 4 (AKAP4). One hundred and sixty-one individual sperm samples were analyzed with one-dimensional (1-D) gel electrophoresis. Major differences between samples (including the levels of A-kinase anchor protein 4 (AKAP4)) were characterized by mass spectrometry. AKAP4 expression was further investigated by Western blotting of sperm. Sperm samples showed distinct proteome patterns, characterized by intense bands (group A) or weak bands (group B) in the 80-110 kDa molecular weight range. Progressive sperm motility was significantly higher in group A than in group B ($p=0.025$). AKAP4 showed several distinct expression patterns, which were mainly characterized by differences in proteolysis products. Levels of a 100 kDa AKAP4 protein comprising the pro-domain were positively correlated with the progressive motility of separated spermatozoa ($p=0.046$). Levels of AKAP4 proteolytic fragments of 35, 45 and 60 kDa and the cumulative level of 35, 45, 60, 80 and 100 kDa fragments were correlated with the sperm concentration ($p<0.001$). Our results suggest that the sperm proteome profile and the AKAP4 processing patterns could serve as the basis of a clinically valuable molecular assay for sperm motility.

Study funding and competing interest(s): This study was funded by a PhD grant from Lille University Hospital (awarded to Fanny Jumeau) and a grant from the French Ministry of Health (Clinical Research Hospital Program 2009; no. 2009_07). LB, VM and NS are co-founders of the SPQI spin-off involved in biomarkers research in male infertility

Keywords: sperm, motility, proteome, AKAP4

INTRODUCTION

Semen analysis is of fundamental importance in the characterization and diagnosis of male infertility. The routine evaluation of semen usually included a descriptive, qualitative analysis of semen volume and pH, and sperm concentration, vitality, motility and morphology (Aitken, 2006; Lewis, 2007). However, spermatozoa in the ejaculate display considerable heterogeneity in many respects, and some infertility-related aspects of sperm dysfunction are not always apparent in a conventional semen analysis (Chi et al., 2004; Pixton, 2004; Turek, 2005). Indeed, some infertile men may have a normal sperm analysis. Hence, idiopathic infertility (Kumar et al., 2006) is diagnosed in about half of all men consulting in andrology clinics (Holt and Van Look, 2004; Krausz, 2011). The current limitations of conventional sperm analysis has highlighted the need for better markers of sperm quality in general and the live birth rate (by means of natural conception or assisted reproduction) in particular.

Given that protein synthesis is quiescent in spermatozoa, assessment of the sperm proteome provides quantitative and qualitative information on key regulators of sperm function. Much effort has been focused on several specific sperm proteins in an attempt to identify biomarkers of relevance to specific sperm functions (such as the regulation of motility, capacitation, acrosome reaction, and fertilization) and thus male infertility. A number of researchers have studied the sperm proteome in infertile patients (Xu et al., 2012) and have sought to identify correlations between levels of human sperm proteins and other sperm parameters (de Mateo et al., 2007). Other studies have characterized sperm proteins in infertile men with normal sperm parameters (Pixton, 2004; Frapsauce et al., 2014; Légaré et al., 2014). However, the proteomes of individual sperm samples have rarely been systematically analyzed (Jumeau et al., 2015). With regard to conventional semen parameters, some studies have focused on nucleoproteins (Torregrosa et al., 2006; de Mateo et al., 2007; de Mateo et al., 2009). In contrast, Silva (Silva et al., 2015) studied the association between semen parameters and the activation of specific signaling pathways.

In the present study, we systematically assessed the proteome (using one-dimensional (1D) polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)) of 161 individual sperm samples from men undergoing routine semen analysis in our assisted reproduction unit. High-molecular-weight proteins from the 1D gels were further characterized by mass spectrometry. A-kinase anchor protein 4 (AKAP4) was formally identified as being responsible for differences between samples, and so was further investigated by Western blotting. A hierarchical clustering

procedure was used to study the correlation between AKAP4 products and routine parameters in both non-processed spermatozoa and separated spermatozoa.

MATERIALS AND METHODS

Ethical approval

One hundred and sixty-one sperm samples from patients undergoing routine semen analysis in the Assisted Reproduction Unit at Lille University Medical Center (Lille, France) were subjected to a proteomics analysis (Fig. 1). The participants provided their informed consent to the use of their semen samples for research purposes. The study protocol was approved by the local investigational review board (*Comite de Protection des Personnes Nord Ouest IV HP 16/53*, Lille, France). The study was conducted in accordance with Lille University Medical Center's regulations on clinical research.

Subjects

Individual, non-pooled, fresh semen samples were used. None of the men had known infectious diseases no had taken medications that could have interfered with semen parameters. Standard semen analysis was performed according to the World Health Organization guidelines (World Health Organization, 2010). Spermatozoa were separated from the seminal plasma by density gradient centrifugation through 45/90% PureSperm (Nidacon, Mölndal, Sweden) / Fercult (Fertipro, Beernem, Belgium) media. A 1 mL aliquot of each fresh semen sample was prepared for the proteomics analysis as reported in Jumeau et al. (2015).

Preparation of sperm proteins for the proteomics analysis

First, seminal plasma, immature germ cells, and non-sperm cells were removed by centrifugation ($350 \times g$, 20 min at room temperature) through 50% PureSperm / Fercult (Jumeau et al., 2015). Next, the sperm pellet was gently washed once by resuspension in 1 mL of Tris-buffered saline (TBS: 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 100 mM NaCl) and further centrifugation ($350 \times g$, 20 min at room temperature). The sperm pellet was then resuspended in 500 μ L of lysis buffer containing 20 mM Tris, 2% SDS and 1% Nuclease Mix (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA). Lysates were sonicated on ice (40 Hz, 60 pulses) and centrifuged ($14,000 \times g$, 20 min at 4°C). The supernatants were recovered and pellets were discarded. The protein concentration was assayed according to Bradford's

method (BioRad, Hercules, CA, USA), according to the kit manufacturer's instructions. Protein lysates were stored at -80°C prior to analysis. For comparative purposes, the same procedure was used to extract proteins from a human glioblastoma cell line (T98).

One-dimensional SDS-PAGE

A total of 15 μg of protein from each individual sperm sample or each T98 cell extract was diluted in lithium dodecyl sulfate buffer (LDS 2 \times , Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Protein homogenates were boiled for 10 min, quickly spun at $500 \times g$ (using a bench centrifuge) and loaded onto a 4-12% acrylamide gel (NuPage® Bis-Tris PreCast 12 wells, Life Technologies). Molecular weight markers (Novex and Magic Marks, Life Technologies) were loaded into the first well. Electrophoresis was performed with a constant voltage of 200 V for 1 h. Polyacrylamide gels were stained with Coomassie Blue reagent (0.1% Blue G250 (BioRad, Hercules, CA, USA), 50% ethanol (v/v), 10% acetic acid (v/v) and H_2O). Protein staining was visualized after destaining with 7% (v/v) acetic acid and 10% ethanol in H_2O . The gels were digitized with a Perfection V750 Pro scanner (Epson France, Levallois-Perret, France) and Photoshop Element 9 Software (Adobe, Paris, France). Coomassie-Blue-stained 1D gel protein patterns were analyzed and bands were quantified using ImageJ software (Schneider et al., 2012). Band intensities (corresponding to the surface under the peak) were expressed in arbitrary units.

NanoLC matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)-TOF-MS/MS experiments and protein identification

Coomassie-Blue-stained protein bands were further trypsinized. Nanoseparation was performed with a U3000 nano high performance liquid chromatography system (Dionex-LC-Packings, Sunnyvale, CA, USA). After a pre-concentration step (using a C18 cartridge, 300 μm , 1 mm), peptide samples were separated on a Pepmap C18 column (75 μm , 15 cm) by applying an acetonitrile/0.1% TFA gradient: 0% acetonitrile for 3 minutes, 0% to 15% over 7 minutes, 15% to 65% over 42 minutes, 65% to 90% over 5 minutes and, lastly, 90% acetonitrile for 6 minutes. The flow rate was set to 300 nL/min, and fractions were automatically collected every 30 seconds (giving 110 in all) on an AnchorChip™ MALDI target using a Proteineer™ FC fraction collector (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Two

μl of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix (0.3 mg/mL in acetone:ethanol; 0.1% TFA-acidified water, 3:6:1 v/v/v) were added during the collection step. Mass spectrometry (MS) and MS/MS measurements were performed off-line using an Ultraflex™ II time-of-flight (TOF)/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The spectrometer's parameters are given in the following section. Peptide fragmentation was driven by Warp LC™ software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), according to the following parameters: signal-to-noise ratio >15, more than three MS/MS steps per fraction if an MS signal was available, 0.15 Da tolerance for peak merge, and the elimination of peaks that appeared in more than 35% of the fractions. Identification of the proteins is described below.

Molecular mass measurements were performed in automatic mode (using FlexControl™ 3.0 software) on an Ultraflex™ II TOF/TOF instrument, in reflectron mode for MALDI-TOF peptide mass fingerprinting (PMF) or in “LIFT” mode for MALDI-TOF/TOF peptide fragmentation fingerprinting (PFF). External calibration over a 1000–3200 mass range was performed using $[M + H]^+$ + monoisotopic ions of bradykinin 1–7, angiotensin I, angiotensin II, substance P, bombesin and adrenocorticotrophic hormone (clip 1–17 and clip 18–39) using a peptide calibration standard kit (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Briefly, MS spectra were obtained with an accelerating voltage of 25 kV, a reflector voltage of 26.3 kV and a pulsed ion extraction of 160 ns. Each individual spectrum was produced by accumulating data from 800 laser shots. A maximum of five precursor ions per sample was chosen for LIFT-TOF/TOF MS/MS analysis. Precursor ions were accelerated to 8 kV and selected in a timed ion gate. Metastable ions generated by laser-induced decomposition were further accelerated by applying 19 kV in the LIFT cell, and their masses were measured in reflectron mode. Peak lists from MS and MS/MS spectra were generated using Flexanalysis™ 3.3 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Combined PMF and PFF searches in the UnitProt 2012_06_database (ProteinScape™ 2.1, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) were performed with Mascot 2.3.02 (Matrix Science Ltd, London, UK). Taxonomic analysis was restricted to human sequences. A mass tolerance of 75 ppm and 1 missing cleavage site (for PMF) and an MS/MS tolerance of 0.5 Da and 1 missing cleavage site (for MS/MS) were allowed. Carbamidomethylation of cysteine and oxidation of methionine residues were considered to be fixed and variable modifications, respectively. The relevance of protein identities was judged according to the probability-based molecular weight search score; the threshold for statistical significance was set to $p < 0.05$.

Immunoblotting and quantification

The levels of AKAP4 were further studied using Western blots. After SDS-PAGE, sperm proteins were transferred onto 0.45 μm nitrocellulose membranes (Amersham, Life Science GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) using the NuPage Liquid Transfer System (Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. Membranes were blocked in 5% skimmed milk in Tris-HCl 15 mM pH 8.0/NaCl 140 mM/0.05%; w/v / Tween-20 (TNT buffer). Membranes were incubated with the mouse AKAP4 amino-terminal antibody (AKAP4 N-ter, 1:10000 in 1% bovine serum albumin (BSA)/TBS; Ab 56551, Abcam, Cambridge, UK), goat AKAP4 carboxy-terminal antibody (AKAP4 C-ter, 1:5000 in 1% BSA/TBS; Sc-66308, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) overnight at 4°C with rotation. Immune complexes were revealed after incubation with secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (horse anti-mouse: 1:50000 in TNT; horse anti-goat: 1:20000 in TNT (Vector Laboratories, Burlingame, CA USA)) and detected using the ECL™ chemiluminescence kit (Amersham, Life Science GE Healthcare). The luminescence of immune complexes was measured with a LAS-3000 system (Fujifilm, Stamford, CT, USA), and Western blot densitometry was performed using ImageJ software (NIH). Protein loading equivalency was confirmed using rabbit anti-histone H3 antibodies (1:2000 in TNT; Millipore, Billerica, MA, USA).

Immunofluorescence on fixed spermatozoa

Human spermatozoa were fixed in 2% paraformaldehyde in TBS for 15 min at room temperature. After centrifugation (10 min, 350 x g), the seminal supernatant was removed. The sperm pellet was suspended in TBS, washed twice by centrifugation (10 min, 350 x g) and resuspended in 100 μL of TBS. A drop was placed on a Superfrost® slide (Menzel-Glazer, Braunschweig, Germany). Slides were dried for 2 h and placed in an acetone bath for 5 min, washed twice in TBS 1x (5 min) and incubated with the blocking solution containing 0.2% BSA in TBS for 1 h at room temperature. One hundred μL of primary antibody (AKAP4 N-ter diluted 1:500 and C-ter diluted 1:400) diluted in TBS 1x were incubated overnight at 4°C. The slides were then washed twice for 5 min in TBS. Alexa secondary antibodies 568 and 488 (Molecular Probes, Life Technologies) were diluted in TBS 1x (1:400) and slides were incubated for 1 h at room temperature. Slides were washed twice (for 5 min) in TBS 1x. Next, slides were mounted with Vectashield Mounting Medium with 4',6'-

diamidino-2-phenylindole (H-1200, Vector Laboratories, Burlingame, NY, USA), according to the manufacturer's instructions. The slides were imaged with an LSM 710 confocal microscope (Zeiss, Jena, Germany). Acquisitions were performed in sequential mode and analyzed with Zeiss Efficient Navigation confocal software (Zeiss). To test for non-specific binding, the primary antibodies were omitted from control incubations.

Statistical analysis

All the experiments reported here were replicated at least twice using independent samples. Statistical analysis was performed using SAS software (version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). In a descriptive analysis, quantitative data were presented as the median (interquartile range). The normality of the data distribution was checked with a Shapiro Wilk test. Due to the lack of normality, non-parametric statistical methods were applied (the Mann-Whitney test and Spearman's correlation coefficient). In order to identify clusters of parameters potentially correlated, a hierarchical clustering analysis was performed on parameters (using Euclidian metrics and Ward's method). Correlations were then studied between parameters within clusters highlighted. The threshold for statistical significance was set to $p < 0.05$.

RESULTS

Semen analysis

The median (interquartile range) age of the study population (n=161) was 34 (31-38) years, the sperm concentration ($\times 10^6/\text{mL}$) was 85.0 (55.7-125), the total sperm count ($\times 10^6/\text{ejaculate}$) was 319.3 (220.8-497.5), the progressive (PR) motility was 55 (45-60), and the proportion of morphologically normal forms (in %) was 34 (26.5-43.0). The median (interquartile range) sperm concentration ($\times 10^6/\text{mL}$) after density gradient centrifugation was 46.8 (17.5-77.2) and the median PR motility (in %) was 85 (70-90).

The electrophoretic protein pattern differs from one semen sample to another

To evaluate the sperm proteome as a potential indicator of sperm quality (in comparison with sperm parameters), we analyzed Coomassie-blue-stained 1D gels (Fig. 2A). The protein composition differed from one semen sample to another but there were two major proteome patterns. The first pattern corresponded to the presence of intense protein bands at 110 and 80 kDa (a representative pattern is shown in Fig. 2A, lane SPZ A). These samples (n=80 out of 161; 49.6%) were classified as “group A”. The second proteome pattern (n=81 out of 161; 50.4%) was characterized by a substantially lower intensity or the absence of bands at 110 and 80 kDa (lane SPZ B in Fig. 2A). These samples were classified as “group B”. Less strongly stained bands at molecular weights below 60 kDa were also observed in group B and were suggestive of a proteolytic process. However, the addition of a protease inhibitor cocktail during the sperm preparation did not change the number and intensity of bands observed on Coomassie-Blue-stained gels in either group A or group B (Fig. 2B).

The electrophoretic sperm protein pattern is correlated with sperm parameters

We next looked at whether or not the electrophoretic sperm protein pattern was correlated with other sperm parameters (Table I). Groups A and B did not differ significantly in terms of the median (interquartile range) age (34 (30-37) and 35 (31-39) years, respectively; $p=0.147$). The PR motility (in %) was significantly higher ($p=0.025$) in group A (55 (45-60)) than in group B (50 (40-60)). The proportion of morphologically normal forms (in %) was similar in groups A and B (34 (28-43) and 34 (26-43), respectively; $p=0.789$).

Mass spectrometry identification of AKAP4

The intensely Coomassie-blue-stained protein bands at 110 and 80 kDa in group A were removed from the gels and (after trypsin digestion) analyzed using NanoLC-MALDI-TOF-MS/MS. Six proteins were identified (Table II): keratin type II, A-kinase anchor protein 3 (AKAP3), glial fibrillary acidic protein, hexokinase 1, A-kinase anchor protein 4 (AKAP4) and angiotensin-converting enzyme. Given the statistically significant difference in PR motility between group A and group B samples in one hand (Table I) and the major proteins involved in sperm motility on the other (Eddy et al., 2003), we hypothesized that differences between groups A and B could be related to differences in AKAP4 protein expression. To this end, we analyzed AKAP4 levels by Western blotting of the 1D SDS-PAGE gels.

A Western blot analysis of AKAP4 expression corroborated the 1D SDS-PAGE sperm proteome analysis

A specific mouse anti-human AKAP4 N-ter domain monoclonal antibody was used to analyze expression of the AKAP4 holoprotein (referred to as pro-AKAP4 of 110 kDa) in individual sperm samples from groups A and B (Fig. 3). The anti-N-ter AKAP4 antibody labelled a band at 110 kDa (corresponding to pro-AKAP4), which was detected in all the group A samples (Fig. 3, AKAP4 N-ter, lane SPZ A). We next applied an antibody against AKAP4's carboxy-terminal (C-ter) domain. AKAP4 bands at 110 and 85 kDa were observed in all sperm samples from group A (Fig. 3, AKAP4 C-ter, lane SPZ A). On the basis of their relative molecular masses and relative abundance, these bands most likely corresponded to pro-AKAP4 (110 kDa) and pro-AKAP4 lacking the first 188 amino acids (85 kDa). In contrast, the AKAP4 pattern in group B differed when probed with the N-ter and C-ter anti-AKAP4 antibodies. AKAP4 bands at 60, 45 and 35 kDa were detected with the anti-AKAP4 N-ter (Fig. 3, AKAP4 N-ter, lane SPZ B), whereas the anti-AKAP4 C-ter antibody labelled a single band at 35 kDa (Fig. 3, AKAP4 C-ter, lane SPZ B). Probing each of these Western blots with anti-histone H3 revealed equivalent protein loadings. The specificity of staining was checked with T98 cell lysates from a glioblastoma cell lineage, which completely lacked AKAP4 expression when probed with anti-AKAP4 N-ter or C-ter antibodies.

Anti-AKAP4 antibodies labelled the flagellum of human spermatozoa

AKAP4 within the spermatozoon was localized by immunofluorescence (Fig. 4). As previously reported (Eddy *et al*, 2003), the staining was localized along the entire length of the principal piece of the sperm flagellum. Similar labeling patterns were observed for anti-AKAP4 N-ter and C-ter antibodies. Neither the intensity nor the localization of the labeling differed when comparing spermatozoa from groups A and B.

Western blotting and hierarchical cluster analysis of sperm parameters and the quantity of AKAP4.

Since group A had a higher percentage of PR motile spermatozoa and a different AKAP4 protein pattern relative to group B, we next assessed the potential relationship between Western blot patterns and the semen parameters. To this end, a Western blot analysis of AKAP4 using the N-ter specific anti-AKAP4 antibody was performed in individual sperm. In order to normalize for the amount of total protein, equal amount of proteins from samples 79 (a pattern showing a low level of AKAP4 holoprotein and AKAP4 proteolytic fragments), 109 (with AKAP4 holoprotein at 110 kDa) and 153 (AKAP4 holoprotein and N-terminal catabolic fragments at 100, 80, 60, 45 and 35 kDa) were loaded onto each gel (Fig 5). The mean band intensities in sample 153 were determined and a normalizing factor was applied to each gel. All AKAP4 bands stained with the anti-AKAP4 N-ter antibodies were quantified (as intensity values) using ImageJ Software. The AKAP4 band intensities and sperm variables were analyzed in a hierarchical cluster analysis; the resulting dendrogram is shown in Fig. 6.

The hierarchical cluster analysis revealed three clusters: the first cluster (A, Fig. 6) contained the mean values of the AKAP4 N-ter bands at 110 (AKAP110), 100 (AKAP100), and 80 (AKAP80) kDa, the AKAP4/proteolytic fragment ratios, PR motility before density gradient centrifugation, PR motility after density gradient centrifugation, and the proportion of morphologically normal forms. The mean value of AKAP100 was positively correlated with the PR motility of spermatozoa after density gradient centrifugation (Table III; $p=0.046$). There were no associations between the AKAP4/proteolytic fragment ratio, the PR motility and the proportion of normal forms. The second cluster (B, Fig. 6) contained the mean values of semen volume, the multiple anomaly index, non-progressive motility and immotile IM spermatozoa in semen and after gradient preparation. The third cluster (C, Fig. 6) depicted the

sum of the N-ter AKAP4 and proteolytic products at 100, 80, 60, 45, 35 kDa (AKAP100_80_60_45-35), AKAP4 at 60 kDa (AKAP60), 45 kDa (AKAP45) and 35 kDa (AKAP35), the sperm concentration, the total sperm count and the sperm concentration after gradient preparation. The mean values of AKAP100_80_60_45_35, AKAP60, AKAP45 and AKAP35 were positively correlated with the sperm concentration in whole semen and after gradient preparation, and total sperm count (Table IV). The mean values of AKAP45 and AKAP60 were positively correlated with the sperm concentration and total sperm count (Table IV).

DISCUSSION

This is the first study to have analyzed the association between conventional semen parameters, the sperm proteome from individual sperm, and the processing of pro-AKAP4 and AKAP4. One of the key findings is that sperm samples from individuals exhibit distinct proteomes. Proteolysis of AKAP4 holoprotein (comprising the pro-domain) was positively correlated with the motility of separated spermatozoa, whereas the levels of proteolytic products were correlated with the sperm count. Our results therefore suggest that AKAP4 processing might be a molecular marker for sperm motility.

In our proteomics analysis, the amount of proteins loaded from each sperm was standardized. Nevertheless, there were noticeable inter-individual differences in the sperm proteome – primarily in terms of the amount of high molecular weight proteins in the 80 to 110 kDa range. It is noteworthy that the intensity of the Coomassie-Blue-stained bands did not increase with the amount of protein loaded (Fig.S1.A). We also processed a gel with silver staining, which detects proteins with high sensitivity (Fig. S1.B). The proteome profile in group B might result from partial proteolysis of the sperm proteome. The sperm proteins were isolated immediately after sperm liquefaction, which limited protein damage. However, sperm samples treated with protease inhibitor cocktail gave a pattern that was much the same as with untreated sperm (Fig 2.B). Nevertheless, we cannot rule out the occurrence of a certain amount of proteolysis sperm storage and transport within the male genital tract.

Mass spectrometry analysis of the 110 kDa band evidenced AKAP4 as one of the main sperm proteins. Specifically, we showed that the expression pattern of AKAP4 holoprotein differed from one individual to another. The expression of AKAP4 is restricted in germ cells but not in the somatic cells of the testis or in any other tissues (Fulcher et al., 1995), which provides a unique opportunity to determine how expression varies in human spermatozoa. Since proteolytic AKAP4 fragments were detected by using the anti-AKAP4 N-ter antibody, pro-AKAP4 might be degraded by endoproteases at the C-ter region of the protein. This proteolytic process probably affected the AKAP4 comprising the prodomain. Proteolysis of AKAP4 had no major impact on the morphology of the flagellum nor the AKAP4 immunolabeling pattern - suggesting that the fibrous sheath was properly assembled at the microscopic level. It would be instructive to determine the fate of signaling proteins in sperm with proteolyzed AKAP4. The molecular basis for these results remained to be determined.

Another key finding of the present study was the observation that pro-AKAP4 and AKAP4 are found in equal amount in human spermatozoa. During spermatogenesis, AKAP4 is synthesized as a precursor that is subsequently cleaved to the 85 kDa protein (Turner et al., 1998). After more than 148 million years of divergent mammalian evolution, the AKAP4 protein's amino acid sequence has been highly conserved (Hu et al., 2009). In the mouse testis, AKAP4 is synthesized and incorporated into the nascent fibrous sheath late in spermatid development (Brown et al., 2003). However, the pro-AKAP4/AKAP4 ratio varies from one species to another and is greatest in human spermatozoa - indicating that pro-AKAP4 processing in the human is less complete than (and possibly differs from) that in the mouse and bull (Moss et al., 1999). Pro-AKAP4 is found principally in epididymal sperm in the mouse and the bull, whereas processed AKAP4 is found in ejaculated sperm in both species. Our results suggest that in human spermatozoa, levels of pro-AKAP4 and AKAP4 are equivalent. Although pro-AKAP4 is localized only in the proximal portion of the principal piece in murine mature cauda epididymal spermatozoa (Turner et al., 1999), we confirmed that pro-AKAP4 and AKAP4 are found along the entire length of the principal piece in human spermatozoa.

AKAP4 is the major fibrous sheath protein of the principal piece of sperm flagellum, and has critical roles in motility (Miki et al., 2002). AKAP4 knock-out mice are infertile as a result of poor sperm motility associated with a thin principal piece and incomplete fibrous sheath processing (Miki et al., 2002). AKAP4 fulfils a mechanical role by modulating the degree and shape of flagellar bending. It recruits cAMP-dependent-kinase A to facilitate phosphorylation of neighboring proteins and thus regulates flagellar functions (Brown et al., 2003; Moretti et al., 2007). Whereas the conversion of pro-AKAP4 to AKAP4 is required for motility in mice, no direct relationships have been evidenced in human and it is not yet known whether pro-AKAP4 or AKAP4 are either regulating sperm motility. Interestingly, levels of pro-AKAP4 (100 kDa) and the long form of AKAP4 (85 kDa) were significantly correlated with the PR motility of separated spermatozoa. PR motility is considered to be an important, predictive marker of successful fertilization and the fertility outcome (especially for intra-uterine insemination) (Merviel et al., 2010; de Araùjo et al., 2013; Ombelet et al., 2014; Guan et al., 2016). In our study, the loss of 20 to 30 kDa (generating the 80 kDa AKAP4 polypeptide) extinguished the correlation with PR motility. Furthermore, endoprotease processing of the C-ter region of AKAP4 might contribute to a partial loss of AKAP4 function.

One important objective of the present study was the search for potential correlations between semen parameters and the expression of AKAP4. We observed that the level of pro-AKAP4 in the proteome was significantly and positively correlated with PR motility in separated spermatozoa. Density gradient preparation induces a hyperactivated sperm motility state that is closely associated with capacitation. Density gradient centrifugation is the preferred technique for sperm processing in assisted reproductive technologies (e.g. intrauterine insemination, or conventional *in vitro* fertilization alone or combined with intracytoplasmic sperm injection). The goal is to select highly motile, morphologically normal spermatozoa with minimal levels of DNA damage. Cellular debris (round cells) is also removed by centrifugation. Our present results are important in that the long form of AKAP4 was correlated with PR motility after density gradient centrifugation – a technique that is commonly used in infertility clinics. However, the sperm preparation media commonly used for density gradient centrifugation interfere with proteomics analyses. Thus, the sperm proteome had not previously been studied in sperm samples after density gradient preparation.

Our results suggest that C-ter proteolysis of AKAP4 (through an as-yet undetermined mechanism) could implement the analysis of sperm motility. The inter-individual molecular differences in the proteome pattern and AKAP4 expression might be related to sperm motility rather than other sperm parameters (e.g. morphology). We hypothesize that the AKAP4 expression is sensitive to proteolysis and contributes to the regulation/deregulation of sperm motility. Moreover, our results are supported by the 1D SDS-PAGE Coomassie Blue and Western blot analysis of AKAP4. AKAP4 not only has a pivotal role in normal morphology of sperm but may also influence sperm motility and might be a biomarker of value in understanding prefertilization events. The present results have two important implications: (i) there are substantial inter-individual differences in the sperm proteome and (ii) the detection of the significant correlations between AKAP4 products and sperm parameters highlighted functional roles of AKAP4 expression in the spermatozoa.

To the best of our knowledge, the present study is the first to have evidenced a link between the sperm proteome, expression of AKAP4, and sperm parameters in individuals. Assessment of the human sperm proteome and AKAP4 processing might provide information on protein damage and might serve to develop a test that complements conventional sperm analysis. The question of whether failure of *in vitro* fertilization is caused by abnormalities in AKAP4 expression merits further investigation.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Meryem Tardivel (BioImaging Center Lille Nord de France, Lille, France) for assistance with imaging, and David Fraser (Biotech Communication, Damery, France) for editorial assistance.

CONFLICT OF INTEREST

JF, SJ, SN and MV are cited as inventors on a patent application (Patent EP13306212.5).

DECLARATION OF AUTHORS' ROLES

JF and SJ performed semen analyses and proteomics experiments. FGFJ, CC, OH and ES participated in proteomics experiments. DDS and HJ acquired and interpreted mass spectrometry data. RJM and BL provided valuable intellectual input on experimental design. DP and BH performed the statistical analysis. JF, SN and MV designed and wrote the manuscript. All authors have approved the manuscript as submitted.

REFERENCES

Aitken, R.J., 2006. Sperm function tests and fertility. *Int. J. Androl.* 29, 69–75.

Brown, P.R., Miki, K., Harper, D.B., Eddy, E.M., 2003. A-kinase anchoring protein 4 binding proteins in the fibrous sheath of the sperm flagellum. *Biol. Reprod.* 68, 2241-2248.

Chi, H.J., Koo, J.J., Song, S.J., Lee, J.Y., Chang, S.S., 2004. Successful fertilization and pregnancy after intracytoplasmic sperm injection and oocyte activation with calcium ionophore in a normozoospermic patient with extremely low fertilization rates in intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil. Steril.* 82, 475-477.

de Araùjo, L.F., Bossoni, M.C., Machado-Paula, L.A., Corrente, J.E., Cavagna, M., Matheus, P.C., Pontes, A., 2013. Efficacy of sperm motility after processing and incubation to predict pregnancy after intrauterine insemination in normospermic individuals. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 11, 101.

de Mateo, S., Martínez-Heredia, J., Estanyol, J.M., Domínguez-Fandos, D., Vidal-Taboada, J.M., Ballescà, J.L., Oliva, R., 2007. Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa. *Proteomics* 7, 4264-4277.

de Mateo, S., Gázquez, C., Guimerà, M., Balasch, J., Meistrich, M.L., Ballescà, J.L., Oliva, R., 2009. Protamine 2 precursors (Pre-P2), protamine 1 to protamine 2 ratio (P1/P2), and assisted reproduction outcome. *Fertil. Steril.* 91, 715–722.

Eddy EM, Toshimori K, O'Brien DA., 2003. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc. Res. Tech.* 6, 103-115

Frapsauce, C., Pionneau, C., Bouley, J., Delarouziere, V., Berthaut, I., Ravel, C., Antoine, J.M., Soubrier, F., Mandelbaum, J., 2014. Proteomic identification of target proteins in normal but nonfertilizing sperm. *Fertil. Steril.* 102, 372-380.

Fulcher, K.D., Mori, C., Welch, J.E., O'Brien, D.A., Klapper, D.G., Eddy, E.M., 1995. Characterization of Fsc1 cDNA for a mouse sperm fibrous sheath component. *Biol. Reprod.* 52, 41-49.

Guan, H.T., Zheng, Y., Wang, J.J., Meng, T.Q., Xia, W., Hu, S.H., Xiong, C.L., Rao, M., 2016. Relationship between donor sperm parameters and pregnancy outcome after intrauterine insemination: analysis of 2821 cycles in 1355 couples. *Andrologia* 48, 29-36.

Holt, W.V. and Van Look, K.J., 2004. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction* 127, 527-535.

Hu, Y., Yu, H., Pask, A.J., O'Brien, D.A., Shaw, G., Renfree, M.B., 2009. A-kinase anchoring protein 4 has a conserved role in mammalian spermatogenesis. *Reproduction* 137, 645-653.

Jumeau, F., Com, E., Lane, L., Duek, P., Lagarrigue, M., Lavigne, R., Guillot, L., Rondel, K., Gateau, A., Melaine, N., Guével, B., Sergeant, N., Mitchell, V., Pineau, C., 2015. Human Spermatozoa as a Model for Detecting Missing Proteins in the Context of the Chromosome-Centric Human Proteome Project. *J. Proteome Res.* 14, 3606-3620.

Krausz, C., 2011. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 25, 271-285.

Kumar, R., Gautam, G., Gupta, N.P., 2006. Drug therapy for idiopathic male infertility: rationale versus evidence. *J. Urol.* 176, 1307-1312.

Légaré, C., Droit, A., Fournier, F., Bourassa, S., Force, A., Cloutier, F., Tremblay, R., Sullivan, R., 2014. Investigation of male infertility using quantitative comparative proteomics. *J. Proteome Res.* 13, 5403-5414.

Lewis, S.E.M., 2007. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction* 134, 31-40.

Merviel, P., Heraud, M.H., Grenier, N., Lourdel, E., Sanguinet, P., Copin, H., 2010. Predictive factors for pregnancy after intrauterine insemination (IUI): an analysis of 1038 cycles and a review of the literature. *Fertil. Steril.* 93, 79-88.

Miki, K., Willis, W.D., Brown, P.R., Goulding, E.H., Fulcher, K.D., Eddy, E.M., 2002. Targeted disruption of the Akap4 gene causes defects in sperm flagellum and motility. *Dev. Biol.* 248, 331-342.

Moretti, E., Scapigliati, G., Pascarelli, N.A., Baccetti, B., Collodel, G., 2007. Localization of AKAP4 and tubulin proteins in sperm with reduced motility. *Asian J. Androl.* 9, 641-649.

Moss, S.B., Turner, R.M., Burkert, K.L., VanScoy Butt, H., Gerton, G.L., 1999. Conservation and function of a bovine sperm A-kinase anchor protein homologous to mouse AKAP82. *Biol. Reprod.* 61, 335-342.

Ombelet, W., Dhont, N., Thijssen, A., Bosmans, E., Kruger, T., 2014. Semen quality and prediction of IUI success in male subfertility: a systematic review. *Reprod. Biomed. Online* 28, 300-309.

Pixton, K.L., 2004. Sperm proteome mapping of a patient who experienced failed fertilization at IVF reveals altered expression of at least 20 proteins compared with fertile donors: Case report. *Hum. Reprod.* 19, 1438–1447.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671-675.

Silva, J.V., Freitas, M.J., Correia, B.R., Korrodi-Gregório, L., Patrício, A., Pelech, S., Fardilha, M., 2015. Profiling signaling proteins in human spermatozoa: biomarker identification for sperm quality evaluation. *Fertil. Steril.* 104, 845-856.

Torregrosa, N., Domínguez-Fandos, D., Camejo, M.I., Shirley, C.R., Meistrich, M.L., Ballescà, J.L., Oliva, R., 2006. Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. *Hum. Reprod.* 21, 2084-2089.

Turner, R.M., Johnson, L.R., Haig-Ladewig, L., Gerton, G.L., Moss, S.B., 1998. An X-linked gene encodes a major human sperm fibrous sheath protein, hAKAP82. Genomic organization, protein kinase A-RII binding, and distribution of the precursor in the sperm tail. *J. Biol. Chem.* 273, 32135–32141.

Turner, R.M., Eriksson, R.L., Gerton, G.L., Moss, S.B., 1999. Relationship between sperm motility and the processing and tyrosine phosphorylation of two human sperm fibrous sheath proteins, pro-hAKAP82 and hAKAP82. *Mol. Hum. Reprod.* 5, 816-824.

Turek, P.J., 2005. Practical approaches to the diagnosis and management of male infertility. *Nat. Clin. Pract. Urol.* 2, 226-238.

World of Health Organization., 2010. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th edn. Geneva, Switzerland.

Xu, W., Hu, H., Wang, Z., Chen, X., Yang, F., Zhu, Z., Fang, P., Dai, J., Wang, L., Shi, H., Li, Z., Qiao, Z., 2012. Proteomic characteristics of spermatozoa in normozoospermic patients with infertility. *J. Proteomics* 75, 5426–5436.

Figure 1: A schematic diagram of the strategy used to characterize the sperm proteome and the AKAP4 profile.

Figure 2: Coomassie Blue staining patterns in 1D SDS-PAGE of the human sperm proteome.

Panel 2.A: lane SPZ A shows a homogeneous distribution of bands across the entire molecular weight range. Panel 2.A, lane SPZ B displayed a loss of high-molecular-weight proteins and a gain in low-molecular-weight proteins. Representative patterns are presented (n=161).

Panel 2.B: the presence/absence of the protease inhibitor (PI) cocktail did not change the SPZ A or SPZ B sperm proteome profiles. Representative patterns are presented (n=8).

Figure 3: AKAP4 expression, as revealed by representative Western blotting of sperm from the group A (SPZ A) and group B (SPZ B). Equal amounts of proteins were loaded. The numbers to the left of the blots indicate the molecular weights of standard proteins.

An antibody against the AKAP4 N-ter domain revealed a single, prominent band at 110 kDa in lane SPZ A and fainter bands between 30 and 60 kDa in lane SPZ B. An antibody against the AKAP4 C-ter domain revealed two prominent bands at 100 and 85 kDa in lane SPZ A and fainter bands at lower molecular weights in lane SPZ B. T98 glioblastoma cell lysate was used as a control for protein expression (lanes T98).

Figure 4: Localization of AKAP4, as revealed by immunofluorescence labelling of spermatozoa with anti-AKAP4 N-ter (A) and anti-AKAP4 C-ter (B) antibodies.

AKAP4 was expressed along the entire length of the flagellum's principal piece. A negative control (see the insert at the left bottom of figure B) corresponded to incubation with the secondary antibodies alone.

Figure 5: Representative Western blots used for quantitative analysis of AKAP4 N-ter expression. Equal amounts of proteins were loaded. The numbers to the left of the blots indicate the molecular weights of standard proteins. Apparent molecular weights of AKAP4 protein bands used for the statistical analyses are indicated to the right of the blot. Sample 71 was excluded due to the lack of protein. Sperm samples 79, 109 and 153 were loaded on each gel in the series, in order to normalize the band intensity between gels and align the AKAP4 bands.

Figure 6: A dendrogram showing the results of a hierarchical cluster analysis of AKAP4 products and sperm parameters. Three major clusters (A, B and C) were observed.

Supplemental Figure S1: Coomassie-Blue- (panel S1.A) and silver-stained (panel S1.B) 1D SDS-PAGE profiles of sperm lysates, with increasing amounts of protein loaded (15, 20, 25, and 30 μ g).

The gels are representative of the 1D SDS-PAGE protein profiles of sperm lysates from the group A and group B. Increasing the protein load did not change the patterns.

Fig. 1

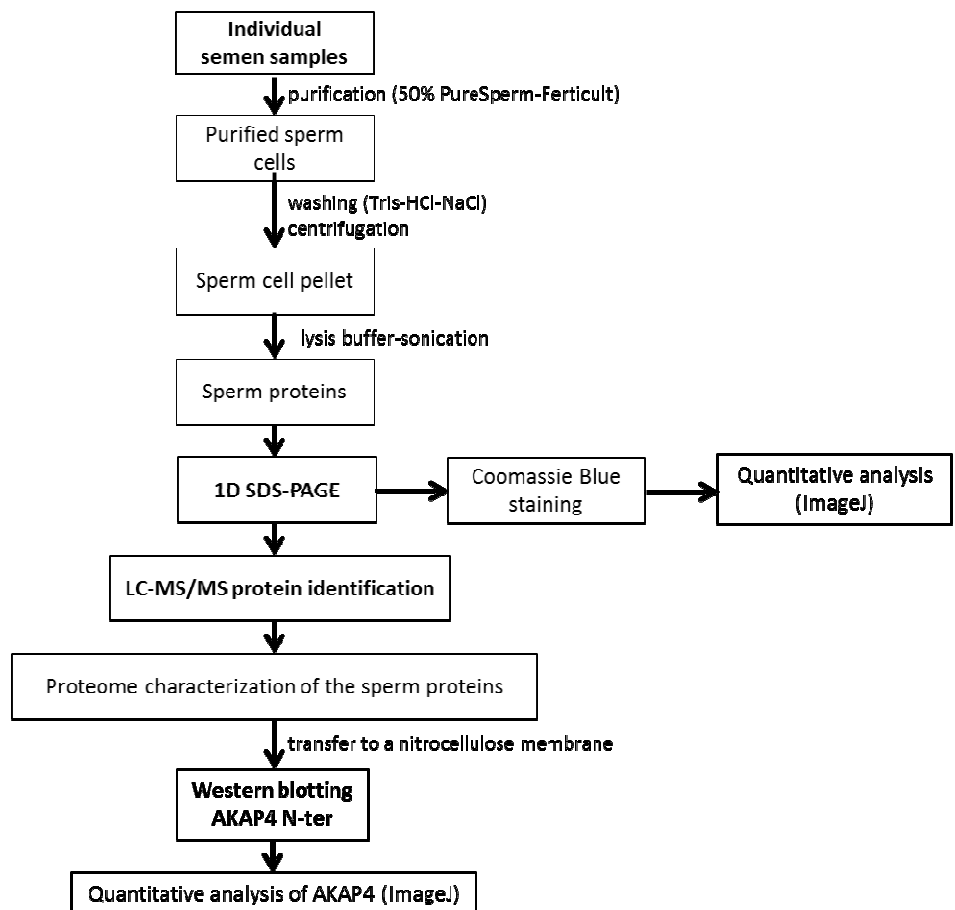


Fig. 2

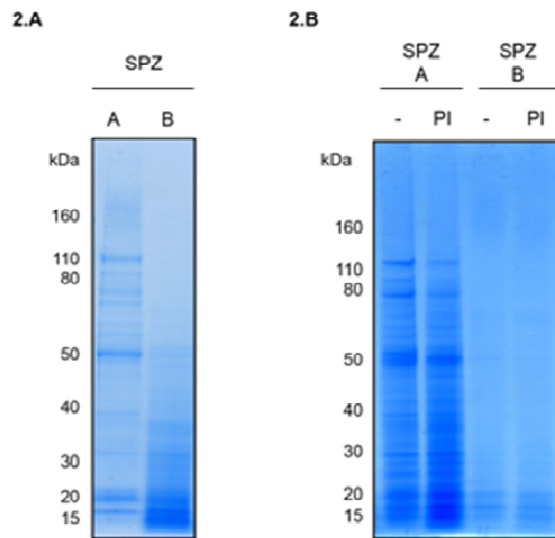


Fig. 3

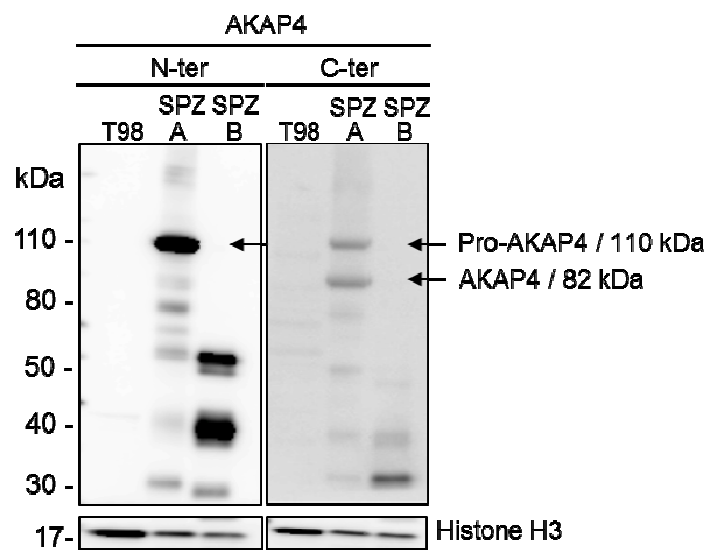


Fig. 4

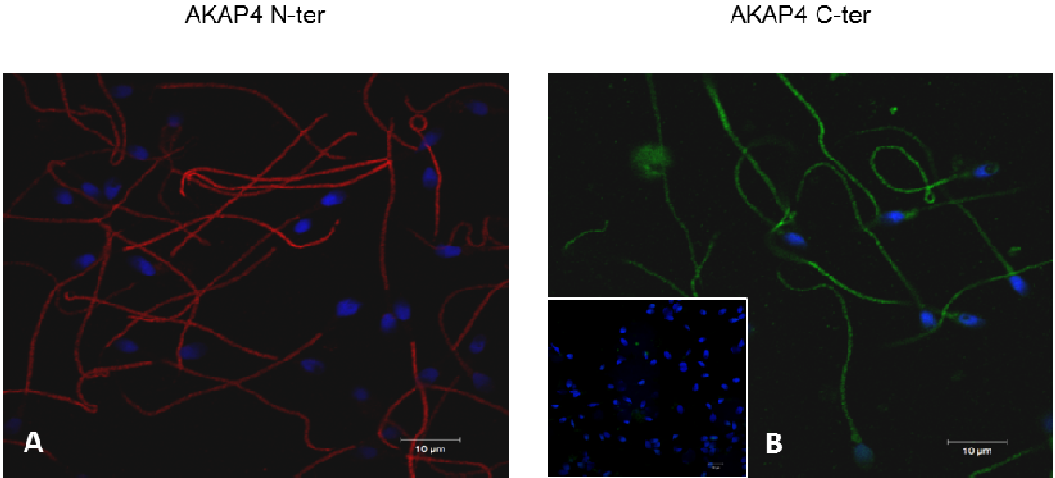


Fig. 5

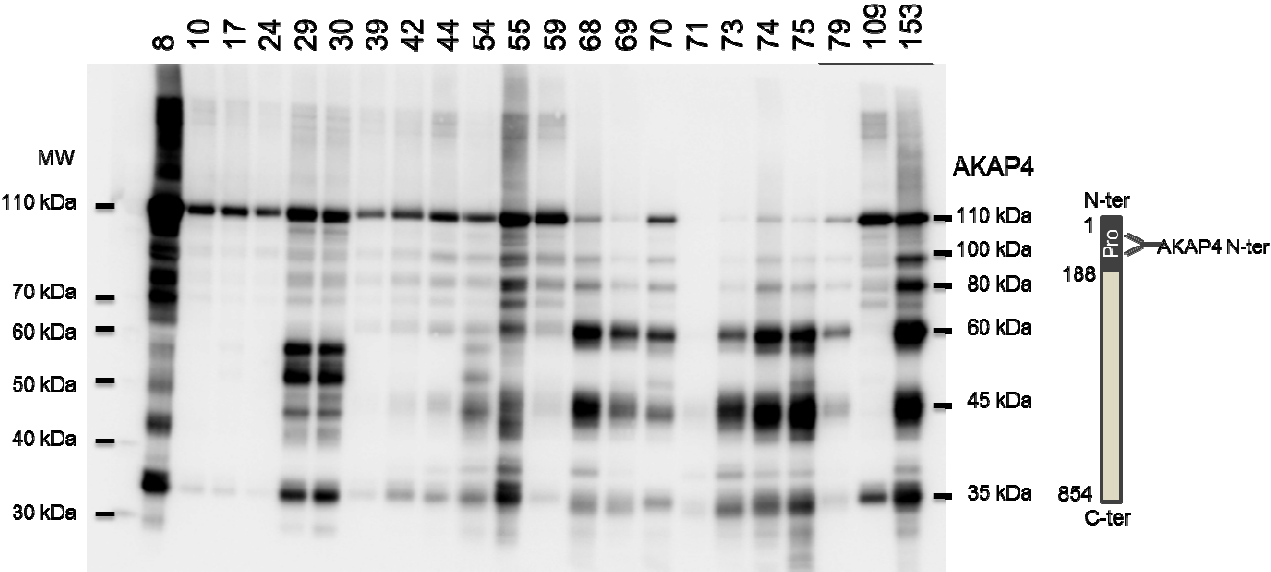


Fig. 6

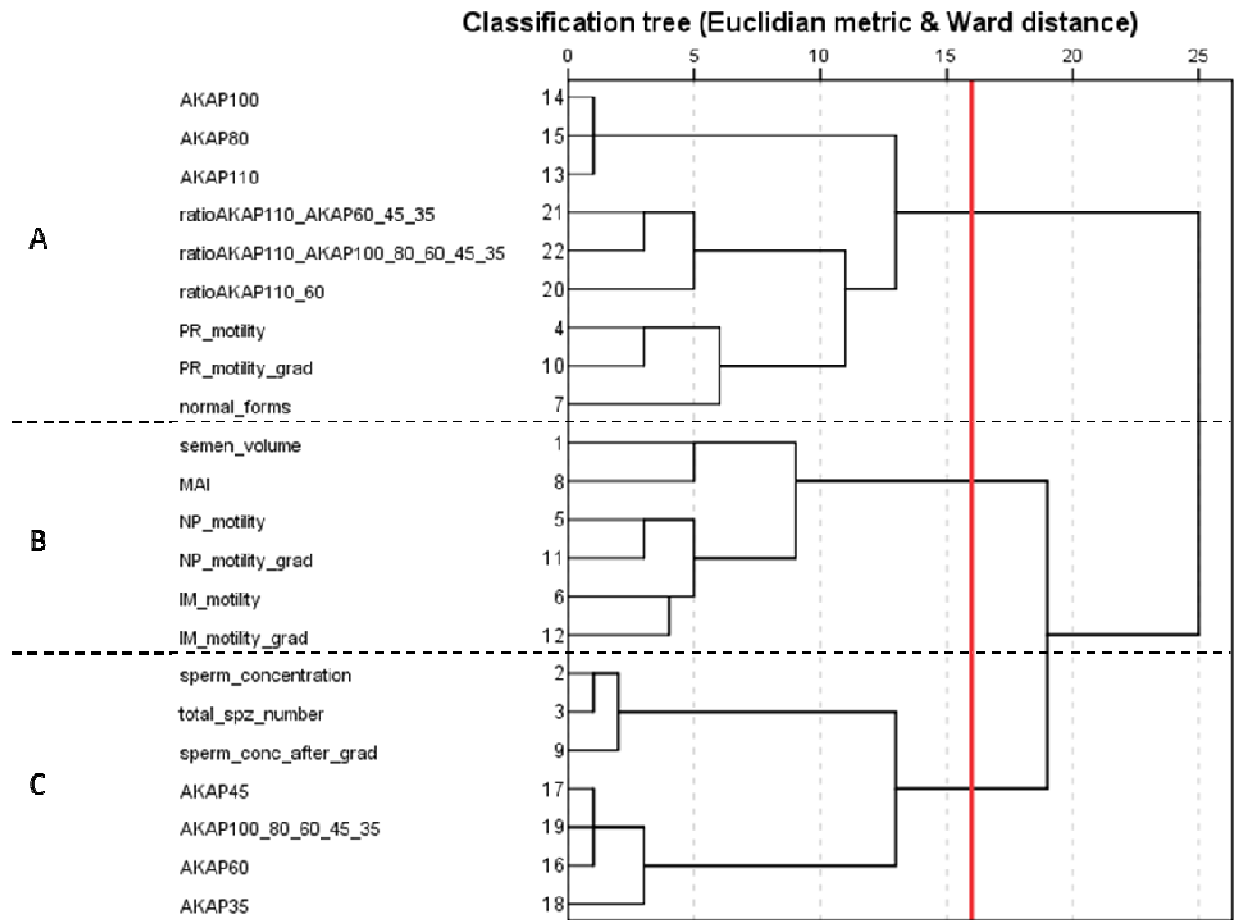


Fig. S1

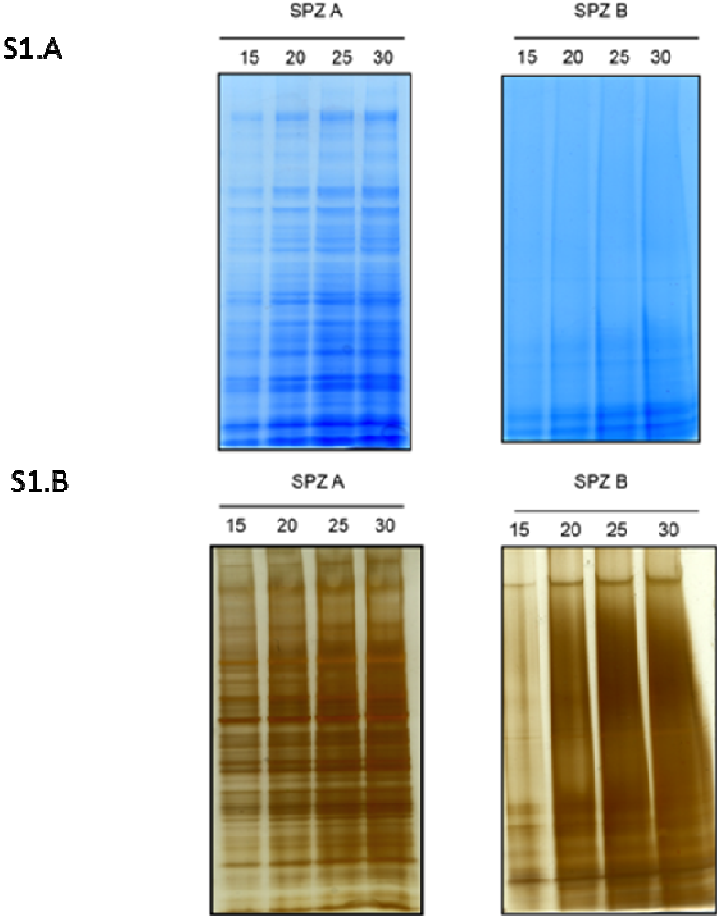


Table I: Sperm parameters corresponding to the two major proteome patterns (A and B) in the study population. Data are quoted as the median (interquartile range); n= number.

Sperm parameter	Group A n=80	Group B n=81	Mann-Whitney test p-value
Age (years)	34 (30-37)	35 (31-39)	0.147
Semen volume (mL)	3.75 (2.90-4.70)	3.5 (3.1-4.5)	0.496
Sperm concentration ($\times 10^6/\text{mL}$)	94.75 (57-149)	77.35 (55.75-106)	0.053
Progressive motility (%)	55 (45-60)	50 (40-60)	0.025
Morphologically normal forms (%)	34 (28-43)	34 (26-43)	0.789

Table II: Proteins contained in the 110 and 80 kDa bands, following in-gel trypsinization and mass spectrometry identification.

MW: theoretical molecular weight; pI: isoelectric point; Score: identification score; #Pept: number of peptides sequenced; SC: overlap with the protein sequence.

Accession	MW [kDa]	pI	Score	#Pept. [n]	SC [%]	Protein
K2C1_HUMAN	66.0	8.8	301.8	5	10.2	Keratin, type II cytoskeletal 1
AKAP3_HUMAN	94.7	5.8	250.2	4	5.7	A-kinase anchor protein 3
GFAP_HUMAN	49.8	5.3	42.4	1	2.5	Glial fibrillary acidic protein
HXK1_HUMAN	102.4	6.4	118.6	2	3.2	Hexokinase 1
AKAP4_HUMAN	94.4	6.6	477.1	6	9	A-kinase anchor protein 4
ACE_HUMAN	149.6	5.9	56.7	1	0.8	Angiotensin-converting enzyme

Table III: Statistical analysis of cluster A (Fig. 6) with regard to the relative values of the AKAP N-ter products, ratios, the PR motility and normal sperm.

The quoted values are Spearman's correlation coefficient ρ and the associated p value (in brackets). grad: gradient. PR: progressive.

	PR_motility (%)	PR motility_grad (%)	Normal_forms (%)
AKAP110	0.073 (0.525)	0.150 (0.190)	0.057 (0.621)
AKAP100	0.077 (0.503)	0.227 (0.046)	0.065 (0.570)
AKAP80	0.002 (0.979)	0.221 (0.052)	0.025 (0.829)
RatioAKAP110_60	0.185 (0.105)	0.202 (0.077)	0.039 (0.735)
RatioAKAP110_AKAP60_45_35	0.182 (0.112)	0.123 (0.286)	-0.006 (0.958)
RatioAKAP110_AKAP100_80_60_45_35	0.158 (0.168)	0.108 (0.346)	-0.029 (0.796)

Table IV: Statistical analysis of cluster C (Fig. 6) with regard to the relative values of the AKAP N-ter products, the sperm concentration and total sperm count.

The quoted values are Spearman's correlation coefficient ρ and the associated p value (in brackets).

	AKAP35	AKAP45	AKAP60	AKAP100_80_60_45_35
Sperm concentration ($\times 10^6$)	0.449 (<0.0001)	0.463 (<0.001)	0.397 (0.0003)	0.508 (<0.001)
Total sperm count ($\times 10^6$)	0.417 (0.0002)	0.416 (0.0002)	0.309 (0.006)	0.455 (<0.0001)
Sperm concentration after gradient centrifugation ($\times 10^6$)	0.344 (0.002)	0.154 (0.17)	0.134 (0.24)	0.303 (0.007)

DISCUSSION Article 3

Au cours de ce travail, l'analyse du protéome global du spermatozoïde par notre équipe, chez des hommes issus de couples infertiles, a permis d'enrichir les connaissances fondamentales en mettant en relation la quantification de différents niveaux d'expression de l'AKAP4 et de la pro-AKAP4 avec les résultats des paramètres spermatiques. Nous avons notamment montré pour la première fois que la pro-AKAP4 est corrélée positivement avec la mobilité spermatique après gradient de densité.

Au cours des premiers travaux de notre équipe, l'analyse des paramètres spermatiques conventionnels a montré un lien entre la mobilité progressive et le protéome global spermatique (tableau 1). De plus, l'étude poussée du protéome global spermatique a mis en évidence qu'un marqueur biologique qualitatif d'intérêt (AKAP4) était retrouvé protéolysé dans près de la moitié des 161 échantillons. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à cette protéine AKAP4 car il s'agit d'une protéine spécifique du spermatozoïde, dont le rôle est de lier la PKA pour induire la mobilité du spermatozoïde (Brown, 2002; Moretti *et al.*, 2007). Or, la mobilité spermatique est considérée comme un marqueur reconnu de fertilité (Lewis, 2007) et un paramètre prédictif de fécondation (Nallella *et al.*, 2006). L'AKAP4 a été largement étudiée dans les anomalies de flagelle du spermatozoïde (Baccetti, 2005; Baccetti *et al.*, 2005). La mutation génique *akap4* mène à une absence relative de la protéine ou à une forme anormale de l'AKAP4 et à des anomalies de la mobilité spermatique (Baccetti, 2005). Cependant, les échantillons utilisés dans cette étude provenant d'hommes ne présentant pas la mutation, il a été conclu que les différences observées de mobilité progressive entre les 2 groupes ne sont donc pas en lien avec la mutation.

Par ailleurs, la protéine AKAP4 est synthétisée sous la forme d'un précurseur, la pro-AKAP4, dont le pro-domaine de 188 acides aminés est ensuite clivé pour donner la protéine AKAP4 au cours de la spermiogenèse (Turner *et al.*, 1998; Eddy *et al.*, 2003). Selon les données de la littérature, seule l'AKAP4 clivée a un rôle actif (Luconi *et al.*, 2011). L'hypothèse est que les protéines de la gaine fibreuse synthétisées dans le corps de la spermatide pourraient être transportées jusqu'à l'axonème sous la forme d'un complexe incompetent avec la pro-AKAP4 (Johnson *et al.*, 1997). Une fois la pro-AKAP4 clivée en AKAP4 active, cette dernière permettrait un arrangement correct de la gaine fibreuse. Il est donc mis en avant un rôle inactif de la pro-AKAP4. Cependant, nos résultats montrent d'une part, la présence de la pro-AKAP4 dans le spermatozoïde mature, et d'autre part que c'est l'intégrité de la pro-AKAP4 qui est un

indicateur positif de la mobilité spermatique après gradient. Ces nouvelles données fondamentales apportent donc une vision nouvelle du rôle et de l'impact de cette protéine.

En conclusion, les résultats issus de ce travail ont permis de relever 2 éléments majeurs. Premièrement, des différences substantielles dans l'expression du protéome global des spermatozoïdes sont présentes dans des échantillons individuels d'hommes issus de couples infertiles. Secondairement, l'intégrité de la pro-AKAP4 pourrait permettre de distinguer les éjaculats présentant des spermatozoïdes submobiles avec un processus protéolytique engagé, et d'apporter un complément d'information pour la définition des limites de la normozoospermie.

Brevet d'invention

Methods for determining human sperm quality

BIO 13168 – SERGEANT-AN

PCT international application number: PCT/EP2014/068783

United States application number: 14/913.856

Sergeant N, Mitchell V, Jumeau F, **Sigala J.**

11450368US

**DECLARATION (37 C.F.R. 1.63) FOR UTILITY PATENT APPLICATION USING AN
APPLICATION DATA SHEET (37 C.F.R. 1.76) AND ASSIGNMENT**

Title of Invention: **METHODS FOR DETERMINING HUMAN SPERM QUALITY**

As a below named inventor, I hereby declare that:

This declaration and assignment document is directed to:

the attached application;

United States application number 14/913,856 filed on February 23, 2016 ;

PCT international application number PCT/EP2014/068783 filed on September 5, 2014 .

The above-identified application was made or authorized to be made by me.

I believe that I am the original inventor or an original joint inventor of a claimed invention in the application.

I have reviewed and understand the contents of the application, including the claims.

I am aware of the duty to disclose to the United States Patent and Trademark Office all information known to me to be material to patentability as defined in 37 CFR Section 1.56.

Whereas, the undersigned inventor(s) has/have made certain inventions, improvements, and discoveries (herein referred to as the "Invention") disclosed in the above-identified patent application;

Whereas, **INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE)**, having a place of business at 101, rue de Tolbiac, F-75013 Paris, FRANCE; **UNIVERSITÉ DE DROIT ET DE LA SANTÉ DE LILLE 2**, having a place of business at 42 rue Paul Duez, F-59800 Lille, FRANCE; AND **CENTRE HOSPITALIER REGIONAL UNIVERSITAIRE DE LILLE**, having a place of business at 2 Avenue Oscar Lambret Lille, 59037 Lille, FRANCE (herein referred to as "ASSIGNEE"), desires to acquire, and each undersigned inventor desires to grant to ASSIGNEE, the entire worldwide right, title, and interest in and to the Invention and in and to any and all patent applications and patents directed thereto;

Now, therefore, for good and valuable consideration, the receipt and sufficiency thereof being hereby acknowledged, each undersigned inventor ("ASSIGNOR") hereby sells or has sold, assigns or has assigned, and otherwise transfers or has transferred to the ASSIGNEE, its successors, legal representatives, and assigns, the entire worldwide right, title, and interest in and to the Invention, the above-identified United States patent application, and any and all other patent applications and patents for the Invention which may be applied for or granted therefor in the United States and in all foreign countries and jurisdictions, including all divisions, continuations, reissues, reexaminations, renewals, extensions, counterparts, substitutes, and extensions thereof, and all rights of priority resulting from the filing of such applications and granting of such patents. In addition, each undersigned inventor hereby authorizes and requests the Director of the United States Patent and Trademark Office to issue any United States Patent, and foreign patent authorities to issue any foreign patent, granted for the Invention, to ASSIGNEE, its successors, legal representatives, and assigns, the entire worldwide right, title, and interest in and to the same to be held and enjoyed by ASSIGNEE, its successors, legal representatives, and assigns to the full end of the terms for which any and all such patents may be granted, as fully and

11450368US

entirely as would have been held and enjoyed by the undersigned had this Assignment not been made; and each undersigned inventor agrees to execute any and all documents and instruments and perform all lawful acts reasonably related to recording this Assignment or perfecting title to the Invention and all related patents and applications, in ASSIGNEE, its successors, legal representatives, and assigns, whenever requested by ASSIGNEE, its successors, legal representatives, or assigns.

Each undersigned inventor acknowledges their prior and ongoing obligations to sell, assign, and transfer the rights under this Assignment to ASSIGNEE and is unaware of any reason why they may not have the full and unencumbered right to sell, assign, and transfer the rights hereby sold, assigned, and transferred, and has not executed, and will not execute, any document or instrument in conflict herewith. Each undersigned inventor also hereby grants ASSIGNEE, its successors, legal representatives, and assigns, the right to insert in this Assignment any further identification (including, but not limited to, patent Application Number) which may be necessary or desirable for recordation of this Assignment.

I hereby acknowledge that any willful false statement made in this declaration is punishable under 18 U.S.C. 1001 by fine or imprisonment of not more than five (5) years, or both.

I hereby authorize and request any attorney of WHITHAM, CURTIS, CHRISTOFFERSON & COOK, P.C., Customer No. 30743, to insert or correct any information concerning the identity of ASSIGNOR, ASSIGNEE, or the above-mentioned application (including the serial no. and the filing date).

(1) Legal Name of Inventor: **Nicolas SERGEANT**

Signature: _____ Date: _____

(2) Legal Name of Inventor: **Valérie MITCHELL**

Signature: _____ Date: _____

(3) Legal Name of Inventor: **Fanny JUMEAU**

Signature: _____ Date: _____

(4) Legal Name of Inventor: **Julien SIGALA**

Signature: _____ Date: _____

Article 4

Human sperm proteome profile and pro-A-kinase anchor protein 4 (pro-AKAP4), new tracks to enhance Assisted Reproduction Technologies (ART) outcomes.

Sigala J, Jumeau F, Keller L, Barbotin AL, Eddarkaoui S, Obriot H, Dossou-Gbete F, Buée L, Drumez E, Sergeant N*, Mitchell V*.

* : ces auteurs ont contribué de façon égalitaire à ce travail.

En préparation.

Suite à l'étude du protéome global spermatique qui a permis de définir 2 profils protéiques distincts (i.e. un profil « non protéolysé » et un profil « protéolysé ») un index de qualité spermatique (SPQI) a été élaboré. Cet index est basé sur une méthode d'isolement des spermatozoïdes, une méthode d'extraction des protéines spermatiques et une méthode d'analyse par gel de polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie. Deux groupes ont été constitués via le calcul de cet index. Le groupe SPQI A reflète une répartition homogène des protéines soit un profil protéique « non protéolysé ». Le groupe SPQI B illustre une protéolyse partielle de protéines de haut poids moléculaire soit un profil protéique « protéolysé ». Cette découverte a donné lieu à un Brevet européen, puis à une extension via le Patent Cooperation Treaty (PCT) (cf. brevet d'invention). Dans un deuxième temps, le travail précédent a abouti à l'identification d'un marqueur biologique qualitatif impliqué dans la mobilité spermatique et en lien avec la protéolyse observée : la protéine AKAP4. Nous avons complété ce travail en apportant des données fondamentales nouvelles sur la protéine AKAP4 et en établissant un lien entre l'intégrité de la pro-AKAP4 (précurseur de l'AKAP4) et la mobilité progressive de spermatozoïdes sélectionnés après gradient de densité (cf. article 3). Sachant que, lors d'une tentative d'AMP, les taux de fécondation, de qualité embryonnaire et de grossesse sont liés à la mobilité spermatique (Bhilawadikar *et al.*, 2013), nous avons cherché à savoir si (i) l'analyse du protéome global spermatique via le SPQI d'une part et (ii) l'analyse de la protéine pro-AKAP4 d'autre part, pouvaient représenter un(des) test(s) prédictif(s) de succès lors de tentatives d'IIU, de FIV ou d'ICSI.

Pour cela, nous avons confronté les résultats des tentatives d'AMP des patients inclus dans cette étude selon le profil « protéolysé » ou « non-protéolysé » du protéome spermatique défini soit par le SQPI, soit par l'intégrité de la pro-AKAP4. Dans un premier temps, nous avons enrichi la cohorte initiale des 161 patients et obtenu une cohorte finale de 253 échantillons de patients. À partir de cette cohorte, 153 patients ont bénéficié d'au moins une tentative d'IIU, de FIV ou d'ICSI dans le service de Biologie de la Reproduction-Spermiologie-CECOS du CHRU de Lille. Cette étude a été réalisée avec 3 cohortes distinctes de patients toutes issues des 153 échantillons de patients suivis en tentative. Dans un premier temps, l'analyse des résultats d'AMP a été réalisée selon le protéome global via le SPQI, en incluant la totalité des patients de notre cohorte initiale ayant fait au moins une tentative, soit n=153. Ce groupe est principalement constitué de patients normozoospermiques (77,7 %) ainsi que d'un certain nombre de patients présentant des altérations mineures au spermogramme-spermocytogramme (22,3 %) telles que définies dans le manuel de

Laboratoire de l'OMS (World Health Organization, 2010). Dans un deuxième temps, la même analyse a été effectuée en incluant uniquement les patients normozoospermiques de la cohorte initiale (n=119). Enfin, les résultats d'AMP ont été analysés chez les 53 patients dont la quantification de la pro-AKAP4 a pu également être réalisée (matériel biologique restant insuffisant pour les autres échantillons).

Les résultats obtenus en prenant en compte la totalité des IIU ont montré de façon surprenante une tendance non-significative à de meilleurs taux de grossesse clinique et de naissance dans les 3 cohortes de patients « protéolysé » (SPQI et pro-AKAP4). Cependant, les taux de fausse-couche spontanée (FCS) précoce étaient significativement nettement plus élevés chez ces patients, indiquant ainsi qu'une bonne qualité du protéome du sperme conduirait à éviter un nombre important de FCS précoce.

Dans les tentatives de FIV et ICSI, les résultats affichent un taux significativement plus important d'embryons top qualité dans les 3 cohortes de patients « non-protéolysé » (SPQI et pro-AKAP4). Une tendance à de meilleurs taux d'implantation, de grossesse clinique et de naissance vivante chez les patients appartenant à ces groupes est également mise en avant. Cependant, ces résultats ne sont pas significatifs.

Notre étude suggère que l'intégrité du protéome spermatique global évalué selon le SPQI et la pro-AKAP4 chez les hommes issus de couples infertiles pourrait (i) permettre de limiter les risques de FCS en IIU (ii) et être indicative d'un meilleur taux global de succès en FIV/ICSI. L'utilisation du SPQI et/ou la quantification de la protéine pro-AKAP4 en combinaison avec les paramètres spermatiques pourrait constituer une aide supplémentaire pour l'orientation des couples par les Cliniciens et les Biologistes de l'AMP. Ce travail correspond à **l'article 4 en préparation**.

Human sperm proteome profile and pro-AKAP4, new tracks to enhance Assisted Reproduction Technologies (ART) outcomes.

Sigala J^{1,2,3#}, Jumeau F^{1,2,3¥}, Keller L^{1,2}, Barbotin AL^{1,2}, Eddarkaoui S³, Obriot H³, Dossou Gbete F^{1,2}, Buée L³, Drumez E⁴, Sergeant N^{3*}, Mitchell V^{1,2*}

¹ University of Lille, EA 4308 - GQG – Gametogenesis and gamete quality, F-59000 Lille, France

² CHU Lille, Reproductive Biology – Spermiology – CECOS Institute, F-59000 Lille, France

³ University of Lille, INSERM, CHU Lille, UMR-S 1172, Alzheimer & Tauopathies, F-59000 Lille, France

⁴ University of Lille, CHU Lille, EA 2694 - Santé publique: épidémiologie et qualité des soins, F-59000 Lille, France

and ¥, Present address, respectively: Reproductive Biology Laboratory – Calais Hospital – F-62107 Calais, France; Reproductive Biology Laboratory - CECOS, Rouen University Hospital, Rouen University, F-76031 Rouen, France.

Corresponding author:

j.sigala@ch-calais.fr

*: these authors contributed equally to the present work.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the sperm proteome quality index (SPQI) which reflects the whole proteome quality of human ejaculated spermatozoa and the pro-AKAP4 sperm protein as potential prognosis biomarkers to predict ART outcomes.

Design: The analyze of ART outcomes were done by comparing two categories of patients. Patients presenting a “non-proteolysed” SPQI or pro-AKAP4 profile were confronted to patients with a “proteolysed” SPQI or pro-AKAP4 profile, respectively.

Settings: Academic IVF center of the Lille University Hospital

Patients: A total cohort of 153 distinct male patients from infertile couples for which the SPQI profile was known were included in this study. Three different groups were designed from this cohort. The total-SPQI group included the whole cohort constituted mostly of normozoospermic patients and some patients with mild sperm abnormality (n=153). The normo-SPQI group strictly included the normozoospermic patients of the cohort (n=119). The normo-pro-AKAP4 group was constituted with only normozoospermic patients for which the pro-AKAP4 quantification was also known (n=53). Each group was divided in 2 subgroups of patients: patients presenting a “non-proteolysed” SPQI or pro-AKAP4 profile were compared to patients “proteolysed”.

Interventions: none

Main outcome measures: Fertilization, embryo quality, implantation, clinical pregnancy, live birth and early miscarriage rates.

Results: In IVF/ICSI attempts considering the total-SPQI group, we found a significant higher number of top embryo quality and non-significant but higher implantation, clinical pregnancy and live birth rates in the “non-proteolysed” total-SPQI subgroup. Regarding IUI outcomes, the good quality of the sperm proteome led to prevent a significant number of early miscarriages. Similar results were highlighted considering the normo-SPQI group. Finally, ART outcomes from normozoospermic patients of the pro-AKAP4 group led to similar trend of results.

Conclusions: need to be analyzed These latter preliminary results suggested sperm proteome pattern of ejaculate spermatozoa according to SQPI and pro-AKAP4 level as new track to enhance ART success. However, these preliminary results must be interpreted with caution

due to the small cohort of patients studied. Further studies including a larger cohort of patients will be helpful to confirm the present study conclusion.

Key words: AKAP4, FIV, IUI, Proteome, Sperm, ART

CONFIDENTIEL

INTRODUCTION

It is well known that conception failure could be owed to female as well as male gamete quality. Around 15% of couples present difficulties to conceive and approximately 50% present alteration of sperm quality (Krausz, 2011). The competent gamete is the one which allow fertilization success, early embryo development and implantation in uterus partner (Assou *et al.*, 2010). To date, a lot of embryos obtained and transferred in assisted reproduction technology (ART) remains incompetent to continue their development. More, during an *in vitro* fertilization (IVF) or an intracytoplasmic sperm injection (ICSI) attempt, clinicians and embryologists tend to transfer more than a single embryo to increase pregnancy rate. Finding new male and female biomarkers would permit to improve the selection of the most efficient gamete and reduce at once the number of embryos to be produced and the number of multiple pregnancies.

Usually, clinical assessment of semen quality is based on a descriptive analysis of essential sperm parameters. It includes sperm count, motility and morphology (WHO, 2010). These three parameters are considered as the most predictive markers of male fertility (Guzik *et al.*, 2001; Jdrzejczak *et al.*, 2008) and used to predict pregnancy success (Aitken, 2006). Nevertheless, infertility of 50% of individuals classified as having a normozoospermia remains unknown (Krausz, 2011). In the last decade, numerous analyzes and biomarkers have been described to help intra-uterine insemination (IUI), IVF and ICSI attempts success (Sakkas, 2013). Particularly, using the proteomic technology, several studies identified relevant biomarkers of male infertility i.e. prohibitin (Wang *et al.*, 2012), vitamin-D-metabolizing enzyme CYP24A1 (Blomberg *et al.*, 2012), CFTR (Jiang *et al.*, 2014), or biomarkers predictive of ART outcomes success i.e. acrosin (Chaudhury *et al.*, 2005) or protamine (Aoki *et al.*, 2006; De Mateo *et al.*, 2009). However, among the whole sperm biomarkers and tests to determine the sperm quality, none used alone or in association are enough to diagnose consistently infertility or to predict ART outcomes.

Recently, we demonstrated that sperm proteome pattern appears to be a relevant approach to explore spermatozoon quality (Jumeau *et al.*, 2016 *in submission*). It was shown that 2 distinct sperm proteome profiles could be found in men from infertile couples: a “proteolysed” profile and a “non-proteolysed” profile. A sperm proteome quality index (SPQI) was developed to distinguish the 2 different proteome profiles. The difference observed between these 2 profiles is linked particularly to the degradation of one protein: A-kinase anchor protein 4 (AKAP4)

(Jumeau *et al.*, 2016 *in submission*). During spermatogenesis, AKAP4 is synthesized as a precursor of 95 kDa (pro-AKAP4) that is subsequently cleaved to the 85 kDa AKAP4 protein (Turner *et al.*, 1998). AKAP4 is localized in the fibrous sheath of the sperm flagellum (Moss & Gerdon, 2001; Luconi *et al.*, 2011). This protein plays important roles in regulation of motility, sperm capacitation and the acrosome reaction (Miki *et al.*, 2002; Carnegi *et al.*, 2009). Several studies demonstrated that IVF outcomes as fertilization and pregnancy rates, or embryos quality were linked to sperm motility (Chetrit *et al.*, 1995; Nagy *et al.*, 1995; Turhan *et al.*, 2011; Vendrell *et al.*, 2003; Verheyen *et al.*, 1999). Fertilization rate and embryo quality would be improved by the use of spermatozoa with normal motility, even in ICSI technology attempt (Nijs *et al.*, 1996; Bhilwadikar *et al.*, 2013). In our precedent study, we described a relationship between the sperm proteome profile and the sperm motility. More, we demonstrated that the proteolysis of pro-AKAP4 was positively correlated with the motility of post-gradient selected spermatozoa. So, it is worth considering if the sperm proteome profile in the first place and the pro-AKAP4 in a second place might provide additional information regarding to the ART outcomes.

In this prospective current study, we proposed to evaluate the proteome quality of human ejaculated spermatozoa through the SPQI and the pro-AKAP4 sperm protein as potential prognosis biomarkers to predict ART outcomes. This study was performed using different cohorts of men from infertile couples: normozoospermic and/or patients presenting mild sperm alteration. First point was to compare these profiles to the sperm parameters. Second point was to analyze the IUI, IVF and ICSI outcomes in terms of fertilization, embryos development, implantation, pregnancy and birth rates.

MATERIALS AND METHODS

Patients

A total of 153 distinct male patients included in the present study were prospectively recruited from the Academic IVF Centre of the Lille University Hospital (France) from October 2009 to July 2014. They belonged to infertile couples who were undergoing IUI, IVF or ICSI treatment. The procedure was approved by the local institutional review board of the Lille University Hospital. An informed consent was given from all subjects for the use of their semen for research purposes (PHRC 2009 program). The sperm proteome profile was established and the SPQI was calculated for the 153 patients. The pro-AKAP4 profile was done for 53 of these patients.

Design of the study

The analyze of ART outcomes were done by comparing two categories of patients. Patients presenting a “non-proteolysed” SPQI or pro-AKAP4 profile were confronted to patients with a “proteolysed” SPQI or pro-AKAP4 profile, respectively. This study was performed in 3 steps. Three different groups of couples were designed from the same cohort of the 153 male patients. In the first and second steps, the analyze were done according to the SPQI profile. The third step was done according to the pro-AKAP4 level.

The first group included the whole of patients (n=153), constituted mostly of normozoospermic patients (77.7 %) and some patients with mild sperm abnormality as count, mobility or morphology (22.3 %) according to the World Health Organization laboratory manual (WHO, 2010). This group was named total-SPQI group. The second group strictly included the normozoospermic patients (n=119). It was named normo-SPQI group. The third group was constituted with only normozoospermic patients for which the pro-AKAP4 was quantified (n=53). It was named normo-pro-AKAP4 group. For the 3 different steps of this study, each group was divided in 2 sub-groups of patients: patients presenting a “non-proteolysed” SPQI or pro-AKAP4 profile were named groups “A” et were compared to patients with a “proteolysed” profile named “B” (i-e total-SPQI A group were compared to total-SPQI B, normo-SPQI A to normo-SPQI B, and normo-pro-AKAP4 A to normo-pro-AKAP4 B).

Semen samples and quality assessment

Semen samples were collected by masturbation after 3–5 days of abstinence. After liquefaction (30 min after ejaculation), sperm parameters analysis (volume, cell counting, motility) were realized according to the protocol of the WHO. The sperm morphology characterization was performed according to the David's modified classification (Auger & Eustache, 2000). Semen characteristics are summarized in table 1, 2 and 3. The reproducibility of the inter-biologist evaluation of sperm parameters was validated by an external quality control (Evaluation Externe de Qualité, Biologie prospective).

Sperm protein extraction and proteome profile

The protocol for sperm cells selection, protein extraction and sperm proteome profile analyze was fully explained in previous study (Jumeau *et al.*, 2016 *in submission*). To resume, each remaining semen was separated from the seminal plasma and round cells by a density gradient, centrifuged twice with tris-saline buffer, and finally re-suspended in a lysis buffer containing 20 mM Tris, 2% SDS and 1% Nuclease Mix (GE Healthcare Life Sciences, USA). After sonication and centrifugation the supernatants were recovered. A total of 15 μ L of each protein homogenates samples were loaded on a polyacrylamide gel (1D SDS-PAGE). Electrophoresis was performed, then the gel was stained with Coomassie-Blue (0.1% Blue G250 (Biorad, USA), 50% ethanol (v/v), 10% acetic acid (v/v) and H₂O). Protein staining was visualized with an Epson perfection V750 Pro scanner (Epson, France) and acquired using Adobe Photoshop Element 9 Software (Adobe, France).

Immunoblotting and pro-AKAP4 quantification

The levels of pro-AKAP4 were further studied using Western blots. After SDS-PAGE, sperm proteins were transferred onto 0.45 μ m nitrocellulose membranes (Life Science GE Healthcare, USA) using the NuPage Liquid Transfer System (Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. Membranes were blocked in 5% skimmed milk in Tris-HCl 15 mM pH 8.0/NaCl 140 mM/0.05%; w/v / Tween-20 (TNT buffer). Membranes were incubated with the mouse AKAP4 amino-terminal antibody (AKAP4 N-ter, 1:10000 in 1% bovine serum albumin (BSA)/TBS; Ab 56551 (Abcam, UK)), overnight at 4°C with rotation. Immune complexes were revealed after incubation with secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (horse anti-mouse: 1:50000 in TNT (Vector Laboratories, CA USA))

and detected using the ECL™ chemiluminescence kit (Life Science GE Healthcare, USA). The luminescence of immune complexes was measured with a LAS-3000 system (Fujifilm, USA), and Western blot densitometry was performed using ImageJ software (NIH).

Sperm proteome quality index (SPQI) formulation

After numerical analyses of Coomassie blue stained gels with Image J (fig. 1.A), bands with the strongest intensities were used to compare the 153 human sperm protein samples. Two windows of molecular weight were defined. Thus, protein bands between 15 to 30 kDa (Low molecular weights LMW) and secondly bands between 80 to 110 kDa (high molecular weights HMW) were selected. These two windows were reproducibly defined using molecular weight markers to calibrate the gels. Each band visualized on gel was defined as a pic by the software (fig. 1.B). For each window, area under the curve was calculated (fig. 1.C). To establish the SPQI, the ratio between the area under curve from HMW and LMW band intensities (fig. 1.D) was calculated. From this ratio, it was defined SPQI A (ratio between 1 and 2) and a SPQI B (lower ratio of 1 or greater than 2) profiles. The SPQI A reflected a homogeneous distribution of the proteins corresponding to a "non-proteolysed" proteome profile. The SPQI B showed partial proteolysis of all high molecular weight proteins corresponding to a "proteolysed" proteome profile.

Ovarian stimulation and assisted reproductive technology procedure

IUI attempts

Injectable gonadotropin was used on day 2 or day 3 of the cycle at doses of 50–150 units based on female parameters. A monitoring by blood hormonal measurement and vaginal ultrasound examination was performed during the all ovarian stimulation. According to sonographic and hormonal criteria, ovulation triggering was performed using 5000 IU hCG (Ovitrelle®, Merck-Serono, Germany) when diameter of one to maximum three follicles was strictly larger than 16 mm. Sperms were prepared using the discontinuous gradient method. Briefly, following liquefaction at room temperature, the semen was overlaid on a 45% and 90% PureSperm gradient column and centrifuged at 300 g for 20 minutes followed by washing the sperm pellet at 500 g in FertiCult™ IVF medium (FertiCult™ IVF, Fertipro, Belgium). One to 10 million of washed progressive spermatozoa were replaced in a single insemination 36 hours after hCG administration.

IVF and ICSI attempts

In agonist protocol, desensitization was started in the mid-luteal phase of the preceding cycle or, for the patients with dysovulation, on the first day of bleeding. Daily subcutaneous injections of recombinant FSH (r-FSH) were started 12 to 15 days after agonist initiation only if E₂ levels were lower than 50 pg/ml and if there was no functional ovarian cyst. In antagonist protocol, r-FSH injections were started on the second day of menses. The antagonist was introduced on day 6 of the FSH treatment. The choice of agonist or antagonist protocol was established on female parameters as age, body mass index (BMI), anti-müllerian hormone (AMH) level, and basal antral follicle count (AFC). A monitoring by blood hormonal measurement and vaginal ultrasound examination was performed during the all ovarian stimulation. According to sonographic and hormonal criteria, oocyte maturation was induced by the administration of 5000 IU hCG (Ovitrelle[®], Merk-Serono, Germany) when diameter of at least three follicles was strictly larger than 16 mm. Oocytes were collected using transvaginal ultrasound-guided needle aspiration puncture 35–36 hours later. Sperms were prepared as the same way than IUI attempts.

In conventional IVF attempts every oocytes were inseminated approximately 3 hours after oocytes retrieval. During ICSI attempts, oocytes were injected under magnification x200 from an inverted microscope (Leica DMIRB). Technique of ICSI was performed by using only metaphase 2 oocyte (M2) according to the conventional technique (Van Steirteghem *et al.*, 1993). Culture of injected oocytes and embryos was performed in Global[®] medium (JCD-Laboratoires, France) under 5% CO₂ at 37°C. Assessment of normal fertilization (zygotes presenting 2 pronuclei (2PN)) was estimated between 16 or 18 hours after sperm injection. Early cleavage was noted 27 hours post-injection. Embryo quality was estimated 44 to 46 hours post-injection. Embryos were graded in 3 categories according to their morphology including number and the size of blastomeres, degree of fragmentation and presence of multinucleated blastomeres (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology *et al.*, 2011). Grade 1 embryos presented 4-cells at day 2 or 8-cells at day 3, regular, normal size and no multinucleated blastomeres, and no anucleated fragmentation. Grade 2 presented 4-cells at day 2 or 8-cells at day 3, regular, normal size and no multinucleated blastomeres, and less than 25% anucleated fragmentation. Others embryos were graded 3. Grade 1 embryos were considered as top quality with higher potential of implantation.

Embryo transfer

Embryos transfer was performed with Elios catheters (Elios Cat Tek, France) 48 or 72 hours post-oocyte retrieval. When possible, elective single embryo transfer was performed with grade 1 embryo according to our center policy. Otherwise, two grade 1 embryos were transferred, or one grade 1 and one grade 2, or two grade 2 or 3 when no grade 1 embryo was obtained. Clinical pregnancy rate was defined as an ongoing pregnancy confirmed by the number of a gestational sacs with an embryo and heart activity by ultrasound. Implantation rate was defined by the ratio between the number of gestational sacs and the number of embryos transferred. Early miscarriage rate was defined by a β -hcg level superior to 100 UI but with no further positive ongoing clinical pregnancy evaluated by ultrasound.

Statistical analysis

Categorical variables are expressed as frequencies and percentages. Quantitative variables are expressed as medians (interquartile ranges, IQR) or means (ranges). Categorical variables were compared between groups using Chi-square test or Fisher exact test (when the expected cell frequency was <5) and quantitative variables were compared between groups using Mann-Whitney U test. Statistical testing was done at the two-tailed α level of 0.05. Data were analyzed using the SAS software package, release 9.4 (SAS Institute, Cary, NC).

RESULTS

Characteristics of the study population of IUI attempts

Values are expressed as median (interquartile range).

Total-SPQI group analysis (n = 153)

Clinical characteristics of the 101 patients which benefit of at least one IUI attempt are shown in table 1. The mean age, BMI or tobacco consumption of male patients did not differ significantly between the two subgroups. Female partners of these patients present equivalent results unless a relative but not significant higher age in total-SPQI B subgroup and FSH level in the total-SPQI A.

Normo-SPQI group analysis (n = 119)

Clinical characteristics of the 88 normozoospermic patients which benefit of at least one IUI attempt are shown in table 1. Results were equivalent to those observed in the total-SPQI group.

Normo-pro-AKAP4 group analysis (n = 53)

Clinical characteristics of the 40 normozoospermic patients which benefit of at least one IUI attempt are shown in table 1. The Normo-pro-AKAP4 A and B subgroups did not differ in terms of age, BMI, tobacco, duration of infertility, AFC count and FSH or AMH levels.

Semen analysis according to the IUI attempts

After sperm selection, no epithelial or round cells were detected as established by light microscopy assessment. Values are expressed as median (interquartile range).

Total-SPQI group analysis (n = 153)

Results through the total-SPQI subgroups of the 101 individual semen samples analyzed under light microscopy from all patients which benefit of at least one IUI attempt are shown in table 2. The volumes and sperm counts were normal and equivalent in the subgroups A and B. It was noted a significant higher progressive motility to subgroup A than subgroup B. The percentage of typical spermatozoon was equivalent in the two groups, as the MAI score. The median sperm concentration, progressive motility including at 24 hours and the proportion of

normal forms after density gradient centrifugation were also equivalent between total-SPQI A and B subgroups.

Normo-SPQI group analysis (n = 119)

Results through the normo-SPQI subgroups of the 88 individual semen samples analyzed under light microscopy from all normozoospermic patients which benefit of at least one IUI attempt are shown in table 2. The semen parameters of all patients included in this group were over the lower limit of the international recommendations (WHO, 2010). The results were equivalent to those observed in the total-SPQI group analysis.

Normo-pro-AKAP4 group analysis (n = 53)

Results through the normo-pro-AKAP4 subgroups of the 40 individual semen samples analyzed under light microscopy from all normozoospermic patients which benefit of at least one IUI attempt are shown in table 2. The semen parameters of all patients included in this group were over the lower limit of the international recommendations (WHO, 2010). The results were equivalent to those observed in the total-SPQI group. The only difference noted was a relative but no significant higher progressive motility to subgroup A than subgroup B.

IUI outcomes

Values are expressed as mean (range).

Total-SPQI group analysis (n = 153)

IUI outcomes of the patients which benefit of at least one IUI attempt are shown in table 3. The 101 couples underwent a total of 309 IUI cycles leading to (i) 29 clinical ongoing pregnancies (ii) 27 deliveries and 21 early miscarriages. Clinical pregnancy and live birth rates were similar in the total-SPQI A and B subgroups. A higher significant miscarriage rate was noted in the total-SPQI B subgroup.

Normo-SPQI group analysis (n = 119)

IUI outcomes of the normozoospermic patients which benefit of at least one IUI attempt are shown in table 3. The 88 couples underwent a total of 268 IUI cycles leading to (i) 27 clinical ongoing pregnancies (ii) 24 deliveries and 17 early miscarriages. Clinical pregnancy and live

birth rates were similar in the normo-SPQI A and B subgroups. A relative higher but no significant early miscarriage rate was noted in the normo-SPQI B subgroup.

Normo-pro-AKAP4 group analysis (n = 53)

IUI outcomes of the normozoospermic patients which benefit of at least one IUI attempt are shown in table 3. The 40 couples underwent a total of 109 IUI cycles leading to (i) 12 clinical ongoing pregnancies (ii) 10 deliveries and 9 early miscarriages. Clinical pregnancy and live birth rates were similar in the pro-AKAP4 A and B subgroups. A relative higher but no significant early miscarriage rate was noted in the pro-AKAP4 B subgroup.

Characteristics of the study population of IVF/ICSI attempts

Values are expressed as median (interquartile range).

Total-SPQI group analysis (n = 153)

Clinical characteristics of the 94 patients which benefit of at least one IVF or ICSI attempt are shown in table 4. The mean age, BMI or tobacco consumption of male patients did not differ significantly between the two subgroups. Female partners of these patients present equivalent results unless a relative but not significant higher age in the total-SPQI A subgroup.

Normo-SPQI group analysis (n = 119)

Clinical characteristics of the 65 normozoospermic patients which benefit of at least one IVF or ICSI attempt are shown in table 4. Results were equivalent to those observed in the total-SPQI group.

Normo-pro-AKAP4 group analysis (n = 53)

Clinical characteristics of the 24 normozoospermic patients which benefit of at least one IVF or ICSI attempt are shown in table 4. The Normo-pro-AKAP4 A and B subgroups did not differ in terms of age, BMI, tobacco, AFC count and FSH or AMH levels.

Semen analysis according to the IVF/ICSI attempts

After sperm selection, no epithelial or round cells were detected as established by light microscopy assessment. Values are expressed as median (interquartile range).

Total-SPQI group analysis (n = 153)

Results through the total-SPQI subgroups of the 94 individual semen samples analyzed under light microscopy from all patients which benefit of at least one IVF or ICSI attempt are shown in table 5. The volumes, sperm counts, progressive motility, percentage of typical spermatozoon and MAI score were equivalent in the subgroups A and B. The median sperm concentration, progressive motility including at 24 hours and the proportion of normal forms after density gradient centrifugation were equivalent between the two subgroups.

Normo-SPQI group analysis (n = 119)

Results through the normal-SPQI subgroups of the 65 individual semen samples analyzed under light microscopy from all normozoospermic patients which benefit of at least one IVF or ICSI attempt are shown in table 5. The semen parameters of all patients included in this group were over the lower limit of the international recommendations (WHO, 2010). The results were equivalent to those observed in the total-SPQI group.

Normo-pro-AKAP4 group analysis (n = 53)

Results through the normo-pro-AKAP4 subgroups of the 24 individual semen samples analyzed under light microscopy from all normozoospermic patients which benefit of at least one IVF or ICSI attempt are shown in table 5. The semen parameters of all patients included in this group were over the lower limit of the international recommendations (WHO, 2010). The results were equivalent to those observed in the total-SPQI group.

IVF and ICSI outcomes

Values are expressed as mean (range).

Total-SPQI group analysis (n = 153)

The 94 couples underwent a total of 184 IVF or ICSI cycles (77.2 % and 22.8 %, respectively) leading to: (i) 879 total embryos produced, (ii) 318 fresh embryos transferred, (iii) 57 clinical ongoing pregnancies, (iv) 51 deliveries and (v) 11 early miscarriages. Female parameters as the mean number of total or M2 oocytes retrieved revealed no difference between subgroups A and B. Percentage of normal fertilization did not vary and it was noted an equivalent number of 1PN or polyploid zygotes. Early cleavage of the fertilized oocytes was observed in equal proportion from subgroups A and B. We did not find any difference regarding the absolute number of embryos obtained in the two subgroups but the rate of top quality embryos (grade 1) was higher in subgroup A. Grades 2 and 3 embryos were comparable in both subgroups. The mean number of embryos transferred presented significant

difference in favor of subgroup B. A higher mean number of embryos were cryopreserved in the subgroup A. Clinical pregnancy, implantation and live birth rates were higher but not significantly in subgroup A than subgroup B. Early miscarriage rate was also higher in the subgroup A.

Normo-SPQI group analysis (n = 119)

The 65 couples underwent a total of 120 IVF cycles (no ICSI technology has been used for these normozoospermic patients) leading to: (i) 614 total embryos produced, (ii) 214 fresh embryos transferred, (iii) 35 clinical ongoing pregnancies, (iv) 32 deliveries and (v) 7 early miscarriages. Results were similar than those of total-SPQI subgroups. The only differences were a significant higher atretic oocytes and grade 1 embryos rate in subgroup A and a higher mean number of fresh embryos transferred in subgroup B.

Normo-pro-AKAP4 group analysis (n = 53)

The 24 couples underwent a total of 47 IVF cycles (no ICSI technology has been used for these normozoospermic patients) leading to: (i) 316 total embryos produced, (ii) 85 fresh embryos transferred, (iii) 12 clinical ongoing pregnancies, (iv) 12 deliveries and (v) no early miscarriage. The mean number of total and M2 oocytes retrieved were significantly higher and immature oocytes lower in subgroup A. Percentage of normal fertilization and early cleavage did not vary and it was noted an equivalent number of 1PN or polyploid zygotes. The mean number of 2PN zygote was superior in subgroup A. We also found a higher absolute number of embryos produced in subgroup A. Grades 1 and 2 embryos were comparable in both subgroups but the rate of grade 3 embryos was higher in the subgroup B. The mean number of embryos transferred and cryopreserved presented significant differences in favor of subgroup A. Clinical pregnancy, implantation and live birth rates were higher but not significantly in subgroup A than subgroup B.

DISCUSSION

In the present study, we reported the IUI and IVF/ICSI outcomes according to the SPQI and the pro-AKAP4 profiles of 153 patients. This analysis was performed in 3 steps. First, we analyzed ART outcomes from the whole patients in our cohort according to the SPQI profile proteolysis, consisting mostly of normozoospermic patients and some patients with mild sperm abnormality as count, mobility or morphology (n=153). In IVF/ICSI attempts, we found a significant higher number of top embryo quality and a non-significant higher implantation, clinical pregnancy and live birth rates in the “non-proteolysed” proteome subgroup. Regarding IUI outcomes, the good quality of the sperm proteome led to prevent a significant number of early miscarriages. Secondly, we have refined the first analysis exclusively including the normozoospermic patients (n=119). Similar results were highlighted. Finally, to go further in the analysis of this study, we analysed ART outcomes from normozoospermic patients according to the pro-AKAP4 level (n=53). A similar trend of results than the first analysis was noted. However, these latter preliminary results need to be analyzed with caution due to the small cohort of patients studied. Moreover, the statistical IVF-ICSI outcomes analyses of the normo-pro-AKAP4 group are not interpretable because of confounding factors (mean rate of total and M2 oocytes, and total embryos produced) between the two subgroups that result in bias. Nonetheless, we can suggest sperm proteome pattern of ejaculate spermatozoa according to SQPI and pro-AKAP4 level as new track to enhance ART success. Further complementary studies are needful including larger cohort of patients to determine if sperm proteome profile and/or pro-AKAP4 would represent new prognosis biomarkers candidate.

Currently, the prognosis of ART success based on sperm quality is still mainly done through the evaluation of ejaculated spermatozoa count and motility (Lewis, 2007; Nallella *et al.*, 2006). In this study, spermatozoa samples of total-SPQI A subgroup presented a higher but not significant progressive motility after gradient than subgroup B samples. Furthermore, this trend of higher progressive motility after gradient was not noted in the analyse using cohorts of only normozoospermic patients. The progressive motility post-gradient was similar between normo-SPQI A and B subgroups, as between normo-pro-AKAP4 A and B subgroups. In our previous study (Jumeau *et al.*, 2016 *in submission*), we demonstrated that pro-AKAP4 level was significantly correlated with the progressive motility of separated spermatozoa. The divergence between our previous and this study may be explained by sample size. More, the morphology remains also an important parameter of the semen analysis even if its real part in

evaluation of male fertility potential is unclear (Natali & Turek, 2012). However, this setting is not to be considered here because whatever of the 3 different cohorts of patients used, the percentage of typical spermatozoa was similar between samples of “non-proteolysed” and “proteolysed” subgroups, as well as the MAI score.

Interestingly, fertilization rates were systematically similar between “non-proteolysed” and “proteolysed” subgroups in any of the 3 different cohorts of patients. It was demonstrated that the sperm tail is used both for oocyte penetration and to direct the intra-oocyte movement of the male pronucleus. Consequently, sperm tail has an effect on success or failure of embryogenesis (Bhilwadikar *et al.*, 2013). Observations of our previous study (Jumeau *et al.*, 2016 *in submission*) suggested that the degradation of the sperm proteome profile might result from a partial proteolysis. Results of the present study supposed that proteolysis of either the global sperm proteome or the pro-AKAP4 did not impact directly on efficacy of the fertilization potential.

Producing embryos with higher implantation potential is of great importance in ART. First, in order to transfer an elective single embryo and reduce medical risks of multiple pregnancies. Second, to increase the “take home baby” chances for the patients. We observed a significantly higher number of top quality embryos in the “non-proteolysed” total-SPQI subgroup despite an equivalent mean number of embryos in both subgroups. Unsurprisingly, the mean numbers of embryos transferred and of surnumerary embryos cryopreserved were also significantly higher in that subgroup. Refining the cohort only with normozoospermic patients, we also observed a higher number of grades 1 and 2 embryo quality on “non-proteolysed” SPQI and pro-AKAP4 subgroups. However, this observation was not always statistically reflected although the higher embryo quality was indirectly confirmed by a significant higher embryo freezing rate. It is known that the sperm tail contributes to the development of mitotic spindles and microtubule nucleation during early embryo development (Van Blerkom *et al.*, 1995). Some studies revealed that the quality of embryos were lower during attempts when male partner had defective sperm motility (Jiaen *et al.*, 1995; Nijs *et al.*, 1996; Avenarius *et al.*, 2009). Particularly, using an immotile spermatozoon instead of a motile in ICSI allowed obtaining lower quality embryos rates (Nijs *et al.*, 1996). These assessments suggest that the sperm proteome profile and the presence of pro-AKAP4 protein are linked to the capacity to obtain good quality embryos.

The sperm proteome profile would reflect the male competence and consequently would lead to a non-invasive test of predicting IVF or ICSI outcomes. Considering the whole male patients from infertile couples included in this study, we observed higher but non-significant pregnancy and birth rates when the sperm proteome was not affected. Likewise, we observed that embryo implantation was higher in this group of patients, reinforcing the results showing the significant higher quality of embryos. Very few studies focused on the sperm proteome profiles and assisted reproduction outcomes (Pixton, 2004; de Mateo *et al.*, 2007). Two studies noted that a decrease of protamines P1/P2 ratios was related to a poor pregnancy outcome, despite an equivalent mean number of embryos (Aoki *et al.*, 2006; De Mateo *et al.*, 2009). Observing these results we can hypothesize that sperm samples presenting a proteolysis profile could fertilize oocytes but partially failed during next steps as good quality embryo development, implantation, ongoing pregnancy and live birth. Surprisingly, the analysis of IUI attempts did not showed higher rates of pregnancy or birth. However, an important early miscarriage rate was observed in the group in which the proteome profile was proteolysed. Thus, the whole male patients of this study with a “non-proteolysed” SPQI exhibit an enhancement of both sperm motility of selected spermatozoa and success rates during IVF/ICSI attempts. These results are consistent with the scientific literature that highlights the link between sperm motility and success rates in ART. Several studies have shown that a low motility of spermatozoa is involved with a decrease of pregnancy rates (Kahraman *et al.*, 1996; Nijs *et al.*, 1996). Bhilawadikar *et al.* reported recently that ART outcomes are generally poor for couples presenting an oligoasthenozoospermia (Bhilawadikar *et al.*, 2013). So, the proteolysis of the sperm proteome seems to be related not only with an alteration of sperm motility but would be responsible for wrong results in each steps of ART success.

Similarly, the reducing cohort of normozoospermic patients with a “non-proteolysed” SPQI presented higher significant chances of pregnancy. The implantation and birth rates showed a non-significant trend in favour of normo-SPQI A subgroup. In the “non-proteolysed” pro-AKAP4 subgroup, we also observed a trend in favour of pregnancy, birth and implantation outcomes although not significant. The higher chances of ART success in the “non-proteolysed” normo-SPQI or normo-pro-AKAP4 subgroups compared to “proteolysed” subgroups were reinforced considering cumulative results of pregnancy, implantation and live birth rates. Similarly as the entire cohort study, an important early miscarriage rate was observed in the 2 normozoospermic patients’ subgroups with a “proteolysed” proteome

profile during IUI attempts. Several lines of thought are to be considered. The lack of power of the normozoospermic patients groups (normo-SPQI, n=119; normo-pro-AKAP4, n=47) would point out the lack of significance of these findings (total-SPQI, n=153). However, although non-significant these results were equivalent of those obtained with the whole patients' cohort. We can hypothesize that statistical results would become significant with the inclusion of a higher number of normozoospermic patients. In the case of normo-pro-AKAP4 group results, we must underline that the greater results in the "non-proteolysed" subgroup could be influenced by the significantly higher number of mature oocyte, diploid zygote, total embryos and embryos transferred in this group. In parallel, we also cannot exclude the potential impact of the use of ICSI technology for 22.7 % of the patients of the total-SPQI cohort, which causes a bias by overcoming sperm motility factor. Nonetheless, we observed here that sperm proteome and pro-AKAP4 integrities seem to impact at once on sperm motility and ART outcomes. We described recently that the proteolysis of pro-AKAP4 was linked to sperm motility (Jumeau *et al.*, 2016 *in submission*). Other motility proteins of spermatozoa as Tektin 2 or centrin have been reported to be associated with poor sperm motility and lower pregnancy rate (Hinduja *et al.*, 2008; Bhilwadikar *et al.*, 2013). So, this study completes the literature on the topic of sperm motility proteins and ART outcomes.

CONCLUSION

This preliminary study suggests that SPQI and pro-AKAP4 profiles would be new elements to consider to prognosis IVF-ICSI outcomes success and to avoid miscarriage during IUI attempts. Further studies with larger cohort of patients are needed to determine if the SPQI and/or pro-AKAP4 represent novel prognostic biomarkers success in ART among normozoospermic patients and/or patients presenting sperm alterations.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by Lille Hospital Center (PHRC 2009), the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM), the French National Center for Scientific Research (CNRS), the Institute of Predictive Medicine and Therapeutic Research (IMPRT), the University of Lille 2, Région Nord Pas-de-Calais and the European Regional Development Fund. FJ received a scholarship from Lille Hospital Medical Center.

CONFLICT OF INTEREST

JS, FJ, NS and VM are cited as inventors on a patent application (Patent EP13306212.5).

CONFIDENTIEL

REFERENCES

Aitken RJ. Sperm function tests and fertility. *Int J Androl.* 2006;29:69–75.

Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting *Hum Reprod.* 2011 Jun;26(6):1270-83.

Aoki VW, Liu L, Jones KP, Hatasaka, HH, Gibson M, Peterson CM, Carrell DT. Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertil Steril.* 2006;86:1408–1415.

Assou S, Haouzi D, De Vos J, Hamamah S. Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. *Mol Hum Reprod.* 2010 Aug;16(8):531-8.

Auger J, Eustache F, David G. Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. *Andrologie.* 2000;10:358–373.

Avenarius MR, Hildebrand MS, Zhang Y, Meyer NC, Smith Luke LH, Kahrizi K, Najmabadi H, Smith RJ. Human male infertility caused by mutations in the Catsper1 Channel Protein. *Am J Hum Genet.* 2009;84:505–10

Bhilawadikar R, Zaveri K, Mukadam L, Naik S, Kamble K, Modi D, Hinduja I. “Levels of Tektin 2 and CatSper 2 in Normozoospermic and Oligoasthenozoospermic Men and Its Association with Motility, Fertilization Rate, Embryo Quality and Pregnancy Rate.” *J Assist Reprod Genet.* 2013;30:513–23.

Blomberg JM, Jorgensen A, Nielsen JE, Bjerrum PJ, Skalkam M, Petersen JH, Egeberg DL, Bangsbo S, Andersen AN, Skakkebaek NE, Juul A, Rajpert-De Meyts E, Dissing S, Leffers H, Jorgensen N. Expression of the vitamin D metabolizing enzyme CYP24A1 at the annulus of human spermatozoa may serve as a novel marker of semen quality. *Int J Androl.* 2012;35:499-510.

Blerkom JV, Davis P, Merriam J, Sinclair J. Nuclear and cytoplasmic dynamics of sperm penetration, pronuclear formation and microtubule organization during fertilization and early preimplantation development in the human. *Hum Reprod Updat.* 1995;1: 429–61.

Carnegie GK, Means CK, Scott JD. A-kinase anchoring proteins: from protein complexes to physiology and disease. *IUBMB Life.* 2009;61:394–406.

Chaudhury K, Das T, Chakravarty B, Bhattacharyya AK. Acrosin activity as a potential marker for sperm membrane characteristics in unexplained male infertility. *Fertil Steril.* 2005;83:104–109.

Chetrit AB, Senoz S, Greenblatt EM, Casper RF. In vitro fertilization outcome in the presence of severe male factor infertility. *Fertil Steril.* 1995;63:1032–7.

De Mateo S, Gázquez C, Guimerà M, Balasch, J, Meistrich ML, Ballejà JL, Oliva R. Protamine 2 precursors (Pre-P2), protamine 1 to protamine 2 ratio (P1/P2), and assisted reproduction outcome. *Fertil Steril.* 2009;91:715–722.

De Mateo S, Martínez-Heredia J, Estanyol JM, Domínguez-Fandos D, Vidal-Taboada JM, Ballejà JL, Oliva R. Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa. *Proteomics.* 2007;7:4264–4277.

- Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson SA, Cisneros P, Steinkampf MP, Hill JA, Xu D, Vogel DL; National Cooperative Reproductive Medicine Network. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med*. 2001;345:1388-93.
- Hoshi K, Katayose H, Yanagida K, Sato A, Yazawa H. Intra cytoplasmic sperm injection using immobilizes or motile human spermatozoon. *Fertil Steril*. 1995;63:1241-5.
- Hinduja I, Zaveri K, Baliga N. Human sperm centrin levels & outcome of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) - A pilot study. *Indian J Med Res*. 2008;128:606-10.
- Jedrzejczak P, Taszarek-Hauke G, Hauke J, Pawelczyk L, Duleba AJ. Prediction of spontaneous conception based on semen parameters. *Int J Androl*. 2008;31:499-507
- Jiang LY, Shan JJ, Tong XM, Zhu HY, Yang LY, Zheng Q, Luo Y, Shi QX, Zhang SY. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is correlated closely with sperm progressive motility and normal morphology in healthy and fertile men with normal sperm parameters. *Andrologia*. 2014;46:824-30.
- Jumeau F, Sigala J, Fernandez-Gomez FJ, Carpentier C, Eddarkaoui S, Obriot H, Duban-Deweer S, Hachani J, Rigot JM, Buée L, Devos P, Béhal H, Sergeant N, Mitchell V. Associations between progressive motility, the human sperm proteome and A-kinase anchor protein 4. *Reprod Biomed Online*. 2016. *In submission*.
- Kahraman S, Tasdemir M, Polat I, Isik AZ, Biberoglu K, Vanderzwalmen P, Nijs M, Schoysman R. Pregnancies achieved with testicular and ejaculated spermatozoa in combination with intracytoplasmic sperm injection in men with totally or initially immotile spermatozoa in the ejaculate. *Hum Reprod*. 1996;11:1343-6.
- Krausz C. Male infertility: Pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011;25:271-285.
- Lewis SE. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction*. 2007;134:31-40.
- Liu J, Nagy Z, Joris H, Tournaye H, Smitz J, Camus M, Devroey P, Van Steirteghem A. Analysis of 76 total fertilization failure cycles out 2732 ICSI cycle. *Hum Reprod*. 1995;10:2630-6.
- Luconi M, Cantini G, Baldi E, Forti G. Role of a-kinase anchoring proteins (AKAPs) in reproduction. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011;16:1315-30.
- Miki K, Willis WD, Brown PR, Goulding EH, Fulcher KD, Eddy EM. Targeted disruption of the Akap4 gene causes defects in sperm flagellum and motility. *Dev Biol*. 2002;248:331-42.
- Moss SB, Turner RM, Burkert KL, VanScoy Butt H, Gerton GL. Conservation and function of a bovine sperm A-kinase anchor protein homologous to mouse AKAP82. *Biol Reprod* 1999; **61**:335-342.
- Nallella KP, Sharma RK, Aziz N, Agarwal A. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertil Steril*. 2006;85:629-634.
- Nagy ZP, Liu J, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, Derde MC, Devroey P, Van Steirteghem AC. The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod*. 1995;10:1123-9.
- Natali A, Turek PJ. An assessment of new sperm tests for male infertility. *Urology*. 2011;77:1027-34

- Nijs M, Vanderzwalmen P, Vandamme B, G-Bertin S, Lejeune B, Segal L, van Roosendaal E, Schoysman R. Fertilizing ability of immotile spermatozoa after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1996;11:2180–5.
- Pixton KL, Deeks ED, Flesch FM, Moseley FL, Bjorndahl L. Sperm proteome mapping of a patient who experienced failed fertilization at IVF reveals altered expression of at least 20 proteins compared with fertile donors: case report, *Hum. Reprod.* 2004;19:1438–1447.
- Sakkas D. Novel technologies for selecting the best sperm for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2013;15;99:1023-9.
- Turhan N, Pekel A, Ayrim A, Bayrak O. ICSI outcome in severely oligoasthenozoospermic patients and its relationship to prewash progressive sperm motility. *Turk J Med Sci.* 2011;4:995–9.
- Turner RM, Johnson LR, Haig-Ladewig L, Gerton GL, Moss SB. An X-linked gene encodes a major human sperm fibrous sheath protein, hAKAP82. Genomic organization, protein kinase A-RII binding, and distribution of the precursor in the sperm tail. *J Biol Chem* 1998;273:32135–32141.
- Van Blerkom J, Davis P, Merriam J, Sinclair J. Nuclear and cytoplasmic dynamics of sperm penetration, pronuclear formation and microtubule organization during fertilization and early preimplantation development in the human. *Hum Reprod Update.* 1995;1:429-61.
- Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smits J, Wisanto A, Devroey P. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1993;8:1061-6.
- Vendrell JM, Arán B, Veiga A, García F, Coroleu B, Egozcue S, Egozcue J, Barri PN. Spermatogenic patterns and early embryo development after intracytoplasmic sperm injection in severe oligoasthenozoospermia. *J Assist Reprod Genet.* 2003;20:106–12.
- Verheyen G, Tournaye H, Staessen C, De Vos A, Vandervorst M, Steirteghem AV. Controlled comparison of conventional in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in patients with asthenozoospermia. *Hum Reprod.* 1999;14:2313–9.
- Wang MJ, Ou JX, Chen GW, Wu JP, Shi, HJ, O WS. Does Prohibitin Expression Regulate Sperm Mitochondrial Membrane Potential, Sperm Motility, and Male Fertility? *Antioxid Redox Signal* 2012;17:513–519.
- World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 2010. 5th edn.

Table 1: Baseline clinical, hormonal, and ultrasonographic characteristics of the IUI attempts according to the total-SPQI, normo-SPQI and normo-pro-AKAP4 groups.

	<i>total-SPQI group</i>			<i>normo-SPQI group</i>			<i>normo-pro-AKAP4 group</i>		
	<i>total-SPQI A</i>	<i>total-SPQI B</i>	<i>p-value</i>	<i>normo-SPQI A</i>	<i>normo-SPQI B</i>	<i>p-value</i>	<i>normo-pro-AKAP4 A</i>	<i>normo-pro-AKAP4 B</i>	<i>p-value</i>
	n = 46	n = 55		n = 42	n = 46		n = 24	n = 16	
Patient age (<i>yrs</i>)	34 (30.5-36.5)	36 (31-40)	0.130	34 (30-36.5)	35.5 (31-40)	0.136	34 (30-38)	33.5 (31-39.5)	0.492
Partner age (<i>yrs</i>)	31 (27-34)	32 (30-36)	0.062	30 (27-34)	32 (30-34)	0.075	31 (27-36)	32 (30-36)	0.491
BMI patient	24 (23-26)	25 (23-27)	0.227	24 (23-26)	26 (23-27)	0.329	24 (22-26)	23 (22-27)	0.948
BMI partner	22 (21-26)	23 (21-27)	0.700	22 (21-26)	23 (21-26.5)	0.972	24 (21-28)	23.5 (21-25)	0.667
Tobacco patient (<i>cig/d</i>)	0 (0-10)	0 (0-10)	0.269	0 (0-10)	1.5 (0-10)	0.168	3 (20-0)	1.5 (0-10)	0.515
Tobacco partner (<i>cig/d</i>)	0 (0-0)	0 (0-0)	0.725	0 (0-0)	0 (0-0)	0.544	0 (0-0)	0 (0-5)	0.242
Duration of infertility (<i>yrs</i>)	3.5 (3-4.5)	3.7 (2.5-5.5)	0.772	3.5 (3-4)	4 (2.5-6.5)	0.470	3.5 (2-9)	5.5 (2.5-8)	0.302
Partner FSH (U/L)	5.5 (4.4-7.4)	5.1 (4.2-6.3)	0.185	5.5 (4.6-7.4)	5 (4.2-6)	0.053	5.1 (4.1-7.3)	5.1 (4.2-6)	0.912
Partner AMH (pmol/L)	21.6 (9.8-44.3)	24.3 (12.8-46.1)	0.657	23.3 (10.6-47.9)	26.6 (15-52)	0.559	21.5 (12-55)	19.6 (12.3-46.1)	0.905
Partner AFC	19.3 (10-41)	26 (11-42)	0.654	20.5 (11-34.5)	25 (12-40)	0.690	20 (11-48)	28 (21-68)	0.688

Note : Values are expressed as median (interquartile range). AKAP : A-kinase anchor protein; AMH = anti-müllerian hormone; BMI = body mass index; AFC = antral follicle count; *cig/d* = cigarettes/day; FSH = follicle stimulating hormone; *n* = number; PN = pronucleus; SPQI = sperm proteome quality index; *yrs* = years.

* $p < 0.05$ is considered as significant

Table 2: Sperm parameters of the IUI attempts according to the total-SPQI, normo-SPQI and normo-pro-AKAP4 groups.

	<i>total-SPQI group</i>			<i>normo-SPQI group</i>			<i>normo-pro-AKAP4 group</i>		
	<i>total-SPQI A</i>	<i>total-SPQI B</i>	<i>p-value</i>	<i>normo-SPQI A</i>	<i>normo-SPQI B</i>	<i>p-value</i>	<i>normo-pro-AKAP4 A</i>	<i>normo-pro-AKAP4 B</i>	<i>p-value</i>
	n = 46	n = 55		n = 42	n = 46		n = 24	n = 16	
Volume (mL)	3.5 (2.9-4.5)	3.6 (3.2-4.7)	0.311	3.5 (2.9-4.3)	3.6 (3.3-4.6)	0.311	3.5 (2.8-4.6)	3.5 (3.2-4.3)	0.879
Sperm count ($\times 10^6$ /mL)	83.2 (60-147)	73 (52-106)	0.175	83.2 (60-147)	73.5 (55.5-110)	0.411	68.7 (38.3-113)	72.5 (53.7-102.7)	0.740
Progressive motility (a+b) (%)	55 (45-60)	50 (45-60)	0.043*	55 (45-60)	50 (45-55)	0.026*	50 (45-55)	45 (40-57.5)	0.356
Normal morphology (%)	36 (25-47)	31 (23-42)	0.088	36 (25-47)	33.5 (25-43)	0.283	30 (-23-43)	41 (-26-47)	0.220
MAI	1.6 (1.5-1.7)	1.6 (1.5-1.7)	0.474	1.6 (1.5-1.7)	1.5 (1.6-1.7)	0.974	1.6 (1.5-1.8)	1.6 (1.5-1.7)	0.280
Sperm count post-migration ($\times 10^6$ /mL)	52.5 (19.7-95.5)	38.6 (13.6-61.1)	0.169	55.8 (28.5-98.8)	47.9 (20.7-75)	0.247	35.5 (18.3-65.1)	47.9 (16.4-58.8)	0.815
Progressive motility post migration (a+b) (%)	85 (80-90)	82.5 (70-90)	0.109	85 (85-90)	85 (70-90)	0.106	85 (72.5-87.5)	90 (70-90)	0.654
Progressive motility post migration 24 h (a+b) (%)	75 (60-80)	70 (47.5-80)	0.275	77.5 (62.5)	75 (60-80)	0.662	75 (62.5-80)	75 (45-80)	0.932
Normal morphology post migration (%)	31.7 (13.6-67.9)	24.1 (6.5-49.1)	0.222	34.2 (15.7-72.5)	30.2 (11.7-51.4)	0.425	27.7 (14-47.1)	23.9 (13.4-51.4)	0.662

Note : Values are expressed as median (interquartile range). AKAP : A-kinase anchor protein; MAI, multiple abnormalities index; n = number; SPQI = sperm proteome quality index.

* p<0.05 is considered as significant

Table 3: IUI outcomes according to the total-SPQI, normo-SPQI and normo-pro-AKAP4 groups.

	<i>total-SPQI group</i>			<i>normo-SPQI group</i>			<i>normo-pro-AKAP4 group</i>		
	<i>total-SPQI A</i>	<i>total-SPQI B</i>	<i>p-value</i>	<i>normo-SPQI A</i>	<i>normo-SPQI B</i>	<i>p-value</i>	<i>normo-pro-AKAP4 A</i>	<i>normo-pro-AKAP4 B</i>	<i>p-value</i>
Total cycles (<i>n</i>)	n = 146	n = 163		n = 129	n = 139		n = 56	n = 53	
Clinical pregnancy (%)	7.5	11	0.161	8.5	10.8	0.156	12.5	9.4	0.609
Delivery (%)	6.8	10.6	0.245	7.7	10.1	0.506	10.7	7.5	0.743
Early miscarriage (%)	3.4	10	0.023*	3.9	8.6	0.110	3.6	13.2	0.088

Note : Values are expressed as mean (range). AKAP : A-kinase anchor protein; *n* = number; PN = pronucleus; SPQI = sperm proteome quality index.

* $p < 0.05$ is considered as significant

Table 4: Baseline clinical, hormonal, and ultrasonographic characteristics of the IVF-ICSI attempts according to the total-SPQI, normo-SPQI and normo-pro-AKAP4 groups.

	<i>total-SPQI group</i>			<i>normo-SPQI group</i>			<i>normo-pro-AKAP4 group</i>		
	<i>total-SPQI A</i>	<i>total-SPQI B</i>	<i>p-value</i>	<i>normo-SPQI A</i>	<i>normo-SPQI B</i>	<i>p-value</i>	<i>normo-pro-AKAP4 A</i>	<i>normo-pro-AKAP4 B</i>	<i>p-value</i>
	n = 42	n = 52		n = 35	n = 30		n = 15	n = 9	
Patient age (yrs)	34 (31-37)	35 (32-38)	0.182	34 (31-37)	34.5 (32-37)	0.749	35 (31-38)	35 (33-37)	1.000
Partner age (yrs)	30 (27-33)	32 (29-35.5)	0.059	30 (27-33)	32 (30-34)	0.062	32 (27-34)	31 (29-33)	0.834
BMI patient	24 (23-27)	24 (23-26)	0.739	24 (23-27)	24 (22-25)	0.717	25 (22-27.5)	23 (21.5-24)	0.140
BMI partner	22 (21-25)	21 (20-25)	0.286	22 (21-25)	21 (21-23)	0.445	21 (20-22)	21 (21-23)	0.737
Tobacco patient (cig/d)	0 (0-0)	0 (0-10)	0.136	0 (0-7.5)	0 (0-10)	0.785	0 (0-10)	0 (0-0)	0.552
Tobacco partner (cig/d)	0 (0-0)	0 (0-0)	0.957	0 (0-0)	0 (0-0)	0.498	0 (0-0)	0 (0-2.5)	0.659
Duration of infertility (yrs)	4 (3.5-4.5)	4 (2.5-5.5)	0.886	4 (3.5-4.5)	3.5 (2.5-5.5)	0.257	5.5 (2.5-8)	4 (2.2-5.2)	NA
Partner FSH (U/L)	5.5 (4.7-7.7)	5.8 (5.1-6.7)	0.940	5.2 (4.7-6.6)	6.3 (5.1-7.1)	0.292	6.2 (4.1-7.9)	5.7 (4.5-10.1)	0.707
Partner AMH (pmol/L)	24.2 (14.7-45.6)	24.6 (15.7-40)	0.650	25.1 (15.2-53.2)	21 (15.4-43)	0.494	25.8 (15.4-65)	19.9 (6-39.6)	0.394
Partner AFC	20 (13-33)	18 (12-35)	0.306	19 (13-32)	18.5 (11.5-35)	0.674	20 (14-52)	14.5 (10.5-20.5)	0.328

Note : Values are expressed as median (interquartile range). AKAP : A-kinase anchor protein; AMH = anti-müllerian hormone; BMI = body mass index; AFC = antral follicle count; cig/d = cigarettes/day; FSH = follicle stimulating hormone; n = number; NA = not applicable; PN = pronucleus; SPQI = sperm proteome quality index; yrs = years.

* p<0.05 is considered as significant

CONFIDENTIAL

Table 5: Sperm parameters of the IVF-ICSI attempts according to the total-SPQI, normo-SPQI and normo-pro-AKAP4 groups.

	<i>total-SPQI group</i>			<i>normo-SPQI group</i>			<i>normo-pro-AKAP4 group</i>		
	<i>total-SPQI A</i>	<i>total-SPQI B</i>	<i>p-value</i>	<i>normo-SPQI A</i>	<i>normo-SPQI B</i>	<i>p-value</i>	<i>normo-pro-AKAP4 A</i>	<i>normo-pro-AKAP4 B</i>	<i>p-value</i>
	n = 42	n = 52		n = 35	n = 30		n = 15	n = 9	
Volume (mL)	3.6 (2.8-4.3)	3.8 (3.1-4.5)	0.221	3.6 (2.9-4.6)	3.5 (2.8-4.3)	0.540	3.2 (2.7-4.2)	3.5 (2.8-3.8)	0.611
Sperm count ($\times 10^6$ /mL)	81.5 (46-117.5)	63 (50-85)	0.098	90 (62-125)	72 (52-85)	0.124	72.5 (44-145)	63 (51-92)	0.905
Progressive motility (a+b) (%)	50 (45-60)	55 (45-65)	0.113	50 (45-60)	55 (45-60)	0.547	55 (45-65)	55 (45-65)	0.762
Normal morphology (%)	34 (25-41.5)	32 (22-42)	0.514	36 (28-44)	36 (28-45)	1.000	39 (21-48)	37 (32-45)	0.975
MAI	1.6 (1.5-1.7)	1.6 (1.5-1.7)	0.602	1.6 (1.5-1.7)	1.6 (1.4-1.7)	0.729	1.4 (1.4-1.7)	1.6 (1.5-1.6)	0.219
Sperm count post migration ($\times 10^6$ /mL)	52.7 (28.5-89.4)	42 (13.5-64.8)	0.141	59.2 (35.7-105)	61.5 (36.3-93.1)	0.806	63.5 (36.5-85)	62.5 (22.6-101.5)	0.787
Progressive motility post-migration (a+b) (%)	85 (80-90)	85 (65-90)	0.146	90 (85-90)	90 (82.5-90)	0.798	87.5 (77.5-90)	90 (82.5-90)	1.000
Progressive motility post migration 24 h (a+b) (%)	72.5 (50-80)	70 (30-80)	0.808	76.5 (70-82)	75 (72-80)	0.652	80 (70-80)	80 (75-82.5)	0.568
Normal morphology post migration (%)	23.9 (11.3-53.1)	21 (6.1-56.7)	0.233	34.2 (15.2-75)	47.3 (20.2-68.7)	0.513	52.9 (25.3-67.3)	44.2 (21.6-82.4)	0.877

Note : Values are expressed as median (interquartile range). AKAP : A-kinase anchor protein; MAI, multiple abnormalities index; n = number; SPQI =sperm proteome quality index.

* p<0.05 is considered as significant

CONFIDENTIAL

Table 6: IVF-ICSI outcomes according to the total-SPQI, normo-SPQI and normo-pro-AKAP4 groups.

	total-SPQI group			normo-SPQI group			normo-pro-AKAP4 group		
	total-SPQI A	total-SPQI B	p-value	normo-SPQI A	normo-SPQI B	p-value	normo-pro-AKAP4 A	normo-pro-AKAP4 B	p-value
Total cycles (n)	n = 79	n = 105		n = 59	n = 61		n = 29	n = 18	
FIV cycles (%)	82.3	73.3		100	100		100	100	
ICSI cycles (%)	17.7	26.7		0	0		0	0	
Total oocytes retrieved	9.3 (1-31)	8.8 (1-24)	0.867	9.1 (1-31)	8.3 (1-21)	0.631	8.1 (3-20)	5.9 (1-15)	0.038*
Atretic oocytes	1.2 (0-12)	0.8 (0-6)	0.249	1.1 (0-7)	0.4 (0-4)	0.008*	0.4 (0-3)	0.4 (0-4)	0.420
Immature oocytes	1.1 (0-10)	1.2 (0-8)	0.153	1 (0-6)	0.9 (0-5)	0.362	0.4 (0-6)	0.9 (0-3)	0.025*
M2 oocytes	6.8 (4.5-24)	6.6 (1-18)	0.846	7.1 (1-24)	6.9 (1-16)	0.796	7.2 (3-16)	4.5 (1-11)	0.01*
Pronuclear assessment									
1PN	0.3 (0-3)	0.2 (0-4)	0.164	0.2 (0-2)	0.1 (0-1)	0.147	0.2 (0-1)	0.1 (0-1)	0.256
2PN	5.3 (1-20)	4.8 (1-12)	0.707	5.5 (1-20)	5.2 (1-12)	0.928	5.4 (2-12)	3.4 (1-9)	0.007*
Polyploid	0.3 (0-3)	0.3 (0-3)	0.752	0.3 (0-3)	0.4 (0-3)	0.223	0.3 (0-3)	0.3 (0-1)	0.908
Fertilization rate (%)	78	74	0.118	79	76	0.504	75	78	0.479
Early cleavage (%)	34	40	0.215	24	32	0.167	38	33	0.739
Total embryos produced	5.1 (1-18)	4.6 (1-13)	0.601	5.2 (1-18)	5 (1-13)	0.926	5.3 (2-12)	3.4 (1-9)	0.010*
Embryos quality									
grade 1	1.4 (0-7)	0.9 (0-6)	0.049*	1.5 (0-7)	0.9 (0-5)	0.127	1.2 (0-4)	1.1 (0-5)	0.357
grade 2	0.2 (0-2)	0.3 (0-4)	0.458	0.1 (0-2)	0.4 (0-4)	0.078	0.7 (0-4)	0.1 (0-1)	0.095
grade 3	3.4 (0-15)	3.3 (0-11)	0.634	3.6 (0-15)	3.5 (0-11)	0.712	3.4 (0-11)	2.1 (0-8)	0.060
Freezed embryos	1.9 (0-7)	1.3 (0-8)	0.016*	2 (0-7)	1.3 (0-8)	0.047*	1.5 (0-7)	0.8 (0-6)	0.048*
Fresh embryos tranfered	1.6 (0-3)	1.8 (0-3)	0.008*	1.7 (0-10)	1.8 (0-3)	0.056	1.9 (1-3)	1.5 (0-2)	0.010*
Clinical pregnancy fresh transfer (%)	35.4	28.2	0.293	37.3	21.7	0.061	27.6	23.5	1.000
Delivery fresh transfer (%)	30.4	26.2	0.535	32.2	21.7	0.195	27.6	23.5	1.000
Implantation fresh transfer (%)	25	20	0.417	27	18	0.235	18	14	0.767
Early miscarriage fresh transfer (%)	7.6	4.8	0.536	6.8	5	NA	2.2	3	NA
Total embryos tranfered	2.6 (0-11)	2.5 (0-7)	0.817	2.7 (1-11)	2.6 (1-7)	0.772	2.6 (1-6)	2.1 (1-6)	0.020*
Total Clinical pregnancy (%)	43.6	35.6	0.273	47.5	31.1	0.067	37.9	27.8	0.475
Total Delivery (%)	37.2	33.6	0.622	40.7	31.1	0.276	37.9	27.8	0.475
Total Implantation (%)	26	20	0.304	27	16	0.093	21	16	0.603
Total early miscarriage (%)	11.7	5.7	0.153	11.9	6.6	0.314	4.5	5.1	

Note : Values are expressed as mean (range). AKAP : A-kinase anchor protein; ICSI = intracytoplasmic sperm injection; IVF = in vitro fertilization; M2 = metaphase 2 oocyte; n = number; NA = not applicable; PN = pronucleus; SPQI = sperm proteome quality index.

* p<0.05 is considered as significant

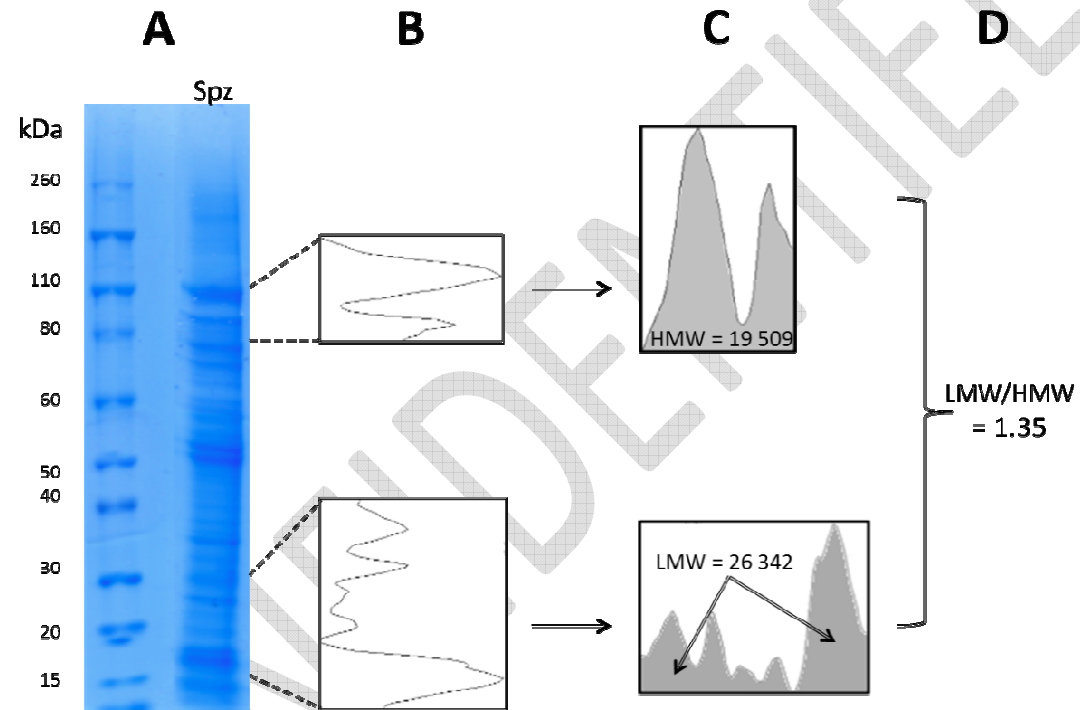


Figure 1: Method to calculate SPQI from a representative sperm samples belonged to “non-proteolysed” group. (A) The sperm protein profile was digitalized and background was eliminated with ImageJ software. (B) Windows from 15 to 30 kDa (low molecular weight LMW) and 80 to 110 kDa (high molecular weight HMW) were selected. (C) Area under curve (grey) was calculated. (D) Ratio LMW/HMW (SPQI) was calculated.

DISCUSSION Article 4

Actuellement, le pronostic de succès d'une tentative d'AMP est basé, d'un point de vue masculin, principalement sur l'évaluation de la numération et sur la mobilité des spermatozoïdes (Nallella *et al.*, 2006; Lewis, 2007). Le travail fourni par notre équipe a montré que le protéome global du spermatozoïde représente également une approche pertinente pour explorer la qualité spermatique (cf. article 3). Deux profils distincts du protéome spermatique ont été mis en évidence dans les spermatozoïdes éjaculés d'hommes issus de couples infertiles, donnant lieu au calcul d'un index de qualité protéique du spermatozoïde, le SPQI. De façon intéressante, ces 2 profils sont notamment associés à la modification de l'expression d'une protéine en lien avec la mobilité, l'AKAP4. Un processus de protéolyse pourrait être à l'origine de la dégradation de cette protéine aboutissant à ces 2 profils protéiques spermatiques caractéristiques : un profil « protéolysé » et un « non-protéolysé ». En affinant nos premiers résultats, notre équipe a montré que c'est l'intégrité de la pro-AKAP4 qui est un indicateur positif de la mobilité spermatique (cf. article 3). Or la mobilité spermatique est un paramètre important pris en compte par les équipes clinico-biologiques lors de la prise en charge d'un couple en AMP. En effet, la littérature scientifique met en avant que lors d'une tentative d'AMP, les taux de fécondation, la qualité embryonnaire et les taux de grossesse sont faibles lorsque les spermatozoïdes utilisés pour la mise en fécondation présentent une mobilité réduite par rapport à l'utilisation de spermatozoïdes avec une mobilité normale (Kahraman *et al.*, 1996; Nijs *et al.*, 1996). Étonnamment, l'utilisation de l'ICSI ne permet d'améliorer que de façon marginale les taux de fécondation et la qualité des embryons (Nijs *et al.*, 1996). De ce fait, l'étude de la dégradation de l'AKAP4, protéine pivot de la mobilité du spermatozoïde, est un sujet pertinent dans la recherche de l'amélioration des taux de succès en techniques d'IIU, de FIV et d'ICSI.

Dans cet article, nous confrontons d'une part l'intégrité du protéome global via l'index SPQI (groupes total-SPQI et normo-SPQI) et d'autre part celle de la pro-AKAP4 (groupe normo-pro-AKAP4) aux résultats obtenus lors de tentatives d'IIU, de FIV et d'ICSI. Nous n'avons volontairement pas créé de groupe « total-pro-AKAP4 » car la cohorte aurait été quasi similaire au groupe normo-pro-AKAP4. Seuls 4 patients non normozoospermes supplémentaires auraient été ajoutés dans ce nouveau groupe. De plus, les résultats statistiques concernant l'analyse des tentatives de FIV avec le groupe de patients normo-pro-AKAP4 (tableau 6) ne sont donnés qu'à titre indicatif. En effet, plusieurs facteurs confondants, tels que le nombre moyen d'ovocytes totaux, en M2 ou d'embryons totaux sont

significativement supérieurs dans le sous-groupe normo-pro-AKAP4 « non protéolysé », ne permettant donc pas une interprétation de ces résultats sans introduire de biais.

Nos résultats mettent en avant des taux similaires de fécondation. Bien que le flagelle des spermatozoïdes soit essentiel pour la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte (Van Blerkom *et al.*, 1995), il semblerait que la protéolyse de la protéine pro-AKAP4 n'ait pas d'impact à ce niveau. En revanche, la qualité embryonnaire a été notée meilleure dans les groupes « non-protéolysés » que ce soit en nombre moyen d'embryons top qualité obtenus ou nombre d'embryons cryoconservés. Certaines études ont révélé que la qualité des embryons était plus faible lorsque le conjoint présentait une mobilité spermatique déficiente (Jiaen *et al.*, 1995; Nijs *et al.*, 1996; Avenarius *et al.*, 2009). L'intégrité du protéome global et a fortiori de protéines en lien avec la mobilité comme l'AKAP4 pourraient donc jouer en faveur d'une meilleure embryogenèse. Les résultats de cette étude concernant les issues de grossesse et de naissance sont controversés. En effet, lorsque l'on prend en compte toutes les tentatives de FIV ± ICSI, les taux d'implantation, de grossesse clinique et de naissance sont en faveur des patients avec un protéome et une pro-AKAP4 intègres, bien que ces résultats ne soient pas significatifs. En revanche, dans les tentatives d'IIU, cette tendance n'est pas retrouvée. Elle est même, dans certains cas, inversée. Cependant, on note un taux important de FCS en IIU chez les patients de type protéome ou pro-AKAP4 « protéolysé », qui n'est pas retrouvé chez les « non-protéolysé ». Nous n'avons pas trouvé d'explication biologique ou mécanistique concernant ces résultats que l'on pourrait qualifier de contradictoires. Cependant, ces observations tendent à suggérer que l'intégrité du protéome spermatique d'une part et de la pro-AKAP4 d'autre part pourraient (i) permettre de limiter les risques de FCS en IIU (ii) et être indicative d'un meilleur taux global de succès en FIV ou en ICSI.

En conclusion, s'il est encore difficile d'affirmer avec certitude que la quantification du SPQI ou de la pro-AKAP4 représentent de nouveaux tests non-invasifs prédictifs des résultats en AMP, ces premiers résultats sont encourageants. Il sera néanmoins nécessaire d'augmenter la puissance de cette étude préliminaire, notamment pour confirmer l'intérêt de la protéine AKAP4 et de son précurseur comme biomarqueur prédictif de succès lors de tentatives d'AMP.

DISCUSSION GÉNÉRALE

La mobilité est une fonction clé de la qualité fécondante des spermatozoïdes et de leur sélection lors des techniques d'AMP. Cependant, les bases génétiques et les mécanismes moléculaires impliqués dans l'assemblage et la fonction des composants du flagelle ainsi que dans la régulation du mouvement flagellaire ne sont pas entièrement compris, en particulier chez l'homme (Pereira *et al.*, 2016). Ce travail de thèse est articulé autour de 2 protéines d'intérêts impliquées dans la mobilité spermatique: la protéine Tau associée à la polymérisation des microtubules dans le neurone, et la protéine AKAP4, protéine majeure de la gaine fibreuse du flagelle spermatique, connue pour son implication dans la mobilité. Le projet de recherche de notre équipe sur la qualité du protéome du spermatozoïde humain et l'infertilité a permis d'aboutir aux différents résultats présentés dans ce manuscrit.

Etude de la protéine Tau testiculaire et spermatique chez l'homme

Très peu d'études traitent de la protéine Tau dans l'appareil génital masculin, et aucune chez l'homme. Dans une première partie de ce travail, nous avons analysé l'expression de la protéine Tau dans le spermatozoïde et le testicule humain par une approche immunohistochimique. Dans le testicule humain, nous avons mis en évidence pour la première fois la protéine Tau dans les tubes séminifères au niveau des spermatocytes et des spermatides, ainsi que dans la pièce intermédiaire du flagelle du spermatozoïde humain mature (article 1). Certaines structures microtubulaires des cellules spermatiques, comme la manchette, ne sont présentes qu'au moment de l'élongation de la spermatide (Kierszenbaum & Tres, 2004; Hermo *et al.*, 2010). La détection de la protéine Tau à ce stade germinal et dans la pièce intermédiaire du spermatozoïde mature pourrait être en faveur d'une action de Tau dans l'organisation de la manchette, dans l'allongement du spermatozoïde et dans la fonction de mobilité spermatique. Ces données nouvelles portant sur l'expression de Tau dans le testicule et le spermatozoïde humain pourraient permettre d'envisager l'étude d'un rôle potentiel dans la spermatogenèse normale et pathologique. La littérature sur la protéine Tau au niveau testiculaire étant très pauvre, nous avons inclus dans ce travail l'écriture d'une revue de la littérature (article 2) qui traite pour la première fois de la protéine Tau dans le testicule et le spermatozoïde. Nous nous sommes notamment appuyés sur les ressemblances existantes entre la cellule spermatique et le neurone, cellule dans laquelle la protéine Tau a été très majoritairement étudiée. De plus, nous nous sommes également servis des rares travaux mettant en évidence chez l'homme et différentes espèces animales la protéine Tau dans

d'autres organes tels que le coeur, le muscle, le poumon, le rein, le pancréas et le foie (Gu *et al.*, 1996; Kenner L *et al.*, 1994 ; Vanier MT *et al.*, 1998).

La place de la protéomique du spermatozoïde dans l'AMP

Dans une deuxième partie de ce travail, nous avons souhaité étudier le protéome du spermatozoïde. Le souhait de départ, lors du choix de la thématique de recherche de ce projet, a été de partir sur une étude « sans a priori » du protéome global des spermatozoïdes éjaculés humains. L'objectif majeur était de détecter d'éventuels nouveaux biomarqueurs de la qualité du spermatozoïde afin de les confronter dans un deuxième temps aux résultats en AMP.

Le spermatozoïde est une cellule spécialisée et organisée présentant un protéome de plusieurs milliers de protéines (Carrell *et al.*, 2016). À la sortie du testicule, le spermatozoïde n'est pas mobile et est incapable de féconder spontanément un ovocyte. C'est par des interactions avec son environnement, l'épididyme et les voies génitales féminines, qu'il acquiert ses fonctions. Ces interactions se traduisent par des modifications du protéome comme le clivage des protéines ou des modifications post-traductionnelles. L'approche protéomique que nous avons choisie pour ce projet représente donc une méthode pertinente d'étude de l'infertilité masculine.

Les études protéomiques sur le spermatozoïde ont identifié jusqu'à présent environ 6000 des plus de 7500 protéines qui constitueraient la cellule spermatique. Les études de protéomique différentielle ont abouti à l'identification d'un nombre important de protéines présentes dans le spermatozoïde de patients infertiles, dont la quantité ou la qualité étaient altérées (tableau 2, chapitre introduction). Cependant, de nouveaux travaux restent nécessaires avant de pouvoir extrapoler ces découvertes à une application clinique. Un intérêt particulier est porté sur la découverte de nouveaux biomarqueurs diagnostiques et pronostiques en AMP. En effet, le gamète masculin compétent est celui qui permet la fécondation d'un ovocyte, le développement précoce de l'embryon et l'implantation dans l'utérus de la partenaire (Assou *et al.*, 2010). Aujourd'hui encore, de nombreux embryons obtenus et transférés lors de tentatives d'AMP sont incapables de poursuivre leur développement et de permettre une grossesse. De plus, au cours d'une tentative de fécondation *in vitro* avec ou sans micromanipulation, les Cliniciens et Biologistes de la reproduction ont tendance à transférer plus d'un seul embryon afin d'augmenter les chances de grossesses offertes au couple. Une des limites importantes de l'AMP reste encore l'efficacité des techniques et les taux de succès. Une meilleure

appréciation de la qualité des gamètes permettrait d'augmenter les chances de réussite d'une tentative, de réduire le nombre d'embryons à transférer et donc les risques de grossesses multiples. Le défi reste maintenant à évaluer si les protéines dérégulées détectées en protéomique peuvent représenter des biomarqueurs cliniquement pertinents. En effet, la littérature sur le protéome du spermatozoïde et son intérêt dans l'étude de l'infertilité est relativement riche, mais très peu d'articles extrapolent ces résultats à leur application en AMP. À ce jour, à notre connaissance, seules 4 études comparatives sur le protéome du spermatozoïde ont identifié des biomarqueurs potentiellement indicatifs de grossesse après AMP (Azpiazu *et al.*, 2014; MacReynolds *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2012 ; Zhu *et al.*, 2013). Parallèlement, peu de protéines ont été individuellement étudiées dans le cadre de tentatives d'AMP (Aarabi *et al.*, 2014; Aoki *et al.*, 2005, 2006b; Bhilawadikar *et al.*, 2013; Buckman *et al.*, 2013; Carrell & Liu 2001; de Mateo *et al.*, 2009; Khara *et al.*, 1997; Simon *et al.*, 2011). C'est pourquoi dans ce projet, notre équipe a choisi d'étudier dans un premier temps le protéome global des spermatozoïdes éjaculés humains, puis de confronter dans un deuxième temps de nouveaux biomarqueurs potentiels aux résultats en AMP. Pour cela, une collaboration a été créée entre le Dr Valérie Mitchell de l'EA 4308 « Gamétogenèse et qualité du gamète » et le Dr Nicolas Sergeant de l'UMR-S 1172 « Alzheimer et Tauopathies ». Cette association complémentaire a permis de construire une synergie entre l'expérience dans le domaine de la Reproduction de l'EA à celle du domaine et de la technologie Protéomique de l'UMR-S.

Profil protéique spermatique global et protéolyse

Les travaux effectués par cette équipe collaborative ont permis dans un premier temps à caractériser le protéome du spermatozoïde humain grâce à une approche par électrophorèse monodimensionnelle appliquée sur des éjaculats spermatiques humains non poolés. L'analyse protéomique du spermatozoïde à partir d'échantillons de sperme d'hommes issus de couples infertiles a permis de définir, pour la première fois, 2 profils protéiques distincts. L'un présente une répartition homogène des protéines de 10 à 120 kDa (profil protéique « non-protéolysé »), l'autre moitié présente une disparition des protéines de hauts poids moléculaires au profit de celles de bas poids moléculaires (profil protéique « protéolysé »). En s'appuyant sur ce constat, notre équipe a traduit mathématiquement cette observation en mettant au point un index de qualité, le SPQI (brevet d'invention). Les bandes de hauts et bas poids

moléculaires ont été quantifiées et un ratio a été calculé. À partir de ce ratio, il a été défini un groupe SPQI A (ratio compris entre 1 et 2) et un groupe SPQI B (ratio inférieur à 1 ou supérieur à 2). Le SPQI A reflète une répartition homogène des protéines soit un profil protéique « non-protéolysé ». Le SPQI B illustre une protéolyse partielle de l'ensemble des protéines de haut poids moléculaire soit un profil protéique « protéolysé ». Selon nos premiers résultats, il existe une protéolyse partielle dans les spermatozoïdes éjaculés chez près de la moitié des hommes de notre cohorte, alors que plus de 77 % sont des patients diagnostiqués comme normozoospermiques selon les normes de l'OMS (World Health Organization, 2010). Au cours du travail méthodologique précédemment effectué par notre équipe, il a été montré que l'addition d'inhibiteurs de protéases après la liquéfaction ne permettait pas d'améliorer le profil protéique. Ainsi, la protéolyse surviendrait lors de la liquéfaction du sperme et non lors de la préparation des spermatozoïdes. Par ailleurs, Thompson et collaborateurs ont montré, en 2003, que les spermatozoïdes anormaux pouvaient présenter des « tags » induisant leurs destructions (Thompson *et al.*, 2003). Ce mécanisme pourrait permettre la régulation et l'élimination des spermatozoïdes défectueux. C'est le cas notamment de la prohibitine dont l'ubiquitination semble plus élevée dans les spermatozoïdes anormaux. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la protéolyse des protéines spermatiques que nous observons soit due à l'expression d'un « tag » positionné suite à une anomalie indétectable par les moyens conventionnels, chez des patients présentant des paramètres spermatiques normaux. Une autre hypothèse pourrait être que la protéolyse soit un marqueur de sénescence du spermatozoïde. Cependant, les patients de notre étude présentaient un délai d'abstinence sexuel entre 2 et 5 jours, ce qui rend cette hypothèse peu probable. Par ailleurs, l'analyse par spectrométrie de masse de la bande à 110 kDa, bande majoritairement touchée par la protéolyse, met en évidence l'AKAP4 comme la protéine principalement protéolysée. Nous avons montré dans ce travail que le profil d'expression de l'AKAP4 diffère d'un individu à l'autre. Étant donné que les fragments protéolytiques de l'AKAP4 ont été détectés en utilisant l'anticorps anti-AKAP4 N-terminal, la pro-AKAP4 pourrait être dégradée par des endoprotéases ciblant la partie C-terminale de la protéine. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que le processus protéolytique affecte probablement la protéine AKAP4 comprenant son prodomaine. La protéolyse de l'AKAP4 n'a eu, en revanche, aucun impact majeur sur la répartition de la protéine dans le flagelle, ni sur la morphologie de celui-ci. Ces observations suggèrent que la gaine fibreuse a été correctement assemblée au niveau microscopique, et que la protéolyse de l'AKAP4 post-spermatogenèse-spermiogenèse n'a donc pas d'impact au niveau structurel (assemblage et développement) du flagelle. Il serait instructif de déterminer le sort des

protéines de signalisation dans les spermatozoïdes présentant une AKAP4 protéolysée. La base moléculaire de ces résultats reste donc à déterminer. Il est également important de préciser que la méthodologie développée pour la sélection des spermatozoïdes a été mise au point pour éviter certains biais dans nos résultats. La centrifugation sur macromolécules sélectionne une quantité suffisante de spermatozoïdes et donc de matériel pour établir les profils protéiques. Le remplacement du milieu de culture des spermatozoïdes par du Tris salin garantit la provenance exclusive des protéines du spermatozoïde et l'élimination des protéines contaminantes.

Impact de la protéolyse de l'AKAP4 sur la mobilité spermatique

Dans un deuxième temps, l'analyse en spectrométrie de masse ayant permis d'identifier l'AKAP4 comme protéine majoritairement en lien avec la protéolyse observée, nous avons supposé que l'évaluation de la qualité protéique spermatique pourrait être réalisée soit par la mesure du protéome global via le SPQI, soit directement par la mesure de l'intégrité de la protéine AKAP4. En approfondissant la partie fondamentale de ce travail sur cette protéine, nous avons mis en lumière des éléments nouveaux. La dégradation dans le protéome global du spermatozoïde humain de cette protéine AKAP4 est une donnée complètement nouvelle. En effet, cette dégradation n'est pas décrite chez l'homme ou chez les mammifères. La localisation de cette protéine dans la pièce principale du flagelle nous a amené à réfléchir à l'impact que pourrait avoir cette protéolyse. Cette dégradation touche-t-elle l'ensemble du protéome ou est-ce un processus propre à la fonctionnalité du flagelle ? Les données que nous rapportons à travers ce travail sont plutôt en faveur d'une perte de la mobilité associée à cette protéolyse. On sait aujourd'hui que la mobilité des spermatozoïdes est fortement dépendante de plusieurs voies métaboliques et de mécanismes de régulation (Pereira *et al.*, 2016). La voie du calcium et celle de la PKA dépendante de l'AMPc sont les 2 voies métaboliques principales impliquées dans la régulation de la mobilité des spermatozoïdes (Darszon *et al.*, 2001, 2006). Ces voies impliquent des ions calcium, adénylyl cyclases, ions bicarbonates, différents canaux de membrane et des événements de phosphorylation. Tous sont responsables de l'acquisition des compétences qui permettent aux spermatozoïdes de féconder l'ovocyte, à savoir la capacitation, l'hyperactivité, et la réaction acrosomique. Les protéines AKAPs sont très importantes dans la régulation de la mobilité des spermatozoïdes notamment puisqu'elles piègent de façon localisée les enzymes telles que les protéines kinases et

phosphatases avec des substrats appropriés pour coordonner la phosphorylation et la déphosphorylation des événements (Luconi *et al.*, 2011). Chez l'homme, on sait que l'AKAP4 est une protéine d'ancrage qui se lie à la PKA pour former un dimère activant ainsi la phosphorylation de substrats (Brown *et al.*, 2002). Par l'intermédiaire de l'AKAP4, cette voie de signalisation initie et assure le maintien de la mobilité du spermatozoïde (Turner *et al.*, 1999). D'autres voies et mécanismes sont également des acteurs importants pouvant impacter la mobilité du spermatozoïde. C'est le cas des anomalies moléculaires et de structure du flagelle, ou du rôle des ROS dans l'acquisition et le contrôle de la mobilité des spermatozoïdes (Pereira *et al.*, 2016). Le contrôle du volume cellulaire et de l'osmolarité est également fondamental pour la mobilité des spermatozoïdes. Cependant, nos résultats mettant en avant que la protéolyse du protéome global est principalement liée à l'AKAP4, il semble donc peu probable que cela impacte les autres acteurs de la mobilité, en dehors de la voie PKA-AMPC-dépendante.

Dégradation tardive versus absence précoce de l'AKAP4, un impact différent

En dehors de sa contribution dans la mobilité du spermatozoïde, l'AKAP4 joue un rôle majeur dans l'assemblage de la gaine fibreuse (Eddy *et al.*, 2003). L'inactivation ciblée du gène *akap4* donne lieu à des défauts du flagelle et de la mobilité des spermatozoïdes (Miki *et al.*, 2002). En effet, les souris KO pour la protéine AKAP4 produisent un nombre normal de spermatozoïdes, mais ces derniers ne parviennent pas à développer de mobilité progressive. Ils présentent un flagelle raccourci et réduit, ou des absences de protéines normalement associées et coordonnées à l'AKAP4, comme l'alpha-RII, l'AKAP3, ou la GAPDS (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase-S). Ainsi, l'absence d'AKAP4 donne lieu à une altération de structure et de fonctionnalité du flagelle. Chez des patients présentant une asthénozoospermie sévère caractérisée par une dysplasie de la gaine fibreuse, l'absence d'AKAP4 dans la pièce principale du spermatozoïde a pu être mise en évidence (Baccetti *et al.*, 2005). Cela confirme le rôle central que joue l'AKAP4 dans la mobilité du spermatozoïde. Cependant, nos résultats nous amènent à reconsidérer la mécanistique de la protéine intègre mais aussi sous forme de fragments après protéolyse. En effet, la littérature montre qu'une absence de l'AKAP4 au cours du développement du spermatozoïde entraîne une altération structurelle majeure du flagelle qui entraîne a fortiori dans un deuxième temps une diminution de la mobilité. Dans notre cohorte de patients, ces anomalies de structure n'ont pas été

observées. On note donc une dégradation par protéolyse de la protéine AKAP4 dans le spermatozoïde mature (post-spermato-spermio-genèses) qui impacte de façon modérée la mobilité. Nos résultats viennent compléter ceux de la littérature en montrant qu'une absence d'AKAP4 due à une dégradation tardive a moins de conséquence sur la mobilité que si cette altération survient plus précocement dans le développement du gamète. On ne peut donc pas écarter l'hypothèse que les fragments de protéolyse de l'AKAP4 préalablement observés conservent une certaine activité malgré la dégradation de la protéine entière, à moins que l'activité de l'AKAP4 ne soit compensée par une ou plusieurs autres protéines de la gaine fibreuse. Cela pourrait expliquer pourquoi une dégradation tardive de cette protéine, qui n'empêche pas la mise en place correcte de la gaine fibreuse, peut être secondée en cas de nécessité par d'autres protéines de cette gaine présentes en back-up. Cependant, l'analyse statistique cherchant un lien entre les différents fragments ou groupes de fragments de l'AKAP4 et la mobilité ne mettait pas en avant de corrélation.

Quel rôle pour la pro-AKAP4 et l'AKAP4 humaines dans la mobilité ?

Une autre constatation clé lors de ce travail a été l'observation d'une quantité équivalente de pro-AKAP4 et d'AKAP4 dans les spermatozoïdes humains. Au cours de la spermatogenèse, l'AKAP4 est synthétisée sous forme d'un précurseur qui est ensuite clivé en une protéine de 85 kDa (Turner *et al.*, 1998). Le rapport pro-AKAP4/AKAP4 varie cependant d'une espèce à l'autre. Dans les spermatozoïdes humains, ce rapport est supérieur à celui retrouvé chez d'autres espèces animales, ce qui indique que le clivage de la pro-AKAP4 chez l'humain est soit moins complet soit différent que chez la souris et le taureau (Moss *et al.*, 1999). Nos résultats suggèrent que dans les spermatozoïdes humains, les niveaux de pro-AKAP4 et AKAP4 sont équivalents.

Considérant que le clivage de la pro-AKAP4 en AKAP4 est nécessaire pour la mobilité du spermatozoïde chez la souris, aucune relation directe n'a cependant été mise en évidence chez l'homme et on ne sait pas encore si c'est la pro-AKAP4 ou l'AKAP4 qui régulent la mobilité des spermatozoïdes. Dans ce travail nous mettons en évidence que la quantité de pro-AKAP4 était significativement et positivement corrélée avec la fraction mobile des spermatozoïdes sélectionnés par gradient de densité. À l'inverse, la perte du pro-domaine de l'AKAP4 ne permet pas de retrouver de corrélation avec la mobilité progressive. Ce travail a donc permis de montrer que c'est l'intégrité de la protéine AKAP4 comprenant son pro-domaine qui est un

indicateur positif de la mobilité spermatique, alors que cette pro-AKAP4 est à ce jour encore considérée comme une protéine inactive (Luconi *et al.*, 2011). Ces données apportent une vision nouvelle du rôle et de l'impact de cette protéine, bien que la mécanistique n'ait pas été établie. De plus, la protéolyse par des endoprotéases de la région C-ter (C-terminale) pourrait contribuer à une perte partielle de la fonction de l'AKAP4.

La protéolyse en lien avec une autre protéine de la mobilité

Dans nos travaux, une autre protéine faisant partie de la bande de protéines à 110 kDa était également en lien avec cette protéolyse : l'HK1. Or cette protéine est également localisée au niveau de la pièce intermédiaire du flagelle. Elle est décrite dans la littérature comme impliquée dans la mobilité du spermatozoïde (Turner *et al.*, 1999; Brown, 2002; Eddy *et al.*, 2003; Moretti *et al.*, 2007). L'HK1 est une enzyme glycolytique associée à la production d'ATP nécessaire à l'activité flagellaire (Eddy *et al.*, 2003). Le clivage ou la déphosphorylation du dimère d'HK1 sont profondément liés avec l'initiation de la mobilité spermatique (Nakamura *et al.*, 2008a). On peut donc supposer que la protéolyse qui impacte la mobilité, bien que principalement due à la dégradation de l'AKAP4, puisse également être influencée par d'autres protéines telles que l'HK1. Au cours de ce travail, nous nous sommes focalisés en priorité sur la protéine AKAP4. Une exploration de l'HK1 reste cependant nécessaire pour venir enrichir les résultats observés avec la protéine AKAP4.

La place du SPQI et de l'AKAP4 comme biomarqueurs de réussite en AMP

Actuellement, l'évaluation de la qualité spermatique en routine de laboratoire repose sur le spermogramme-spermocytogramme. Cependant, dans 50 % des cas, cet examen ne permet pas d'expliquer l'infertilité. Or le choix de la technique et l'issue de grossesse en AMP dépendent directement de la qualité spermatique évaluée par cet examen (Lewis, 2007). La concentration, la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes évalués lors du spermogramme-spermocytogramme sont les seuls paramètres masculins considérés comme prédictifs d'une grossesse chez les couples qui veulent concevoir naturellement. Ils sont également un prérequis essentiel pour les couples bénéficiant d'une prise en charge en AMP pour le choix de la technique : IUI, FIV ou ICSI voire IMSI (pour *intracytoplasmic morphologically selected sperm injection*). Cependant, le taux global de naissances en AMP

atteint actuellement un maximum de 30 %, d'où la nécessité de nouveaux marqueurs moléculaires pour affiner le diagnostic d'infertilité masculine. Dans la littérature, l'AKAP4 est une protéine spécifique du spermatozoïde, utilisée comme pivot central de la mobilité spermatique (Moss & Gerton, 2001; Luconi *et al.*, 2011). La mobilité pouvant avoir un impact sur les taux de fécondation, de qualité embryonnaire et de grossesse (Bhilwadikar *et al.*, 2013), nous avons cherché à évaluer dans ce travail la valeur pronostique (i) du protéome global spermatique via le SPQI et (ii) de la pro-AKAP4 sur le succès au cours d'une tentative d'AMP.

Lors de la comparaison des paramètres spermatiques entre les sous-groupes SPQI « protéolysés » et « non-protéolysés », seule la mobilité progressive est apparue statistiquement différente entre les 2 groupes, en faveur du groupe « non-protéolysé » lors de l'analyse des tentatives d'IIU. Entre les groupes pro-AKAP4 « non-protéolysé » et pro-AKAP4 « protéolysé », l'état de l'AKAP4 n'est pas discriminant. Par ailleurs, les populations des sous-groupes « protéolysés » versus « non-protéolysés » étudiées étaient comparables en termes d'âge, de BMI, d'intoxication tabagique ou de bilan de réserve ovarienne. Concernant les tentatives de FIV et ICSI, la protéolyse observée au SPQI ou au niveau de la pro-AKAP4 n'a pas mis en avant d'impact sur les taux de fécondation. En revanche, le développement embryonnaire à J2-J3 a été noté de meilleure qualité chez les patients des sousgroupes « non-protéolysé » que ce soit en se basant sur le SPQI ou sur la pro-AKAP4. Cette meilleure qualité a d'ailleurs systématiquement mené à une augmentation significative des taux de cryoconservation. L'obtention d'une grossesse clinique évolutive et d'une naissance semble favorisée chez les patients présentant un protéome spermatique et une pro-AKAP4 intègres. Nous sommes cependant obligés de nous montrer prudents sur les résultats statistiques de FIV centrés sur la pro-AKAP4 qui ne sont pas interprétables à cause de plusieurs facteurs confondants entre les 2 sous-groupes de patients. De plus, de façon inattendue des résultats contradictoires sont observés lors de l'analyse des tentatives d'IIU. Les taux de grossesse clinique et de naissance sont plutôt supérieurs dans les sous-groupes « protéolysés » (SPQI B et pro-AKAP4 B), bien que statistiquement non significatifs. En revanche, parmi les couples dont le conjoint présentait un SPQI ou une pro-AKAP4 de type « protéolysé » survenaient également un important taux de FCS précoce par rapport aux patients de type « non-protéolysé ». Suite à ces résultats divergents, il est difficile d'affirmer avec certitude l'impact ou non de la protéolyse du protéome global et/ou de la pro-AKAP4 dans le succès de la tentative. Nous avons également réalisé cette même étude en prenant en considération, de

façon isolée, uniquement les premières tentatives d'IIU, les premières tentatives de FIV, ou toutes les FIV après échec d'IIU (ces résultats ne sont pas présentés dans ce manuscrit). Les résultats sont similaires à ceux observés lors des analyses qui prennent en compte la totalité des IIU et de FIV. Cependant, ces résultats préliminaires fondamentaux et cliniques sont encourageants et doivent être approfondis sur une plus grande cohorte afin de mieux comprendre le rôle et l'impact de cette protéolyse et de la protéine AKAP4. Nous pouvons cependant avancer que les analyses du protéome global du spermatozoïde et/ou de la protéine AKAP4 et de son précurseur constituent une nouvelle piste sérieuse dans l'évaluation de la qualité du spermatozoïde humain, en complément du spermogramme-spermocytogramme. Ce constat se rapproche de celui de Xu et collaborateurs (Xu *et al.*, 2012) qui ont réalisé une étude comparative des protéomes de spermatozoïdes provenant d'hommes normozoospermes fertiles et non fertiles. De façon intéressante, l'AKAP4 a été identifiée comme sous-réglée chez les patients normozoospermes infertiles (Xu *et al.*, 2012). De plus, une augmentation de la puissance de nos travaux préliminaires devrait permettre de confirmer l'intérêt du SPQI et/ou de la protéine (pro-)AKAP4 comme biomarqueurs prédictifs de succès lors de tentatives d'AMP ou permettant d'affiner le choix de la technique à utiliser.

Evaluation statistique des effectifs

Pour aller plus loin dans nos résultats, nous avons évalué, avec l'équipe des biostatisticiens du CHRU de Lille, le nombre total de patients nécessaire pour confirmer ces premiers travaux.

Tout d'abord, la quantification de la protéine AKAP4 et des différents fragments ont été mise en lien avec les différents paramètres spermatiques (article 3). Les résultats montrent un lien entre la pro-AKAP4 et la mobilité après gradient. Nous avons donc cherché à établir un cut-off optimal de la protéine pro-AKAP4 qui nous permettrait de séparer nos patients en 2 groupes, en fonction du taux de succès (grossesse clinique) selon les techniques d'IIU et de FIV ou ICSI. L'équipe des biostatisticiens a établi que pour qu'une aire sous la courbe ROC (AUC pour *area under the curve*) de la protéine AKAP4 de 0,80 soit supérieure à une AUC de 0,70 (considérée comme le minimum acceptable) avec un test bilatéral (risque α de 5 %, et une puissance de 80 %), il serait nécessaire de disposer de 264 sujets sous l'hypothèse d'un taux de grossesse de 30 %. La cohorte totale de patients pour lesquels le dosage de la protéine a pu être réalisé au cours de ce travail était de 53 patients. Nous n'avons donc pas pu établir de cut-off de la protéine AKAP4. D'un point de vue statistique, la faiblesse de notre travail

sont le nombre de sujets, le fait qu'un couple puisse bénéficier de plusieurs tentatives (une seule quantification d'AKAP4 pour plusieurs tentatives d'AMP avec des résultats de grossesse différents). L'utilisation potentielle de techniques d'AMP différentes pour un même couple de patients (IIU, FIV, ICSI) entraîne une faiblesse pour l'analyse globale. Cependant, la force de ce travail est que ces analyses puissent être proposées chez chaque patient (et non des pools), ce qui permet d'avoir une vraie réflexion personnalisée de la prise en charge en AMP.

Dans un deuxième temps, en s'appuyant sur nos résultats basés sur le SPQI, nous observons qu'environ 50 % des échantillons de sperme des hommes normozoospermiques présentent un profil protéique protéolysé. Les résultats présentés dans l'article 4 montrent des taux de grossesse entre les sous-groupes normo-SPQI « protéolysé » vs. « non-protéolysé » de 37 % et 21 % respectivement, soit une différence d'environ 15 %. L'étude statistique doit donc tenir compte de cette différence observée et mettre en évidence une différence (absolue) du taux de grossesse clinique de 15 % entre les 2 profils protéiques spermatiques en faveur du profil « non protéolysé ». Sachant que le taux de grossesse clinique est estimé à 30 % dans notre population d'étude, et que les 2 profils protéiques spermatiques sont équilibrés, nous avons fait l'hypothèse qu'un taux de grossesse clinique de 20 % sera observé pour les profils « protéolysés » et 35 % pour les profils « non-protéolysés ». Pour mettre en évidence cette différence de taux de grossesse entre les 2 profils, avec un test bilatéral, un risque de première espèce de 5 % et une puissance de 80 %, il est nécessaire d'inclure 252 patients. Pour anticiper 10 % de données manquantes (perdue de vue, sortie d'étude), 277 échantillons seraient donc à inclure pour chaque technique d'AMP à évaluer. A partir de la base de données incluant uniquement les 53 patients avec quantification de la protéine pro-AKAP4 pour lesquels les taux de grossesse étaient de respectivement de 27,6 % vs. 23,5 % dans le groupe « protéolysé » versus « non-protéolysé », un minimum de 3552 patients serait à inclure. Ces calculs supposent que l'unité statistique soit le patient, et que le taux de grossesse soit obtenu après une tentative ou un ensemble prédéfini de tentatives.

La protéomique, un bon outil en devenir pour l'AMP

Les études fonctionnelles et comparatives en protéomiques chez les patients infertiles contribuent à notre connaissance croissante de l'infertilité masculine. Cependant, peu de recherches ont été concentrées sur le protéome spermatique et sa relation avec les paramètres

de l'AMP tels que la fécondation, l'embryogenèse ou l'implantation des embryons. Encore moins d'études se sont focalisées sur la relation entre de nouvelles protéines d'intérêts et leur évaluation comme biomarqueurs de l'AMP. Notre travail vient enrichir les connaissances sur les protéines d'intérêts en lien avec les issues de tentatives d'AMP. Une enquête plus approfondie du protéome du gamète mâle, sa contribution au développement de l'embryon et au résultat en AMP reste cruciale. Ces résultats pourraient permettre notamment de révéler les causes sous-jacentes de l'infertilité masculine étiquetée aujourd'hui d'idiopathiques (50 % des hommes normozoospermes), ce qui pourraient permettre une amélioration des soins aux patients et augmenter les chances de grossesse avec ou sans AMP. De plus, malgré les résultats intéressants des différentes études, il semble peu probable que l'altération d'une protéine isolée impacte de façon majeure sur les chances de succès. C'est donc la mutualisation de nos résultats avec ceux déjà publiés en protéomiques mais aussi ceux des autres techniques « -omiques » qui devraient permettre, à terme, d'évaluer au mieux le pouvoir fécondant réel du spermatozoïde.

***CONCLUSION
ET PERSPECTIVES***

Ce travail s'est articulé autour de 2 protéines en lien avec la mobilité. Nous nous sommes intéressés dans un premier temps au potentiel de la protéine Tau dans les cellules spermatiques, protéine très étudiée dans le neurone notamment pour son rôle essentiel dans la polymérisation et le fonctionnement des microtubules. Le deuxième objectif de ce travail était d'approfondir la compréhension de la protéolyse du protéome global chez des hommes issus de couples infertiles, en se focalisant en particulier sur la protéine AKAP4. Enfin, notre travail avait pour troisième objectif d'évaluer le potentiel de l'index SPQI et de la protéine AKAP4 sous ses différentes formes comme biomarqueur(s) prédictif(s) de succès lors d'une prise en charge en AMP.

Au final, ce travail de Thèse aura permis :

- 1. De mettre en évidence la présence de la protéine microtubulaire Tau dans les cellules spermatiques humaines à différents stades de différenciation. De plus, nous avons synthétisé les connaissances de la protéine Tau testiculaire et spermatique humaine en une revue de la littérature.**

Les études sur la protéine Tau au niveau testiculaire sont très peu nombreuses dans la littérature et exclusivement basées sur l'animal. Nos travaux ont permis de décrire pour la première fois chez l'être humain la protéine Tau aux stades spermatocyte et spermatide dans le testicule, ainsi que dans la pièce intermédiaire du spermatozoïde mature. Ces résultats pourraient être le point de départ de l'identification d'un rôle de Tau dans la spermatogenèse. En s'inspirant de ce qui a été largement étudié dans le neurone, plusieurs axes pourraient être exploités. Nos résultats permettent d'envisager de poursuivre ce travail en microscopie électronique pour une analyse plus fine des spermatozoïdes et de la pièce intermédiaire en immunocytochimie. Parallèlement, le rôle de la protéine Tau par exemple, pourrait être identifié en utilisant des lentivirus permettant l'expression de Tau dans les testicules de souris KO *tau*, pour voir si la spermatogenèse est altérée ou améliorée. La suppression de l'expression de la protéine Tau dans des souris Wild Type permettrait de voir si cela entraîne une altération de la spermatogenèse. Enfin, les modèles de souris THY-Tau22 sur-expriment une isoforme de Tau humaine mutée sur 2 sites et sous contrôle d'un promoteur neuronal. Ce modèle présente, dès l'âge de trois mois, des altérations progressives de l'apprentissage et de la mémoire en parallèle à une accumulation de protéines Tau principalement au niveau hippocampique, sans perte neuronale majeure (Van der Jeugd *et al.*, 2013). Ce modèle de

souris pourrait être exploité dans le but de déterminer si une accumulation de Tau chez ces souris entraîne également une altération de la spermatogenèse.

2. D'enrichir les connaissances fondamentales en mettant en relation la quantification de la protéine AKAP4 et les résultats des paramètres spermatiques. Nous avons notamment montré que la préservation de l'intégrité du précurseur de cette protéine, la pro-AKAP4, est corrélée positivement avec la mobilité spermatique après sélection par gradient de densité. Parallèlement, nous avons également enrichi la base de données existante en incluant de nouveaux patients.

Nos résultats montrent d'une part que la pro-AKAP4 dans le spermatozoïde mature humain est retrouvée en quantité équivalente à l'AKAP4 et que d'autre part, c'est l'intégrité de cette pro-AKAP4 qui est un indicateur positif de la mobilité spermatique. Ces observations apportent donc une vision nouvelle du rôle et de l'impact de cette protéine. Les perspectives de ce travail sont, dans un premier temps, d'aller plus loin dans la connaissance mécanistique de l'impact de l'intégrité de la pro-AKAP4 et de l'AKAP4. Le travail effectué au cours de cette Thèse nous a permis de conforter les données acquises lors du travail initial de notre équipe, en affinant ces résultats avec des données quantitatives de l'AKAP4. Cependant, l'utilisation d'un seul anticorps anti-AKAP4 de type Nter représente une faiblesse de nos résultats. Deux autres anticorps sont disponibles sur le marché (Cter et intermédiaire) et leur utilisation devrait nous permettre d'approfondir nos connaissances sur l'impact de la protéolyse et le rôle à la fois de l'AKAP4 et de la pro-AKAP4, en ciblant mieux les zones de protéolyse par exemple. Par ailleurs, dans ce travail, il faudrait tenir compte des phénomènes de phosphorylation de la pro-AKAP4 ou de l'AKAP4. De rares données publiées sur le sujet ne mettent pas en avant de différences probantes entre un état phosphorylé ou non (Turner *et al.*, 1999). Cependant, ces travaux nécessiteraient d'être réévalués avec des technologies plus modernes et les nouvelles connaissances de la protéine AKAP4. D'autres protéines, comme l'HK1, seront également à étudier pour savoir si la protéolyse impacte également leur rôle dans le spermatozoïde. Enfin, nous avons montré que la protéolyse de l'AKAP4 n'entraîne pas de modification notable de la morphologie des spermatozoïdes. Une exploration plus fine par microscopie électronique nous semble indispensable pour comprendre si des altérations de l'ultrastructure peuvent être mises en lien avec la protéolyse de l'AKAP4.

3. D'enrichir la recherche de biomarqueurs prédictifs de succès en AMP en confrontant respectivement l'analyse du protéome global spermatique humain via l'index SPQI et la protéine pro-AKAP4, avec les résultats des tentatives en IIU, FIV et ICSI.

Les résultats d'AMP pourraient conforter l'impact de la protéolyse spermatique sur la qualité du gamète masculin. Cependant, les observations divergentes entre les résultats en IIU et en FIV ou ICSI ne permettent pas, aujourd'hui, d'expliquer l'impact précis et direct de la dégradation du SPQI ou de la pro-AKAP4 sur les résultats de ces techniques et donc de les proposer comme biomarqueurs. De plus, nous n'avons pas pu lors de ce travail établir un cut-off de la quantification de la pro-AKAP4 permettant une validation statistique, en raison d'une puissance insuffisante. Il est donc nécessaire d'augmenter le nombre d'échantillons pour lesquels une quantification doit être réalisée. Il est nécessaire de mettre en place une multicentrique, afin de valider nos résultats du secteur thérapeutique. L'objectif, à terme, serait de pouvoir réaliser l'analyse de la qualité spermatique en prospectif le jour même de la tentative d'AMP. Si les premiers résultats se confirment, la poursuite du travail pourrait être la mise au point d'un test permettant l'évaluation simple et en routine de laboratoire d'un nouvel indicateur. La mise au point d'une méthode ELISA (pour *enzyme-linked immunosorbent assay*) de détection simple de l'AKAP4 ou de la pro-AKAP4 directement à partir d'échantillons de sperme entier pourrait représenter un test pertinent. Enfin, il est probable que des anomalies d'un faisceau de protéines soient responsables d'une baisse de la fertilité chez les patients considérés comme normozoospermiques. Les résultats de nos travaux devront être associés à ceux d'autres travaux traitant de protéines également décrites comme impactant les résultats en AMP afin de trouver la combinaison optimale qui permettra de mieux comprendre, aider et prendre en charge nos patients au quotidien.

En conclusion, l'utilisation de la protéomique chez le spermatozoïde s'est révélée un atout précieux dans ce travail pour envisager l'utilisation de nouveaux biomarqueurs à la fois de la qualité spermatique et prédictifs des chances de succès en reproduction. L'amélioration des technologies et la baisse progressive des coûts de l'ensemble des technologies « -omiques » autorisant des études à large échelle ont permis d'importantes avancées dans la connaissance biologique, notamment des fonctions spermatiques. Notre travail permet d'apporter aujourd'hui une « pierre à l'édifice » à l'établissement de la

« carte d'identité protéique » du spermatozoïde. La compréhension de la composition, des rôles des différentes protéines du spermatozoïde et de leurs impacts devrait permettre, à terme, de mieux assister cette cellule dans son but ultime, à savoir mener à la naissance d'un enfant en bonne santé et au bonheur du couple.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Aarabi M, Balakier H, Bashar S, Moskovtsev SI, Sutovsky P, Librach CL, *et al.* Sperm content of postacrosomal WW binding protein is related to fertilization outcomes in patients undergoing assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2014; 102: 440–7.
- Abou-Haila A, Tulsiani DRP. Mammalian Sperm Acrosome: Formation, Contents, and Function. *Arch Biochem Biophys.* 2000, 79:173–82.
- Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril.* 2003, 79:829–43.
- Ainsworth C. Development of a novel electrophoretic system for the isolation of human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2005, 20:2261–70.
- Aitken RJ. Possible Redox Regulation of Sperm Motility Activation. *J Androl.* 2000, 21:491–6.
- Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Defining the Efficacy of Sperm Preparation Techniques. *J Androl.* 1988, 9:367–76.
- Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Iuliis GN. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl.* 2014, 16:31.
- Allen MJ, Lee C, Lee JD, Pogany GC, Balooch M, Siekhaus WJ, *et al.* Atomic force microscopy of mammalian sperm chromatin. *Chromosoma.* 1993, 102:623–30.
- Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, Balaban B, Brison D, Calderon G, Catt J, Conaghan J, *et al.* The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod.* 2011, 26:1270–83.
- Alto NM, Soderling SH, Hoshi N, Langeberg LK, Fayos R, Jennings PA, *et al.* Bioinformatic design of A-kinase anchoring protein-in silico: a potent and selective peptide antagonist of type II protein kinase A anchoring. *Proc Natl Acad Sci.* 2003, 100:4445–4450.
- Amaral A, Castillo J, Estanyol JM, Ballesca JL, Ramalho-Santos J, Oliva R. Human Sperm Tail Proteome Suggests New Endogenous Metabolic Pathways. *Mol Cell Proteomics.* 2013, 12:330–42.
- Amaral A, Castillo J, Ramalho-Santos J, Oliva R. The combined human sperm proteome: cellular pathways and implications for basic and clinical science. *Hum Reprod Update.* 2014a, 20:40–62.
- Amaral A, Paiva C, Attardo Parrinello C, Estanyol JM, Ballescà JL, Ramalho-Santos J, *et al.* Identification of Proteins Involved in Human Sperm Motility Using High-Throughput Differential Proteomics. *J Proteome Res.* 2014b, 13:5670–84.
- Amaral A, Ramalho-Santos J, St John JC. The expression of polymerase gamma and mitochondrial transcription factor A and the regulation of mitochondrial DNA content in mature human sperm. *Hum Reprod.* 2007, 22:1585–96.
- Andersen AG, Als-Nielsen B, Hornnes PJ, Andersen LF. Time interval from human chorionic gonadotrophin (HCG) injection to follicular rupture. *Hum Reprod.* 1995, 10:3202–5.
- Angelo R, Rubin CS. Molecular Characterization of an Anchor Protein (AKAPCE) That Binds the RI Subunit (RCE) of Type I Protein Kinase A from *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem.* 1998, 273:14633–43.

- Aoki VW. Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Hum Reprod.* 2005, 20:1298–306.
- Aoki VW, Emery BR, Liu L, Carrell DT. Protamine Levels Vary Between Individual Sperm Cells of Infertile Human Males and Correlate With Viability and DNA Integrity. *J Androl.* 2006a, 27:890–8.
- Aoki VW, Liu L, Jones KP, Hatasaka HH, Gibson M, Peterson CM, *et al.* Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertil Steril.* 2006b, 86:1408–15.
- Arimura N, Kaibuchi K. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci.* 2007, 8:194–205.
- Asghar W, Assal RE, Shafiee H, Anchan RM, Demirci U. Preserving human cells for regenerative, reproductive, and transfusion medicine. *Biotechnol J.* 2014a, 9:895–903.
- Asghar W, Velasco V, Kingsley JL, Shoukat MS, Shafiee H, Anchan RM, *et al.* Selection of Functional Human Sperm with Higher DNA Integrity and Fewer Reactive Oxygen Species. *Adv Healthc Mater.* 2014b, 3:1671–9.
- Ashman JB, Hall ES, Eveleth J, Boekelheide K. Tau, the neuronal heat-stable microtubule-associated protein, is also present in the cross-linked microtubule network of the testicular spermatid manchette. *Biol Reprod.* 1992, 46:120–129.
- Assou S, Haouzi D, De Vos J, Hamamah S. Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. *Mol Hum Reprod.* 2010, 16:531–8.
- Auger J, Eustache F. Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. *Andrology.* 2000, 10:358–73.
- Avenarius MR, Hildebrand MS, Zhang Y, Meyer NC, Smith LL, Kahrizi K, *et al.* Human Male Infertility Caused by Mutations in the CATSPER1 Channel Protein. *Am J Hum Genet.* 2009, 84:505–10.
- Azpiazu R, Amaral A, Castillo J, Estanyol JM, Guimera M, Ballesca JL, *et al.* High-throughput sperm differential proteomics suggests that epigenetic alterations contribute to failed assisted reproduction. *Hum Reprod.* 2014, 29:1225–37.

B

- Babcock DF, Rufo GA, Lardy HA. Potassium-dependent increases in cytosolic pH stimulate metabolism and motility of mammalian sperm. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983, 80:1327–31.
- Baccetti B. Gene deletions in an infertile man with sperm fibrous sheath dysplasia. *Hum Reprod.* 2005, 20:2790–4.
- Baccetti B, Bruni E, Gambera L, Moretti E, Piomboni P. An ultrastructural and immunocytochemical study of a rare genetic sperm tail defect that causes infertility in humans. *Fertil Steril.* 2004, 82:463–468.

- Baccetti B, Collodel G, Gambera L, Moretti E, Serafini F, Piomboni P. Fluorescence in situ hybridization and molecular studies in infertile men with dysplasia of the fibrous sheath. *Fertil Steril*. 2005, 84:123–9.
- Baker MA. Identification of SRC as a key PKA-stimulated tyrosine kinase involved in the capacitation-associated hyperactivation of murine spermatozoa. *J Cell Sci*. 2006, 119:3182–92.
- Baker MA. The 'omics' revolution and our understanding of sperm cell biology. *Asian J Androl*. 2011, 13:6–10.
- Baker MA, Aitken RJ. Proteomic insights into spermatozoa: critiques, comments and concerns. *Expert Rev Proteomics*. 2009, 6:691–705.
- Baker MA, Naumovski N, Hetherington L, Weinberg A, Velkov T, Aitken RJ. Head and flagella subcompartmental proteomic analysis of human spermatozoa. *Proteomics*. 2013, 13:61–74.
- Baker MA, Reeves G, Hetherington L, Müller J, Baur I, Aitken RJ. Identification of gene products present in Triton X-100 soluble and insoluble fractions of human spermatozoa lysates using LC-MS/MS analysis. *Proteomics – Clin Appl*. 2007, 1:524–32.
- Balhorn R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol*. 2007, 8:1.
- Baltz JM, Williams PO, Cone RA. Dense fibers protect mammalian sperm against damage. *Biol Reprod*. 1990, 43:485–491.
- Banerjee M, Chowdhury M. Induction of capacitation in human spermatozoa in vitro by an endometrial sialic acid-binding protein. *Hum Reprod*. 1995, 10:3147–53.
- Barazani Y, Agarwal A, Sabanegh ES. Functional Sperm Testing and the Role of Proteomics in the Evaluation of Male Infertility. *Urology*. 2014, 84:255–61.
- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowki A, Menezo Y, Barak Y. Real-Time Fine Morphology of Motile Human Sperm Cells is Associated With IVF-ICSI Outcome. *J Androl*. 2002, 23:1–8.
- Batruch I, Smith CR, Mullen BJ, Grober E, Lo KC, Diamandis EP, *et al*. Analysis of Seminal Plasma from Patients with Non-obstructive Azoospermia and Identification of Candidate Biomarkers of Male Infertility. *J Proteome Res*. 2012, 11:1503–11.
- Behrouzi B, Kenigsberg S, Alladin N, Swanson S, Zicherman J, Hong S-H, *et al*. Evaluation of potential protein biomarkers in patients with high sperm DNA damage. *Syst Biol Reprod Med*. 2013, 59:153–63.
- Belleannee C, Belghazi M, Labas V, Teixeira-Gomes A-P, Gatti JL, Dacheux J-L, *et al*. Purification and identification of sperm surface proteins and changes during epididymal maturation. *Proteomics*. 2011, 11:1952–64.
- Belokopytova IA, Kostyleva EI, Tomilin AN, Vorob'ev VI. Human male infertility may be due to a decrease of the protamine P2 content in sperm chromatin. *Mol Reprod Dev*. 1993, 34:53–7.
- Bhande S, Naz RK. Molecular identities of human sperm proteins reactive with antibodies in sera of immunoinfertile women. *Mol Reprod Dev*. 2007, 74:332–40.
- Bhilawadikar R, Zaveri K, Mukadam L, Naik S, Kamble K, Modi D, *et al*. Levels of Tektin 2 and CatSper 2 in normozoospermic and oligoasthenozoospermic men and its association with

- motility, fertilization rate, embryo quality and pregnancy rate. *J Assist Reprod Genet.* 2013, 30:513–23.
- Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow E., Mandelkow E. Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: Distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron.* 1993, 11:153–63.
- Billingsley M, Kincaid R. Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem J.* 1997, 323:577–591.
- Bohring C, Krause E, Habermann B, Krause W. Isolation and identification of sperm membrane antigens recognized by antisperm antibodies, and their possible role in immunological infertility disease. *Mol Hum Reprod.* 2001, 7:113–8.
- Bohring C, Krause W. The characterization of human spermatozoa membrane proteins - surface antigens and immunological infertility. *Genome Proteome.* Wiley-VCH Verlag GmbH; 1999. p. 391–6.
- Botta T, Blescia S, Martinez-Heredia J, *et al.* Identification of proteomic differences in oligozoospermic sperm samples. *Rev Int Androl* 2009, 7:14-19.
- Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VMY. Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron.* 1993, 10:1089–99.
- Brandt R, Hundelt M, Shahani N. Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: mechanisms and models. *Biol Pathobiol Tau* . 2005, 1739:331–54.
- Brewer L, Corzett M, Balhorn R. Condensation of DNA by Spermatid Basic Nuclear Proteins. *J Biol Chem.* 2002, 277:38895–900.
- Brewis IA, Gadella BM. Sperm surface proteomics: from protein lists to biological function. *Mol Hum Reprod.* 2010, 16:68–79.
- Brown PR. A-Kinase Anchoring Protein 4 Binding Proteins in the Fibrous Sheath of the Sperm Flagellum. *Biol Reprod.* 2002, 68:2241–8.
- Brown PR, Miki K, Harper DB, Eddy EM. A-Kinase Anchoring Protein 4 Binding Proteins in the Fibrous Sheath of the Sperm Flagellum. *Biol Reprod.* 2003, 68:2241–8.
- Buckman C, George TC, Friend S, Sutovsky M, Miranda - Vizuete A, Rawe VY, *et al.* High throughput, parallel imaging and biomarker quantification of human spermatozoa by ImageStream flow cytometry. *Syst Biol Reprod Med* 2009; 55: 244–51.
- Buée L, Bussière T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev.* 2000, 33:95–130.
- Burks D, Carballada R, Moore H, Saling P. Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. *Science.* 1995, 269:83.
- Burns-Hamuro LL, Ma Y, Kammerer S, Reineke U, Self C, Cook C, *et al.* Designing isoform-specific peptide disruptors of protein kinase A localization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003, 100:4072–7.

C

- Cahier de formation Bioforma. Exploration de la fonction de reproduction / versant masculin. 2009.
- Cantineau AE, Cohlen BJ. Ovarian stimulation protocols (anti-oestrogens, gonadotrophins with and without GnRH agonists/antagonists) for intrauterine insemination (IUI) in women with subfertility. In: The Cochrane Collaboration, editor. Cochrane Database Syst Rev. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2007.
- Cárdenas AM, Ardiles AO, Barraza N, Baéz-Matus X, Caviedes P. Role of Tau Protein in Neuronal Damage in Alzheimer's Disease and Down Syndrome. *Arch Med Res*. 2012, 43:645–54.
- Caron CP, Saling PM. Sperm antigens and immunological interference of fertilization. In: Wassarman PM, ed. Elements of Mammalian Fertilization. Boca Raton, FL: CRC Press. 1991, 147-176.
- Carnegie GK, Scott JD. A-kinase anchoring proteins and neuronal signaling mechanisms. *Genes Dev*. 2003, 17:1557–68.
- Carr DW, Acott TS. Intracellular pH regulates bovine sperm motility and protein phosphorylation. *Biol Reprod*. 1989, 41:907–20.
- Carr DW, Stofko-Hahn RE, Fraser ID, Bishop SM, Acott TS, Brennan RG, *et al*. Interaction of the regulatory subunit (RII) of cAMP-dependent protein kinase with RII-anchoring proteins occurs through an amphipathic helix binding motif. *J Biol Chem*. 1991, 266:14188–92.
- Carrell DT, Aston KI, Oliva R, Emery BR, De Jonge CJ. The “omics” of human male infertility: integrating big data in a systems biology approach. *Cell Tissue Res*. 2016, 363:295–312.
- Carrell DT, Emery BR, Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod Update*. 2007, 13:313–27.
- Carrell DT, Liu L. Altered Protamine 2 Expression Is Uncommon In Donors of Known Fertility, but Common Among Men With Poor Fertilizing Capacity, and May Reflect Other Abnormalities of Spermiogenesis. *J Androl*. 2001, 22:604–10.
- Carrera A, Gerton GL, Moss SB. The Major Fibrous Sheath Polypeptide of Mouse Sperm: Structural and Functional Similarities to the A-Kinase Anchoring Proteins. *Dev Biol*. 1994, 165:272–84.
- Carrera A, Moos J, Ning XP, Gerton GL, Tesarik J, Kopf GS, *et al*. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation. *Dev Biol*. 1996, 180:284–296.
- Castillo J, Amaral A, Azpiazu R, Vavouri T, Estanyol JM, Ballescà JL, *et al*. Genomic and proteomic dissection and characterization of the human sperm chromatin. *Mol Hum Reprod*. 2014, 20:1041–53.
- Castillo J, Simon L, de Mateo S, Lewis S, Oliva R. Protamine/DNA Ratios and DNA Damage in Native and Density Gradient Centrifuged Sperm From Infertile Patients. *J Androl*. 2011, 32:324–32.
- Cedenho AP, Lima SB, Cenedeze MA, Spaine DM, Ortiz V, Oehninger S. Oligozoospermia and heat-shock protein expression in ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod*. 2006, 21:1791–4.

- Chan CC, Shui HA, Wu CH, Wang CY, Sun GH, Chen HM, *et al.* Motility and Protein Phosphorylation in Healthy and Asthenozoospermic Sperm. *J Proteome Res.* 2009, 8:5382–6.
- Chan CC, Sun GH, Shui HA, Wu GJ. Differential Spermatozoal Protein Expression Profiles in Men With Varicocele Compared to Control Subjects: Upregulation of Heat Shock Proteins 70 and 90 in Varicocele. *Urology.* 2013, 81:1379.e1-1379.e8.
- Chemes H, Brugo S, Zanchetti F, Carrere C, Lavieri J. Dysplasia of the fibrous sheath: an ultrastructural defect of human spermatozoa associated with sperm immotility and primary sterility. *Int J Gynecol Obstet.* 1987, 28:87.
- Cherr GN, Yudin AI, Overstreet JW. The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling. *Matrix Biol.* 2001, 20:515–25. A
- Chevallier PH, Mauro N, Feneux D, Jouannet P, David G. Anomalous protein complement of sperm nuclei in some infertile men. *The Lancet.* 1987, 330:806–807.
- Cho BS, Schuster TG, Zhu X, Chang D, Smith GD, Takayama S. Passively Driven Integrated Microfluidic System for Separation of Motile Sperm. *Anal Chem.* 2003, 75:1671–5.
- Cissen M, Bendsorp A, Cohlen BJ, Repping S, de Bruin JP, van Wely M. Assisted reproductive technologies for male subfertility. In: *The Cochrane Collaboration, editor. Cochrane Database Syst Rev.* Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2016 .
- Cleveland DW, Hwo S-Y, Kirschner MW. Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol.* 1977a, 116:227–47.
- Cleveland DW, Hwo S-Y, Kirschner MW. Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol.* 1977b, 116:207–25.
- Codina M, Estanyol JM, Fidalgo MJ, Ballescà JL, Oliva R. Advances in sperm proteomics: best-practise methodology and clinical potential. *Expert Rev Proteomics.* 2015, 12:255–77.
- Cohen-Bacrie. Qualité et sélection du spermatozoïde. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction.* 2008, 37:S4-S8.
- Cohlen BJ. Should We Continue Performing Intrauterine Inseminations in the Year 2004? *Gynecol Obstet Invest.* 2005, 59:3–13.
- Colledge M, Scott JD. AKAPs: from structure to function. *Trends Cell Biol.* 1999, 9:216–221.
- Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HWG, Behre HM, *et al.* World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update.* 2010, 16:231–45.
- Cooper TG, Yeung C-H. Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microsc Res Tech.* 2003, 61:28–38.
- Cooper TG, Yeung C-H. Computer-aided evaluation of assessment of “grade a” spermatozoa by experienced technicians. *Fertil Steril.* 2006, 85:220–4.
- Cox J, Mann M. Is Proteomics the New Genomics? *Cell.* 2007, 130:395–8.

D

- Darszon A, Beltrán C, Felix R, Nishigaki T, Treviño CL. Ion Transport in Sperm Signaling. *Dev Biol.* 2001, 240:1–14.
- Darszon A, López-Martínez P, Acevedo JJ, Hernández-Cruz A, Treviño CL. T-type Ca²⁺ channels in sperm function. *T-Type Calcium Channels Old Physiol Nov Funct.* 2006, 40:241–52.
- Dehmelt L, Halpain S. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* 2005, 6:204.
- Dessauer CW. Adenylyl Cyclase-A-kinase Anchoring Protein Complexes: The Next Dimension in cAMP Signaling. *Mol Pharmacol.* 2009, 76:935–41.
- Dolan PJ, Johnson GV. The role of tau kinases in Alzheimer's disease. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2010, 13:595.
- Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *science.* 2006, 312:212–217.
- Dorus S, Busby SA, Gerike U, Shabanowitz J, Hunt DF, Karr TL. Genomic and functional evolution of the *Drosophila melanogaster* sperm proteome. *Nat Genet.* 2006,38:1440-5
- Drewes G, Ebnet A, Preuss U, Mandelkow E-M, Mandelkow E. MARK, a Novel Family of Protein Kinases That Phosphorylate Microtubule-Associated Proteins and Trigger Microtubule Disruption. *Cell.* 1997, 89:297–308.
- Druart X. Sperm Interaction with the Female Reproductive Tract. *Reprod Domest Anim.* 2012, 47:348–52.
- Drubin D, Kobayashi S, Kirschner M. Association of tau protein with microtubules in living cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1986, 466:257–268.
- Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod.* 2002, 17:3122–8.

E

- Eddy EM, Toshimori K, O'Brien DA. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech.* 2003, 61:103–15.
- Ergur AR, Dokras A, Giraldo JL, Habana A, Kovanci E, Huszar G. Sperm maturity and treatment choice of in vitro fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection: diminished sperm HspA2 chaperone levels predict IVF failure. *Fertil Steril.* 2002, 77:910–918.
- Erickson HP, O'Brien ET. Microtubule Dynamic Instability and GTP Hydrolysis. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1992, 21:145–66.
- Escalier D. Knockout mouse models of sperm flagellum anomalies. *Hum Reprod Update.* 2006, 12:449–61.
- Etienne-Manneville S. From signaling pathways to microtubule dynamics: the key players. *Curr Opin Cell Biol.* 2010, 22:104–11.

F

- Fardilha M, Esteves SLC, Korrodi-Gregório L, Pelech S, da Cruz e Silva OAB, da Cruz e Silva E. Protein phosphatase 1 complexes modulate sperm motility and present novel targets for male infertility. *Mol Hum Reprod.* 2011, 17:466–77.
- Fernandez-Gomez FJ, Jumeau F, Derisbourg M, Burnouf S, Tran H, Eddarkaoui S, *et al.* Consensus brain-derived protein, extraction protocol for the study of human and murine brain proteome using both 2D-DIGE and mini 2DE immunoblotting. *J Vis Exp.* 2014.
- Ferramosca A, Zara V. Bioenergetics of Mammalian Sperm Capacitation. *BioMed Res Int.* 2014, 2014:902-953.
- Ferrer M, Rodriguez H, Zara L, Yu Y, Xu W, Oko R. MMP2 and acrosin are major proteinases associated with the inner acrosomal membrane and may cooperate in sperm penetration of the zona pellucida during fertilization. *Cell Tissue Res.* 2012, 349:881–95.
- Ficarro S, Chertihin O, Westbrook VA, White F, Jayes F, Kalab P, *et al.* Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm: evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation. *J Biol Chem.* 2003, 278:11579–89.
- Findlay GD, Swanson WJ. Proteomics enhances evolutionary and functional analysis of reproductive proteins. *BioEssays.* 2010, 32:26–36.
- Fleming SD, Ilad RS, Griffin A-MG, Wu Y, Ong KJ, Smith HC, *et al.* Prospective controlled trial of an electrophoretic method of sperm preparation for assisted reproduction: comparison with density gradient centrifugation. *Hum Reprod.* 2008, 23:2646–51.
- Ford WCL. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum Reprod Update.* 2004, 10:387–99.
- Frapsauc C, Pionneau C, Bouley J, Delarouziere V, Berthaut I, Ravel C, *et al.* Proteomic identification of target proteins in normal but nonfertilizing sperm. *Fertil Steril.* 2014, 102:372–80.
- Frapsauc C, Pionneau C, Bouley J, de Larouzière V, Berthaut I, Ravel C, *et al.* Infertilité masculine chez les patients normospermiques: analyse protéomique des spermatozoïdes normaux non fécondants en fécondation in vitro classique. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* 2009, 37:796–802.
- Fraser LR, Quinn PJ. A glycolytic product is obligatory for initiation of the sperm acrosome reaction and whiplash motility required for fertilization in the mouse. *J Reprod Fertil.* 1981, 61:25–35.
- Frayne J, Hall L. The gene for the human tMDC I sperm surface protein is non-functional: implications for its proposed role in mammalian sperm-egg recognition. *Biochem J.* 1998, 334:171–6.
- Frayne J, Hurd EAC, Hall L. Human tMDC III: a sperm protein with a potential role in oocyte recognition. *Mol Hum Reprod.* 2002, 8:817–22.
- Fujita A, Nakamura K, Kato T, Watanabe N, Ishizaki T, Kimura K, *et al.* Ropporin, a sperm-specific binding protein of rhophilin, that is localized in the fibrous sheath of sperm flagella. *J Cell Sci.* 2000, 113:103.

Fulcher KD, Mori C, Welch JE, O'Brien DA, Klapper DG, Eddy EM. Characterization of Fsc1 cDNA for a mouse sperm fibrous sheath component. *Biol Reprod* . 1995, 52:41–49.

G

Ghaleno LR, Valojerdi MR, Janzamin E, Chehrazi M, Sharbatoghli M, Yazdi RS. Evaluation of conventional semen parameters, intracellular reactive oxygen species, DNA fragmentation and dysfunction of mitochondrial membrane potential after semen preparation techniques: a flow cytometric study. *Arch Gynecol Obstet*. 2014, 289:173–80.

Gilany K, Lakpour N, Vafakhah M, Sadeghi MR. The Profile of Human Sperm Proteome; A Mini-review. *J Reprod Infertil* . 2011, 12:193–9.

Glander HJ, Schaller J, Weber W, Alexander H, Haake KW. In Vitro Fertilization: Increased V α 1 (Very Late Antigen) Integrins and Fibronectin After Acrosome Reaction. *Arch Androl*. 1996, 36:177–85.

Goedert M, Wischik CM, Crowther RA, Walker JE, Klug A. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci*. 1988, 85:4051–4055.

Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. *Int J Androl*. 1998, 21:81–94.

Goverde AJ, McDonnell J, Vermeiden JP, Schats R, Rutten FF, Schoemaker J. Intrauterine insemination or in-vitro fertilisation in idiopathic subfertility and male subfertility: a randomised trial and cost-effectiveness analysis. *The Lancet*. 2000, 355:13–8.

Grunewald S, Paasch U, Glander H-J, Anderegg U. Mature human spermatozoa do not transcribe novel RNA. *Andrologia*. 2005, 37:69–71.

Gu B, Zhang J, Wu Y, Zhang X, Tan Z, Lin Y, *et al*. Proteomic Analyses Reveal Common Promiscuous Patterns of Cell Surface Proteins on Human Embryonic Stem Cells and Sperms. Brivanlou AH, editor. *PLoS One*. 2011, 6:e19386.

Gu Y, Oyama F, Ihara Y. τ Is Widely Expressed in Rat Tissues. *J Neurochem*. 1996, 67:1235–44.

Gur Y. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes Dev*. 2006, 20:411–6.

Gur Y, Breitbart H. Protein synthesis in sperm: Dialog between mitochondria and cytoplasm. *Mol Cell Endocrinol*. 2008, 282:45–55.

H

Hamada A, Sharma R, du Plessis SS, Willard B, Yadav SP, Sabanegh E, *et al*. Two-dimensional differential in-gel electrophoresis-based proteomics of male gametes in relation to oxidative stress. *Fertil Steril*. 2013, 99:1216–1226.e2.

- Hamatani T. Spermatozoal RNA profiling towards a clinical evaluation of sperm quality. *Reprod Biomed Online*. 2011, 22:103–5.
- Hansen S, Eichler EE, Fullerton SM, Carrell D. SPANX Gene Variation in Fertile and Infertile Males. *Syst Biol Reprod Med*. 2010, 56:18–26.
- Harper CV, Cummerson JA, White MRH, Publicover SJ, Johnson PM. Dynamic resolution of acrosomal exocytosis in human sperm. *J Cell Sci*. 2008, 121:2130–5.
- Henkel R. Sperm preparation: state-of-the-art—physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian J Androl*. 2012, 14:260–9.
- Henkel RR, Schill W-B. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003, 1:1.
- Hermo L, Pelletier R-M, Cyr DG, Smith CE. Surfing the Wave, Cycle, Life History, and Genes/Proteins Expressed by Testicular Germ Cells. Part 2: Changes in Spermatid Organelles Associated With Development of Spermatozoa. *Microsc Res Tech*. 2010, 279–319.
- Hoff JD, Quigley ME, Yen SSC. Hormonal Dynamics at Midcycle: A Reevaluation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1983, 57:792–6.
- Hosseini H, Gourabi H, Salekdeh GH, Alikhani M, Mirshahvaladi S, Sabbaghian M, *et al*. Study of Sperm Protein Profile in Men With and Without Varicocele Using Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Urology*. 2013, 81:293–300.
- Huszar G, Jakab A, Sakkas D, Ozenci C-C, Cayli S, Delpiano E, *et al*. Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reprod Biomed Online*. 2007, 14:650–63.
- Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril*. 2003, 79, Supplement 3:1616–24.
- Huszar G, Stone K, Dix D, Vigue L. Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. *Biol Reprod*. 2000, 63:925–932.

I

- Ibañez-Tallon I¹, Heintz N, Omran H. To beat or not to beat: roles of cilia in development and disease. *Hum Mol Genet*. 2003, 12 Spec No 1:R27-35.
- Inaba K. Molecular Architecture of the Sperm Flagella: Molecules for Motility and Signaling. *Zool Sci*. 2003, 20:1043–56.
- Inaba K. Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components. *Mol Hum Reprod*. 2011, 17:524–38.
- Inoue H, Hiradate Y, Shirakata Y, Kanai K, Kosaka K, Gotoh A, *et al*. Site-specific phosphorylation of Tau protein is associated with deacetylation of microtubules in mouse spermatogenic cells during meiosis. *FEBS Lett*. 2014, 588:2003–8.

Intasqui P, Camargo M, Del Giudice PT, Spaine DM, Carvalho VM, Cardozo KHM, *et al.* Unraveling the sperm proteome and post-genomic pathways associated with sperm nuclear DNA fragmentation. *J Assist Reprod Genet.* 2013, 30:1187–202.

J

Jiaen L, Zsolt N, Hubert J, Herman T, Johan S, Michel C, *et al.* Analysis of 76 total fertilization failure cycles out of 2732 intracytoplasmic sperm injection cycles. *Hum Reprod.* 1995, 10:2630–6.

Jodar M, Oriola J, Mestre G, Castillo J, Giwercman A, Vidal-Taboada JM, *et al.* Polymorphisms, haplotypes and mutations in the protamine 1 and 2 genes: Mutational studies in the protamine 1 and 2 genes. *Int J Androl.* 2011, 34:470–85.

Jodar M, Soler-Ventura A, Oliva R. Semen proteomics and male infertility. *J Proteomics* . 2016

Jones RC, Murdoch RN. Regulation of motility and metabolism of spermatozoa for storage in the epididymis of the Eutherian and marsupial mammals. *Reprod Fertil Dev.* 1996, 8:553-558.

Johnson LR, Foster JA, Haig-Ladewig L, Vanscoy H, Rubin CS, Moss SB, *et al.* Assembly of AKAP82, a Protein Kinase A Anchor Protein, into the Fibrous Sheath of Mouse Sperm. *Dev Biol.* 1997, 192:340–50.

Johnston DS, Wooters J, Kopf GS, Qiu Y, Roberts KP. Analysis of the Human Sperm Proteome. *Ann N Y Acad Sci.* 2005, 1061:190–202.

K

Kahraman S, Tasdemir M, Tasdemir I, Vicdan K, Özgür S, Polat G, *et al.* Pregnancies achieved with testicular and ejaculated spermatozoa in combination with intracytoplasmic sperm injection in men with totally or initially immotile spermatozoa in the ejaculate. *Hum Reprod.* 1996, 11:1343–6.

Kempf M, Clement A, Faissner A, Lee G, Brandt R. Tau binds to the distal axon early in development of polarity in a microtubule- and microfilament-dependent manner. *J Neurosci.* 1996, 16:5583–5592.

Kenner L, El-Shabrawi Y, Hutter H, Forstner M, Zatloukal K, Hoefler G, *et al.* Expression of three- and four-repeat tau isoforms in mouse liver. *Hepatology.* 1994, 20:1086–9.

Khara KK, Vlad M, Griffiths M, Kennedy CR. Human protamines and male infertility. *J Assist Reprod Genet.* 1997, 14:282–90.

Kichine E, Di Falco M, Hales BF, Robaire B, Chan P. Analysis of the Sperm Head Protein Profiles in Fertile Men: Consistency across Time in the Levels of Expression of Heat Shock Proteins and Peroxiredoxins. Yan W, editor. *PLoS One.* 2013, 8:e77471.

Kierszenbaum AL, Tres LL. The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol.* 2004, 67:271–284.

Kierszenbaum AL. Fusion of membranes during the acrosome reaction: a tale of two SNAREs. *Mol Reprod Dev.* 2000, 57:309–10.

- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL. The actin-based motor myosin Va is a component of the acroplaxome, an acrosome-nuclear envelope junctional plate, and of manchette-associated vesicles. *Cytogenet Genome Res.* 2003, 103:337–44.
- Kim YH, Haidl G, Schaefer M, Egner U, Mandal A, Herr JC. Compartmentalization of a unique ADP/ATP carrier protein SFEC (Sperm Flagellar Energy Carrier, AAC4) with glycolytic enzymes in the fibrous sheath of the human sperm flagellar principal piece. *Dev Biol.* 2007, 302:463–76.
- Kirichok Y, Lishko PV. Rediscovering sperm ion channels with the patch-clamp technique. *Mol Hum Reprod.* 2011, 17:478–99.
- Kirkman-Brown JC, Smith DJ. Sperm motility: is viscosity fundamental to progress? *Mol Hum Reprod.* 2011, 17:539–44.
- Kitajima TS, Ohsugi M, Ellenberg J. Complete Kinetochore Tracking Reveals Error-Prone Homologous Chromosome Biorientation in Mammalian Oocytes. *Cell.* 2011, 146:568–81.
- Klentzeris LD, Fishel S, McDermott H, Dowell K, Hall J, Green S. A positive correlation between expression of beta-1 integrin cell adhesion molecules and fertilizing ability of human spermatozoa in vitro. *Mol Hum Reprod.* 1995, 10:728-733.
- Klemm U, Müller-Esterl W, Engel W. Acrosin, the peculiar sperm-specific serine protease. *Hum Genet.* 1991;87:635–41.
- Krawetz SA. Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nature Reviews Genetics* 2005, 6:633–642.
- Kricka LJ, Nozaki O, Heyner S, Garside WT, Wilding P. Applications of a microfabricated device for evaluating sperm function. *Clin Chem.* 1993, 39:1944–1947.
- Kriegel TM, Heidenreich F, Kettner K, Pursche T, Hoflack B, Grunewald S, *et al.* Identification of diabetes-and obesity-associated proteomic changes in human spermatozoa by difference gel electrophoresis. *Reprod Biomed Online.* 2009, 19:660–670.
- Kumar M, Kumar K, Jain S, Hassan T, Dada R. Novel insights into the genetic and epigenetic paternal contribution to the human embryo. *Clinics.* 2013, 68(Suppl 1):5–14.

L

- Lalli G. Regulation of neuronal polarity. *Cell Polarity.* 2014, 328:267–75.
- de Lamirande E, O'Flaherty C. Sperm activation: Role of reactive oxygen species and kinases. *Inhib Protein Kinases 5th Int Conf IPK-2007 Workshop Sess Mol Des Simul Methods Wars Pol June 23-27 2007.* 2008, 1784:106–15.
- de Lamirande E, Yoshida K, Yoshiike M, Iwamoto T, Gagnon C. Semenogelin, the Main Protein of Semen Coagulum, Inhibits Human Sperm Capacitation by Interfering With the Superoxide Anion Generated During This Process. *J Androl.* 2001, 22:672–9.
- Lea IA, Adoyo P, O'Rand MG. Autoimmunogenicity of the human sperm protein Sp17 in vasectomized men and identification of linear B cell epitopes. *Fertil Steril.* 1997, 67:355–61.

- Lee CYG, Liu MS, Su MW, Zhu JB. Studies of sperm antigens reactive to HS-11 and HS-63 monoclonal antibodies. In: Alexander NJ, Griffin D, Spieler JM, Waites GMH eds. Gamete Interaction: Prospects for Immunocontraception. New York: Wiley-Liss Inc; 1990, 37-52.
- Lefièvre L, Chen Y, Conner SJ, Scott JL, Publicover SJ, Ford WCL, *et al.* Human spermatozoa contain multiple targets for protein S-nitrosylation: An alternative mechanism of the modulation of sperm function by nitric oxide? *Proteomics*. 2007, 7:3066–84.
- Lewis SEM. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction*. 2007, 134:31–40.
- Li C, Zhou X. Gene transcripts in spermatozoa: Markers of male infertility. *Clin Chim Acta*. 2012, 413:1035–8.
- Li LW, Fan LQ, Zhu WB, Nie HC, Sun BL, Luo KL, *et al.* Establishment of a high-resolution 2-D reference map of human spermatozoal proteins from 12 fertile sperm-bank donors. *Asian J Androl*. 2007, 9:321–9.
- Li Y, Ndubuka C, Rubin CS. A Kinase Anchor Protein 75 Targets Regulatory (RII) Subunits of cAMP-dependent Protein Kinase II to the Cortical Actin Cytoskeleton in Non-neuronal Cells. *J Biol Chem*. 1996, 271:16862–9.
- Liao H, Li Y, Brautigan DL, Gundersen GG. Protein Phosphatase 1 Is Targeted to Microtubules by the Microtubule-associated Protein Tau. *J Biol Chem*. 1998, 273:21901–8.
- Liao TT, Xiang Z, Zhu WB, Fan LQ. Proteome analysis of round-headed and normal spermatozoa by 2-D fluorescence difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Asian J Androl*. 2009, 11:683–93.
- Lim S, Haque MM, Kim D, Kim DJ, Kim YK. Cell-based Models To Investigate Tau Aggregation. *Comput Struct Biotechnol J*. 2014, 12:7–13.
- Lindwall G, Cole RD. Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem*. 1984, 259:5301–5.
- Lishko PV, Kirichok Y, Ren D, Navarro B, Chung J-J, Clapham DE. The Control of Male Fertility by Spermatozoan Ion Channels. *Annu Rev Physiol*. 2012, 74:453–75.
- Liu Y, Wang D-K, Chen L-M. The Physiology of Bicarbonate Transporters in Mammalian Reproduction. *Biol Reprod*. 2012, 86:99.
- Loveland KL, Herszfeld D, Chu B, Rames E, Christy E, Briggs LJ, *et al.* Novel Low Molecular Weight Microtubule-associated Protein-2 Isoforms Contain a Functional Nuclear Localization Sequence. *J Biol Chem*. 1999, 274:19261–8.
- Lu R¹, Guo C, Tao XQ, Liu HY, Shi SS, Lin CY, *et al.* Abstract. Protective effect of Annexin 5 on human sperm membrane and DNA integrity. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2011, 17:17-20.
- Luconi M, Cantini G, Baldi E, Forti G. Role of a-kinase anchoring proteins (AKAPs) in reproduction. *Front Biosci*. 2011, 16:1315–1330.
- Luconi M, Forti G, Baldi E. Pathophysiology of sperm motility. *Front Biosci*. 2006, 11:1433–1447.

M

- Macchia G, Topo E, Mangano N, D'Aniello E, Boni R. dl-Aspartic acid administration improves semen quality in rabbit bucks. *Anim Reprod Sci.* 2010, 118:337–43.
- Magli MC, Crippa A, Muzii L, Boudjema E, Capoti A, Scaravelli G, *et al.* Head birefringence properties are associated with acrosome reaction, sperm motility and morphology. *Reprod Biomed Online.* 2012a, 24:352–9.
- Magli MC, Jones GM, Lundin K, van den Abbeel E. Preface. *Hum Reprod.* 2012b, 27(suppl 1):i1–i1.
- Marchetti C, Jouy N, Leroy-Martin B, Defossez A, Formstecher P, Marchetti P. Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. *Hum Reprod.* 2004, 19:2267–76.
- Marchetti C, Obert G, Deffosse A, Formstecher P, Marchetti P. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum Reprod.* 2002, 17:1257–65.
- Martin-DeLeon PA. Germ-cell hyaluronidases: their roles in sperm function. *Int J Androl.* 2011, 34:e306–18.
- Martinez AR, Bernardus RE, Voorhorst FJ, Vermeiden JPW, Schoemaker J. Pregnancy rates after timed intercourse or intrauterine insemination after human menopausal gonadotropin stimulation of normal ovulatory cycles: a controlled study*. *Fertil Steril.* 1991, 55:258–65.
- Martínez-Heredia J, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R. Proteomic identification of human sperm proteins. *Proteomics.* 2006, 6:4356–69.
- Martinez-Heredia J, de Mateo S, Vidal-Taboada JM, Ballescà JL, Oliva R. Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. *Hum Reprod.* 2008, 23:783–91.
- de Mateo S, Castillo J, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R. Proteomic characterization of the human sperm nucleus. *Proteomics.* 2011, 11:2714–26.
- de Mateo S, Estanyol JM, Oliva R. Methods for the Analysis of the Sperm Proteome. In: Carrell TD, Aston IK, editors. *Spermatogenesis Methods Protoc*. Totowa, NJ: Humana Press; 2013. p.411–22.
- de Mateo S, Gázquez C, Guimerà M, Balasch J, Meistrich ML, Ballescà JL, *et al.* Protamine 2 precursors (Pre-P2), protamine 1 to protamine 2 ratio (P1/P2), and assisted reproduction outcome. *Fertil Steril.* 2009, 91:715–22.
- de Mateo S, Martínez-Heredia J, Estanyol JM, Domínguez-Fandos D, Vidal-Taboada JM, Ballescà JL, *et al.* Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa. *Proteomics.* 2007, 7:4264–77.
- de Mateo S, Ramos L, de Boer P, Meistrich M, Oliva R. Protamine 2 Precursors and Processing. *Protein Pept Lett.* 2011, 18:778–85.
- McReynolds S, Dzieciatkowska M, Stevens J, Hansen KC, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Toward the identification of a subset of unexplained infertility: a sperm proteomic approach. *Fertil Steril.* 2014, 102:692–9.

- Mengual L, Ballescá JL, Ascaso C, Oliva R. Marked Differences in Protamine Content and P1/P2 Ratios in Sperm Cells From Percoll Fractions Between Patients and Controls. *J Androl.* 2003, 24:438–47.
- Miki K, Willis WD, Brown PR, Goulding EH, Fulcher KD, Eddy EM. Targeted Disruption of the Akap4 Gene Causes Defects in Sperm Flagellum and Motility. *Dev Biol.* 2002, 248:331–42.
- Milardi D, Grande G, Vincenzoni F, Castagnola M, Marana R. Proteomics of human seminal plasma: Identification of biomarker candidates for fertility and infertility and the evolution of technology: SEMINAL PLASMA PROTEOMICS. *Mol Reprod Dev.* 2013, 80:350–7.
- Miller MR, Mansell SA, Meyers SA, Lishko PV. Flagellar ion channels of sperm: similarities and differences between species. *SI Organellar Channels Transp.* 2015, 58:105–13.
- Miescher F. Die Spermatozoen einiger Wirbeltiere. Ein Beitrag zur Histochemie. *Verh Naturforsch Ges VI.*, 1874, 138–208.
- Mochida K, Tres L., Kierszenbaum A. Structural and biochemical features of fractionated spermatid manchettes and sperm axonemes of the azh/azh mutant mouse. *Mol Reprod Dev.* 1999, 52:434–44.
- Mochtar MH, Custers IM, Koks CAM, Bernardus RE, Verhoeve HR, Mol BW, *et al.* Timing oocyte collection in GnRH agonists down-regulated IVF and ICSI cycles: a randomized clinical trial. *Hum Reprod.* 2011, 26:1091–6.
- Mohanty G, Swain N, Samanta L. Sperm Proteome: What Is on the Horizon? *Reprod Sci.* 2015, 22:638–53.
- Moreno RD, Alvarado CP. The mammalian acrosome as a secretory lysosome: New and old evidence. *Mol Reprod Dev.* 2006, 73:1430–4.
- Moretti E, Scapigliati G, Pascarelli NA, Baccetti B, Collodel G. Localization of AKAP4 and tubulin proteins in sperm with reduced motility. *Asian J Androl.* 2007, 9:641–9.
- Mori C, Nakamura N, Welch JE, Shiota K, Eddy EM. Testis-specific expression of mRNAs for a unique human type 1 hexokinase lacking the porin-binding domain. *Mol. Reprod. Dev.* 1996, 44:14–22.
- Moss SB, Gerton GL. A-kinase anchor proteins in endocrine systems and reproduction. *Trends Endocrinol Metab.* 2001, 12:434–440.
- Moss SB, Turner RM, Burkert KL, Butt HV, Gerton GL. Conservation and function of a bovine sperm A-kinase anchor protein homologous to mouse AKAP82. *Biol Reprod.* 1999, 61:335–342.
- Muratori M, Luconi M, Marchiani S, Forti G, Baldi E. Molecular markers of human sperm functions. *Int J Androl.* 2009, 32:25–45.
- Müsch A. Microtubule Organization and Function in Epithelial Cells. *Traffic.* 2004, 5:1–9.

N

- Naaby-Hansen S. Electrophoretic map of acidic and neutral human spermatozoal proteins. *J Reprod Immunol.* 1990, 17:167–85.

- Naaby-Hansen S. Functional and immunological analysis of the human sperm proteome. *Dan Med J*. 2012, 59:B4414.
- Naaby-Hansen S, Herr JC. Heat shock proteins on the human sperm surface. *J Reprod Immunol*. 2010, 84:32–40.
- Nakajima A, Morita M, Takemura A, Kamimura S, Okuno M. Increase in intracellular pH induces phosphorylation of axonemal proteins for activation of flagellar motility in starfish sperm. *J Exp Biol*. 2005, 208:4411.
- Nakamura N, Miranda-Vizuete A, Miki K, Mori C, Eddy EM. Cleavage of Disulfide Bonds in Mouse Spermatogenic Cell-Specific Type 1 Hexokinase Isozyme Is Associated with Increased Hexokinase Activity and Initiation of Sperm Motility. *Biol Reprod*. 2008a, 79:537–45.
- Nakamura N, Shibata H, O'Brien DA, Mori C, Eddy EM. Spermatogenic cell-specific type 1 hexokinase is the predominant hexokinase in sperm. *Mol Reprod Dev*. 2008b, 75:632–40.
- Nallella KP, Sharma RK, Aziz N, Agarwal A. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertil Steril*. 2006, 85:629–34.
- Naz RK, Ahmad K, Kaplan P. Expression and function of ras proto-oncogene proteins in human sperm cells. *J Cell Sci*. 1992, 102:487–494.
- Naz RK, Ahmad K, Kumar G. Presence and role of c-myc proto-oncogene product in mammalian sperm cell function. *Biol Reprod*. 1991, 44:842–50.
- Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S, editors. *Andrology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010.
- Nijs M, Vanderzwalmen P, Vandamme B, Segal-Bertin G, Lejeune B, Segal L, *et al*. *Andrology: Fertilizing ability of immotile spermatozoa after intracytoplasmic sperm injection*. *Hum Reprod*. 1996, 11:2180–5.
- Nipper RW, Jones BH, Gerton GL, Moss SB. Protein Domains Govern the Intracellular Distribution of Mouse Sperm AKAP4. *Biol Reprod*. 2006, 75:189–96.

O

- Oh-Oka T, Tanii I, Wakayama T, Yoshinaga K, Watanabe K, Toshimori K. Partial Characterization of an Intra-Acrosomal Protein, Human Acrin1 (MN7). *J Androl*. 2001, 22:17–24.
- Ohtake H. Respiratory behaviour of sea-urchin spermatozoa. Effect of pH and egg water on the respiratory rate. *J Exp Zool*. 1976, 198:303–11.
- Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update*. 2006, 12:417–35.
- Oliva R, Castillo J. Proteomics and the genetics of sperm chromatin condensation. *Asian J Androl*. 2011a, 13:24–30.
- Oliva R, Castillo J. Sperm Nucleoproteins. In: Zini A, Agarwal A, editors. *Sperm Chromatin Biol Clin Appl Male Infertil Assist Reprod*. New York, NY: Springer New York; 2011b. p. 45–60.

- Oliva R, Dixon GH. Vertebrate Protamine Genes and the Histone-to-Protamine Replacement Reaction. In: Waldo E. Cohn and Kivie Moldave, editor. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* . Academic Press; 1991. p. 25–94.
- Oliva R, Martínez-Heredia J, Estanyol JM. Proteomics in the Study of the Sperm Cell Composition, Differentiation and Function. *Syst Biol Reprod Med*. 2008, 54:23–36.
- Oliva R, de Mateo S, Estanyol JM. Sperm cell proteomics. *Proteomics*. 2009, 9:1004–17.
- O’Rand MG. Changes of sperm surface properties correlated with capacitation. In: Fawcett DW, Bedford JM, eds. *The Spermatozoon*. Urban and Schwarzenberg, Baltimore-Munich: Alan R. Liss Inc; 1979, 195-204.
- Olson S, Fauci L, Suarez S. Mathematical modeling of calcium signaling during sperm hyperactivation. *Mol Hum Reprod*. 2011, 17:500–10.
- Ostermeier GC, Goodrich RJ, Moldenhauer JS, Diamond MP, Krawetz SA. A Suite of Novel Human Spermatozoal RNAs. *J Androl*. 2005, 26:70–4.

P

- Paasch U, Heidenreich F, Pursche T, Kuhlisch E, Kettner K, Grunewald S, *et al*. Identification of Increased Amounts of Eppin Protein Complex Components in Sperm Cells of Diabetic and Obese Individuals by Difference Gel Electrophoresis. *Mol Cell Proteomics*. 2011, 10:M110.007187.
- Paiva C, Amaral A, Rodriguez M, Canyellas N, Correig X, Ballescà JL, *et al*. Identification of endogenous metabolites in human sperm cells using proton nuclear magnetic resonance (1H-NMR) spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Andrology*. 2015, 3:496–505.
- Parte PP, Rao P, Redij S, Lobo V, D’Souza SJ, Gajbhiye R, *et al*. Sperm phosphoproteome profiling by ultra performance liquid chromatography followed by data independent analysis (LC–MSE) reveals altered proteomic signatures in asthenozoospermia. *J Proteomics*. 2012, 75:5861–71.
- Perdrix A, Rives N. Motile sperm organelle morphology examination (MSOME) and sperm head vacuoles: state of the art in 2013. *Hum Reprod Update*. 2013, 19:527–41.
- Pereira R, Oliveira J, Ferraz L, Barros A, Santos R, Sousa M. Mutation analysis in patients with total sperm immotility. *J Assist Reprod Genet* . 2015, 32:893–902.
- Pereira R, Sà R, Barros A, Sousa M. Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian J Androl*. 2016, 18:1-10.
- Petersen C, Füzesi L, Hoyer-Fender S. Outer dense fibre proteins from human sperm tail: molecular cloning and expression analyses of two cDNA transcripts encoding proteins of ~70 kDa. *Mol Hum Reprod*. 1999, 5:627–35.
- Petersen CG, Vagnini LD, Mauri AL, Massaro FC, Cavagna M, Baruffi RLR, *et al*. Relationship between DNA damage and sperm head birefringence. *Reprod Biomed Online*. 2011, 22:583–9.

Piomboni P, Focarelli R, Stendardi A, Ferramosca A, Zara V. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility: Mitochondria functionality in human spermatozoa. *Int J Androl.* 2012, 35:109–24.

Pixton KL. Sperm proteome mapping of a patient who experienced failed fertilization at IVF reveals altered expression of at least 20 proteins compared with fertile donors: Case report. *Hum Reprod.* 2004, 19:1438–47.

Platt MD, Salicioni AM, Hunt DF, Visconti PE. Use of Differential Isotopic Labeling and Mass Spectrometry To Analyze Capacitation-Associated Changes in the Phosphorylation Status of Mouse Sperm Proteins. *J Proteome Res.* 2009, 8:1431–40.

Q

Quill TA, Garbers DL. Sperm motility activation and chemoattraction. In: Hardy DM (ed). *Fertilization.* San Diego, USA: Academic Press. 2002, 29-49.

R

Raff EC, Hoyle HD, Popodi EM, Turner FR. Axoneme β -tubulin sequence determines attachment of outer dynein arms. *Curr Biol CB.* 2008, 18:911–4.

Rajeev SK, Reddy KVR. Integrins and disintegrins: the candidate molecular players in sperm–egg interaction. *Ind J Exp Biol.* 2000, 38:1217-1221.

Rajeev SK. Sperm membrane protein profiles of fertile and infertile men: identification and characterization of fertility-associated sperm antigen. *Hum Reprod.* 2004, 19:234–42.

Rappa KL, Rodriguez HF, Hakkarainen GC, Anchan RM, Mutter GL, Asghar W. Sperm processing for advanced reproductive technologies: Where are we today? *Biotechnol Adv.* 2016, 34:578-87.

Reddy KVR, Meherji PK, Shahani SK. Integrin cell adhesion molecules on human spermatozoa. *Ind J Exp Biol.* 1998, 36:450-463.

Robert M, Gagnon C. Purification and characterization of the active precursor of a human sperm motility inhibitor secreted by the seminal vesicles: identity with semenogelin. *Biol Reprod.* 1996, 55:813–21.

Roten R, Paz GF, Hamonnai ZT, Kalina M, Naor Z. Protein kinase C is present in human sperm: possible role of flagellar motility. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990, 87:7305-7308.

S

Sabeur K, Cherr GN, Yudin AI, Primakoff P, Li MW, Overstreet JW. The PH-20 Protein in Human Spermatozoa. *J Androl.* 1997, 18:151–8.

Said TM, Land JA. Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review. *Hum Reprod Update.* 2011, 17:719–33.

- Salemi M, Calogero AE, Benedetto DD, Cosentino A, Barone N, Rappazzo G, *et al.* Expression of SPANX proteins in human-ejaculated spermatozoa and sperm precursors. *Int J Androl.* 2004, 27:134–9.
- Schuster TG, Cho B, Keller LM, Takayama S, Smith GD. Isolation of motile spermatozoa from semen samples using microfluidics. *Reprod Biomed Online.* 2003, 7:75–81.
- Secciani F, Bianchi L, Ermini L, Cianti R, Armini A, La Sala GB, *et al.* Protein Profile of Capacitated versus Ejaculated Human Sperm. *J Proteome Res.* 2009, 8:3377–89.
- Sendler E, Johnson GD, Mao S, Goodrich RJ, Diamond MP, Hauser R, *et al.* Stability, delivery and functions of human sperm RNAs at fertilization. *Nucleic Acids Res.* 2013, 41:4104–17.
- Sergeant N, Bretteville A, Hamdane M, Caillet-Boudin M-L, Grognet P, Bombois S, *et al.* Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev Proteomics.* 2008, 5:207–24.
- Sergeant N, Bussière T, Vermersch P, Lejeune JP, Delacourte A. Isoelectric point differentiates PHF-tau from biopsy-derived human brain tau proteins. *NeuroReport.* 1995, 6.
- Shao X, Murthy S, Demetrick DJ, van der Hoorn FA. Human outer dense fiber gene, ODF2, localizes to chromosome 9q34. *Cytogenet Genome Res.* 1998, 83:221–3.
- Shapiro BM, Schackmann RW, Tombes RM, Kazazoglou T. Coupled ionic and enzymatic regulation of sperm behaviour. *Curr Top Cell Regul.* 1985, 26:97-113.
- Sharma R, Agarwal A, Mohanty G, Hamada AJ, Gopalan B, Willard B, *et al.* Proteomic analysis of human spermatozoa proteins with oxidative stress. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013, 11:48.
- Shen S, Wang J, Liang J, He D. Comparative proteomic study between human normal motility sperm and idiopathic asthenozoospermia. *World J Urol.* 2013, 31:1395–401.
- Shetty J, Diekman AB, Jayes FC, Sherman NE, Naaby-Hansen S, Flickinger CJ, *et al.* Differential extraction and enrichment of human sperm surface proteins in a proteome: identification of immunocontraceptive candidates. *Electrophoresis.* 2001, 22:3053-3066.
- Shivaji S, Kota V, Siva AB. The role of mitochondrial proteins in sperm capacitation. *J Reprod Immunol.* 2009, 83:14–8.
- Sigala J, Jumeau F, Caillet-Boudin M-L, Sergeant N, Ballot C, Rigot J-M, *et al.* Immunodetection of Tau microtubule-associated protein in human sperm and testis. *Asian J Androl.* 2014, 16:927-8.
- Simon L, Castillo J, Oliva R, Lewis SEM. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod Biomed Online.* 2011, 23:724–34.
- Siva AB, Kameshwari DB, Singh V, Pavani K, Sundaram CS, Rangaraj N, *et al.* Proteomics-based study on asthenozoospermia: differential expression of proteasome alpha complex. *Mol Hum Reprod.* 2010, 16:452–62.
- Skerget S, Rosenow M, Polpitiya A, Petritis K, Dorus S, Karr TL. The rhesus macaque (*Macaca mulatta*) sperm proteome. *Mol Cell Proteomics* 2013;12(11):3052-67.
- Sontag E. Molecular Interactions among Protein Phosphatase 2A, Tau, and Microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies.. *J Biol Chem.* 1999, 274:25490–8.

- Sousa AP, Amaral A, Baptista M, Tavares R, Caballero Campo P, Caballero Peregrín P, *et al.* Not All Sperm Are Equal: Functional Mitochondria Characterize a Subpopulation of Human Sperm with Better Fertilization Potential. Clarke H, editor. PLoS One. 2011, 6:e18112.
- Sperry AO. The dynamic cytoskeleton of the developing male germ cell. Biol Cell. 2012, 104:297–305.
- Sun G, Jiang M, Zhou T, Guo Y, Cui Y, Guo X, *et al.* Insights into the lysine acetylproteome of human sperm. J Proteomics. 2014, 109:199–211.

T

- Tamowski S, Aston KI, Carrell DT. The Use of Transgenic Mouse Models in the Study of Male Infertility. Syst Biol Reprod Med. 2010, 56:260–73.
- Tang EI, Mruk DD, Cheng CY. MAP/microtubule affinity-regulating kinases, microtubule dynamics, and spermatogenesis. J Endocrinol. 2013, 217:R13–23.
- Tarlatzis BC, Fauser BC, Kolibianakis EM, Diedrich K, Devroey P, On Behalf of the Brussels GnRH Antagonist Consensus Workshop Group. GnRH antagonists in ovarian stimulation for IVF. Hum Reprod Update. 2006, 12:333–40.
- Tassan J-P, Le Goff X. An overview of the KIN1/PAR-1/MARK kinase family. Biol Cell. 2004, 96:193–9.
- Testart J, Frydman R. Minimum time lapse between luteinizing hormone surge or human chorionic gonadotropin administration and follicular rupture. Fertil Steril. 1982, 37:50–3.
- Thacker S, Yadav SP, Sharma RK, Kashou A, Willard B, Zhang D, *et al.* Evaluation of Sperm Proteins in Infertile Men: A Proteomic Approach. Fertil Steril. 2011, 95:2745–8.
- Thompson A, Schäfer J, Kuhn K, Kienle S, Schwarz J, Schmidt G, *et al.* Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein Mixtures by MS/MS. Anal Chem. 2003, 75:1895–904.
- Torregrosa N. Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. Hum Reprod. 2006, 2:2084–9.
- Tosti E, Ménézo Y. Gamete activation: basic knowledge and clinical applications. Hum Reprod Update. 2016, 22:420–39.
- Travis AJ, Foster JA, Rosenbaum NA, Visconti PE, Gerton GL, Kopf GS, *et al.* Targeting of a Germ Cell-specific Type 1 Hexokinase Lacking a Porin-binding Domain to the Mitochondria as Well as to the Head and Fibrous Sheath of Murine Spermatozoa. D. Fox T, editor. Mol Biol Cell. 1998, 9:263–76.
- Turner RM, Casas-Dolz R, Schlingmann KL, Hameed S. Characterization of an A-kinase anchor protein in equine spermatozoa and examination of the effect of semen cooling and cryopreservation on the binding of that protein to the regulatory subunit of protein kinase-A. Am J Vet Res. 2005, 66:1056–64.
- Turner RM. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. Reprod Fertil Dev. 2006, 18:25–38.

- Turner RM, Johnson LR, Haig-Ladewig L, Gerton GL, Moss SB. An X-linked Gene Encodes a Major Human Sperm Fibrous Sheath Protein, hAKAP82 genomic organization, protein kinase A-RII binding, and distribution of the precursor in the sperm tail. *J Biol Chem.* 1998, 273:32135–32141.
- Turner RM, Musse MP, Mandal A, Klotz KEN, Jayes FC, Herr JC, *et al.* Molecular genetic analysis of two human sperm fibrous sheath proteins, AKAP4 and AKAP3, in men with dysplasia of the fibrous sheath. *J Androl.* 2001, 22:302–315.
- Turner RMO, Eriksson RLM, Gerton GL, Moss SB. Relationship between sperm motility and the processing and tyrosine phosphorylation of two human sperm fibrous sheath proteins, pro-hAKAP82 and hAKAP82. *Mol Hum Reprod.* 1999, 5:816–24.
- Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. 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, 13:1429–36.

V

- Van Blerkom J, Davis P, Merriam J, Sinclair J. Nuclear and cytoplasmic dynamics of sperm penetration, pronuclear formation and microtubule organization during fertilization and early preimplantation development in the human. *Hum Reprod Update.* 1995, 1:429–447.
- Van der Jeugd A, Blum D, Raison S, Eddarkaoui S, Buée L, D'Hooge R. Observations in THY-Tau22 mice that resemble behavioral and psychological signs and symptoms of dementia. *Behav Brain Res.* 2013, 242:34–9.
- Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smits J, *et al.* High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1993, 8:1061–1066.
- Vanier MT, Neuville P, Michalik L, Launay J-F. Expression of specific tau exons in normal and tumoral pancreatic acinar cells. *J Cell Sci.* 1998, 111:1419–1432.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutellingsperger C. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 1995, 184:39–51.
- Vigodner M, Shrivastava V, Gutstein LE, Schneider J, Nieves E, Goldstein M, *et al.* Localization and identification of sumoylated proteins in human sperm: excessive sumoylation is a marker of defective spermatozoa. *Hum Reprod.* 2013, 28:210–23.
- Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman AB. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol.* 2002, 53:133–150.

W

- Walczak CE, Heald R. Mechanisms of Mitotic Spindle Assembly and Function. In: Kwang W. Jeon, editor. *Int Rev Cytol* . Academic Press; 2008. p. 111–58.

- Wang G, Guo Y, Zhou T, Shi X, Yu J, Yang Y, *et al.* In-depth proteomic analysis of the human sperm reveals complex protein compositions. *J Proteomics*. 2013a, 79:114–22.
- Wang G, Wu Y, Zhou T, Guo Y, Zheng B, Wang J, *et al.* Mapping of the N-Linked Glycoproteome of Human Spermatozoa. *J Proteome Res*. 2013b, 12:5750–9.
- Wang S, Wang W, Xu Y, Tang M, Fang J, Sun H, *et al.* Proteomic characteristics of human sperm cryopreservation. *Proteomics*. 2014, 14:298–310.
- Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod*. 1991, 44:569–74.
- Wasbrough ER, Dorus S, Hester S, Howard-Murkin J, Lilley K, Wilkin E, *et al.* The *Drosophila melanogaster* sperm proteome-II (DmSP-II). *J Proteomics*. 2010,73:2171-85.
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo S-Y, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci*. 1975, 72:1858–1862.
- Welch JE, Swinnen JV, O'Brien DA, Eddy EM, Conti M. Unique adenosine 3',5' cyclic monophosphate phosphodiesterase messenger ribonucleic acids in rat spermatogenic cells: evidence for differential gene expression during spermatogenesis. *Biol Reprod*. 1992, 46:1027–33.
- Wennemuth G, Meinhardt A, Mallidis C, Albrecht M, Krause W, Renneberg H, *et al.* Assessment of fibronectin as a potential new clinical tool in andrology. *Andrologia*. 2001, 33:43–6.
- Westbrook VA, Schoppee PD, Vanage GR, Klotz KL, Diekman AB, Flickinger CJ, *et al.* Hominoid-specific SPANXA/D genes demonstrate differential expression in individuals and protein localization to a distinct nuclear envelope domain during spermatid morphogenesis. *Mol Hum Reprod*. 2006, 12:703–16.
- World Health Organization Task Force Investigators. Temporal relationships between ovulation and defined changes in the concentration of plasma estradiol-17 beta, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and progesterone. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1980, 138:382–90.
- World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010.
- Wykes SM, Krawetz SA. The Structural Organization of Sperm Chromatin. *J Biol Chem*. 2003, 278:29471–7.

X

- Xu W, Hu H, Wang Z, Chen X, Yang F, Zhu Z, *et al.* Proteomic characteristics of spermatozoa in normozoospermic patients with infertility. *J Proteomics*. 2012, 75:5426–36.

Y

- de Yebra L, Ballecà JL, Vanrell JA, Bassas L, Oliva R. Complete selective absence of protamine P2 in humans. *J Biol Chem*. 1993, 268:10553-10557.

- de Yebra L, Ballezá J-L, Vanrell JA, Corzett M, Balhorn R, Oliva R. Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels. *Fertil Steril*. 1998, 69:755–759.
- Yeung CH, Majumder GC, Rolf C, Behre HM, Cooper TG. The role of phosphocreatine kinase in the motility of human spermatozoa supported by different metabolic substrates. *Mol Hum Reprod*. 1996, 2:591–6.
- Yin L, Chung CM, Huo R, Liu H, Zhou C, Xu W, *et al*. A sperm GPI-anchored protein elicits sperm-cumulus cross-talk leading to the acrosome reaction. *Cell Mol Life Sci*. 2009, 66:900–8.
- Yoshii T, Kuji N, Komatsu S, Iwahashi K, Tanaka Y, Yoshida H, *et al*. Fine resolution of human sperm nucleoproteins by two-dimensional electrophoresis. *Mol Hum Reprod*. 2005, 11:677–681.
- Yudin AI, Vandervoort CA, Li MW, Overstreet JW. PH-20 but not acrosin is involved in sperm penetration of the macaque zona pellucida. *Mol. Reprod. Dev*. 1999, 53:350–362.

Z

- Zahn A, Furlong LI, Biancotti JC, Ghiringhelli PD, Marín-Briggiler CI, Vazquez-Levin MH. Evaluation of the proacrosin/acrosin system and its mechanism of activation in human sperm extracts. *J Reprod Immunol*. 2002, 54:43–63.
- Zhao C, Guo X-J, Shi Z-H, Wang F-Q, Huang X-Y, Huo R, *et al*. Role of translation by mitochondrial-type ribosomes during sperm capacitation: An analysis based on a proteomic approach. *Proteomics*. 2009, 9:1385–99.
- Zhao C, Huo R, Wang F-Q, Lin M, Zhou Z-M, Sha J-H. Identification of several proteins involved in regulation of sperm motility by proteomic analysis. *Fertil Steril*. 2007, 87:436–8.
- Zhou T, Wang G, Chen M, Zhang M, Guo Y, Yu C, *et al*. Comparative analysis of macaque and human sperm proteomes: insights into sperm competition. *Proteomics* 2015,15:1564-73.
- Zhu Y, Wu Y, Jin K, Lu H, Liu F, Guo Y. Differential proteomic profiling in human spermatozoa that did or did not result in pregnancy via IVF and AID. *Proteomics Clin Appl* 2013, 7:850-8.
- Zikopoulos K, Kaponis A, Adonakis G, Sotiriadis A, Kalantaridou S, Georgiou I, *et al*. A prospective randomized study comparing gonadotropin-releasing hormone agonists or gonadotropin-releasing hormone antagonists in couples with unexplained infertility and/or mild oligozoospermia. *Fertil Steril*. 2005, 83:1354–62.
- Zylbersztejn DS, Andreoni C, Del Giudice PT, Spaine DM, Borsari L, Souza GHMF, *et al*. Proteomic analysis of seminal plasma in adolescents with and without varicocele. *Fertil Steril*. 2013, 99:92–8.

ANNEXES

CURRICULUM VITAE

Julien SIGALA, né le **20 mars 1982** à Perpignan.

Biologiste, spécialité **Biologie de la Reproduction**.

Pacsé.

Adresse personnelle : 175 rue des pierres, 59229

Téteghem

Téléphone : 06 84 95 49 09 ; 03 61 17 72 67

Courriels : julien.sigala@yahoo.fr ; j.sigala@ch-calais.fr



DIPLÔMES

- ✓ 2015 **Concours national de Praticien** des établissements publics de santé, Paris.
- ✓ 2013 **DU d'Andrologie**, Université Lille 2.
- ✓ 2013 **Master 2 Recherche**, Sciences, Technologies, Santé, Mention Santé, spécialité Biologie-Santé, Université Lille 2.
- ✓ 2011 **Diplôme d'Etudes Spécialisées** de Biologie Médicale, Université de Besançon.
- ✓ 2010 **Master 2 Professionnel**, Sciences de la Vie et de la Santé, spécialité Biologie de la Reproduction humaine et Assistance Médicale à la Procréation, Université de Paris 5.
- ✓ 2009 **DIU de Biologie appliquée à la Procréation**, Nord-Est, Université de Besançon.
- ✓ 2007 **Doctorat en Pharmacie** : Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier 1.
- ✓ 2005 **Master 1**, Biologie moléculaire. Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier 1.

EXPERIENCE

PROFESSIONNELLE

- ✓ Depuis novembre 2015 **Praticien Hospitalier**, Service d'Assistance Médicale à la Procréation, CH de Calais.
- ✓ 2011-2015 **Assistant Hospitalo-Universitaire**, Institut de Biologie de la Reproduction-Spermiologie-CECOS, CHRU Lille.
- ✓ 2007-2011 **Interne de Biologie Médicale**, spécialité **Biologie de la Reproduction**, CHU Besançon.

ACTIVITE HOSPITALIERE
CH de Calais
depuis novembre 2015

1- Activité de routine d'Assistance Médicale à la Procréation : seul Biologiste temps-plein.

Centre d'AMP assurant environ 300 ponctions/an, 300 IIU/an, proposant les techniques de FIV-conventionnelle, d'ICSI, de culture prolongée, de

	<p>culture embryonnaire par système time-lapse, de vitrification.</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Participation aux techniques d'AMP journalières. ✓ Gestion des dossiers médicaux des tentatives d'AMP. ✓ Validation des dossiers biologiques. ✓ Consultations pré-FIV/ICSI. ✓ Utilisation du logiciel Medifirst (gestion/traitement des données d'AMP cliniques, biologiques, statistiques par tableau de bord). ✓ Participation aux staffs de suivi de stimulation, de transfert, aux commissions multi-disciplinaires clinico-biologiques, aux réunions d'informations des couples. ✓ Rapport d'activité annuel pour l'ABM. ✓ Faisant fonction de Cadre. <p><u>2. Participation à la mise en place de la qualité dans la démarche d'Accréditation du COFRAC :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Utilisation du logiciel Kalilab. ✓ Rédaction et application des procédures qualités. ✓ Mise en place et rédaction des dossiers de vérification de méthode : Spermologie et Embryologie. ✓ Responsable de la mise en place et de l'évaluation des CQI et EEQ: Spermologie et Embryologie. ✓ Réunion qualité hebdomadaire. ✓ Participation aux Audits à blanc : externe (octobre 2015) et interne (mai et juin 2016). ✓ Responsable lors de l'Audit par le COFRAC pour une accréditation initiale du centre : les 20-21-22 juin 2016.
<p>ACTIVITE HOSPITALIERE CHRU de Lille 2011-2015</p>	<p><u>1. Activité de routine d'Assistance Médicale à la Procréation :</u></p> <p>Centre d'AMP assurant >1000 ponctions/an, >700 IIU/an, proposant les techniques de FIV-conventionnelle, d'ICSI, d'IMSI, de culture prolongée, de congélation embryonnaire, de vitrification (ovocyte/blastocyste), de don de sperme et d'ovocytes, d'accueil d'embryons, d'extraction des spermatozoïdes testiculaires ou épидидymaires et de préservation de la fertilité féminine et masculine (gamètes et tissus).</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Gestion des dossiers médicaux des tentatives d'AMP. ✓ Participation aux techniques d'AMP journalières. ✓ Validation des dossiers biologiques. ✓ Consultations pré-FIV/ICSI, spermologiques et CECOS. ✓ Utilisation du logiciel Infofiv (gestion/traitement des données d'AMP cliniques, biologiques et statistiques). ✓ Participation aux staffs de suivi de stimulation, de transfert, aux commissions multi-disciplinaires clinico-biologiques, aux réunions d'informations des couples et aux sessions bibliographiques

clinico-biologiques (bi-mensuelles).

- ✓ **Formation** (théorie/pratique) et **encadrement** (mémoire de DES, Master 2 professionnel) hospitalo-universitaire des internes.
- ✓ Participation aux **astreintes** de week-end.
- ✓ Mise en place de **nouvelles technologies** (vitrification, time-lapse) et aide au perfectionnement de celles déjà pratiquées en routine.

2. Projets de Recherche Clinique ou d'études :

- ✓ **Essais industriels** suivants :
 - **Co-investigateur** : *ESTHER (Evidence-based Stimulation Trial with Human rFSH in Europe and Rest of World 1) : a randomized, controlled, assessor-blind, parallel groups, multicentre, multinational, phase III trial comparing the efficacy and safety of FE 999049 with follitropin alfa (Gonal-F), in controlled ovarian stimulation in women undergoing an assisted reproductive technology programme. Ferring Pharmaceuticals. 2014-2015.*
- ✓ **Investigateur** du dossier de **Budget de Programme d'Innovation** (BPI) pour la campagne 2015-2016 : acquisition d'un système time-lapse Embryoscope™.
- ✓ **Investigateur** de l'**appel d'offre** « Aide à l'émergence » (AAPAE), GIRCI Nord-Ouest 2015.
- ✓ **Travaux de Recherche Clinique** sur les thématiques suivantes :
 - *Qualité ovocytaire chez les patientes présentant des ovaires polykystiques.*
 - *Qualité du développement embryonnaire précoce et des techniques de cryoconservation par vitrification.*

3. Participation à la mise en place de la qualité dans la démarche d'Accréditation du COFRAC :

- ✓ **Validation de méthode** : numération spermatique par cellule KOVA, mesure du volume spermatique par pesée.
- ✓ **Participation** à la rédaction et à l'application des **procédures qualités**.
- ✓ Mise en place de **CQI** : Embryologie.

ACTIVITE UNIVERSITAIRE
Faculté de Médecine,

Enseignements Magistraux : (8h).
Histologie : Embryologie de l'appareil génital féminin ; Histologie des

<p>Université de Lille 2011-2016</p> <p>Faculté de Pharmacie, Université de Besançon 2011</p> <p>Facultés de Pharmacie, Université de Besançon Université de Montpellier 1 2009-2015</p>	<p>voies génitales féminines ; Embryologie et Histologie des voies urinaires ; Traitement des troubles de l'infertilité : versant masculin.</p> <p><u>Enseignements Master 1</u> : (21h). Médecine et Biologie de la Reproduction : Les techniques d'Assistance Médicale à la Procréation ; Développement embryonnaire précoce ; Biomarqueurs de la fertilité masculine : nouvelles technologies et applications ; Risques épigénétique en AMP.</p> <p><u>Enseignements Dirigés</u> : (147h). Histologie : Appareil génital masculin ; Appareil génital féminin ; Glandes endocrines ; Epithélium, tissu conjonctif, tissus osseux, tissus nerveux, vaisseaux ; Appareil digestif, gustation ; Appareil respiratoire, olfaction ; Appareil urinaire ; Peau et annexes ; Organes nerveux, oeil.</p> <p><u>Surveillance et corrections d'examens</u> : (47h et 52h). PACES, MED 2, MED 3, MED 4, MED 5, DCEM 4, CSCT (MED 4).</p> <p><u>Conférences</u> : (6h) UE « Préparation à l'internat » : Immunologie biologique et clinique.</p> <p><u>Travaux Pratiques</u> : (3h). Biologie cellulaire et génétique.</p> <p><u>Jury de Thèse</u> : Membre de jury dans le cadre de 4 Thèses d'exercice en Pharmacie.</p>
<p>RECHERCHE UNIVERSITAIRE 2011-2016</p>	<p><u>Thématique de Recherche fondamentale</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Master 2 Recherche : <i>Protéine et transcrits tau au cours de la spermatogenèse.</i> ✓ Thèse d'Université : <i>Qualité du protéome du spermatozoïde humain et infertilité.</i> <p><u>Labellisation de la Recherche</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Equipe d'accueil en réseau Rouen-Lille EA 4308 Gamétogenèse et qualité du gamète dirigée conjointement par le Pr Nathalie Rives et le Dr Valérie Mitchell. ✓ Collaboration avec le Dr Nicolas Sergeant du Jean-Pierre Aubert Research Center (JP Arc) à Lille, équipe « <i>Alzheimer et Tauopathies</i> », UMR-S 1172, dirigée par le Dr Luc Buée. <p><u>Brevet d'invention</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Brevet Inserm-transfert : <i>Composition et méthode d'un test diagnostique du risque d'infertilité chez l'homme. Human Sperm</i>

Proteome Quality Index (S.P.Q.I.): a new marker to be considered with sperm parameters. N°BIO13168-Sergeant/AN.

COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

Avec Comité de lecture
Total SIGAPS : 85 points

- ✓ Barbotin AL, Ballot C, **Sigala J**, Leroy M, Rigot JM, Dewailly D, Robin G, Mitchell V. Pregnancy after ICSI following extended sperm preparation and hormone therapy in an azoospermic man with maturation arrest: a case report and literature review. *Accepté avec revisions mineures. Andrologia* 2016. (catégorie D, points SIGAPS : 6).
- ✓ Barbotin AL, Ballot C, **Sigala J**, Ramdane N, Duhamel A, Marcelli F, Rigot JM, Dewailly D, Pigny P, Mitchell V. The serum inhibin B concentration and reference ranges in normozoospermia. *Eur J Endocrinol.* 2015 Jun ;172:669-676. (catégorie C, points SIGAPS : 12).
- ✓ **Sigala J**, Jumeau F, Buée L, Sergeant N, Mitchell V. La protéine microtubulaire Tau testiculaire : une place dans la spermatogenèse? *Morphology*, 2015 Apr;99,141-148. (catégorie NC, points SIGAPS : 4).
- ✓ **Sigala J**, Sifer C, Dewailly D, Robin G, Bruyneel A, Ramdane N, Lefebvre-Khalil V, Mitchell V, Decanter C. Is the polycystic ovarian morphology (PCOM) related to a poor oocyte quality after controlled ovarian hyperstimulation (COH) for ICSI? Results from a prospective comparative study. *Fertil Steril.* 2015 Jan;103(1):112-8. (catégorie A, points SIGAPS : 32).
- ✓ **Sigala J**, Jumeau F, Caillet-Boudin ML, Sergeant N, Ballot C, Tardivel M, Rigot JM, Marcelli F, Buée L & Mitchell V. Immunoexpression of tau in human sperm and testis. *Asian J Androl.* 2014 Nov-Dec;16(6):927-8. (catégorie C, points SIGAPS : 16).
- ✓ Mitchell V, **Sigala J**, Ballot C, Jumeau F, Barbotin AL, Duhamel A, Rives N, Rigot JM, Escalier D, Peers MC. Light microscopy morphological characteristics of the sperm flagellum may be related to axonemal abnormalities. *Andrologia* 2014 Feb, xx, 1-7. (catégorie D, points SIGAPS : 9).
- ✓ Mitchell V, **Sigala J**, Jumeau F, Ballot C, Peers MC, Decanter C, Rives N, Perdrix A, Rigot JM, Escalier D. ICSI treatment in severe asthenozoospermia. *Gynecol Obstet Fertil.* 2012 Dec;40(12):776-9. (catégorie E, points SIGAPS : 6)

COMMUNICATIONS ORALES	<ul style="list-style-type: none"> ✓ <i>Protocoles agonistes versus antagonistes : étude d'un cas.</i> Soirée de formation Merck-Serono, Lille, septembre 2016. ✓ <i>IMSI : doit-on encore y croire ?</i> Club des Jeunes Fivistes du Nord-Pas-de-Calais-Picardie-Champagne-Ardennes. St Quentin, juillet 2015. ✓ <i>Microtubule-associated protein Tau et ARN messagers : expression dans le testicule et le spermatozoïde humain.</i> Congrès du Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénéticiens. Amiens, mars 2014. ✓ <i>Spécialisations de niveau 2 : Biologie de la Reproduction.</i> Assemblée Générale nationale des Internes en Pharmacie et Biologie Médicale. Lille, mars 2012.
COMMUNICATIONS AFFICHEES	Nombre de communications affichées libres à des congrès : 12
REVIEWING	Nombre de reviewings pour le mensuel scientifique Gynécologie, Obstétrique & Fertilité : 3 (2015, 2016, 2016)

FORMATION MEDICALE CONTINUE

CONGRES	<ul style="list-style-type: none"> ✓ European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) : 2016 (<i>Helsinki</i>). ✓ Fédération Française d'Etude de la Reproduction (FFER) : 2015 (<i>Montpellier</i>). ✓ Société d'Andrologie de Langue Française (SALF) : 2014 (<i>Marseille</i>), 2015 (<i>Dijon</i>). ✓ Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénéticiens (CHEC) : 2014 (<i>Amiens</i>), 2015 (<i>Paris</i>). ✓ COOK Medical, <ul style="list-style-type: none"> ○ Hands-On Training Workshop with Kristin Lietz : 2016 (<i>Vienne, Autriche</i>). ○ Journée sur les milieux de culture en AMP : 2016 (<i>Paris</i>). ✓ MSD Fertilité, Journée Scientifique : 2016 (<i>Paris</i>).
----------------	---

	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Merck Serono, <ul style="list-style-type: none"> ○ Protocoles agonistes versus antagonistes : 2016 (<i>Lille</i>). ○ Ateliers Qualité et Performance : 2016 (<i>Paris</i>). ○ Sharing european practices in ART : overview and visions of future : 2016 (<i>Paris</i>). ○ Présentation du système time-lapse <i>Eeva™</i> : 2015 (<i>Paris</i>). ○ Journée Médecine et Biologie de la Reproduction (MBR) : 2012, 2013, 2014 (<i>Paris</i>). ○ Club des Jeunes Fivistes du Nord-Pas-de-Calais-Picardie-Champagne-Ardenne : 2013 (<i>Lesquin</i>), 2014 (<i>St Quentin</i>), 2015 (<i>St Quentin</i>). ✓ Participation à la journée de renouvellement de l'EA 4308 par le comité d'expert du HCERES. 2015 (<i>Rouen</i>). ✓ Vitrolife, Présentation du système time-lapse <i>Embryoscope®</i> : 2015 (<i>Paris</i>). ✓ FERRING Today : 2012 (<i>Paris</i>), 2013 (<i>Monaco</i>).
<p>FORMATIONS</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Formation vitrification ovocytaire et embryonnaire. Formation et partage d'expérience avec le Dr K. Pocate de l'Hôpital Cochin. CH de Calais. Octobre 2016. ✓ Formation sur l'utilisation du tableau de bord du logiciel Médifirst par le Dr P. Arvis, CH de Calais. Octobre 2016. ✓ Formations Qualité : <ul style="list-style-type: none"> ○ Viskali ACC. 1 jour portant sur la gestion des Processus. CH de Calais. Octobre 2016. ○ AFNOR. 2 jours portant sur la norme 15189 : CHRU de Lille. Juin 2016. ○ AFNOR de 1 jour portant sur les « indicateurs qualité » : CHRU de Lille. Mai 2016. ✓ Pré-CNU : sous-section 4202. Juin 2012 et mars 2015. ✓ « Formation des jeunes à la pédagogie » : présentation d'une coupe d'ovaire selon la méthodologie des lames virtuelles. Congrès du Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénéticiens. Mars 2015. ✓ Séminaire pédagogique, présentation d'un cours de type CNU : Le tractus génital féminin. Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénéticiens. Octobre 2014.

- ✓ « **Formation des jeunes à la pédagogie** » : présentation d'une coupe de **testicule** selon la méthodologie des lames virtuelles. Congrès du Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénéticiens. Mars 2014.
- ✓ **Formation pratique** sur la **vitrification** : *Vitrification System Hands-On Workshop Training Program*. Irvine Scientific. 2011.
- ✓ Module **Organisation, Gestion et Droit**. Inter Région Nord-Est, CHU Strasbourg. Septembre 2011.

SOCIETES SAVANTES

- ✓ **Membre** de la *Société d'Andrologie de Langue Française SALF*. 2014-2016.
- ✓ **Membre** des *Biologistes des Laboratoires d'Etudes de la Fécondation et de la Conservation de l'Oeuf BLEFCO*. 2014-2016.
- ✓ **Membre** du *Collège des Histologistes-Embryologistes-Cytogénéticiens CHEC*. 2014-2015.

MISSIONS D'INTERET COLLECTIF

- ✓ **Membre** de l'Association des Chefs de Clinique et Assistants de Lille. 2011-2015.
- ✓ Ancien **trésorier** du Syndicat des Internes en Pharmacie de Franche-Comté. 2011.
- ✓ Ancien **vice-président** du Syndicat des Internes en Pharmacie de Franche-Comté. 2010.
- ✓ Ancien **représentant des internes** en Biologie Médicale de Franche-Comté. 2008- 2010.
- ✓ **Membre** du Syndicat des Jeunes Biologistes Médicaux **SJBM**. 2009-2016.
- ✓ Ancien **vice-président** de l'association des internes en Médecine et chefs de cliniques des CHRU de Franche-Comté. 2007-2009.

ACTIVITE LIBERALE

- ✓ 2012 Remplacements en laboratoires de Biologie Médicale polyvalents.
 - Laboratoire BioFlandres, Annoeulin (*Nord-Pas-de-Calais*) ;
 - Laboratoire Lemmens, Raimés (*Nord-Pas-de-Calais*).
- ✓ 2010-2011 Remplacements en laboratoires de Biologie Médicale polyvalents.
 - Laboratoire du Dr Mougins, Besançon (*Franche-Comté*) ;
 - Laboratoire du Dr Coulon, Salins-les-bains (*Franche-Comté*).

PUBLICATIONS 2013-2016

Publications dans des revues en Anglais avec comité de lecture

1. Barbotin AL, Ballot C, **Sigala J**, Leroy M, Rigot JM, Dewailly D, Robin G, Mitchell V. Pregnancy after ICSI following extended sperm preparation and hormone therapy in an azoospermic man with maturation arrest: a case report and literature review. *Andrologia* 2016 Jul.
2. **Sigala J**, Barbotin AL, Keller L, Delforge-Dandre P, Deken V, Leroy-Martin B, Decanter C, Mitchell V. Systematic rescue policy of poor quality D2-3 embryo by extended culture and further blastocyst vitrification: a prospective study enlisting 2455 embryos from 736 IVF. *En préparation*.
3. Barbotin AL, Ballot C, **Sigala J**, Ramdane N, Duhamel A, Marcelli F, Rigot JM, Dewailly D, Pigny P, Mitchell V. The serum inhibin B concentration and reference ranges in normozoospermia. *Eur J Endocrinol*. 2015 Jun;172:669-676.
4. **Sigala J**, Sifer C, Dewailly D, Robin G, Bruyneel A, Ramdane N, Lefebvre-Khalil V, Mitchell V, Decanter C. Is the polycystic ovarian morphology (PCOM) related to a poor oocyte quality after controlled ovarian hyperstimulation (COH) for ICSI? Results from a prospective comparative study. *Fertil Steril*. 2015 Jan;103:112-8.
5. **Sigala J**, Jumeau F, Caillet-Boudin ML, Sergeant N, Ballot C, Tardivel M, Rigot JM, Marcelli F, Buée L & Mitchell V. Immunoexpression of tau in human sperm and testis. *Asian J Androl*. 2014 Nov-Dec;16(6):927-8.
6. Mitchell V, **Sigala J**, Ballot C, Jumeau F, Barbotin AL, Duhamel A, Rives N, Rigot JM, Escalier D, Peers MC. Light microscopy morphological characteristics of the sperm flagellum may be related to axonemal abnormalities. *Andrologia* 2014 Feb, xx, 1-7.

Publications dans des revues en Français avec comité de lecture

7. **Sigala J**, Jumeau F, Buée L, Sergeant N, Mitchell V. La protéine microtubulaire Tau testiculaire : une place dans la spermatogenèse? *Morphology*, 2015 Apr;99,141-148.

COMMUNICATIONS ORALES 2013-2016

1. **Sigala J***, Petit E*. Fragmentation embryonnaire et échecs répétés en FIV : étude d'un cas. Soirée scientifique Merck-Serono : agonistes versus antagonistes dans la stimulation ovarienne. *Le 27 septembre 2016. Lille.*
* *Présentation commune clinico-biologique.*
2. **Sigala J.** IMSI : doit-on encore y croire ? Club des Jeunes Fivistes du Nord-Pas-de-Calais-Picardie-Champagne-Ardenne. *Le 3 juillet 2015. St Quentin.*
3. **Sigala J,** Maurage CA. Coupe d'ovaire selon la méthodologie des lames virtuelles. « Formation des jeunes à la pédagogie ». Congrès du Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénétiens. *Les 20, 21 et 22 mars 2015. Paris.*
4. **Sigala J,** Maurage CA. Coupe de testicule selon la méthodologie des lames virtuelles. « Formation des jeunes à la pédagogie ». Congrès du Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénétiens. *Les 20, 21 et 22 mars 2014. Amiens.*
5. **Sigala J,** Jumeau F, Ballot C, Carpentier C, Fernandez-Gomez F, Violet M, Sergeant N, Caillet-Boudin ML, Rigot JM, Marcelli F, Buée L, Mitchell V. Microtubule-associated protein Tau et ARN messagers : expression dans le testicule et le spermatozoïde humain. Congrès du Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénétiens. *Les 20, 21 et 22 mars 2014. Amiens.*

COMMUNICATIONS AFFICHÉES 2013-2016

1. **Sigala J**, Delforge-Dandre P, Barbotin A.L, Keller L, Decanter C, Mitchell V. Politique de sauvetage systématique des “poor quality” embryons (PQE) J2-J3 par la culture prolongée et la vitrification au stade blastocyste. *Fédération Française de l'Etude de la Reproduction. Les 24, 25 et 26 septembre 2015. Montpellier.*
2. Barbotin A.L, Robin G, **Sigala J**, Marcelli F, Rigot JM, Mitchell V. Intérêt du traitement hormonal dans les azoospermies avec arrêt de maturation : à propos d'un cas. *Fédération Française de l'Etude de la Reproduction. Les 24, 25 et 26 septembre 2015. Montpellier.*
3. **Sigala J**, Jumeau F, Barbotin A.L, Keller L, Buée L, Sergeant N & Mitchell V. Evaluation of a sperm biomarker for predictive diagnosis of male fertility. *15ème journée André Verbert. Le 14 septembre 2015. Lille.*
4. **Sigala J**, Jumeau F, Ballot C, Carpentier C, Fernandez-Gomez F, Violet M, Sergeant N, Caillet-Boudin ML, Rigot JM, Marcelli F, Buée L, Mitchell V. Microtubule-associated protein Tau et ARN messagers : expression dans le testicule et le spermatozoïde humain. *Société d'Andrologie de Langue Française. Les 28, 29 et 30 janvier 2015. Dijon.*
5. **Sigala J**, Jumeau F, Ballot C, Carpentier C, Fernandez-Gomez F, Violet M, Sergeant N, Caillet-Boudin ML, Rigot JM, Marcelli F, Buée L, Mitchell V. Expression de la protéine et des transcrits Tau dans le testicule humain. *Société d'Andrologie de Langue Française. Les 22, 23 et 24 janvier 2014. Marseille.*
6. **Sigala J**, Jumeau F, Ballot C, Carpentier C, Fernandez-Gomez F, Violet M, Sergeant N, Caillet-Boudin ML, Rigot JM, Marcelli F, Buée L, Mitchell V. Microtubule-associated protein Tau et ARN messagers : expression dans le testicule et le spermatozoïde humain. *Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénéticiens. Les 20, 21 et 22 mars 2014. Amiens.*