

## **Impact de la congélation sur la structure tridimensionnelle du noyau spermatique humain: développement d'un nouveau biomarqueur morphométrique de la qualité nucléaire des spermatozoïdes**

Marine Compagnon <sup>1,2</sup>, Tristan Dubos <sup>3</sup>, Sophie Desset <sup>3</sup>, Mélanie Fiot <sup>1</sup>, , Maïssa Andrieux <sup>1</sup>, Gilles Sireta <sup>3</sup>, Bruno Pereira <sup>4</sup>, Christophe Tatout <sup>3</sup>, Brugnon Florence <sup>1,2</sup> et Pons-Rejraji Hanae <sup>1,2</sup>

**Introduction** : Trente à 60% des patients infertiles présenteraient une altération nucléaire. De plus, la cryopréservation affecte fortement l'intégrité des noyaux des spermatozoïdes. Pourtant, la qualité nucléaire des spermatozoïdes n'est jamais analysée dans le bilan d'infertilité masculine de première intention. Ainsi, le développement de marqueurs de la qualité nucléaire spermatique est un enjeu primordial notamment dans le cadre de la préservation de la fertilité. **L'objectif de cette étude est de déterminer l'impact de la congélation lente sur la structure du noyau spermatique. Pour cela nous avons mis au point une nouvelle technique d'analyse morphométrique 3D des noyaux des spermatozoïdes humains.**

**Matériels et méthodes** : Les paramètres spermatiques standards (OMS, 2010), la taille des télomères (qPCR), la fragmentation de l'ADN (TUNEL) et la décondensation de la chromatine (marquage Chromomycine A3), et les analyses morphométrique 3D ont été mesurés sur des reliquats d'éjaculats avant et après leur congélation/décongélation. L'analyse 3D des noyaux a été réalisée à partir d'une image 3D grand champ après marquages iodure de propidium puis DAPI. L'analyse tridimensionnelle a été réalisée à l'aide du logiciel NucleuJ2.0 et a permis de calculer automatiquement le volume, la surface et l'équivalent sphérique du rayon (ESR), l'élongation et l'aplatissement du noyau ainsi que le volume de l'hétérochromatine.

**Résultats** : L'analyse des 10 patients ne montre pas de différence significative entre les spermatozoïdes « frais » et « congelés » pour les 5 paramètres morphologiques globaux du noyau. Toutefois, de fortes variations interindividuelles sont observables pour l'ensemble des paramètres. Une diminution significative du volume d'hétérochromatine est observée après congélation avec une taille d'effet de -0,89,  $p < 0,01$ . La congélation induit également une réduction significative de la vitalité, de la mobilité totale et progressive des spermatozoïdes avec des tailles d'effet respectives de -3,55, -1,72 et -2,87 ( $p < 0,01$ ) et une augmentation significative du pourcentage de spermatozoïdes avec un ADN fragmenté avec une taille d'effet de 1,09 ( $p < 0,05$ ). La taille des télomères spermatiques n'est pas altérée par le cycle de congélation/décongélation. Les paramètres mesurés dans la population générale sont représentatifs des spermatozoïdes vivants, les deux populations se comportant de façon identique quant aux marqueurs morphométriques 3D globaux du noyau et ceux spécifiques à l'hétérochromatine.

**Conclusion** : La congélation lente induit une altération significative du volume d'hétérochromatine mais sans affecter significativement les marqueurs morphométriques 3D globaux du noyau, démontrant l'intérêt de l'analyse de la structure 3D du noyau en tant que marqueur de la qualité des noyaux spermatozoïdes humains.