

# THESE

pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 13

*Discipline : Biologie*

Présentée et soutenue publiquement par

**Charlotte DUPONT**

Le 4 décembre 2013

**Impact de la corpulence masculine et de la nutrition  
maternelle sur les fonctions de reproduction masculine**

**Sous la direction du Professeur Rachel LEVY et du Docteur Pascale  
CHAVATTE-PALMER**

### JURY

<b>Mme le Professeur Nathalie CHABBERT-BUFFET</b>	Rapporteur
<b>M. le Docteur Eric PAILLOUX</b>	Rapporteur
<b>Mme le Professeur Catherine PATRAT</b>	Examineur
<b>Mme le Docteur Aviva DEVAUX</b>	Examineur
<b>M. le Professeur Jean-Noël HUGUES</b>	Examineur
<b>Mme le Professeur Rachel LEVY</b>	Directeur
<b>Mme le Docteur Pascale CHAVATTE-PALMER</b>	Directeur

## Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement le **Professeur Rachel Lévy** pour son soutien constant depuis toutes ces années et pour son optimisme inébranlable. Je la remercie également d'avoir encadré ce travail en qualité de directeur de thèse.

Un très grand merci au **Docteur Pascale Chavatte-Palmer** qui m'a fait découvrir la recherche avec enthousiasme et m'a permis de continuer dans cette voie. Je la remercie également d'avoir encadré ce travail en qualité de directeur de thèse.

J'adresse mes vifs remerciements au **Professeur Nathalie Chabbert-Bufferet** et au **Docteur Eric Pailhoux** pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail et d'avoir consacré une partie de leur temps à la lecture de ce manuscrit.

Je tiens également à remercier le **Professeur Catherine Patrat** pour l'honneur qu'elle me fait en participant à mon jury de thèse et en acceptant à nouveau de juger mon travail.

Je remercie chaleureusement le **Docteur Aviva Devaux** de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury de thèse.

Je remercie sincèrement le **Professeur Jean-Noël Hugues** qui me fait bénéficier tous les jours de son expérience de la médecine de la reproduction et qui a accepté de juger ce travail.

Je souhaite remercier vivement le **Docteur Céline Faure** pour son amitié et son soutien inébranlable. Ce travail n'aurait jamais abouti sans sa présence.

Un grand merci au **Docteur Nathalie Sermondade** qui est à mes côtés depuis le début de cette aventure et dont l'amitié et les encouragements ont été précieux.

Merci à l'équipe ODEEPHA de l'unité BDR de l'INRA. J'adresse des remerciements particuliers au **Docteur Corinne Cotinot** pour m'avoir accueillie dans son unité, ainsi qu'aux **Docteurs Anne Tarrade, Delphine Rousseau, Sylvaine Camous** et **Eve Mourier** et mesdames **Michèle Dahirel** et **Marie-Christine Aubrière**, pour leur aide précieuse lors des

expériences chez les lapins. Mes remerciements vont également à l'équipe UCEA qui prend soin des animaux.

Je remercie **sincèrement Messieurs Marouane Boubaya et Benoit Gaultier** pour leur aide et leur efficacité pour les analyses statistiques.

A toute l'équipe HEC-BDR-CECOS de l'hôpital Jean verdier, recevez mes remerciements les plus chaleureux et ma plus grande reconnaissance. En particulier au **Pr Brigitte Benzacken** pour son accueil dans son service, et aux **Docteurs Eva Pipiras, Andrée Delahaye, Christophe Sifer et Wael Mansour** avec qui je travaille quotidiennement. Un très grand merci à **Mesdames Anne Christine Marty, Peggy Masson, Christelle Quibon, Anne Catherine Rousseau, Sandrine Tranchant, Emilie Visentin et Séverine Wantier** pour leurs encouragements. Je remercie également les techniciens de cytogénétique **Mesdames Véronique Baracat, Evelyne Bellais, Céline Bourillon, Nathalie Laplace, Myriame Séjor et Monsieur Jean Sevestre** pour leur accueil et leur aide pour certaines procédures. Mes remerciements vont aussi aux secrétaires du service, **Mesdames Sabrina Futo, Catherine Santo, Karine Caseiro et Maryline Desse**. Je remercie tous les internes qui se sont succédés depuis trois ans et qui par leur efficacité m'ont libéré du temps pour travailler sur cette thèse : les **Docteurs Laila El Khattabi, Nesrine Hakima, Ilan Heilikman, Laura Alter, Charlène Herbemont, Marine Durand**.

Mes remerciements vont également au **Professeur Serge Hercberg**, et à toute l'équipe de l'UREN dont le dynamisme permet la concrétisation de nos projets.

Je remercie sincèrement le **Docteur Brigitte Martin-Pont** pour ses conseils depuis mes débuts en biologie de la reproduction. Un grand merci au **Professeur Catherine Prost** pour son encadrement dans le cadre des enseignements d'histologie.

Je remercie le **Docteur Betty Dondi** pour son aide et ses conseils expérimentés en cytométrie en flux et le Docteur **Yoann Lalatonne** pour les dosages de testostérone.

Je remercie toute l'équipe de médecine de la reproduction, les **Docteurs Isabelle Cedrin-Durnerin, Michael Grynberg, Clémence Roche, Charlotte Sonigo** ainsi que les infirmières, les secrétaires pour leurs compétences professionnelles et leur expérience, c'est un plaisir de travailler avec eux.

Je remercie les co-auteurs des différents articles, en particulier les **Professeurs Sébastien Czernichow, Jean-Phillipe Wolf, Claudine Junien, Vincent Levy** et les **Docteurs Anne-Gaël Cordier, Patrice Clément, Pascal Briot, Isabelle Berthaut** et **Madame Pauline Léveillé**.

Je remercie **Madame Marie-Jeanne Faure** et le **Docteur Stéphane Chaffaux** pour leur relecture efficace.

Un grand merci au laboratoire pharmaceutique Merck Serono, en particulier à **Madame Stéphanie Pailhé-Joly**, qui par leur sponsor, ont apporté une aide logistique précieuse pour le bon déroulement de ma soutenance de thèse.

Je remercie sincèrement Laila, Audrey, Anne-Gaël, Marie Clémence, Marie-Laure et Achraf que j'ai croisés au cours de mon parcours professionnel et qui sont maintenant des amies très chères ainsi que mes amis depuis longtemps : Christelle, Mathieu, Clément, Laure, Cécile, Emilie.

Je remercie toute ma famille, en particulier,  
**mes parents et mes frères** pour leur soutien et leurs encouragements,  
**Odile et Blaise** pour toutes ces années passées chez eux,  
**mes grands-mères**.

## Résumé

Le surpoids et l'obésité, dont la prévalence augmente régulièrement depuis quelques décennies, ont un impact négatif sur les fonctions de reproduction masculine. De plus, le concept de DOHAD suggère que l'environnement très précoce pourrait programmer à long terme la fertilité d'un individu.

L'objectif de cette thèse est d'évaluer, d'une part, la relation entre l'obésité et les paramètres spermatiques, d'autre part, l'influence de l'environnement maternel et du développement néonatal sur les fonctions de reproduction masculine.

Dans une étude incluant 300 hommes infertiles, nous avons observé un impact négatif de l'obésité sur l'intégrité de l'ADN spermatique. L'obésité abdominale, évaluée par impédancemétrie et mesure du tour de taille, semble également impacter sur la qualité spermatique. Nous n'avons cependant pas observé d'influence du surpoids ou de l'obésité sur la capacité des spermatozoïdes à se fixer à la zone pellucide.

Nous rapportons aussi l'histoire de 6 patients infertiles présentant une obésité abdominale et une augmentation de la fragmentation de l'ADN spermatique. Après quelques mois de prise en charge hygiéno-diététique, une diminution ciblée de l'obésité abdominale et une amélioration de l'intégrité de l'ADN spermatique et du bilan hormonal ont été observées. Les 6 couples ont par la suite obtenu une grossesse et la naissance d'un enfant en bonne santé.

Concernant l'impact de la croissance *in utero* sur les paramètres spermatiques masculins, nous avons observé une corrélation négative entre le poids de naissance et le nombre total de spermatozoïdes, ainsi qu'une corrélation positive entre le poids de naissance et la fragmentation de l'ADN spermatique.

Une étude chez le lapin nous a permis d'observer un impact négatif de l'hyperlipidémie-hypercholestérolémie maternelle sur le poids des testicules et des épидидymes des lapins adultes et sur les concentrations en testostérone, montrant ainsi l'importance de l'alimentation maternelle dans le développement des fonctions de reproduction masculine.

Ces résultats confirment l'importance de la corpulence des hommes dans la prise en charge de l'infertilité. Les effets néfastes de l'obésité, simplement définie par l'IMC, ou de l'obésité abdominale, définie par une augmentation du tour de taille, pourraient être réversibles avec une prise en charge adaptée. L'alimentation de la mère pendant la grossesse semble également être un facteur important pour la programmation de la fertilité à long terme. Ce travail s'inclut dans un large projet, qui prend en compte l'origine multifactorielle de l'infertilité et nécessite une prise en charge multidisciplinaire très précoce du couple.

Table des matières :

<b>Introduction .....</b>	<b>13</b>
<b>Etat des connaissances.....</b>	<b>14</b>
<b><u>Partie 1 : Corpulence et fonctions de reproduction masculine .....</u></b>	<b>14</b>
I. Fonctions de reproduction masculine .....	14
A) Ontogénèse et physiologie testiculaire.....	14
1- Embryologie et développement de l'appareil testiculaire chez l'homme .....	14
2- Histologie et physiologie testiculaire.....	15
B) La fécondation .....	18
1- Capacitation .....	18
2- Réaction acrosomique .....	19
3- Fusion gamétique.....	19
C) Marqueurs biologiques de la fertilité masculine .....	20
1- Spermogramme et spermocytogramme.....	20
2- Examens complémentaires .....	21
D) Infertilité masculine .....	27
1- Définition et épidémiologie.....	27
2- Causes de l'infertilité masculine.....	27
3- Déclin de la qualité spermatique ? .....	28
II. Surpoids, obésité et syndrome métabolique .....	29
A) IMC, surpoids et obésité.....	29
1- Définitions.....	29
2- Epidémiologie.....	29
3- Comorbidités dues au surpoids et à l'obésité.....	30
4- Etiologie.....	30
B) Obésité abdominale et syndrome métabolique .....	31
1- Paramètres anthropométriques .....	31
2- Syndrome métabolique .....	33
3- Le « syndrome de l'obésité à poids normal ».....	35
III. Relation entre paramètres anthropométriques, métabolisme et fertilité.....	35
A) Introduction .....	35
B) IMC et fonctions de reproduction masculine .....	36
1- IMC et fertilité .....	36
2- IMC et paramètres spermatiques.....	36
3- IMC et intégrité de l'ADN du noyau des spermatozoïdes.....	37
4- IMC et capacité fécondante des spermatozoïdes .....	38
5- IMC et assistance médicale à la procréation .....	39
C- Obésité abdominale, syndrome métabolique et fertilité .....	41
1- Obésité abdominale et paramètres spermatiques .....	41
2- Dyslipidémies, syndrome métabolique et paramètres spermatiques.....	41
D) Mécanismes .....	42
1- Déséquilibre hormonal.....	42
2- Inflammation .....	48
3- Stress oxydant .....	50
4- Augmentation de la température scrotale .....	52
5- Dysfonctions érectiles .....	53
E) Interventions thérapeutiques.....	53
1- Données chez l'animal.....	53
2- Modifications hygiéno-diététiques (associant régime alimentaire et exercice physique), chez l'homme.....	54
3- Chirurgie bariatrique.....	55
IV. Conclusion .....	57
<b><u>Partie 2 : DOHaD.....</u></b>	<b>58</b>
I. DOHaD.....	58
A) Le concept DOHaD.....	58
1- Origine du concept de DOHaD.....	58

2- Elargissement du concept de DOHaD .....	59
3- Surpoids et obésité maternelle pendant la grossesse .....	59
4- Plasticité développementale .....	60
B) Mécanismes .....	60
1- Hormones et nutriments.....	61
2- Stress oxydant .....	61
3- Epigénétique .....	62
C) Périodes de l'exposition.....	67
1. Période pré-conceptionnelle .....	67
2. Période préimplantatoire.....	68
3. Période fœtale.....	68
4. Période néonatale .....	69
II. Environnement maternel et fonctions de reproduction de la descendance.....	71
A) Données épidémiologiques .....	71
B) Données chez l'animal.....	71
C) Mécanismes .....	72
D) Conclusion .....	72
<b>Objectifs.....</b>	<b>83</b>
<b>Présentation des travaux.....</b>	<b>85</b>
<b><u>Partie 1 : Nutrition et fonctions de reproduction masculine.....</u></b>	<b>85</b>
I. Relation entre le statut nutritionnel et les paramètres spermatiques .....	85
A) IMC et noyaux spermatiques.....	85
1- IMC et intégrité de l'ADN spermatique .....	85
2- Paramètres anthropométriques, bilan métabolique et qualité spermatique.....	92
B) IMC et pouvoir fécondant des spermatozoïdes .....	114
II. Réversibilité de l'impact du surpoids sur les fonctions de reproduction.....	120
Diminution de la graisse viscérale grâce à une prise en charge hygiéno-diététique.....	120
<b><u>Partie 2: DOHAD .....</u></b>	<b>144</b>
I. Poids de naissance et paramètres spermatiques.....	144
II. Impact d'une alimentation maternelle hypercholestérolémique sur les fonctions de reproduction masculine, étude chez le lapin.....	155
<b>Discussion et perspectives .....</b>	<b>182</b>
I. Synthèse générale.....	182
A) Paramètres anthropométriques et fonctions de reproduction masculine .....	182
B) DOHAD .....	183
C) Conclusion.....	185
II. Au delà de la programmation maternelle .....	186
A) Empreinte nutritionnelle paternelle .....	186
1- Données chez l'animal .....	186
2- Données chez l'homme.....	187
3- Mécanismes .....	188
4- Conclusion.....	189
B) Effets multigénérationnels et transgénérationnels .....	189
1- Données épidémiologiques.....	190
2- Données chez l'animal.....	190
3) Conclusion.....	191
III. Perspectives.....	193
A) Comprendre les mécanismes .....	193
B) Traitements ? .....	194
C) Application clinique.....	196
<b>Conclusion .....</b>	<b>199</b>
<b>Références.....</b>	<b>200</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>226</b>

# Abréviations

## A

**ADN** : acide désoxyribonucléique  
**AMP** : assistance médicale à la procréation  
**AgRP** : agouti-related protein  
**ARN** : acide ribonucléique

## C

**CAT** : catalase  
**CG** : cellules germinales  
**Chol/PE** : rapport cholestérol/phosphatidyléthanolamine  
**CGP** : cellules germinales primordiales  
**CpG** : dinucléotides cytosine-guanine  
**CRP** : C-reactive protein

## D

**DMR** : differentially methylated region  
**DNC** : délai nécessaire à concevoir  
**DNMT** : DNA methyltransferases  
**DOHaD** : Developmental Origins of Health and Diseases

## E

**E2** : œstradiol  
**EGF** : Epidermal growth factor  
**EOR** : espèces oxygénées réactives

## F

**FIV** : fécondation in vitro  
**FIVc** : fécondation in vitro conventionnelle  
**FITC** : fluorescein isothiocyanate  
**FSH** : follicle stimulating hormone

## G

**GH** : growth hormone  
**GHS-R** : growth hormone secretagogue receptor  
**GnRH** : gonadotrophin relising hormone  
**GPx** : glutathion peroxydase

## H

**HAS** : haute autorité de santé  
**HATs** : histone acetyltransferases  
**HDACs** : histone deacetylases  
**HDL-c** : high density lipoprotein cholestérol  
**HF** : High fat  
**HDMs** : histone demethylases  
**HH** : hyperlipidique, hypercholestérolémique  
**HMTs** : histone methyltransferases

## I

**IC** : intervalle de confiance  
**ICR** : imprinting control regions  
**ICSI** : intracytoplasmic sperm injection  
**IDF** : international diabète fédération  
**IGF1** : Insulin Growth factor 1  
**IGF2** : Insulin-Like Growth factor 2  
**IL** : interleukine

## J

**jpc** : jours post conception

## L

**LDL-c** : low density lipoprotein cholesterol  
**IMC** : indice de masse corporelle  
**LH** : luteinizing hormone

## M

**miARN** : microARN

## N

**NADPH** : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate  
**NOS** : nitric oxyde synthase  
**NPY** : neuropeptid Y  
**NS** : non significatif  
**NTS** : numération totale spermatique

## O

**Ob** : gène de la leptine  
**ob/ob** : mutation homozygote du gène de la leptine  
**OMS** : organisation mondiale de la santé  
**OR** : odds ratio

## P

**PE** : perturbateur endocrinien  
**PHRC** : programme hospitalier de recherche clinique  
**PNO** : plan national obésité  
**POMC** : proopiomélanocortine

## R

**RCIU** : retard de croissance intra utérin

## S

**SCD** : sperm chromatin dispersion  
**SCSA** : sperm chromatin structure assay  
**SHBG** : sex hormone binding globulin  
**SOD** : super oxyde dismutase  
**SOPK** : Syndrome des ovaires polykystique

## T

**TdT** : Terminal deoxynucleotidyl transférase  
**TESE** : testicular sperm extraction  
**TGF** : transforming growth factor  
**TNF- $\alpha$**  : tumor necrosis factor alpha  
**TT** : tour de taille  
**TT/TH** : ratio tour taille/ tour hanche  
**TUNEL** : Terminal dUTP Nick End Labelling

## Z

**ZB test** : zona binding test

## Liste des articles inclus dans la thèse

Article 1 (p88)

**Obesity leads to higher risk of sperm DNA damage, in infertile patients**

C. Dupont, C. Faure, N. Sermondade, M. Boubaya, F. Eustache, P. Clément, P. Briot, I. Berthaut, V. Levy, I. Cedrin-Durnerin, B. Benzacken, P. Chavatte-Palmer, R. Levy (2013 Asian Journal of Andrologie)

Article 2 (p94)

**Association between male anthropometric data, metabolic status and semen parameters**

C. Dupont, C. Faure, N. Sermondade, B. Gautier, I. Cedrin-Durnerin, S. Czernichow, B. Benzacken, S. Czernichow, P. Chavatte-Palmer, R. Lévy and the ALIFERT collaborative group (Soumis)

Article 3 (p116)

**Body mass index is not associated with sperm-zona pellucida binding ability in subfertile mâles.**

N. Sermondade, C. Dupont, C. Faure, M. Boubaya, I. Cédric-Durnerin, P. Chavatte-Palmer, C. Sifer, R. Lévy (2013 Asian Journal of Andrologie)

Article 4 (p122)

**In subfertile men, abdominal fat loss is associated with improvement of sperm quality and pregnancy: a case series**

C. Faure, C. Dupont, N. Sermondade, I. Cedrin-Durnerin, J-P. Wolf, R. Lévy (Révision majeure)

Article 5 (p146)

**Are semen parameters related to birthweight ?**

C. Faure, C. Dupont, B. Gautier, R. Lévy and the ALIFERT collaborative group (Soumis)

Article 6 (p167)

**Impact of maternal hyperlipidic hypercholesterolemic diet on male reproductive organs and testosterone concentration in rabbits.**

C. Dupont, D. Ralliard-Rousseau, A. Tarrade, C. Faure, M. Dahirel, B. Sion, F. Brugnon, R. Levy, P. Chavatte-Palmer (soumis).

## **Annexes : Autres articles et chapitres d'ouvrages publiés au cours de la thèse**

Annexe 1 (p73):

### **Physiologie de la fonction testiculaire.**

C. Dupont, L. El Khattabi, N. Sermondade, R. Lévy. Chapitre 2. « Préservation de la fertilité » M. Grynberg, R. Frydman- Essai (broché).

Annexe 2 (p227):

### **L'appareil génital masculin**

C. Dupont, B. Martin-Pont and R. Lévy; De Boeck

Annexe 3 (p246):

### **Maternal environment and the reproductive function of the offspring.**

C. Dupont, A.G. Cordier, C. Junien, R. Levy, and P. Chavatte-Palmer. Theriogenology. 2012 Oct 15; 78(7):1405-14. Review.

Annexe 4 (p260):

### **Dietary lipid and cholesterol induce ovarian dysfunction and abnormal LH response to stimulation in rabbits.**

A-G. Cordier, P. Léveillé, C. Dupont, A. Tarrade, O. Picone, T. Larcher, M. Dahirel, E. Pומרol, B. Mandon-Pepin, R. Lévy and P. Chavatte-Palmer (Plos One)

## Figures et tableaux

### FIGURES

- Figure 1.** Périodes critiques du développement testiculaire conduisant à la production spermatique.....p18
- Figure 2 :** Principales causes et principaux mécanismes conduisant à la fragmentation de l'ADN spermatique et leurs conséquences.....p23
- Figure 3 :** Obésité et fonctions de reproduction masculine : axe hypothalamo-hypophysogonadique.....p43
- Figure 4 :** Obésité et fonctions de reproduction masculine : rôle de la leptine .....p45
- Figure 5 :** Obésité et fonctions de reproduction masculine : rôle de la ghréline .....p46
- Figure 6 :** Obésité et réponse des adipocytes, rôle de l'inflammation.....p49
- Figure 7 :** Régulation paracrine de la spermatogénèse, rôle de cytokines inflammatoires...p50
- Figure 9.** Déméthylation des cellules germinales primordiales et reméthylation sexe spécifique.....p64
- Figure 10 :** Principales voies impliquées dans le métabolisme de la méthionine. ....p65
- Figure 11 :** DOHAD : Mécanismes et périodes d'exposition.....p70
- Figure 12:** Développement gonadique du lapin mâle.....p156
- Figure 13 :** Représentation schématique du protocole expérimental.....p158
- Figure 14 :** Exemples de graphes obtenus en cytométrie en flux après marquage des spermatozoïdes de lapins par la technique TUNEL. ....p161
- Figure 15 :** Périodes au cours desquelles l'environnement nutritionnel est critique.....p185
- Figure 16 :** Transmissions multigénérationnelles et transgénérationnelles, maternelles et paternelles.....p189

## TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Normes et valeurs de référence pour les paramètres spermatiques selon le manuel de l’OMS 2010.....	<b>p21</b>
<b>Tableau 2.</b> Méthodes d’analyses de l’intégrité de l’ADN spermatique. ....	<b>p25</b>
<b>Tableau 3.</b> Principales causes d’infertilité masculine.....	<b>p28</b>
<b>Tableau 4.</b> Définition du syndrome métabolique « Fédération internationale du diabète ». ....	<b>p34</b>
<b>Tableau 5.</b> Principales publications évaluant l’impact de l’IMC masculin sur l’intégrité de l’ADN spermatique.....	<b>p38</b>
<b>Tableau 6.</b> Principales publications évaluant l’impact de l’IMC masculin sur les issues de FIV-ICSI.....	<b>p40</b>
<b>Tableau 7.</b> Synthèse des publications rapportant l’impact de la chirurgie bariatrique sur les paramètres spermatiques.....	<b>p56</b>
<b>Tableau 8 :</b> Ingrédients et composition chimique des aliments témoins et HH.....	<b>p158</b>
<b>Tableau 9.</b> Phénotype des descendants mâles en fonction de l’alimentation maternelle et de l’alimentation post sevrage.....	<b>p166</b>
<b>Tableau 10 :</b> Conséquences sur 2 générations d’une obésité masculine induite par l’alimentation.....	<b>p192</b>

## PHOTOS

<b>Photo 1 :</b> Testicule et épидидyme de lapin (37 semaines) .....	<b>p160</b>
<b>Photo 2 :</b> Histologie testiculaire d’un lapin.....	<b>p160</b>

## **Introduction**

L'infertilité est un problème de santé publique qui concerne environ 15% des couples en âge de procréer dans les pays développés. Dans 50% des cas un facteur masculin est identifié. La pandémie d'obésité observée depuis quelques décennies pourrait être liée à une augmentation de la prévalence de l'infertilité masculine. De plus en plus de données suggèrent un effet défavorable de l'obésité et du syndrome métabolique sur la production et la qualité spermatique.

Le concept de DOHAD admet qu'une altération de l'environnement nutritionnel maternel pendant la grossesse prédispose l'individu au développement de pathologies à long terme, tel que le syndrome métabolique. La fertilité d'un individu pourrait donc être programmée dès la période périconceptionnelle, et l'alimentation maternelle pendant la grossesse pourrait avoir un impact sur les fonctions de reproduction masculine futures.

Avant d'aborder ces deux thèmes dans une revue de la littérature, un rappel concernant le développement gonadique masculin, les fonctions testiculaires et l'infertilité masculine sera fait. Une partie sur l'obésité et le syndrome métabolique sera également développée.

# Etat des connaissances

## Partie 1 : Corpulence et fonctions de reproduction masculine

### I. Fonctions de reproduction masculine

#### A) Ontogénèse et physiologie testiculaire

##### 1- Embryologie et développement de l'appareil testiculaire chez l'homme

Le sexe génétique 46, XY est établi lors de la fécondation. Au cours du stade indifférencié, des structures primitives identiques se développent dans les embryons mâles et femelles. Puis, le génotype sexuel est responsable du contrôle du développement gonadique : les gonades bi potentielles se différencient alors en testicules. Le développement de l'appareil génital masculin se fait en 3 étapes à partir du mésoblaste intermédiaire.

##### a. Gonades indifférenciées

Les cellules germinales primordiales naissent de l'épiblaste (22-24 jours) et sont dans un premier temps localisées dans la paroi postérieure de la vésicule vitelline, dans la région extra embryonnaire où elles se multiplient par mitose. Elles migrent ensuite le long de la paroi de l'intestin postérieur et du mésentère dorsal et colonisent les crêtes génitales. Les crêtes génitales se forment dès la quatrième semaine de développement à partir de la prolifération de l'épithélium cœlomique et d'une condensation du mésenchyme sous-jacent. Au cours de la 6<sup>ème</sup> semaine, les cellules issues de l'épithélium cœlomique forment des agrégats de cellules somatiques de soutien qui entourent complètement les cellules germinales et forment ainsi les cordons sexuels primitifs : c'est le stade de gonades indifférenciées.

##### b. Différentiation gonadique

Au cours de la 7<sup>ème</sup> semaine de développement, les gonades indifférenciées se différencient en testicules sous l'influence du gène *SRY* (*sex-determining region on the Y chromosome*) porté par le chromosome Y. Les cellules de Sertoli, premières cellules différenciées à apparaître, s'organisent avec les cellules interstitielles pour former les cordons testiculaires qui renferment en leur centre les cellules germinales. Ces cordons sont à l'origine des tubes séminifères dans lesquels seront produits les spermatozoïdes. Au cours de la 9<sup>ème</sup> ou 10<sup>ème</sup> semaine de développement, les cellules de Leydig se différencient à partir des cellules mésenchymateuses mésonéphrotiques recrutées par les cellules pré sertoliennes et produisent la testostérone. Ces cellules sont situées entre les cordons testiculaires et constituent en grande partie le tissu interstitiel. Les testicules, initialement localisés dans la cavité abdominale migrent dès la 8<sup>ème</sup> semaine pour atteindre le scrotum vers la fin du 8<sup>ème</sup> mois.

Cette partie est détaillée plus longuement dans la première partie du chapitre de livre, inséré dans l'**annexe 1** : Chapitre « Physiologie de la fonction testiculaire ».

### c. Enfance et puberté

Les testicules subissent divers changements pendant l'enfance et l'adolescence. Chez l'homme, entre la naissance et l'âge de 6 mois, il existe une période d'activité hypothalamo-hypophyso-testiculaire qui se caractérise par la sécrétion de FSH et de LH et se traduit par une augmentation de la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig (Winters *et al.*, 1975). Sous l'influence de ce pic de testostérone, les cellules de Sertoli continuent de proliférer au cours de la période néonatale (jusqu'à environ 6 mois). S'en suit une période de quiescence, au cours de laquelle il y a un arrêt de prolifération des cellules de Sertoli, associé à un arrêt de la sécrétion de testostérone. Juste avant la puberté, les cellules de Sertoli reprennent leur prolifération et leur maturation, sous le contrôle de la FSH qui recommence à être sécrétée (Sharpe *et al.*, 2003). Les stades embryonnaires et fœtaux ainsi que les premiers mois après la naissance et l'adolescence sont donc des périodes critiques dont dépendra la fertilité future (**Figure 1**).

## 2- Histologie et physiologie testiculaire

### a. Epithélium séminifère et tissu interstitiel

Les testicules sont composés de nombreux lobules dans lesquels se trouvent plusieurs tubes séminifères qui assurent la fonction exocrine du testicule, c'est à dire la production de gamètes matures : les spermatozoïdes. L'épithélium séminifère est constitué à la fois de cellules somatiques, les cellules de Sertoli, et de cellules germinales disposées entre elles sur toute la hauteur de l'épithélium. La position des cellules de Sertoli dans les tubes séminifères leur confère un rôle fondamental pour le contrôle de la spermatogenèse. Elles permettent, entre autres, le développement des cellules germinales jusqu'au stade de spermatozoïdes et leur progression depuis la lame basale vers la lumière du tube séminifère.

Le tissu interstitiel comble les espaces entre les tubes séminifères, il est constitué en grande partie de cellules de Leydig dont la fonction principale est la synthèse de testostérone qui confère aux testicules leur fonction endocrine.

#### b. Spermatogénèse

La spermatogenèse est un phénomène continu à partir de la puberté. Les cellules germinales souches se multiplient et se différencient, aboutissant à la formation des spermatozoïdes. On distingue trois phases : une phase de prolifération des spermatogonies (mitoses), les phases méiotiques, permettant le brassage de l'information génétique, et la spermiogenèse, au cours de laquelle les spermatides subissent un certain nombre de remaniements cellulaires pour aboutir aux spermatozoïdes. La durée totale de la spermatogenèse est constante pour une espèce donnée : elle est de 74 jours chez l'homme et 48 jours chez le lapin. Les spermatozoïdes ainsi formés sont libérés dans la lumière du tube séminifère (spermiation). Ils rejoignent les tubes droits, le *rete testis*, puis l'épididyme où leur maturation se poursuit. Ils sont stockés principalement dans la queue de l'épididyme jusqu'à leur émission.

#### c. Régulation de la spermatogénèse

Le fonctionnement testiculaire est sous la dépendance d'hormones qui agissent de façon endocrine, autocrine et paracrine.

L'hypothalamus sécrétant la GnRH (Gonadotrophine Releasing Hormone) de façon pulsatile stimule la synthèse de LH (Luteinizing Hormone) et de FSH (Follicle Stimulating Hormone).

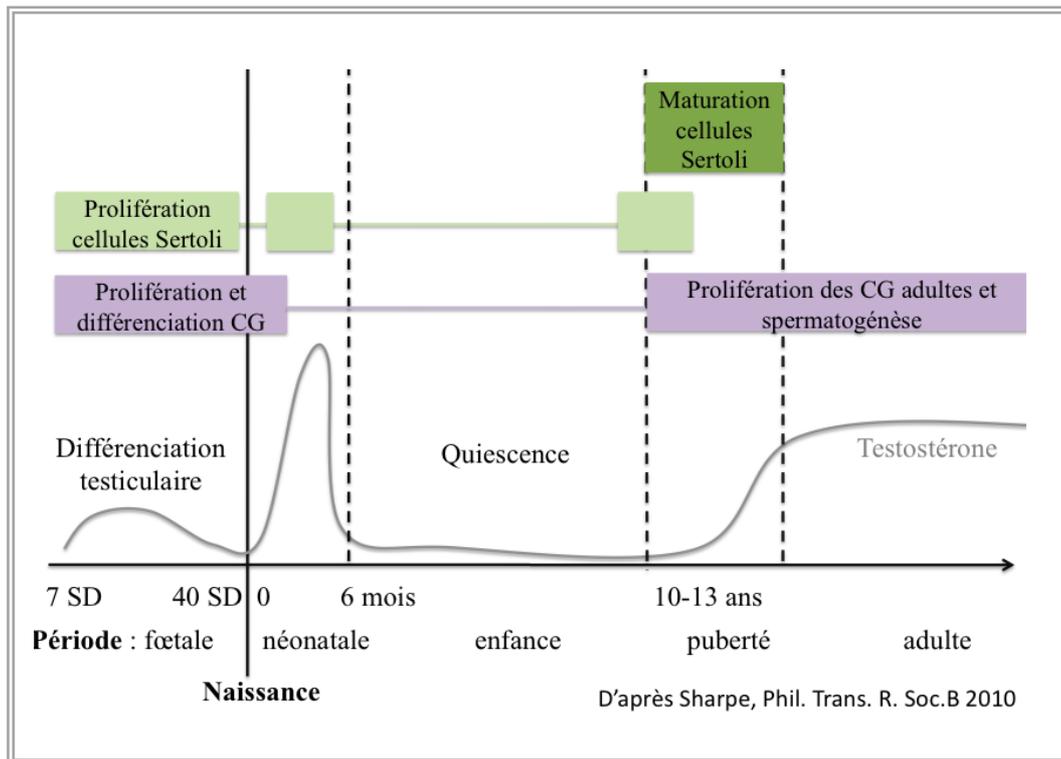
Ces gonadotrophines sont sécrétées par les cellules gonadotropes de l'antéhypophyse et interviennent dans la production d'hormones stéroïdes et de spermatozoïdes par le testicule.

Des récepteurs à la LH sont présents sur les cellules de Leydig. La LH va stimuler la synthèse et la sécrétion de testostérone par ces cellules. La testostérone est nécessaire à la spermatogénèse, mais elle va également servir de rétrocontrôle négatif au niveau hypothalamo-hypophysaire. La FSH, via des récepteurs présents sur les cellules de Sertoli, va stimuler la synthèse d'inhibine B qui exerce un rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus et l'hypophyse et qui stimule la spermatogénèse.

La cellule de Sertoli présente des récepteurs pour la FSH et la testostérone, les principaux régulateurs hormonaux de la spermatogénèse. La FSH exerce son activité via un récepteur à la FSH (FSHR) couplé à une protéine G, situé sur la membrane des cellules de Sertoli. La testostérone exerce son action en se liant à des récepteurs aux androgènes localisés dans les cellules de Sertoli. Certaines voies de signalisation sont communes entre la FSH et la testostérone, mais pas toutes. La FSH régulerait préférentiellement le développement des spermatogonies alors que la testostérone régulerait la phase tardive de spermiogénèse. La FSH et la testostérone agiraient de façon concomitante pour contrôler le développement des spermatocytes.

La spermatogénèse est également contrôlée par de nombreux facteurs autocrines et paracrines qui exercent leur action via le réseau de communications intercellulaires. Les cellules de Sertoli produisent de nombreux facteurs (cytokines et facteurs de croissance) qui interviennent dans la multiplication et la différenciation des cellules germinales. Parmi les mieux décrits, les interleukines (IL-1 et IL-6) jouent un rôle dans la réplication de l'ADN des cellules germinales.

Cette partie est détaillée plus longuement dans le chapitre de livre inséré dans **l'annexe 2** : Chapitre «L'appareil génital masculin».



**Figure 1.** Périodes critiques du développement testiculaire conduisant à la production spermatique. (CG : cellules germinales ; SD : semaines de développement)

## B) La fécondation

### 1- Capacitation

Après dépôt dans le vagin, les spermatozoïdes sont confrontés à plusieurs étapes de maturation. Au cours de leur progression dans les voies génitales féminines, ils subissent la capacitation, phénomène réversible, qui est caractérisé par des remaniements membranaires et des modifications intra-cellulaires (Austin, 1952).

Des facteurs « décapacitants », intégrés à la membrane spermatique pour prévenir leur capacitation prématurée, sont majoritairement éliminés lors de la traversée de la glaire cervicale puis pendant le trajet dans les voies génitales. Parallèlement, des facteurs de capacitation présents dans le tractus féminin, induisent la capacitation.

Ces signaux entraînent une redistribution des phospholipides membranaires avec une diminution du ratio cholestérol/phospholipides (Zaneveld *et al.*, 1991) et donc l'augmentation de la fluidité et de la perméabilité membranaire qui conduit à l'externalisation de récepteurs nécessaires à l'interaction gamétique

Des modifications de l'activité de canaux ioniques ( $K^+$  et  $Na^+$ ) entraînent une hyperpolarisation de la membrane plasmique ( $-80mV$ ) (Florman *et al.*, 2008) et une entrée de

Ca<sup>2+</sup>. On observe également une augmentation de l'activité de l'adénylate cyclase et une diminution de celle des phosphodiesterases qui entraînent une augmentation de l'AMP cyclique intracellulaire et donc une activation de la protéine kinase A, qui permet la phosphorylation des tyrosines, en activant les tyrosines kinases et en inhibant les phosphatases. Ces mécanismes permettent aux spermatozoïdes d'acquérir de nouvelles caractéristiques de vitesse ; ils sont dits alors hyperactivés (Signorelli *et al.*, 2012).

## 2- Réaction acrosomique

Les spermatozoïdes hyperactivés qui arrivent au contact de l'ovocyte pénètrent dans le cumulus oophorus qui entoure l'ovocyte et se lient à la zone pellucide via leur membrane plasmique. Cette liaison est le facteur déclenchant de la réaction acrosomique, phénomène d'exocytose irréversible indispensable à la fécondation, qui précède la fusion gamétique (Patrat *et al.*, 2000). La réaction acrosomique démarre avec la fusion entre la membrane acrosomique externe et la membrane cytoplasmique du spermatozoïde, entraînant une vésiculation de la membrane et une exposition de la membrane acrosomique interne. La formation de ces vésicules d'exocytose permet la libération du contenu acrosomique constitué d'enzymes hydrolytiques et protéolytiques que sont l'acrosine, la hyaluronidase et la phosphatase acide, ainsi que l'activation des enzymes protéolytiques (Silva et Gadella, 2006).

## 3- Fusion gamétique

La libération de ces enzymes permet au spermatozoïde de pénétrer la zone pellucide et d'entrer dans l'espace péri-vitellin.

La membrane plasmique du spermatozoïde, qui, après la réaction acrosomique, ne subsiste que dans une portion appelée segment équatorial, se lie à une zone microvillaire de l'ovocyte. Au niveau de la partie postérieure de la tête spermatique et du flagelle, les membranes spermatiques fusionnent avec les membranes ovocytaires. La partie antérieure de la tête est incorporée dans l'ovocyte. La fusion gamétique fait intervenir un certain nombre de protéines d'interaction (Rubinstein *et al.*, 2006). Parmi les mieux décrites, on peut citer :

- Les protéines spermatiques ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease Interaction) qui interagissent avec les intégrines ovocytaires  $\alpha 6\beta 1$ . L'intégrine  $\alpha 6\beta 1$  et son ligand, la fertiline  $\beta$ , sont distribués à la fois sur la membrane ovocytaire et la membrane spermatique, impliquant ainsi le transfert de fragments entre les deux gamètes.

- CD9, membre de la grande famille des tétraspanines, est une protéine ovocytaire impliquée dans la fusion gamétique (Barraud-Lange *et al.*, 2012).

- La protéine spermatique IZUMO est également indispensable à la fusion gamétique (Inoue *et al.*, 2005).

La pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte entraîne le blocage de la polyspermie et permet la formation du zygote puis le développement embryonnaire.

### C) Marqueurs biologiques de la fertilité masculine

#### 1- Spermogramme et spermocytogramme

Le spermogramme est l'examen de première intention réalisé chez l'homme infertile. Ce test, réalisé à l'état frais, est un reflet de la production et de la maturation des spermatozoïdes dans les 3 mois précédant l'analyse. Il permet une évaluation quantitative et qualitative du sperme. Le volume de l'éjaculat et le pH sont mesurés. La mobilité est ensuite évaluée à l'aide d'un microscope (grossissement x200 et x400) à partir de 10µl de sperme déposé entre lame et lamelle, un pourcentage des différentes catégories de mobilités est alors estimé à partir d'approximativement 200 spermatozoïdes. Dans la nouvelle version du manuel de l'OMS (WHO, 2010), seules 3 catégories sont comptabilisées : les spermatozoïdes ayant une mobilité progressive (a+b), les spermatozoïdes ayant une mobilité non progressive (c) et les immobiles (d). La différence entre les spermatozoïdes ayant une mobilité progressive rapide (a) et ceux ayant une mobilité progressive lente (b) étant difficile à estimer sans biais, cette distinction a été retirée de la nouvelle version du manuel. La concentration en spermatozoïdes est calculée grâce à un hémocytomètre, 200 spermatozoïdes sont comptés. A partir du volume et de la concentration, on peut calculer la numération, ou nombre total de spermatozoïdes (NTS) présents dans l'éjaculat. La vitalité des spermatozoïde est estimée sur 200 spermatozoïdes en évaluant l'intégrité de la membrane spermatique. Le test de coloration à l'éosine-nigrosine est utilisé, il conduit à une coloration rouge-rose des spermatozoïdes morts. Les nouvelles valeurs de référence des principaux paramètres spermatiques ont été établies à partir des données de 1953 hommes fertiles jeunes, dont le délai nécessaire à concevoir était inférieur à 12 mois. Les 5<sup>ème</sup> percentiles des valeurs ont été proposés comme valeurs de référence inférieures de normalité (Cooper *et al.*, 2010). Ces valeurs ont été publiées par l'OMS en juin 2010 (5<sup>ème</sup> édition) (WHO, 2010) (**Tableau 1**).

Paramètres	Valeurs de références (OMS 2010)
Volume de l'éjaculat	≥ 1,5 ml
Concentration spermatique	≥ 15 x .10 <sup>6</sup> /ml
Numération spermatique	≥ 39 x .10 <sup>6</sup> /éjaculat
Mobilité totale : progressive (a+b) + non progressive (c)	≥ 40%
Mobilité progressive (a+b)	≥ 32%
Vitalité	≥ 58%
Morphologie (Critères stricts de Krüger)	≥ 4%

**Tableau 1.** Normes et valeurs de référence pour les paramètres spermatiques selon le manuel de l'OMS 2010.

Le spermocytogramme détermine le nombre de spermatozoïdes morphologiquement normaux et décrit les différentes anomalies morphologiques des spermatozoïdes. Cet examen est réalisé à partir d'un frottis coloré. Il existe plusieurs systèmes de classification, la méthode stricte de Kruger étant la plus utilisée dans le monde et la méthode de David modifiée étant celle fréquemment choisie en France (Auger *et al.*, 2001). Il a été démontré une association entre la morphologie des spermatozoïdes et la probabilité de concevoir. La méthode de David modifiée permettrait une meilleure discrimination (Auger, 2010). Avec cette méthode, la valeur seuil de spermatozoïdes ayant une morphologie normale a été établie à 23%.

## 2- Examens complémentaires

### a. Etude de l'intégrité du noyau des spermatozoïdes

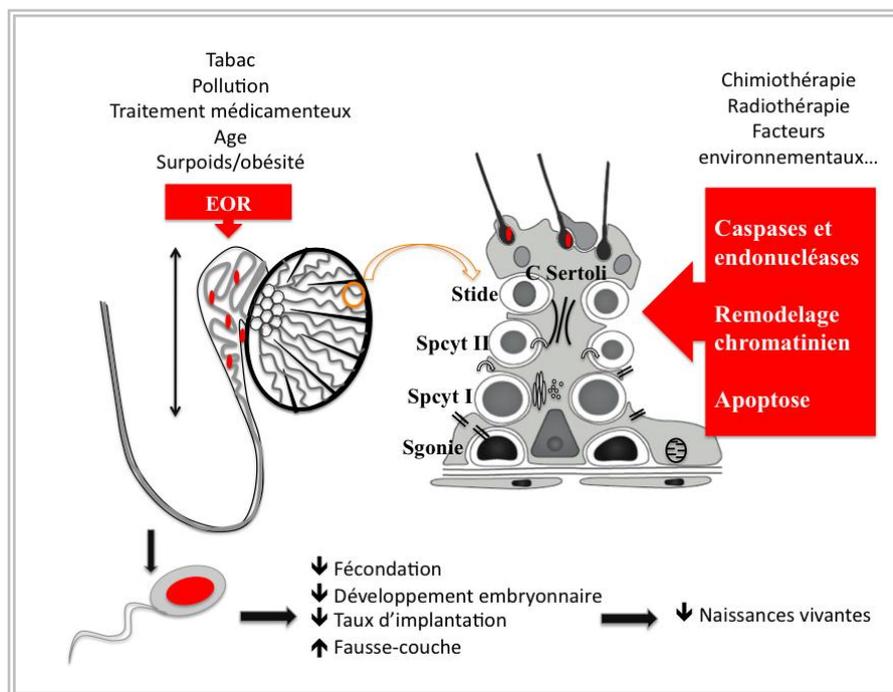
#### *Etiologie*

Un certain nombre de facteurs environnementaux et de toxiques peuvent être à l'origine d'une augmentation de la fragmentation de l'ADN spermatique. Parmi les plus décrits, on trouve le tabac (Sepaniak *et al.*, 2006), la pollution (Evenson et Wixon, 2005), certains traitements médicamenteux (Bujan *et al.*, 2013). L'âge (Wyrobek *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2013) le surpoids et l'obésité seraient également des facteurs de risque d'altération de l'ADN spermatique.

## Pathogénie

L'intégrité de l'ADN spermatique est essentielle à l'obtention d'une grossesse et à la naissance d'un enfant vivant et en bonne santé. Il existe une corrélation négative entre une augmentation de la fragmentation de l'ADN et la fertilité (Shamsi *et al.*, 2008). Dans la méta-analyse réalisée par Evenson en 2006, il a été montré que les chances d'obtenir une grossesse avec une naissance vivante seraient meilleures lorsque le noyau des spermatozoïdes n'est pas fragmenté (index de fragmentation de l'ADN <30%), que ce soit pour les grossesses spontanées ou après assistance médicale à la procréation (AMP) (Evenson et Wixon, 2006). En effet, les altérations de l'ADN spermatique peuvent conduire à un défaut de fécondation (Sakkas et Alvarez, 2010) et à des anomalies du développement embryonnaire et de la formation des blastocystes (Seli *et al.*, 2004; Aitken *et al.*, 2009). Il a aussi été observé une diminution des taux d'implantation et une augmentation des fausses-couches spontanées (Carrell *et al.*, 2003; Frydman *et al.*, 2008).

Le noyau des spermatozoïdes contient un génome haploïde. Au cours de la spermatogenèse et de la spermiogenèse, un certain nombre d'événements peuvent affecter l'intégrité de l'ADN spermatique. On observe une perte de l'organisation de l'ADN spermatique, caractérisée par une décondensation et une fragmentation de l'ADN. La fragmentation de l'ADN spermatique consiste en une cassure simple ou double brin de l'ADN (Muratori *et al.*, 2008). Au moment de la spermatogenèse, des spermatozoïdes anormaux peuvent échapper au processus d'apoptose, si les taux de protéines pro-apoptotiques sont déséquilibrés, et conduire à une augmentation du nombre de spermatozoïdes présentant des dommages de l'ADN (Sakkas *et al.*, 2003). Au cours de la spermiogenèse, le remplacement des histones par les protamines peut être déséquilibré et entraîner une décondensation de l'ADN spermatique ce qui favorise l'altération de l'ADN spermatique. Le remodelage chromatinien requiert des cassures d'ADN pour permettre le déroulement de l'ADN, cette étape est normalement suivie d'une réparation de l'ADN par les complexes de réparation (topoisomérases) : dans certains cas, ce système peut être dépassé ou inefficace (Marcon et Boissonneault, 2004). Les caspases et les endonucléases endogènes peuvent aussi induire une altération de l'ADN spermatique (Sailer *et al.*, 1997). Une fois formés, au cours de leur trajet dans l'épididyme ou lorsqu'ils sont stockés dans la queue de l'épididyme, les spermatozoïdes peuvent encore être la cible d'attaques par les espèces oxygénées réactives (EOR) (Sakkas et Alvarez, 2010) (**Figure 2**).



**Figure 2 :** Principales causes et principaux mécanismes conduisant à la fragmentation de l'ADN spermatique et leurs conséquences.

(EOR : espèces oxygénées réactives ; Sgonie : spermatogonie ; Spcyt : spermatocyte ; Stide : spermatide)

Les cassures simple brin sont souvent causées par un défaut de réappariement des brins d'ADN au moment du remodelage chromatinien. Une augmentation du stress oxydatif peut également en être à l'origine. La fragmentation de l'ADN simple brin est plus facile à réparer et souvent de meilleur pronostic. Les cassures doubles brins résultent plutôt de l'apoptose, de l'hydrolyse par les caspases ou les endonucléases ou des attaques par les EOR. Ces cassures sont considérées comme de moins bon pronostic (Sakkas et Alvarez, 2010).

#### *Méthodes d'analyse de l'intégrité de l'ADN spermatique (Tableau2)*

Différents tests sont disponibles pour évaluer l'intégrité de l'ADN spermatique. Certains permettent l'étude de la fragmentation de l'ADN simple brin et/ou double brin :

- *Terminal dUTP Nick End Labelling (TUNEL assay)*. Cette technique ne nécessite pas de dénaturation préalable. Dans cette méthode, les points de fragmentation sont identifiés par l'enzyme "terminal deoxynucleotidyl transférase" (TdT). La TdT catalyse l'incorporation de nucléotides (dUTP) préalablement marqués, aux extrémités 3'-OH des fragments d'ADN. Plus il y a de fragments d'ADN, plus il y a d'extrémités 3'-OH libres et donc plus le signal

fluorescent est fort (Gorczyca *et al.*, 1993). L'analyse peut se faire sur lame, à l'aide d'un microscope à fluorescence ou en cytométrie en flux.

- *Comet assay (Single Cell Gel Electrophoresis assay)*. Les cellules incluses dans de l'agarose sont lysées, ce qui entraîne la formation de boucles d'ADN superenroulées liées à la matrice nucléaire. Une électrophorèse en pH basique permet la formation de structures ayant un aspect de comète qu'on peut observer en microscopie à fluorescence. Les boucles d'ADN superenroulées qui présentent des cassures se retrouvent libres et peuvent s'étendre. L'intensité de la queue de la comète est proportionnelle au nombre de cassures d'ADN (Collins, 2004).

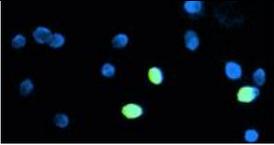
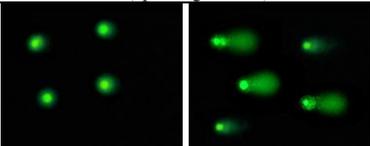
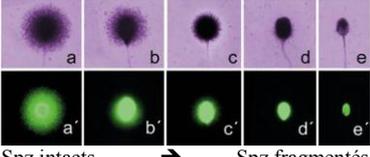
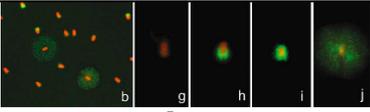
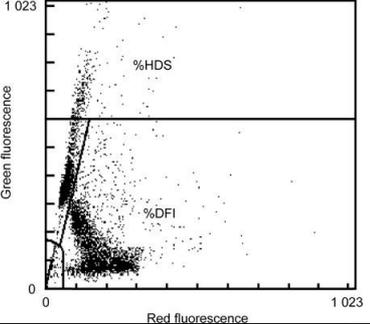
- *SCD (sperm chromatin dispersion test) ou test du halo*. Les spermatozoïdes sont inclus dans un microgel d'agarose et déposés sur une lame. L'ADN est dénaturé ce qui permet la libération des fragments d'ADN simple brin. Après coloration, les spermatozoïdes dont le noyau n'est pas fragmenté présentent de grands halos de boucles d'ADN alors que ceux dont le noyau est fragmenté ne présentent pas ou peu de petits halos. La lecture peut se faire en microscopie à fluorescence ou en microscopie à champs lumineux (Fernandez *et al.*, 2011).

- La technique *in situ nick translation* ne permet de détecter que les cassures d'ADN simple brin. C'est une technique dérivée de la technique TUNEL qui consiste en l'incorporation de d-UTP marqué à l'extrémité de fragment d'ADN simple brin grâce à une réaction enzymatique avec la DNA polymérase 1 (Shamsi *et al.*, 2008). La lecture peut se faire en cytométrie en flux.

- L'étude de l'ADN simple brin natif ou après dénaturation peut être faite à l'aide de la *technique à l'acridine orange : SCSA (sperm chromatin structure assay)*. Ce test mesure la susceptibilité de l'ADN à se dénaturer suite à un traitement en milieu acide. L'acridine orange est le colorant utilisé. Il émet une fluorescence verte lorsqu'il se fixe à de l'ADN natif (double brin) et une fluorescence rouge lorsqu'il se fixe à de l'ADN dénaturé (simple brin). La lecture se fait en cytométrie en flux ou sur lame (Evenson et Jost, 2000).

- L'étude des défauts de condensation de l'ADN peut être réalisée à l'aide de la *technique au bleu d'aniline*. Cette technique permet de discriminer les histones riches en lysine qui

prennent la coloration bleue, des protamines riches en cystéines. La présence d'histones est le signe d'une condensation altérée de la chromatine (Agarwal et Said, 2004).

Méthode	Principe	Lecture	Références	
<b>TUNEL</b> Terminal dUTP Nick End Labelling	TdT : l'incorporation dUTP* 3'-OH ADN (simple et double brins)	MF CMF	(Gorczyca <i>et al.</i> , 1993)	 bleu : noyaux marqués au DAPI vert : TUNEL (spz fragmentés)
<b>Comet assay</b> Single Cell Gel Electrophoresis assay).	Electrophorèse en pH basique. Boucles d'ADN se retrouvent libres → Aspect de comet (simple et double brin)	MF	(Collins, 2004)	 Spz intacts      Spz fragmentés
<b>SCD</b> sperm chromatin dispersion test	Microgel d'agarose. Dénaturation ADN : libération des fragments d'ADN: coloration, si noyau pas fragmenté : grands halos (boucles d'ADN) (simple brin)	MF MCL	(Fernandez <i>et al.</i> , 2011)	 Spz intacts      →      Spz fragmentés
<b>In situ nick translation</b>	DNA polymérase I l'incorporation dUTP* 3'-OH ADN (simple brin)	CMF	(Shamsi <i>et al.</i> , 2008)	 Spz intacts      →      Spz fragmentés
<b>SCSA</b> sperm chromatin structure assay	Mesure susceptibilité de dénaturation de l'ADN en milieu acide. Acridine orange : - fluo verte : fixation ADN natif - fluo rouge : fixation à de l'ADN dénaturé (DFI) (simple brin)	MF CMF	(Evenson et Jost, 2000)	 Green fluorescence Red fluorescence %HDS %DFI
Technique au <b>bleu d'aniline</b>	Etude de la condensation de l'ADN Coloration bleue : histones riches en lysine = signe d'une condensation altérée de la chromatine	MCL	(Agarwal et Said, 2004)	 Bleu : décondensation de l'ADN

**Tableau 2.** Méthodes d'analyses de l'intégrité de l'ADN spermatique.

MF : microscopie à fluorescence ; CMF : cytométrie en flux ; MCL : microscopie à champs lumineux ; spz : spermatozoïdes)

### Discussion des indications de ces examens

L'inconvénient des méthodes présentées ci-dessus est la grande hétérogénéité des résultats liée aux différentes techniques et la difficulté d'établir des seuils de positivité. Ces méthodes

n'ont d'ailleurs pas été incluses dans la dernière édition du manuel de l'OMS (WHO, 2010) car leur validité et leur interprétation restent sujettes à controverse.

Il n'existe pas de consensus sur les indications de cet examen. L'étude de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes n'est à ce jour pas utilisée en routine en France, mais elle peut être prescrite dans certains cas : au cours du bilan d'infertilité idiopathique, en cas d'anomalies du développement embryonnaire (Aitken *et al.*, 2009), d'échecs d'implantation embryonnaire ou de fausses couches à répétition ( $\geq 3$ ) (Carrell *et al.*, 2003; Frydman *et al.*, 2008), et de tératozoospermie sévère (Brahem *et al.*, 2011).

#### b. Test de fixation des spermatozoïdes à la zone pellucide (ZB test : zona binding test)

Le ZB test permet d'estimer la capacité de fixation des spermatozoïdes d'un patient à la zone pellucide d'ovocytes (Liu *et al.*, 2004). On compare le taux de fixation des spermatozoïdes du patient à celui d'un témoin fertile. Ce test consiste à incuber les spermatozoïdes du patient et les spermatozoïdes témoins marqués avec un fluorochrome (exemple : FITC) en présence d'une zone pellucide entière, dans les conditions identiques à celle de la fécondation *in vitro* (FIV). Les zones pellucides utilisées proviennent d'ovocytes humains en métaphase 2 qui ont présenté un échec de fécondation après micro-injection d'un spermatozoïde. Les ovocytes sont stockés dans une solution salée jusqu'au test. Il a été montré que ce test, associé à l'évaluation de la mobilité progressive rapide, permet de prévenir les échecs de fécondation en FIV conventionnelle (FIVc), en proposant directement une ICSI, chez les couples présentant une infertilité idiopathique ou en cas d'altération modérée des paramètres spermatiques (Sifer *et al.*, 2005).

#### c. la capacité des spermatozoïdes à se fixer à l'acide hyaluronique

Les spermatozoïdes présentent à leur surface des récepteurs à l'acide hyaluronique. Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles capables de se fixer à l'acide hyaluronique peut être déterminé en déposant les spermatozoïdes sur des lames sur lesquelles sont fixés des molécules d'acide hyaluronique. Le seuil de fixation normale a été fixé à 80%. Ce test est un reflet de la maturité spermatique et du potentiel de fécondation des spermatozoïdes (Huszar *et al.*, 2006; Wegner *et al.*, 2010).

## D) Infertilité masculine

### 1- Définition et épidémiologie

L'infertilité est une pathologie du système reproductif définie par l'absence de grossesse après au moins 12 mois de rapports sexuels réguliers, sans contraception (WHO, 2000; Zegers-Hochschild *et al.*, 2009). Cette définition est néanmoins controversée en ce qui concerne la durée, qui peut être rallongée à 24 mois (Brzakowski *et al.*, 2009). Il est relativement difficile de donner des estimations fiables de l'infertilité. Différentes approches existent pour mesurer la prévalence de l'infertilité dans une population, avec pour chacune des limites méthodologiques et des biais (<http://www.inserm.fr/thematiques/sante-publique/rapports-publies>) (INSERM et ABM, 2012).

Un des indicateurs utilisé est l'estimation du délai nécessaire à concevoir (DNC). Deux études de grande envergure, avec des méthodologies différentes, ont été réalisées en France. L'enquête nationale périnatale de 2003, a analysé, rétrospectivement, le DNC de 14187 femmes venant d'accoucher : elle a estimé à 18% la fréquence d'infertilité après 12 mois de rapports sans contraception et à 8% après 24 mois (Blondel *et al.*, 2006). L'inconvénient majeur de cette méthodologie est l'exclusion des cas de stérilité totale ou de très faible fertilité. L'observatoire épidémiologique de la fertilité en France s'est affranchi de ce biais en estimant prospectivement le DNC de 867 femmes ayant des rapports sexuels non protégés, sélectionnées à partir d'un échantillon aléatoire de 14187 femmes. Il a été estimé que la prévalence d'infertilité est de 24% à 12 mois et de 11% à 24 mois (Slama *et al.*, 2012a; Slama *et al.*, 2012b).

La cause de l'infertilité est féminine dans 34% des cas, masculine dans 20% des cas, mixte dans 38% des cas et indéterminée dans 8% des cas (Thonneau *et al.*, 1991; de Kretser, 1997).

### 2- Causes de l'infertilité masculine

Les causes de l'infertilité masculine sont diverses. Les altérations peuvent concerner différentes étapes de la production spermatique et/ou de la fécondation : la spermatogenèse, la spermio-genèse, la maturation épидидymaire ou post-éjaculatoire des spermatozoïdes, la réaction acrosomique et la fusion gamétique. Le gamète masculin est également impliqué dans le développement embryonnaire.

Les principales causes de l'infertilité masculine sont résumées dans le **tableau 3**.

Atteinte pré-testiculaire	Atteinte testiculaire	Atteinte post-testiculaire
<b>Endocrine</b> Hypogonadisme hypogonadotrope  <b>Dysfonctions érectiles et troubles de l'éjaculation</b> Neurologiques Médicamenteuses Psychologiques	<b>Génétique</b> Syndrome de Klinefelter Micro délétions du chromosome Y Dyskinésies flagellaires  <b>Congénitale</b> Cryptorchidie  <b>Infectieuse</b> Orchite  <b>Vasculaire</b> Torsion testiculaire Varicocèle  <b>Immunologique</b>  <b>Acquise</b> Chimiothérapie/radiothérapie Traitements Chaleur	<b>Obstructive</b> <i>Epididyme</i> : Congénitale Infectieuse  <i>Déférents</i> : Mucoviscidose/ mutation CFTR Vasectomie  <b>Chirurgies des glandes annexes</b>  <b>Infections des glandes annexes</b> Epididymite Prostatite

**Tableau 3.** Principales causes d'infertilité masculine. (Inspiré de (de Kretser, 1997))

Néanmoins, dans 50% des cas, aucune cause n'est retrouvée, l'infertilité est alors dite idiopathique.

### 3- Déclin de la qualité spermatique ?

Le déclin de la qualité spermatique fait débat depuis de nombreuses années. Même si les données concernant la population générale restent limitées et contradictoires, des études ont montré une diminution de la concentration ou de la numération spermatique depuis presque un demi siècle (Carlsen *et al.*, 1992; Auger *et al.*, 1995; Swan et Elkin, 1999; Rolland *et al.*, 2013). Carlsen *et al.* ont observé une diminution de la concentration spermatique de presque 50% en 50 ans (Carlsen *et al.*, 1992). Auger *et al.* et Rolland *et al.* ont observé une diminution de la concentration de plus de 30% en une vingtaine d'années (Auger *et al.*, 1995; Rolland *et al.*, 2013). A Tours, parmi une population de donneurs fertiles, il a été observé une altération de tous les paramètres spermatiques (numération, mobilité, vitalité et morphologie) entre 1976 et 2009 (Splingart *et al.*, 2012). Une des hypothèses principales expliquant ce phénomène est l'impact croissant de facteurs environnementaux tels que les perturbateurs

endocriniens. Les habitudes de vie tels que l'alimentation, le tabac, le stress pourraient également être responsables de ce phénomène (Sharpe, 2010).

## **II. Surpoids, obésité et syndrome métabolique**

De nombreux facteurs concernant le mode de vie et l'environnement sont susceptibles d'agir sur la production spermatique et la fertilité. Parmi eux, le comportement alimentaire, pouvant conduire au surpoids et à l'obésité, est un élément essentiel à prendre en compte.

### A) IMC, surpoids et obésité

#### 1- Définitions

L'obésité est définie par une accumulation anormale et excessive de graisse dans les tissus adipeux (WHO, 2000). L'indice de masse corporelle (IMC) est une mesure facilement accessible et est très utilisée en pratique clinique pour diagnostiquer le surpoids et l'obésité. Cet indice nécessite la mesure du poids et de la taille des individus et se calcule en divisant le poids (kg) par la taille au carré ( $m^2$ ). L'IMC donne une information sur la corpulence de l'individu et est exprimé en  $kg.m^{-2}$ . L'OMS définit le surpoids lorsque l'IMC est supérieur ou égal à  $25 kg.m^{-2}$  et l'obésité lorsque l'IMC est supérieur ou égal à  $30 kg.m^{-2}$ . Au delà de  $40 kg.m^{-2}$  on parle d'obésité morbide (WHO, 2000).

#### 2- Epidémiologie

L'épidémie d'obésité a commencé aux Etats-Unis dès la fin des années soixante-dix. Une étude récente a montré une augmentation de l'IMC de  $0,4 kg.m^{-2}$  par décade entre 1980 et 2008 partout dans le monde. En 2008, il a été estimé que 1,46 milliards des adultes avaient un IMC supérieur à  $25 kg.m^{-2}$  et parmi eux, 205 millions d'hommes et 297 millions de femmes étaient obèses. Cette épidémie de surpoids et d'obésité concernerait toutes les régions du globe (Finucane *et al.*, 2011). En France, d'après l'étude «ObEpi», 32,3 % des adultes seraient en surpoids et 15 % seraient obèses (Diouf *et al.*, 2010; ObEpi, 2012). En France, depuis la fin des années 1990, la prévalence de l'obésité augmentait de 5,9% par an (Basdevant et Ciangura, 2009). Entre 2009 et 2012, la prévalence de l'obésité continue

d'augmenter, mais cette accélération tend à être moins rapide que dans les années précédentes (ObEpi, 2012).

### 3- Comorbidités dues au surpoids et à l'obésité

Outre les problèmes d'ordre sociodémographique et psychologique, le surpoids et l'obésité sont associés à de nombreuses comorbidités (National Taskforce on Obesity, 2005). Une augmentation significative des maladies cardio-vasculaires, de l'hypertension artérielle, des infarctus du myocarde, ainsi que des principaux facteurs du syndrome métabolique (diabète et dyslipidémies) est observée. Les individus en surpoids ou obèses sont plus sujets au syndrome d'apnée du sommeil qui peut être responsable d'une hypoxémie chronique entraînant une hypertension artérielle et d'autres troubles cardio-vasculaires (Dixon, 2010). Le risque d'athérosclérose et de stéatose hépatique est également augmenté en cas de surpoids et d'obésité (Masuoka et Chalasani, 2013). Chez les hommes et les femmes, l'IMC est associé à des risques plus élevés de décès liés au cancer, les plus fréquents étant ceux de l'œsophage, du colon, du rectum, du foie, de la vessie, du pancréas et du rein (Calle *et al.*, 2003; Dixon, 2010).

### 4- Etiologie

L'obésité est le plus souvent associée à un mode de vie sédentaire en synergie avec un régime alimentaire déséquilibré (consommation énergétique excessive par rapport au niveau de dépense). Les enfants nés de parents en surpoids semblent prédisposés à développer eux même un surpoids (Whitaker *et al.*, 1997). Cette observation ne tient pas uniquement dans le fait que les enfants partagent les habitudes hygiéno-diététiques de leurs parents. Des facteurs génétiques peuvent également favoriser le surpoids et l'obésité (Sabin *et al.*, 2011). Quelques mutations monogéniques ont été identifiées comme étant responsables d'une obésité. Ces mutations peuvent entraîner des modifications endocriniennes conduisant à une prise de poids (Hinney *et al.*, 2010). Le clonage du gène de la leptine en 1994 a permis de montrer pour la première fois que la mutation d'un seul gène peut être responsable d'une obésité (Zhang *et al.*, 1994). Ce gène a été découvert chez les souris obèses *ob/ob* qui présentent une mutation hétérozygote du gène de la leptine (*Ob*). Un traitement adapté dans certaines situations permet d'améliorer le pronostic. Ainsi, Farooqi a décrit le cas d'une jeune fille de 9 ans qui présentait une mutation homozygote du gène de la leptine et des taux plasmatiques indétectables de cette

hormone. Cette jeune fille a été traitée par des injections sous-cutanées de leptine recombinante pendant plus d'un an, ce qui a permis une perte de poids et de graisse significative (Farooqi *et al.*, 1999). Rankinen *et al.*, en établissant la « carte des gènes de l'obésité », ont référencé plus de 600 gènes ou loci associés à l'obésité (Rankinen *et al.*, 2006). Néanmoins, le plus souvent, la prédisposition génétique à l'obésité est polygénique (Hinney *et al.*, 2010). Trente-deux loci ont été associés à des variations de l'IMC dont certains jouent un rôle important dans la balance énergétique contrôlée par l'hypothalamus (*at MC4R, POMC, SH2B1, BDNF*) (Speliotes *et al.*, 2010). Cependant, la part de l'obésité expliquée par la génétique reste faible (Poston, 2012). Il est maintenant reconnu que des événements survenant pendant la période périconceptionnelle, au cours du développement embryonnaire et fœtal, et dans la petite enfance influencent le développement à long terme et sont responsables d'obésité (Gluckman *et al.*, 2010). Ce constat s'inscrit dans le concept « d'origine développementale des maladies de l'adulte (DOHAD) » qui sera détaillé plus longuement dans la seconde partie de la thèse.

**Le surpoids et l'obésité ont donc une étiologie multifactorielle, principalement liée au mode de vie, au patrimoine génétique et à la programmation périconceptionnelle.**

## B) Obésité abdominale et syndrome métabolique

### 1- Paramètres anthropométriques

La mesure de l'IMC qui est couramment utilisée comme indicateur de l'obésité, ne permet pas de différencier la masse maigre et la masse grasse et ne tient pas compte de la répartition des graisses dans l'organisme (Akpinar *et al.*, 2007). La répartition de la masse grasse est cependant un critère important à prendre en compte dans l'évaluation des comorbidités associées à l'obésité.

Le tissu adipeux est localisé dans différents compartiments du corps humain et sa distribution dépend d'un certain nombre de facteurs tels que le sexe, l'âge, l'ethnie, le phénotype, l'alimentation et l'activité physique de l'individu (Shuster *et al.*, 2012). Le tissu adipeux peut être divisé en deux compartiments métaboliques : le tissu adipeux périphérique ou sous-cutané et la graisse viscérale. L'obésité abdominale est caractérisée par une augmentation du tissu adipeux entourant les organes intra abdominaux (graisse viscérale) et se

traduit par une augmentation du tour de taille. Le tour de taille (TT) et le rapport de la circonférence de la taille sur la circonférence au niveau des hanches (TT/TH) sont de bons indicateurs pour évaluer l'obésité abdominale. Ils ont été corrélés aux risques de comorbidités associés à l'obésité (Ashwell *et al.*, 2012). Si le tissu adipeux se situe principalement au niveau abdominal, la répartition des graisses est dite « androïde » et elle est associée à un risque plus important de maladies métaboliques que lorsque que la répartition est « gynoïde » (au niveau des hanches).

Dans une méta-analyse de 9 études de cohortes, incluant 82864 patients, il a été montré que la mesure de l'obésité abdominale évaluée par le TT ou le TT/TH était associée à une augmentation du risque de décès d'origine cardio-vasculaire, alors que la mesure de l'IMC ne l'était pas (Czernichow *et al.*, 2011).

D'autres techniques que les mesures anthropométriques ont été développées pour évaluer l'obésité abdominale (Shuster *et al.*, 2012).

*La tomодensitométrie et l'IRM (imagerie par résonance magnétique)* sont les méthodes de référence pour l'évaluation quantitative de l'obésité abdominale (Seidell *et al.*, 1990).

La tomодensitométrie, en mesurant l'absorption des rayons X par les tissus, évalue directement l'accumulation de graisse viscérale. Elle est exprimée en unité Hounsfield (HU). Le tissu adipeux est défini par des valeurs allant de -250 à -30 HU. Le volume du tissu adipeux est mesuré en voxel et traduit en cm<sup>3</sup>. La mesure peut se faire sur une ou plusieurs coupes. Si la coupe unique réduit les coûts et l'exposition aux radiations, elle est moins précise pour une analyse volumétrique.

L'IRM qui utilise les champs magnétiques est aussi une bonne méthode pour étudier l'obésité abdominale. L'utilisation de plusieurs coupes est préférable.

Bien que ces deux techniques soient les méthodes de référence pour évaluer la composition corporelle, leur utilisation est limitée par leur coût et la nécessité d'un personnel qualifié.

Ces deux méthodes sont de plus inadaptées aux patients souffrant d'une obésité morbide car le diamètre des appareils est souvent trop étroit (Shuster *et al.*, 2012).

*L'absorptiométrie biphotonique à rayon X (Dual energy X-ray ou DXA)* est une autre méthode de référence dans l'étude de la composition corporelle (Hill *et al.*, 2007). Elle consiste à balayer l'ensemble du corps avec un faisceau de rayons X à deux niveaux d'énergie. Le rapport des atténuations de ces deux rayonnements est fonction de la

composition de la matière traversée. Cette technique permet de séparer trois compartiments (masse grasse, masse maigre et contenu minéral osseux) par un traitement informatique des mesures physiques. Le balayage du corps entier et le traitement d'images permettent une approche régionale des trois compartiments mesurés. Néanmoins, cette méthode ne permet qu'une estimation de la graisse viscérale et ne différencie pas le tissu adipeux périphérique de la graisse viscérale (Shuster *et al.*, 2012). Elle nécessite également un appareillage coûteux et volumineux. Si le balayage de l'individu est relativement rapide (10 minutes maximum), l'interprétation des images demande une certaine habitude.

*L'impédancemétrie bioélectrique* est fondée sur une différence de résistance mesurée après le passage d'un courant électrique à travers les masses maigres et grasses de l'organisme. C'est une méthode simple (utilisation d'un appareil de type "balance"), rapide, sans danger et peu onéreuse pour évaluer l'adiposité d'un individu. Cependant, les résultats manquent quelque peu de spécificité et de précision car seule la masse maigre est quantifiée alors que la masse grasse est calculée à partir de la quantité de masse maigre. De plus, la mesure de la masse maigre est influencée par l'hydratation de l'individu (Kyle *et al.*, 2004).

*L'échographie* est une autre méthode valable pour estimer rapidement le tissu adipeux sous-cutané et viscéral, mais la reproductibilité et la précision ne sont pas parfaites (Bellisari *et al.*, 1993). De plus, les résultats sont très opérateurs dépendants.

## 2- Syndrome métabolique

L'obésité abdominale est une des caractéristiques principales du syndrome métabolique qui se traduit par une anomalie de fonctionnement du tissu adipeux (Despres et Lemieux, 2006). Le syndrome métabolique se définit par la combinaison de désordres qui, lorsqu'ils sont associés, augmentent le risque de maladies cardiovasculaires, de diabète de type 2 et entraînent une mortalité plus importante. Différentes définitions ont été proposées. « L'international Diabetes Federation » tient compte des spécificités ethniques (**Tableaux 4 a et b**) (Alberti *et al.*, 2005).



### 3- Le « syndrome de l'obésité à poids normal »

L'obésité abdominale, même en cas d'IMC normal, est associée à une prévalence plus élevée de syndrome métabolique (Goodpaster *et al.*, 2005). Une étude japonaise longitudinale a récemment montré que l'évaluation de l'obésité abdominale par tomodensitométrie est un bon outil pronostic du risque individuel de développer un syndrome métabolique, même chez les individus ayant un IMC  $< 25 \text{ kg.m}^{-2}$  (Nakao *et al.*, 2012). Ainsi, les individus "métaboliquement obèses mais de poids normal" sont susceptibles de développer des comorbidités liées à l'obésité telles qu'une résistance à l'insuline, une hyperinsulinémie, des dyslipidémies et éventuellement des maladies cardiovasculaires (Karelis *et al.*, 2004). Un état pro inflammatoire et une augmentation du stress oxydatif systémique pourraient être impliqués dans la genèse de ces complications (De Lorenzo *et al.*, 2007; Di Renzo *et al.*, 2010).

### **III. Relation entre paramètres anthropométriques, métabolisme et fertilité**

#### A) Introduction

Les effets délétères du surpoids et de l'obésité sur les fonctions de reproduction de la femme sont bien documentés et ont été largement publiés avec une fréquence importante de dysoovulations et de cycles irréguliers (Rich-Edwards *et al.*, 1994; Zain et Norman, 2008). Des études épidémiologiques ont aussi mis en évidence que les délais nécessaires à concevoir étaient allongés chez les femmes présentant un IMC  $> 25 \text{ kg.m}^2$  (Balen et Anderson, 2007; Zain et Norman, 2008). L'obésité abdominale contribue de façon importante aux désordres observés.

Bien que ces données sur les fonctions de reproduction de la femme obèse, soient connues depuis longtemps, ce n'est que récemment que l'intérêt s'est porté sur les conséquences d'un IMC élevé sur la fertilité masculine.

## B) IMC et fonctions de reproduction masculine

### 1- IMC et fertilité

Des études de cohortes de grande envergure ont établi un lien entre un IMC élevé et un risque accru d'infertilité masculine. L'étude réalisée sur 47835 couples inclus dans le registre danois de la cohorte nationale des naissances entre 1996 et 2002, met en évidence qu'un couple a plus de risque de rencontrer des problèmes de fertilité si ses deux membres sont obèses (Ramlau-Hansen *et al.*, 2007b). Une étude rétrospective exploitant la base de données du registre norvégien des naissances entre 1999 et 2005, montre qu'en cas d'IMC élevé (25-29,9 kg/m<sup>2</sup>) ou très élevé (30-34,9 kg/m<sup>2</sup>) chez l'homme, le délai nécessaire à concevoir est plus long et les couples ont plus de risque d'avoir recours à l'AMP (Nguyen *et al.*, 2007). Aux Etats Unis, grâce à l'étude « Agricultural Health study », Sallmen *et al* ont fait la même constatation : ils ont mis en évidence un risque plus important d'infertilité masculine quand l'IMC est élevé (Sallmen *et al.*, 2006).

Malgré certaines limites et de nombreux biais, ces études de cohortes ont attiré l'attention sur un autre aspect des comorbidités associées au surpoids et à l'obésité. Des équipes ont alors étudié l'impact du surpoids et de l'obésité sur les paramètres spermatiques, marqueurs facilement accessibles de la fertilité masculine.

### 2- IMC et paramètres spermatiques

La grande majorité des études a été publiée à partir de 2010 et est caractérisée par l'hétérogénéité des populations étudiées et la diversité des effectifs. Même si quelques études n'ont pas réussi à établir de lien entre l'IMC des hommes et les paramètres spermatiques (Aggerholm *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009b; Duits *et al.*, 2010; Relwani *et al.*, 2011; Rybar *et al.*, 2011), la plupart ont mis en évidence une altération des paramètres spermatiques corrélée à l'augmentation de l'IMC. Une diminution de la concentration ou de la numération totale en spermatozoïdes est le plus souvent observée (Jensen *et al.*, 2004; Hammoud *et al.*, 2008; Chavarro *et al.*, 2010; Martini *et al.*, 2010; Sekhvat et Moein, 2010; Tunc *et al.*, 2011). Des altérations de la mobilité (Martini *et al.*, 2010; Sekhvat et Moein, 2010) et de la morphologie des spermatozoïdes (Jensen *et al.*, 2004; Kort *et al.*, 2006; Shayeb *et al.*, 2011) ont également

été rapportées. La première méta-analyse parue en 2010, fondée sur seulement 5 publications, n'a pas permis de conclure à une association entre l'IMC et les paramètres spermatiques (MacDonald *et al.*, 2010). Depuis, deux nouvelles méta-analyses, intégrant les résultats des études publiées par la suite ont été réalisées. Dans un premier temps, les données de 14 études et de 9779 hommes ont révélé que les hommes en surpoids ou obèses présentaient un risque plus élevé d'oligozoospermie ou d'azoospermie par rapport à ceux ayant un poids normal (Sermondade *et al.*, 2012a). La deuxième méta-analyse recensait 21 études correspondant à 13077 hommes. Une association suivant une courbe en J a été observée entre l'IMC des hommes et le risque de présenter une oligozoospermie (numération spermatique inférieure à 40 million/ml) (Sermondade *et al.*, 2013b).

**Nous disposons donc d'études épidémiologiques en faveur d'un impact du surpoids et de l'obésité sur la production spermatique.**

### 3- IMC et intégrité de l'ADN du noyau des spermatozoïdes

Le surpoids et l'obésité pourraient aussi avoir un impact négatif sur l'intégrité de l'ADN du noyau spermatique.

Le rapport entre l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes et l'IMC des hommes a été étudié. Les résultats publiés n'ont cependant pas permis d'établir un consensus. (**Tableau 5**). La première étude menée par Kort *et al.* à partir de 520 hommes a rapporté une augmentation de l'indice de fragmentation de l'ADN déterminé par la technique SCSA chez les patients en surpoids et obèses (Kort *et al.*, 2006). Avec la méthode COMET assay, Chavarro *et al.* et Fariello *et al.* ont observé une altération de l'ADN des spermatozoïdes chez les hommes obèses uniquement (Chavarro *et al.*, 2010; Fariello *et al.*, 2012). Avec la méthode TUNEL, La Vignera a fait la même constatation (La Vignera *et al.*, 2012). Enfin, Tunc *et al.*, Hammiche *et al.* et Rybar *et al.*, en utilisant respectivement la technique TUNEL et la méthode SCSA, n'ont pas retrouvé d'association entre l'IMC et l'intégrité de l'ADN spermatique ; cependant leurs études ne concernaient que de faibles effectifs (Hammiche *et al.*, 2011; Rybar *et al.*, 2011; Tunc *et al.*, 2011). D'autres études sont donc indispensables pour conclure ou non à l'impact du surpoids et de l'obésité sur l'intégrité de l'ADN spermatique.

Référence	Population étudiée	n	Technique	Résultat principal
(Kort <i>et al.</i> , 2006)	Hommes de couples infertiles	520	SCSA	Le taux de fragmentation est significativement plus élevé chez les hommes obèses ou en surpoids par rapport à celui des hommes de poids normal
(Chavarro <i>et al.</i> , 2010)	Hommes de couples infertiles	483	COMET	
(Fariello <i>et al.</i> , 2012)	Hommes de couples infertiles	305	COMET	Le taux de fragmentation est significativement plus élevé chez les hommes obèses par rapport à celui des hommes de poids normal
(La Vignera <i>et al.</i> , 2012)	Hommes non fumeurs en bonne santé	150	TUNEL (CMF)	
(Hammiche <i>et al.</i> , 2011)	Hommes de couples pris en charge en FIV/ICSI	175	SCSA (CMF)	
(Rybar <i>et al.</i> , 2011)	Hommes de couples infertiles	153	SCSA	Pas d'association entre l'IMC et la fragmentation
(Tunc <i>et al.</i> , 2011)	Hommes de couples infertiles	81	TUNEL (MF)	

**Tableau 5.** Principales publications évaluant l'impact de l'IMC masculin sur l'intégrité de l'ADN spermatique

#### 4- IMC et capacité fécondante des spermatozoïdes

Un nombre suffisant de spermatozoïdes, une mobilité adéquate ou un noyau intact sont nécessaires mais non suffisants pour que la fécondation se fasse correctement. Comme décrit précédemment, entre le moment où les spermatozoïdes sont déposés dans le vagin et celui où ils fécondent l'ovocyte, un certain nombre d'étapes, telles que la capacitation, la réaction acrosomique, la liaison à la zone pellucide et la fusion gamétique se déroulent. Le surpoids et l'obésité pourraient avoir un impact sur le bon déroulement de ces étapes mais également sur le développement embryonnaire.

Quelques données chez l'animal montrent qu'un régime hyperlipidique ou obésogène altérerait le pouvoir fécondant des spermatozoïdes. Chez des souris soumises à un régime

hyperlipidique, il a été observé en plus des altérations des paramètres spermatiques (mobilité, intégrité du noyau), une diminution de la fixation des spermatozoïdes à la zone pellucide associée à des taux de fécondation plus faible (Bakos *et al.*, 2011b).

Chez le lapin, une hypercholestérolémie induite par l'alimentation, a pour conséquence une altération de certains paramètres spermatiques (volume, mobilité, morphologie) et une altération de la composition en cholestérol de la membrane des spermatozoïdes. L'altération de la membrane spermatique est probablement responsable de la diminution de la capacitation et de la capacité des spermatozoïdes à réaliser leur réaction acrosomique (Saez Lancellotti *et al.*, 2010).

Peu d'études existent chez l'homme, mais il a été mis en évidence une association négative entre l'IMC et la capacité des spermatozoïdes à se fixer à l'acide hyaluronique (Wegner *et al.*, 2010). Ce test permet une évaluation indirecte de la capacité des spermatozoïdes à se lier à la zone pellucide, donc à féconder l'ovocyte.

Ces résultats constituent néanmoins un niveau de preuve insuffisant pour conclure à l'impact de l'IMC sur la capacité fécondante des spermatozoïdes.

## 5- IMC et assistance médicale à la procréation

L'étude de l'impact de l'IMC masculin sur les taux de fécondation en FIVc pourrait permettre de voir si le pouvoir fécondant des spermatozoïdes est modifié par le surpoids ou l'obésité. En effet, la pratique de la FIV permet d'avoir accès aux gamètes féminins et masculins, puis aux embryons jusqu'au 5<sup>ème</sup> jour. Il est donc possible d'analyser les capacités fécondantes de spermatozoïdes et le développement embryonnaire en fonction de l'IMC masculin (**Tableau 6**).

Bakos *et al.*, en analysant 305 cycles de FIV ou d'ICSI, n'ont pas observé d'impact de l'IMC masculin sur le développement embryonnaire précoce. Ils ont cependant observé une décroissance linéaire du taux de formation de blastocystes (de 29% pour les hommes ayant un IMC normal, à 19% chez les hommes présentant une obésité morbide ( $>35\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$ ), associée à une décroissance des taux de grossesse (de 46% à 15%) et de naissance vivante (de 41% à 12%) chez les couples dont l'homme avait un IMC élevé (Bakos *et al.*, 2011a). Plus récemment, une autre équipe a retrouvé un impact de l'IMC de l'homme, indépendamment de

l'IMC de leur conjointe, sur la qualité embryonnaire et les taux de grossesse après FIVc ou ICSI (Anifandis *et al.*, 2013). D'après le registre national danois des naissances (12490 couples), l'augmentation des IMC féminin et masculin indépendamment ou associés influencerait les taux de naissance après FIVc. L'impact ne serait pas aussi évident après ICSI (Petersen *et al.*, 2013). De même, Keltz *et al.* ont retrouvé un effet défavorable d'un IMC masculin élevé sur les chances de grossesses en FIVc, mais pas en ICSI (Keltz *et al.*, 2010). En revanche, Colaci *et al.* ont observé un impact négatif de l'IMC masculin sur les chances d'avoir une naissance vivante après ICSI, mais pas après FIVc. Malgré des taux de fécondation plus élevés observés chez les hommes obèses, cette équipe n'avait pas retrouvé d'impact de l'IMC masculin sur la qualité embryonnaire au 3<sup>ème</sup> jour (Colaci *et al.*, 2012). En ne s'intéressant qu'aux issues d'ICSI réalisées avec des spermatozoïdes prélevés chirurgicalement (TESE) dans un contexte d'azoospermie non obstructive, Ramasamy *et al.* ont mis en évidence une diminution des chances de grossesse si les patients étaient en surpoids ou obèses (Ramasamy *et al.*, 2013).

Auteurs	cycles	FIV		ICSI	
		↗ IMC ♂			
(Keltz <i>et al.</i> , 2010)	282	n=73	↘ grossesses cliniques	n=209	Pas d'impact sur grossesses cliniques
(Bakos <i>et al.</i> , 2011a)	305	- Pas d'impact de sur le développement embryonnaire précoce. ↘ formation blastocystes ↘ taux de grossesse ↘ naissances vivantes			
(Colaci <i>et al.</i> , 2012)	172	- ↗ taux de fécondation. - Pas d'impact sur le développement et la qualité embryonnaire, ni sur les taux de grossesse et d'accouchement		- ↘ naissances vivantes	
(Ramasamy <i>et al.</i> , 2013)	250			TESE : ↘ chances de grossesse (azoospermie non obstructive)	
(Anifandis <i>et al.</i> , 2013)	301	- Impact sur la qualité embryonnaire et les taux de grossesse			
(Petersen <i>et al.</i> , 2013)	1906	- ↘ naissances vivantes		Tendance	

**Tableau 6.** Principales publications évaluant l'impact de l'IMC masculin sur les issues de FIV-ICSI.

## **La littérature concernant l'impact du poids des hommes partenaires de couples pris en charge en FIV ou ICSI, ne permet pas d'établir de consensus sur les chances de succès**

### C- Obésité abdominale, syndrome métabolique et fertilité

Si il existe maintenant de nombreuses données sur la relation entre l'IMC et les fonctions de reproduction masculines, peu d'études ont évalué l'impact de l'obésité abdominale sur les paramètres ou les fonctions spermatiques.

#### 1- Obésité abdominale et paramètres spermatiques

Seules 2 études ont établi un lien entre les paramètres spermatiques conventionnels et l'obésité abdominale évaluée par la mesure du tour de taille (Fejes *et al.*, 2005; Hammiche *et al.*, 2012). Fejes *et al.* ont observé un impact négatif du tour de taille sur la concentration et la mobilité spermatique (Fejes *et al.*, 2005). Plus récemment, Hammiche *et al.* ont montré que les patients ayant un tour de taille  $\geq 102$  cm avaient un risque accru d'altération de la concentration spermatique et une diminution du nombre total de spermatozoïdes mobiles (Hammiche *et al.*, 2012).

#### 2- Dyslipidémies, syndrome métabolique et paramètres spermatiques

Une étude parue en 1989 a mis en évidence une altération des paramètres spermatiques chez un faible effectif d'hommes (N= 19) qui souffraient d'une hyperlipoprotéïnémie. Il a également été observé que les déséquilibres lipidiques étaient plus fréquents chez les patients azoospermiques et qu'ils présentaient des taux plus élevés de lipides (Padron *et al.*, 1989). De plus une incidence de 65% de dyslipidémie (hypercholestérolémie et/ou hypertriglycéridémie isolées) a été mise en évidence chez les hommes partenaires de couples infertiles (Ramirez-Torres *et al.*, 2000).

Il a récemment été observé que les patients présentant un syndrome métabolique avaient des paramètres spermatiques altérés. La concentration spermatique, la mobilité, la vitalité, le potentiel de membrane mitochondrial et l'intégrité de l'ADN étaient concernés (Kasturi *et al.*, 2008; Leisegang *et al.*, 2012).

Dans une autre étude, il n'a pas été retrouvé d'association entre les triglycérides sériques et la concentration et la mobilité spermatique. En revanche, un impact négatif d'une hypertriglycéridémie sur la morphologie spermatique a été montrée (Hagiuda *et al.*, 2012).

## D) Mécanismes

### 1- Déséquilibre hormonal

#### a. Axe hypothalamo-hypophyso-gonadique

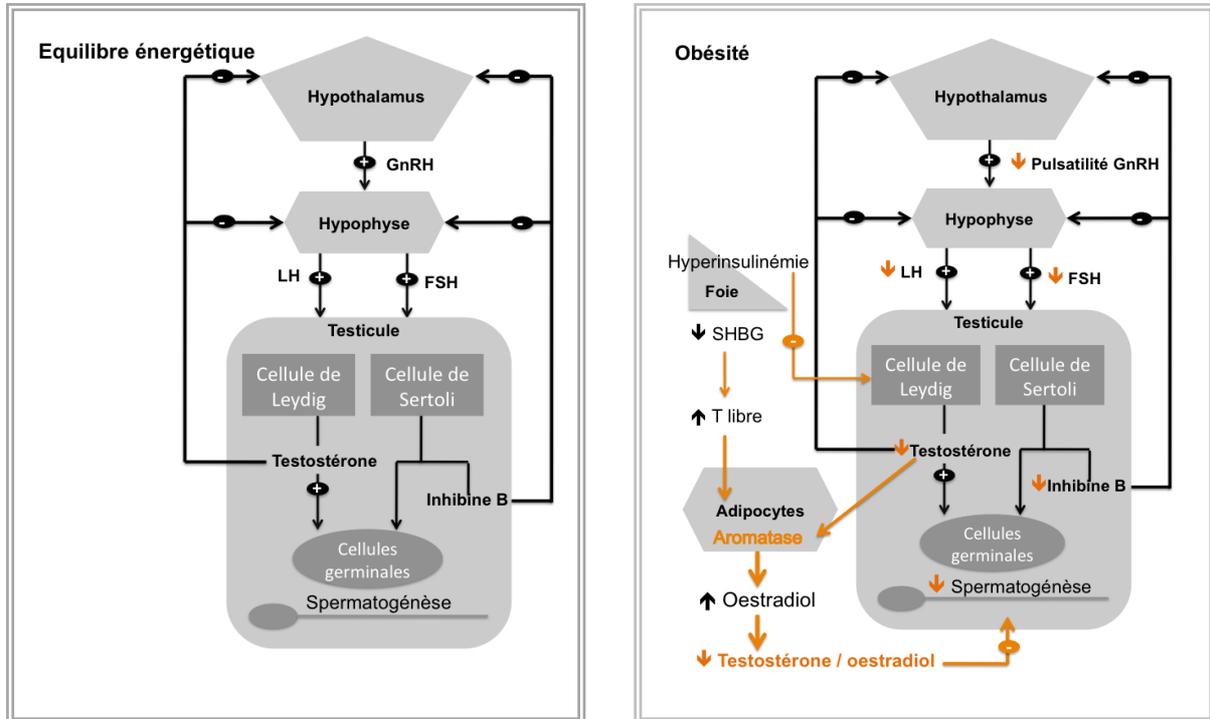
Les hommes en surpoids et obèses présentent souvent un profil hormonal altéré. Une diminution des concentrations sériques de testostérone (libre et totale)(Fejes *et al.*, 2005; Chavarro *et al.*, 2010), de FSH, de LH associée à une augmentation de l'œstradiol est généralement décrite (Teerds *et al.*, 2011; Hammiche *et al.*, 2012). Une diminution de l'inhibine B (Jensen *et al.*, 2004; Aggerholm *et al.*, 2008; Chavarro *et al.*, 2010) et de l'AMH (Robeva *et al.*, 2012) qui sont des marqueurs de la fonction sertolienne est également observée (**Figure 3**).

- La pulsatilité de la GnRH, indispensable à des fonctions de reproduction normales, dépend d'une balance énergétique équilibrée. Une altération des sécrétions de FSH et de LH a un impact sur les fonctions des cellules de Sertoli et de Leydig. La production de spermatozoïdes et de stéroïdes est donc perturbée (Blank *et al.*, 1994; Hammoud *et al.*, 2008).

- La quantité de graisse viscérale est fortement corrélée au rapport testostérone/œstradiol (Gautier *et al.*, 2013). L'activité aromatasase, augmentée en cas d'excès de tissu adipeux, conduit en effet à la conversion accrue de la testostérone en œstradiol dans le tissu adipeux (Bray, 1997), entraînant donc une diminution de la testostérone libre et une augmentation de l'œstradiolémie.

- L'hyperinsulinémie secondaire à l'insulinorésistance observée en cas d'obésité conduit à une diminution de la production de « Sex hormone binding globulin » (SHBG) par le foie (Hautanen, 2000). La diminution de la SHBG entraîne une augmentation de la testostérone libre qui se trouve donc plus disponible pour une conversion en œstradiol. L'insuline aurait également un rôle plus direct sur les fonctions de reproduction. En effet, il a été observé que

l'insulinorésistance est associée à une diminution de la synthèse de testostérone par les cellules de Leydig (Pitteloud *et al.*, 2005).



**Figure 3 :** Obésité et fonctions de reproduction masculine : axe hypothalamo-hypophysogonadique

### b. Adipokines et ghréline

Le tissu adipeux est un organe endocrine actif qui est la source, entre autres, d'adipokines, de cytokines proinflammatoires et de facteurs de croissances. Ces facteurs ont un rôle majeur dans le développement des complications liées à l'obésité (Vazquez-Vela *et al.*, 2008). Les adipocytes sont la source principale de leptine et d'adiponectine alors que les macrophages produisent la résistine (Gnacinska *et al.*, 2009). La ghréline, synthétisée par l'estomac, agit en réseau avec les adipokines. En plus de leur rôle dans la balance énergétique, ces hormones sont impliquées dans les fonctions de reproduction masculine.

#### *Leptine*

La leptine est une cytokine, produit du gène *Ob*, principalement synthétisée et sécrétée par les adipocytes. La concentration plasmatique en leptine reflète l'état des réserves sous forme de

tissu adipeux présentes dans l'organisme ; cette hormone intervient dans la régulation de la prise alimentaire et des dépenses énergétiques (Djiane et Attig, 2008). La leptine joue aussi un rôle essentiel dans les fonctions de reproduction. Les souris *ob/ob*, chez qui le gène *Ob* a été découvert et cloné pour la première fois (Zhang *et al.*, 1994), présentent un développement de l'arbre reproductif altéré avec des taux de gonadotrophines diminués ainsi qu'une absence de maturation sexuelle (Donato *et al.*, 2011).

La leptine est indispensable à l'initiation de la puberté chez la fille et chez le garçon. Chez le garçon, un pic de leptine précède la puberté et l'augmentation des concentrations sériques de testostérone libre totale (Mantzoros *et al.*, 1997).

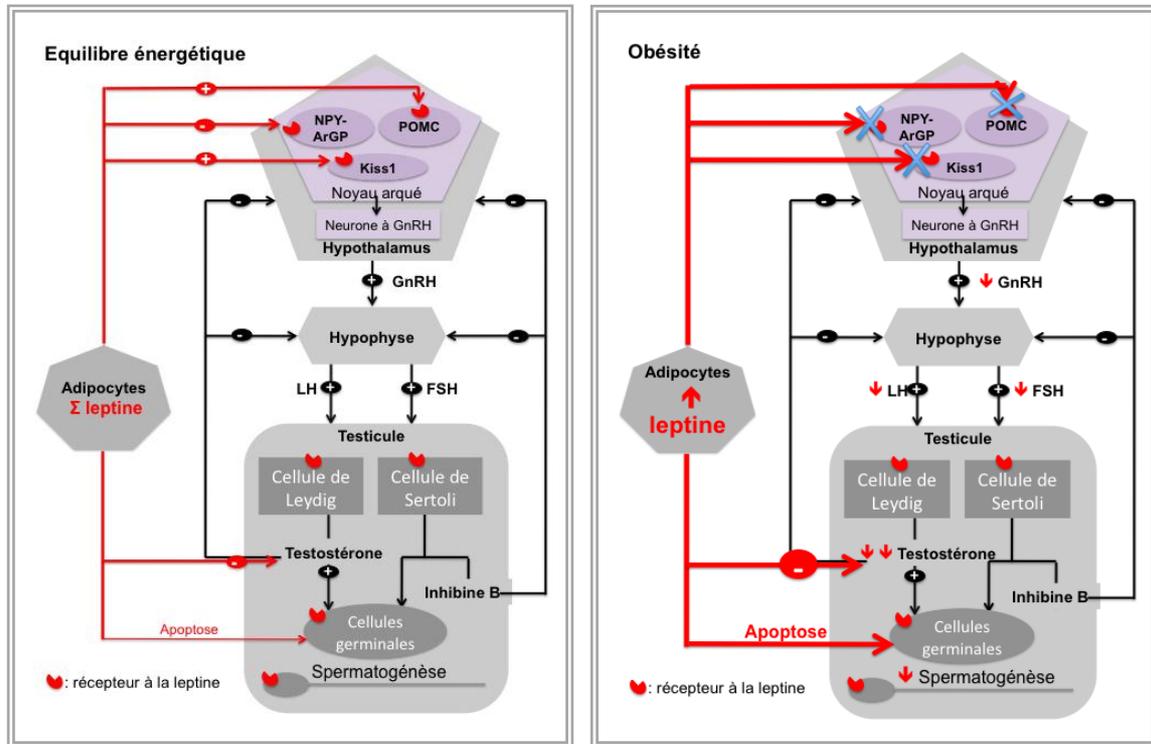
La leptine a un impact sur les fonctions de reproduction au niveau central et au niveau local (**Figure 4**).

- Au niveau central, la leptine a une action stimulatrice de la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus : par conséquent elle stimule la sécrétion de LH et de FSH par l'hypophyse. La leptine n'a pas d'action directe sur les neurones à GnRH car ceux-ci ne présentent pas de récepteurs à la leptine ; en revanche, la leptine régule des neurones du noyau arqué qui émettent des projections vers les neurones à GnRH. Les neurones NPY (neuropeptide Y)/AgRP (agouti-related protein) et les neurones POMC (proopiomélanocortine) sont respectivement inhibés et stimulés par la leptine. La leptine régule aussi indirectement la sécrétion de gonadotrophines en modulant la sécrétion de kisspeptine par les neurones Kiss 1, également présents dans le noyau arqué (Donato *et al.*, 2011; Landry *et al.*, 2013).

- La leptine est capable de traverser la barrière hémato-testiculaire et agit ainsi directement sur les fonctions testiculaires : il existe des récepteurs membranaires à la leptine sur les cellules de Leydig, les cellules de Sertoli, les cellules germinales et les spermatozoïdes matures. (Tena-Sempere, 2007; Lampiao et du Plessis, 2008; Hofny *et al.*, 2010). Il a été montré *in vitro* chez le rat que la leptine réduit significativement la sécrétion de testostérone par le testicule (Tena-Sempere *et al.*, 1999). De plus, la leptine est impliquée dans les phénomènes d'apoptose. Les souris *ob/ob* chez qui la spermatogenèse est altérée, présentent une augmentation de l'apoptose des cellules germinales et une surexpression de gènes pro-apoptotiques au niveau testiculaire (Bhat *et al.*, 2006). La leptine est retrouvée dans le plasma séminal, mais son implication dans la mobilité spermatique, la capacitation ou la réaction acrosomique est cependant controversée (Lampiao et du Plessis, 2008; Li *et al.*, 2009a).

Chez les hommes obèses (**Figure 4**), on retrouve une association entre les concentrations sériques de leptine circulante et les fonctions testiculaires (Zorn *et al.*, 2007). Les taux de leptine sont inversement corrélés à la testostérone totale libre (même après ajustement avec

SHBG, LH et E2) (Isidori *et al.*, 1999). Il a, de plus, été trouvé que les concentrations sériques de leptine sont plus élevées chez les hommes obèses infertiles que chez les hommes obèses fertiles (Hofny *et al.*, 2010).



**Figure 4 :** Obésité et fonctions de reproduction masculine : rôle de la leptine

La surproduction de leptine conduit à une résistance à la leptine au niveau hypothalamo-hypophysaire qui contribue largement à l’hypogonadisme-hypogonadotrope (Isidori *et al.*, 1999). Plusieurs mécanismes pourraient être responsables de cette résistance : la saturation du transport de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique, une incapacité des récepteurs à conduire le signal ou même une dégradation des récepteurs.

La barrière hémato-testiculaire n’est, en revanche, pas concernée par la résistance à la leptine : un excès de leptine va ainsi aggraver le déficit en testostérone en agissant localement (Landry *et al.*, 2013) et conduire à une altération de la spermatogénèse.

### Ghréline

La ghréline, purifiée pour la première fois en 1999 (Kojima *et al.*, 1999), est un peptide sécrété majoritairement par le fundus de l’estomac. C’est une hormone orexigène ayant une

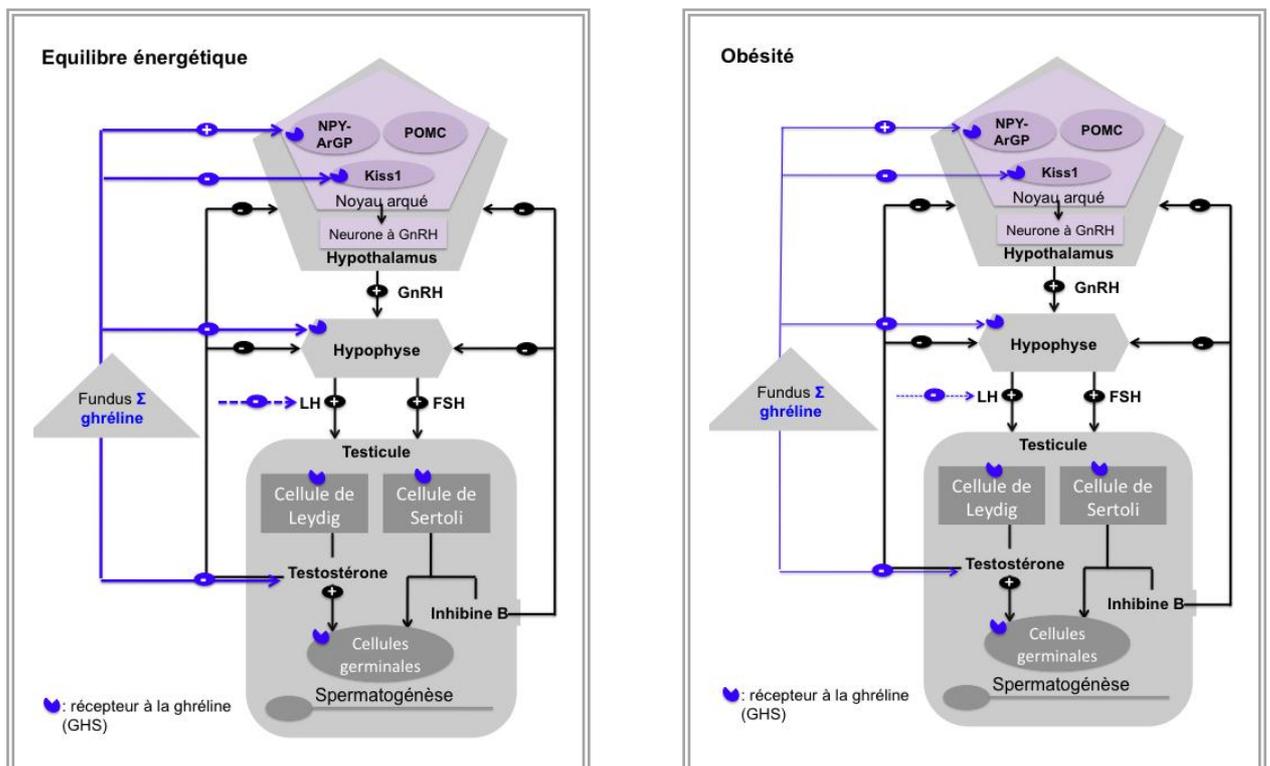
action hypothalamique : elle active les neurones NPY/AgRP du noyau arqué et inhibe l'expression du gène Kiss-1 (Nakazato *et al.*, 2001).

Les taux de ghréline sont plus bas chez les patients obèses, mais il n'existe *a priori* pas de résistance à cette hormone. Néanmoins, chez les hommes obèses, la diminution post prandiale de ghréline est atténuée, n'entraînant donc pas de sensation de satiété (Cummings *et al.*, 2002; Druce *et al.*, 2005).

Concernant les fonctions de reproduction, la ghréline a une action centrale et une action locale gonadique (**Figure 5**).

- Au niveau hypothalamique, les récepteurs de la ghréline (GHS receptor : growth hormone secretagogue receptor) sont fortement exprimés. La ghréline inhibe la sécrétion de GnRH, et par conséquent celle de FSH, de LH. La ghréline a également un impact direct au niveau hypophysaire, où elle inhibe la sécrétion de LH induite par la GnRH (Tena-Sempere, 2007).

- Au niveau périphérique, la ghréline a un effet direct sur les gonades (Tena-Sempere, 2007). Il existe des récepteurs (GHS-R1a) sur les cellules de Leydig matures, les cellules de Sertoli et les cellules germinales (Tena-Sempere, 2007). La ghréline a essentiellement une action inhibitrice de la sécrétion de testostérone.



**Figure 5** : Obésité et fonctions de reproduction masculine : rôle de la ghréline

La leptine et la ghréline agissent en réseau avec des actions plutôt opposées. Dans les conditions physiologiques, au niveau central, la leptine agirait plutôt comme un stimulateur de la sécrétion des gonadotrophines et serait un déclencheur de la puberté, alors que la ghréline aurait plutôt un effet inhibiteur en ce qui concerne la sécrétion de LH et le début de la puberté. Au niveau gonadique, la leptine et la ghréline ont toutes les deux un effet inhibiteur sur la sécrétion de testostérone.

### *Adiponectine et résistine*

L'adiponectine et la résistine sont des adipokines sécrétées par le tissu adipeux blanc. L'adiponectine intervient dans le métabolisme lipidique et glucidique. Cette hormone est sensible à l'insuline : elle agit en diminuant la production de glucose hépatique et en augmentant l'action de l'insuline dans le foie. L'adiponectine est inversement corrélée au risque de diabète, indépendamment de l'IMC (Gil-Campos *et al.*, 2004; Reverchon *et al.*, 2013). Bien qu'elle soit produite par le tissu adipeux, elle est inversement corrélée à la quantité de graisse viscérale, probablement à cause d'un rétrocontrôle négatif (Psilopanagioti *et al.*, 2009).

La résistine, tend à induire un état d'insulinorésistance. Chez l'homme, elle semble être produite par les cellules de la moelle osseuse et les macrophages, puis être transportée ensuite jusqu'au tissu adipeux (Kaser *et al.*, 2003; Patel *et al.*, 2003). Les mécanismes d'action et les récepteurs impliqués sont à ce jour peu décrits.

L'adiponectine et la résistine ont un impact sur les fonctions de reproduction au niveau central et au niveau local.

- Au niveau central, l'adiponectine est retrouvée dans l'hypothalamus et l'hypophyse. Elle se fixe aux récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 principalement localisés au niveau musculaire et hépatique, mais également au niveau hypothalamo-hypophysaire (Psilopanagioti *et al.*, 2009; Reverchon *et al.*, 2013). Elle inhiberait la sécrétion de la GnRH, entre autres via l'inhibition du gène Kiss1. Au niveau hypophysaire, l'adiponectine inhiberait la sécrétion de la LH (Reverchon *et al.*, 2013).

La résistine est exprimée au niveau hypothalamique et hypophysaire. Son rôle au niveau central est encore mal connu, mais elle modifierait l'expression des récepteurs à l'adiponectine.

- L'adiponectine et la résistine sont également présentes au niveau testiculaire. Elles peuvent être produites localement ou provenir de la circulation générale. Il a été montré chez le rat que l'adiponectine est essentiellement présente dans les cellules de Leydig et que les récepteurs sont présents dans les tubes séminifères (Caminos *et al.*, 2008). Chez le rat, la résistine est localisée dans les cellules de Leydig et les cellules de Sertoli. Le jeûne, les gonadotrophines et la leptine régulent son expression (Nogueiras *et al.*, 2004). Des études *in vitro* chez le rongeur ont montré que l'adiponectine inhibe la production de testostérone, alors que la résistine aurait tendance à en augmenter la production (Nogueiras *et al.*, 2004; Caminos *et al.*, 2008).

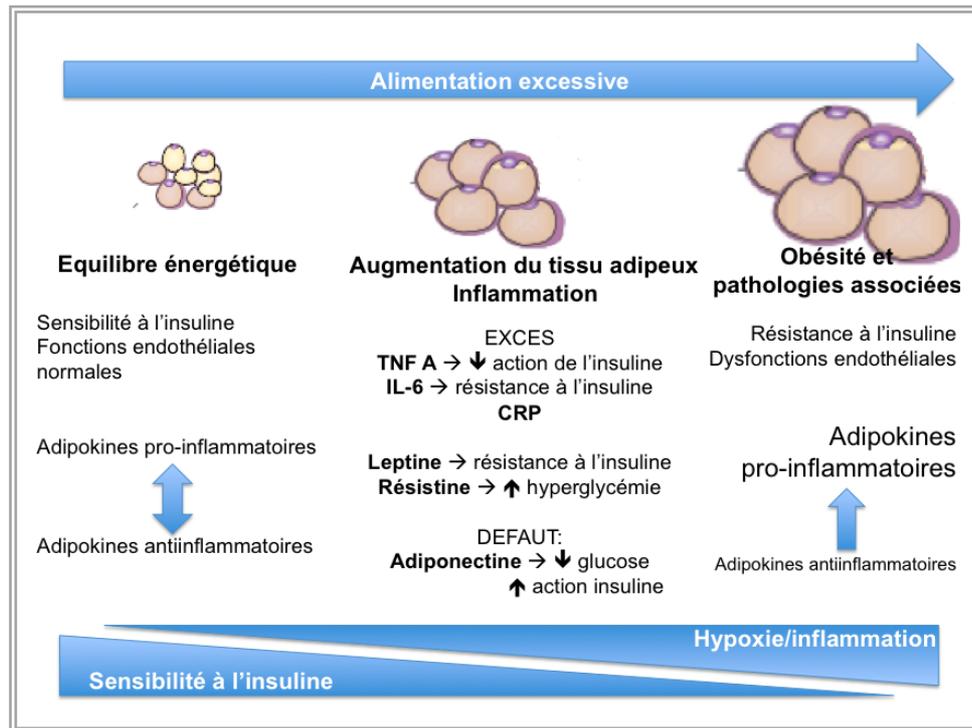
**La leptine, la ghréline, l'adiponectine et la résistine qui sont impliquées dans le métabolisme énergétique ont également une action sur les fonctions de reproduction masculine par leur action au niveau hypothalamo-hypophysaire, ou directement au niveau testiculaire. Les concentrations plasmatiques de ces hormones sont perturbées en cas de surpoids et d'obésité. Elles jouent donc un rôle prépondérant dans l'altération des fonctions de reproduction observées chez les hommes dont l'IMC est augmenté.**

## 2- Inflammation

### a. Cytokines inflammatoires

L'obésité est associée à un état inflammatoire systémique chronique "de faible intensité" qui joue un rôle important dans l'étiologie du syndrome métabolique (Monteiro et Azevedo, 2010). La dérégulation du métabolisme lipidique entraîne une hypertrophie des adipocytes qui peuvent ensuite se rompre et conduire à une réaction inflammatoire. L'hyperplasie adipocytaire entraîne également une hypoxie qui provoque une nécrose cellulaire et un relargage de composés qui recrutent des macrophages et déclenchent une réponse inflammatoire. Il existe une forte corrélation entre les marqueurs de l'inflammation systémique (TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha), IL-6 (Interleukine 6), CRP (C-reactive protein)) produits par les adipocytes et la gravité des comorbidités associées à l'obésité.

L'augmentation des concentrations d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  est fortement impliquée dans l'insulinorésistance et les dysfonctions endothéliales (Fève *et al.*, 2006; Gnancinska *et al.*, 2009). L'élévation de ces marqueurs peut prédire la sévérité de l'athérosclérose, du diabète, de l'apnée du sommeil et de la stéatose hépatique indépendamment de l'IMC (O'Rourke, 2009). La leptine et la résistine sont aussi impliquées dans la réponse inflammatoire (Gnancinska *et al.*, 2009). (**Figure 6**).

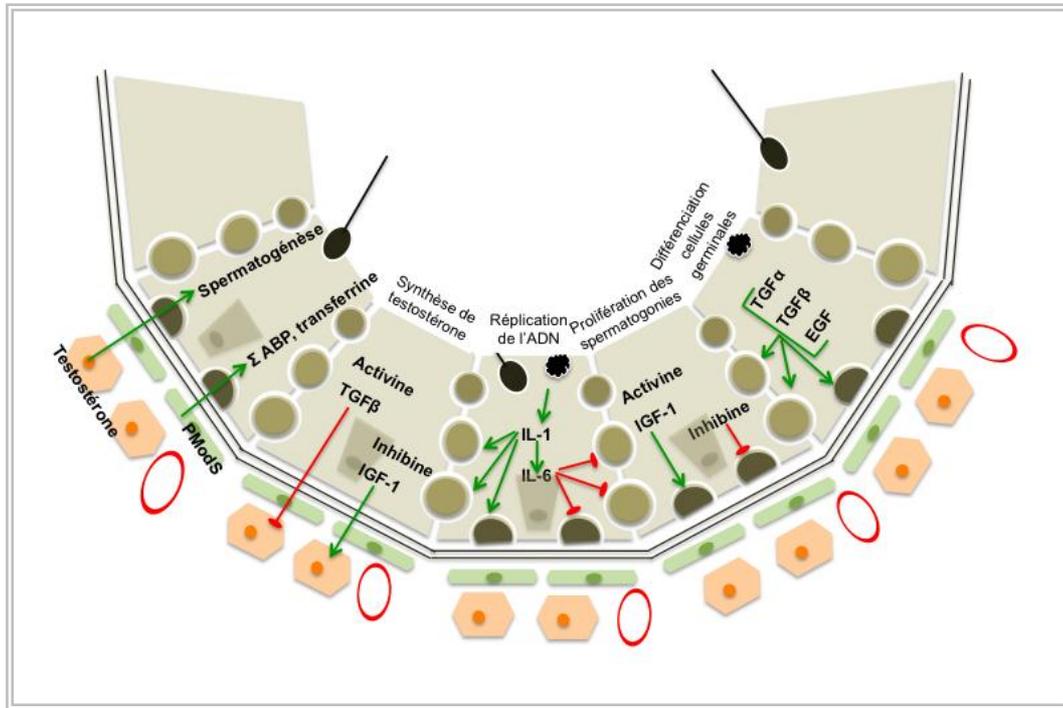


**Figure 6** : Obésité et réponse des adipocytes, rôle de l'inflammation. (Inspiré de C. Dray : *rôle des adipokines dans le métabolisme lipidique, nouvelles pistes* et (Vazquez-Vela *et al.*, 2008)).

## b. Inflammation et fonctions de reproduction masculine

Les cytokines inflammatoires (IL-1a, IL-6, TNF- $\alpha$ , Activine a...) sont indispensables au déroulement de la spermatogénèse normale (O'Bryan et Hedger, 2008). Les cellules de Sertoli vont produire de nombreux facteurs (cytokines et facteurs de croissance) qui vont intervenir dans la multiplication et la différenciation des cellules germinales. Parmi les mieux décrits, l'IL-1 et l'IL-6 jouent un rôle dans la réplication de l'ADN des cellules germinales. L'IGF-1 (Insulin Growth factor 1) et l'activine entraînent la prolifération des spermatogonies alors que l'inhibine inhibe cette prolifération. Le TGF $\beta$  (transforming growth factor bêta) entraîne la division et la différenciation des cellules germinales. Les facteurs de croissance, EGF

(Epidermal growth factor) et  $TGF\alpha$  stimulent la phase méiotique de la spermatogénèse (Jegou et Pineau, 1995). (Annexe 1, p43)



**Figure 7** : Régulation paracrine de la spermatogénèse, rôle de cytokines inflammatoires

En cas d'inflammation locale aiguë ou chronique, l'équilibre de ces cytokines est rompu avec un impact négatif sur les fonctions de reproduction.

L'inflammation chronique systémique liée à l'obésité, peut altérer les fonctions testiculaires à différents niveaux.

- En augmentant l'insulinorésistance, les cytokines proinflammatoires perturbent les fonctions de reproduction masculine.
- Les cytokines pro-inflammatoires altéreraient également la stéroïdogénèse.
- Enfin, L'inflammation aurait un effet direct sur l'épithélium séminifère, compromettant ainsi la spermatogénèse (Hedger, 2011).

De plus les cytokines IL-6 et  $TNF-\alpha$ , stimulent la production d'EOR (Das, 2001) qui impactent directement la spermatogénèse.

### 3- Stress oxydant

#### a. Les espèces oxygénées réactives (EOR)

Les EOR sont des produits hautement réactifs du métabolisme cellulaire et jouent un rôle dans l'homéostasie et la transduction des signaux cellulaires. La respiration mitochondriale représente la principale source d'EOR. Les EOR ont un ou plusieurs électrons non appariés et peuvent modifier les biomolécules qui les entourent. Parmi les EOR, on trouve : l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et l'oxyde nitrique et ses dérivés. Le stress oxydatif provient d'un déséquilibre entre les EOR et les antioxydants dans l'organisme, entraînant des lésions cellulaires. Ce phénomène est impliqué dans de nombreuses affections telles que l'athérosclérose, le cancer, le diabète, des altérations hépatiques, des maladies du système nerveux central et le vieillissement. Le stress oxydant entraîne la détérioration des lipides, des protéines, des acides nucléiques et entraîne la mort cellulaire par apoptose (Ceriello et Motz, 2004).

Un système de défense est présent dans l'organisme sous forme d'enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase (SOD2), catalase (CAT), glutathion peroxydase (GPx1), NADPH, glutathion réductase, glutathion transférase) et de nutriments antioxydants non enzymatiques (glutathion, acide ascorbique,  $\alpha$ -tocophérol, caroténoïdes, polyphénols, flavonoïdes, pyruvate).

Les origines du stress oxydatif sont diverses : iatrogènes, infectieuses, inflammatoires, auto-immunes, environnementales. Concernant le mode de vie, le tabac, l'alcool et une alimentation déséquilibrée entraînent une augmentation systémique du stress oxydant. En cas d'obésité et de dérégulation lipidique, le tissu adipeux relargue des cytokines pro-inflammatoires (Il-6 et TNF- $\alpha$ ) qui stimulent la production d'ERO par les leucocytes (Das, 2001; Singer et Granger, 2007). Il y a également une augmentation de l'activité des mitochondries et de l'utilisation de la chaîne de transport des électrons. Ces mécanismes entraînent aussi une augmentation de la production d'EOR (Rudich *et al.*, 2007; Monteiro et Azevedo, 2010).

#### b. Stress oxydant et fonction de reproduction masculine

Chez l'homme, une faible quantité d'EOR est nécessaire aux spermatozoïdes pour leur permettre d'acquérir leur capacité fécondante (maturation spermatique, capacitation, réaction acrosomique, fusion gamétique) (Tremellen, 2008). Les EOR sont produites par les spermatozoïdes eux même et mais également par les leucocytes présents dans le sperme. Des antioxydants sont présents dans le liquide séminal et ont pour rôle le maintien d'un équilibre.

Des quantités élevées d'ERO dans le sperme ont un impact négatif sur les fonctions spermatiques par deux mécanismes principaux :

- D'une part, les EOR altèrent la membrane des spermatozoïdes composée en grande partie d'acides gras insaturés ce qui les rend vulnérables aux peroxydations. Cette modification membranaire entraîne une diminution de la mobilité spermatique et de la capacité du spermatozoïde à fusionner avec l'ovocyte (Tremellen, 2008).

- D'autre part, les EOR altèrent directement l'ADN spermatique compromettant ainsi la contribution génomique paternelle de l'embryon (Aitken et De Iuliis, 2007; Tremellen, 2008; Lanzafame *et al.*, 2009). Les EOR peuvent aussi altérer les protamines et donc entraîner des anomalies de condensation de l'ADN spermatique ce qui rend les spermatozoïdes plus vulnérables au risque de cassures de l'ADN (Sakkas et Alvarez, 2010).

Le surpoids et l'obésité sont associés à une augmentation du stress oxydatif au niveau systémique (plasmatique et urinaire) (Furukawa *et al.*, 2004). L'accumulation de tissu adipeux a aussi pour conséquence une augmentation du stress oxydatif et de la peroxydation lipidique du microenvironnement testiculaire (Vincent *et al.*, 2007), et conduit à une diminution de la spermatogenèse et une augmentation des dommages spermatiques (Chughtai *et al.*, 2011).

Il a d'ailleurs été observé, chez des souris rendues obèses par un régime hyperlipidique, une augmentation des EOR dans les spermatozoïdes, associée à une augmentation de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes (Bakos *et al.*, 2011b).

Chez l'homme, Tunc et son équipe ont rapporté une corrélation positive entre l'IMC et la production d'ERO dans le plasma séminal. Cette augmentation du stress oxydatif semble être liée à l'activation des macrophages présents dans le plasma séminal. Néanmoins, aucune association entre une augmentation des EOR et l'intégrité de l'ADN spermatique n'a été constatée. Cette étude concernait cependant de faibles effectifs (81 hommes) (Tunc *et al.*, 2011).

#### 4- Augmentation de la température scrotale

La production des spermatozoïdes est optimale lorsque la température est de 34°C (Mieusset et Bujan, 1995). L'accumulation de tissu adipeux dans les régions inguinale et scrotale augmente la température des testicules, ce qui est défavorable à une spermatogenèse normale. L'accumulation de tissu adipeux conduit localement à une augmentation du stress oxydatif, ce

qui perturbe aussi la production spermatique et altère les membranes et le noyau spermatique (Banks *et al.*, 2005).

## 5- Dysfonctions érectiles

Les hommes obèses rapportent plus fréquemment des dysfonctions érectiles et des difficultés d'ordre sexuel. Les mécanismes de la fonction érectile sont complexes. Une diminution des concentrations de testostérone circulante (Diaz-Arjonilla *et al.*, 2009) pourrait être à l'origine de la baisse de la libido (Chughtai *et al.*, 2011). La diminution de la fréquence des rapports sexuels, qui reste cependant controversée (Boyes et Latner, 2009), pourrait être responsable des délais nécessaires à concevoir plus longs observés chez les couples dont l'homme présente un IMC élevé.

De plus, la présence de plaques athéromateuses au niveau des artères péniennes aurait un impact sur les fonctions érectiles (Montorsi *et al.*, 2006).

## E) Interventions thérapeutiques

La perte de poids est connue pour améliorer les comorbidités associées à l'obésité, mais son impact sur les fonctions de reproduction de l'homme a été peu évalué.

### 1- Données chez l'animal

Il existe quelques données chez l'animal montrant qu'il est possible d'intervenir et de reverser les conséquences d'un régime déséquilibré sur les fonctions de reproduction.

L'altération des paramètres spermatiques observée chez les souris rendues obèses par un régime hypergras (Bakos *et al.*, 2011b; Mitchell *et al.*, 2011) est réversible grâce à un régime alimentaire et/ou des exercices physiques progressifs et réguliers (natation). Une amélioration des paramètres de mobilité et de morphologie, de la fragmentation de l'ADN et de la fixation des spermatozoïdes à la zone pellucide a été observée. Le régime alimentaire seul permet une diminution de l'adiposité et du cholestérol total, ce qui n'est pas le cas de l'exercice physique seul. L'association des 2 permet une amélioration de la tolérance au glucose. L'exercice physique peut donc améliorer des fonctions de reproduction, et ce, sans une amélioration du bilan métabolique associée (Palmer *et al.*, 2012).

2- Modifications hygiéno-diététiques (associant régime alimentaire et exercice physique), chez l'homme

a. Mesures concernant l'hygiène de vie et l'alimentation

La prise en charge de l'obésité par des mesures hygiéno-diététiques permet de réduire les comorbidités. Ainsi, une perte de poids de 5 à 10% permet :

- une amélioration du profil glucidique et lipidique ;
- une diminution du risque d'apparition du diabète de type 2 ;
- une réduction des complications liées à l'arthrose ;
- une diminution de la pression artérielle ;
- une amélioration des capacités respiratoires des patients avec ou sans asthme (HAS, 2011).

En éditant en 2011 « La recommandation de bonne pratique : Surpoids et obésité de l'adulte : prise en charge médicale de premier recours », l'HAS (haute autorité de santé) a proposé des conseils diététiques et des interventions visant à augmenter l'activité physique (au moins 150 minutes par semaine avec des sessions d'au moins 10 minutes). Une approche psychologique et cognitivo-comportementale est recommandée. L'objectif chez les patients obèses est d'atteindre une perte de poids de 5 à 15% par rapport au poids initial (HAS, 2011).

b. Mesures hygiéno-diététiques et fonctions de reproduction masculine

Malgré quelques controverses (Hoffer *et al.*, 1986; Kraemer *et al.*, 1999), un certain nombre d'études ont mis en évidence que la perte de poids permet d'améliorer le bilan hormonal et les fonctions érectiles des patients obèses (Kaukua *et al.*, 2003; Esposito *et al.*, 2004; Niskanen *et al.*, 2004; Hannan *et al.*, 2009). Une normalisation de l'hypogonadisme hypogonadotrope avec une amélioration des taux de testostérone et de SHBG ont essentiellement été décrites (Kaukua *et al.*, 2003; Hakonsen *et al.*, 2011).

Seule une étude montre une amélioration des paramètres spermatiques chez 43 hommes obèses après perte de poids. La perte de poids médiane était de 15%. Elle était associée à une augmentation de la numération spermatique (41 millions vs 232 à 193 millions) et une augmentation du volume de l'éjaculat (1 ml vs 1,5 à 1,3 ml) pour une perte de poids allant de 12,2 à 17,1% et 17,2 à 25,4% respectivement. Aucune amélioration de l'intégrité de l'ADN spermatique n'a cependant été observée (Hakonsen *et al.*).

Aucune donnée ne suggère une amélioration de la fertilité après une perte de poids. Il n'existe pas non plus d'étude ayant ciblé les effets spécifiques d'une perte de graisse abdominale sur la fertilité masculine.

La perte de poids grâce à une prise en charge hygiéno-diététique pourrait avoir un effet bénéfique sur les fonctions de reproduction masculine et permettre à des hommes obèses d'obtenir une grossesse et une naissance. Cependant, le risque à long terme, est une reprise du poids avec la réapparition des facteurs de risque (Bray, 1997).

### 3- Chirurgie bariatrique

#### a. Principe

La chirurgie bariatrique constitue une alternative pour permettre aux hommes obèses de perdre du poids : elle est proposée en seconde intention. Elle doit être envisagée après échec des mesures hygiéno-diététiques chez des patients ayant un IMC compris entre 35 et 40kg.m<sup>-2</sup> et qui présentent des comorbidités (comme le diabète ou l'apnée du sommeil) ou chez les patients dont l'IMC dépasse 40 kg.m<sup>-2</sup> (National Institute for clinical excellence, 2006; Neff et le Roux, 2013). Elle nécessite une prise en charge multidisciplinaire. Différents types d'interventions existent. Parmi les plus fréquentes, citons : l'anneau gastrique, la « sleeve gastrectomy » ou gastrectomie longitudinale et le « by pass gastrique » ou court-circuit gastrique avec Roux-en-Y.

#### b. Chirurgie bariatrique et fonctions de reproduction masculine

La perte de poids après chirurgie bariatrique étant associée à l'amélioration de la plupart des comorbidités, une amélioration de la fertilité et des fonctions de reproduction masculine pourrait être attendue. De plus, la perte de poids et la diminution de l'obésité abdominale après chirurgie ont pour conséquence une diminution du stress oxydatif systémique (Uzun *et al.*, 2004; Melissas *et al.*, 2006).

Effectivement, la perte de poids après chirurgie bariatrique permet une amélioration des fonctions sexuelles (Mora *et al.*, 2013) et du bilan hormonal : amélioration des concentrations

de SHBG, de testostérone et de gonadotrophines (Pellitero *et al.*, 2012; Corona *et al.*, 2013), diminution des concentrations d'œstradiol (Corona *et al.*, 2013).

Aucune étude prospective n'a à ce jour évalué l'impact de la chirurgie bariatrique sur les paramètres spermatiques. Quelques cas ont cependant été rapportés, trop peu nombreux ou mal documentés pour pouvoir répondre clairement à la question. Trois équipes, chez 6 patients (di Frega *et al.*, 2005), 3 patients (Sermondade *et al.*, 2012b) et 2 patients (Lazaros *et al.*, 2012), ont rapporté une altération très importante, voire une azoospermie secondaire à la chirurgie bariatrique alors qu'une autre équipe n'a pas retrouvé de modifications majeures des paramètres spermatiques 4 et 24 mois après l'intervention chez 10 patients (Reis *et al.*, 2012) (**Tableau 7**).

Références	Population étudiée	n	Type de chirurgie	Résultats principaux
(di Frega <i>et al.</i> , 2005)	Hommes de couples antérieurement fertiles, devenus infertiles	6	By-pass	Azoospermie secondaire (blocage méiotique à la biopsie testiculaire) Absence de réversibilité à 3 ans
(Sermondade <i>et al.</i> , 2012b)	Hommes de couples infertiles	3	By-pass (n=2) ou sleeve gastrectomy (n=1)	Altération majeure des paramètres spermatiques Réversibilité pour un cas après 2 ans, tendance à la réversibilité pour un cas après 15 mois
(Lazaros <i>et al.</i> , 2012)	Hommes de couples infertiles	2	By-pass	Altération majeure des paramètres spermatiques Absence de réversibilité à 12-18 mois
(Reis <i>et al.</i> , 2012)	Hommes de fertilité inconnue	10	By-pass	Pas de modification des paramètres spermatiques à 4 et 24 mois

**Tableau 7.** Synthèse des publications rapportant l'impact de la chirurgie bariatrique sur les paramètres spermatiques. (D'après N. Sermondade, thèse)

Des études prospectives, de plus grande envergure, évaluant l'impact de la chirurgie bariatrique sur la fertilité masculine, sont donc nécessaires pour répondre clairement à la question et identifier les patients qui seraient à risque d'altération définitive de leur fonction de reproduction. Considérant le principe de précaution, une autoconservation de spermatozoïdes avant la chirurgie bariatrique peut être proposée.

#### **IV. Conclusion**

Malgré une susceptibilité individuelle, le poids a un impact important sur les fonctions de reproduction masculine et la fertilité.

L'environnement pourrait aussi intervenir de manière très précoce dans la programmation de la fertilité à l'âge adulte. De nombreux travaux mettant en évidence un phénomène d'empreinte nutritionnelle maternelle ont été publiés. L'alimentation et le statut métabolique maternels modifient le développement du conceptus et ont des conséquences sur la santé de l'individu à long terme. Ce concept, appelé DOHAD (Developmental Origins of Health and Diseases /origine développementale de la santé et des maladies de l'adulte), implique que le phénotype d'un individu à l'âge adulte est programmé dès la période périconceptionnelle et périnatale.

## **Partie 2 : DOHaD**

### **I. DOHaD**

#### A) Le concept DOHaD

##### 1- Origine du concept de DOHaD

Dans les années 1990, les études épidémiologiques de Barker ont mis en évidence, chez les individus de petit poids de naissance, une prédisposition au développement d'un syndrome métabolique à l'âge adulte (Barker *et al.*, 2002). Cette « hypothèse de Barker » a été le point de départ de nombreux travaux. La notion d'empreinte nutritionnelle maternelle a donc émergé et a évolué vers le concept de DOHaD (Developmental Origins of Health and Diseases /origine développementale de la santé et des maladies de l'adulte) (<http://www.mrc.soton.ac.uk/dohad/>) (Gluckman et Hanson, 2004). La « programmation métabolique » ou « programmation fœtale » a été particulièrement bien étudiée en cas de sous-nutrition maternelle pendant la grossesse lors de la famine hollandaise de l'hiver 1944-1945 (Dutch Famine) (Roseboom *et al.*, 2006). Une incidence plus élevée d'hypertension, d'intolérance au glucose et de surpoids a été observée chez les individus nés de mères soumises à la famine pendant leur grossesse (Lumey et Stein, 1997; Lumey, 1998). Ces effets sont fortement corrélés à la période d'exposition. Ainsi, les individus nés de mères exposées à la famine en début de grossesse n'étaient pas plus petits à la naissance, mais étaient plus sujets à l'obésité à l'âge adulte. Ces individus avaient un risque 3 fois plus important de développer des pathologies cardiovasculaires et avaient un profil lipidique prédisposant à l'athérome. Les individus nés de mères exposées à la famine en milieu ou en fin de grossesse étaient plus petits à la naissance et avaient un risque augmenté de développer une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline (Painter *et al.*, 2005). Il semblerait qu'une sous nutrition pendant la période prénatale ait également un impact sur les préférences alimentaires. Les individus exposés *in utero* à la famine ont tendance à consommer plus d'aliments hypergras, ce qui contribue à long terme, à augmenter le risque de syndrome métabolique associé aux pathologies cardiovasculaires (Lussana *et al.*, 2008). Des observations similaires ont été faites lors d'études de populations exposées à la famine pendant la guerre civile du Nigéria, entre 1967 et 1970, ou lors de la famine en Chine entre 1959 et

1961. Les adultes de 40 ans soumis à la famine *in utero* ou dans la petite enfance lors de la guerre civile du Nigéria présentaient un risque plus élevé d'hypertension et d'intolérance au glucose (Hult *et al.*, 2010). En Chine, une augmentation du risque d'hypertension a été observée chez les adultes d'une cinquantaine d'années exposées *in utero* ou immédiatement après la naissance, à la famine (Wang *et al.*, 2012).

## 2- Elargissement du concept de DOHaD

Initialement, la programmation fœtale a été étudiée chez les enfants souffrant d'un retard de croissance intra-utérin (RCIU) ou nés avec un petit poids de naissance. Il semble évident que différents impacts environnementaux au cours du développement ont des conséquences à long terme. Parmi eux, citons la nutrition dans sa globalité, les perturbateurs endocriniens, la pollution, les agents chimiques industriels, le tabac, les infections, les microbiotes, les médicaments... (Barouki *et al.*, 2012; Schug *et al.*, 2013). Une exposition précoce à ces perturbations environnementales entraîne une modification permanente de la structure des organes, de la physiologie et du métabolisme, induisant à long terme, une prédisposition aux pathologies.

Il est maintenant évident qu'un certain nombre de maladies telles que l'obésité, le diabète, l'hypertension, les maladies cardiovasculaires, mais également l'asthme, des pathologies auto-immunes, des maladies neuro-dégénératives, certains cancers, la dépression et la schizophrénie ont une origine développementale (Barouki *et al.*, 2012; Schug *et al.*, 2013).

## 3- Surpoids et obésité maternelle pendant la grossesse

L'obésité maternelle augmente le risque de complications pendant la grossesse, telles que le diabète gestationnel, la pré-éclampsie et l'accouchement prématuré (Heslehurst *et al.*, 2010). Les enfants nés de mères obèses présentent une résistance à l'insuline et une adiposité augmentée qui se traduit par un risque plus élevé de surpoids et d'obésité. L'exposition *in utero* au diabète maternel a aussi pour conséquence une augmentation de l'indice pondéral (poids/taille<sup>3</sup>) des enfants (Philippis *et al.*, 2011). L'obésité maternelle a été associée à la macrosomie à la naissance, mais également à l'obésité dans la petite enfance (2 à 9 ans), au moment de l'adolescence (14 ans) et à l'âge adulte (Rooney et Ozanne, 2011). Le risque d'obésité est 2 à 5 fois supérieur si la mère est obèse (Lee *et al.*, 1997; Whitaker *et al.*, 1997;

Rooney et Ozanne, 2011). A long terme, ces individus ont un risque plus élevé de développer un syndrome métabolique (Chu *et al.*, 2007; Oken *et al.*, 2007). Une étude épidémiologique récente, incluant 37709 individus, a d'ailleurs mis en évidence que les adultes nés de mères obèses présentent un risque augmenté d'hospitalisation pour des causes cardiovasculaires et plus de décès prématurés (Reynolds *et al.*, 2013).

#### 4- Plasticité développementale

La vie intra-utérine est une période critique au cours de laquelle les organes et systèmes en développement sont vulnérables face aux variations environnementales. Il existe une plasticité développementale qui permet à l'organisme de s'adapter. Les organes peuvent donc changer de phénotype en réponse à un stress environnant (Gluckman *et al.*, 2009).

Mais ce qui au départ pourrait être considéré comme un avantage peut s'avérer délétère en cas de changement brutal d'environnement. Après la naissance, les effets de la programmation fœtale peuvent être détournés par l'environnement néonatal, comme cela a été suggéré par l'hypothèse de « Réponse prédictive adaptative ». Par exemple, *in utero*, si le fœtus est soumis à une restriction énergétique, il anticipe son environnement énergétique futur et ajuste son métabolisme de façon à assurer un apport en énergie suffisant pour les organes vitaux tels que le cerveau, au détriment d'autres organes, comme le pancréas (Gluckman *et al.*, 2009). Mais après la naissance, si l'apport énergétique est important, l'individu qui présente donc « un phénotype économe » (« thrifty phenotype ») (Hales et Barker, 2001) va avoir une croissance trop rapide, ce qui entrainera un risque de complications métaboliques à long terme. Ce phénomène a été appelé « Catch up growth » (Cianfarani *et al.*, 1999). Le rebond pondéral, qui correspond pendant l'enfance à l'âge où l'IMC est le plus bas, est prédictif du poids à l'âge adulte. Il se situe normalement autour de l'âge de six ans, mais un rebond d'adiposité précoce est un facteur de risque de surpoids à long terme (Cianfarani *et al.*, 1999; Ohlsson *et al.*, 2012; Rolland-Cachera et Peneau, 2013). La période post natale est donc aussi une période développementale critique.

#### B) Mécanismes

Les mécanismes impliqués dans la programmation fœtale ne sont pas totalement élucidés et sont d'origine multifactorielle (**Figure 11**). Néanmoins, ils sont liés à une altération

permanente de la structure et de la fonction des organes. Trois systèmes clés sont particulièrement concernés (Martin-Gronert et Ozanne, 2012) :

- L'hypothalamus qui a un rôle essentiel dans le contrôle de la balance énergétique, a un développement qui démarre précocement pendant la grossesse et se poursuit après la naissance. Les périodes *in utero* et post natale sont donc des périodes critiques au cours desquelles le développement hypothalamique et les projections neuronales peuvent être perturbés par l'environnement (Bouret, 2010).

- Le pancréas est particulièrement sensible à l'environnement périnatal. Ainsi, un stress environnemental subis au cours du développement entraîne une altération de la structure du pancréas, et notamment une diminution du nombre de cellules  $\beta$  de Langerhans (Remacle *et al.*, 2007). A long terme le risque de diabète est donc augmenté.

- Le développement rénal fœtal est également vulnérable à l'environnement. Un environnement intra utérin défavorable conduit à une diminution du nombre final de néphrons ayant pour conséquence une augmentation du risque d'hypertension et de pathologies rénales (Vehaskari, 2010).

## 1- Hormones et nutriments

Certains nutriments et certaines hormones maternelles endogènes dont la sécrétion ou la synthèse peuvent être affectées par l'alimentation, sont essentiels au développement du fœtus et ont un impact sur le développement des organes. L'obésité maternelle est d'ailleurs associée à la concentration en leptine dans le sang de cordon, elle même associée à une augmentation du poids à la naissance (Karakosta *et al.*, 2013). L'hyperinsulinémie maternelle conduit également à augmentation du risque de macrosomie (Dorner et Plagemann, 1994).

Les adipokines et l'insuline ont un rôle important dans la croissance fœtale et ont une action plus ou moins directe sur le développement du tissu adipeux, des muscles et du foie (Briana et Malamitsi-Puchner, 2010). De plus, la leptine et l'insuline ont toutes les deux un rôle important dans le développement cérébral et hypothalamique, elles ont une action neurotrophique (Bouret, 2010).

## 2- Stress oxydant

Le stress oxydant, accru en cas d'obésité ou de malnutrition, joue un rôle majeur dans la programmation fœtale. Les EOR contrôlent de nombreuses voies métaboliques en adaptant les signaux intracellulaires, dont les voies de l'apoptose. Un excès d'EOR chez la mère entraîne des altérations de l'ADN qui peuvent être transmises à la génération suivante et affecter son développement (Luo *et al.*, 2006). Une augmentation du stress oxydant (évalué au niveau du sang de cordon) a d'ailleurs été observée chez les enfants nés avec un petit poids de naissance et chez ceux nés prématurément (Gupta *et al.*, 2004). Des études chez l'animal ont montré que les cellules  $\beta$  - donc les voies de l'insuline - pouvaient être altérées par le stress oxydant (Wang *et al.*, 2004). Des rats soumis *in utero* à une sous-nutrition, présentaient une hypertension. Chez ces rats, une diminution l'activité de la superoxyde dismutase et une augmentation de l'anion superoxyde ont été observées (Franco Mdo *et al.*, 2002). Ces données montrent que le stress oxydant contribue à la programmation fœtale du syndrome métabolique et des maladies cardiovasculaires à l'âge adulte.

### 3- Epigénétique

Le terme « épigénétique » a été introduit par Conrad Waddington en 1942 (Waddington, 2012). Les modifications épigénétiques sont des marques permanentes qui affectent le phénotype d'une cellule ou d'un individu et de sa descendance, sans modifier son génotype. Ce processus traduit les changements transmissibles de l'expression des gènes sans altération de leur séquence. L'épigénome sert d'interface entre l'environnement et le génome, il constitue la mémoire de la cellule (Attig *et al.*, 2010). Les trois processus les plus décrits sont la méthylation de l'ADN, la modification des histones et les ARN non codants (microARNs). Les mécanismes d'épigénétique sont responsables de la régulation de l'expression des gènes au cours de la différenciation cellulaire pendant le développement et tout au long de la vie de l'individu (Jammes *et al.*, 2011).

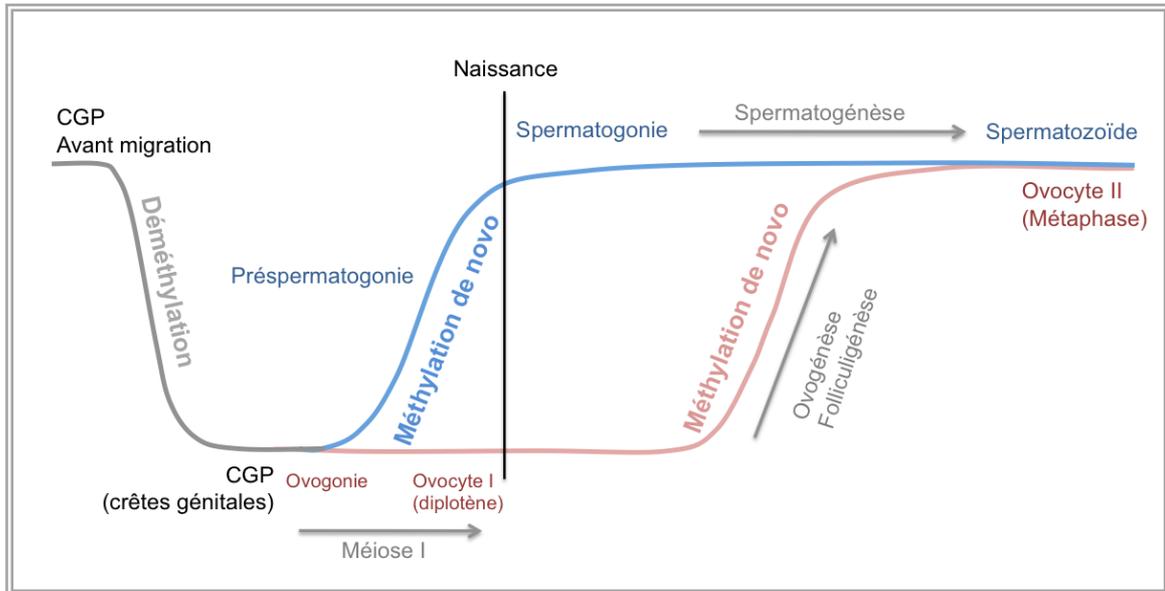
#### a. Marques épigénétiques

##### *Méthylation de l'ADN*

La méthylation de l'ADN est l'un des mécanismes épigénétiques les plus étudiés. La méthylation de l'ADN joue un rôle dans l'information génétique en contrôlant l'expression génique (Jammes *et al.*, 2011) par deux mécanismes : la structure de l'ADN peut être

modifiée ou l'accès des facteurs de transcription peut être limité par la présence des groupements méthyles (Bergman et Cedar, 2013). Le groupement méthyle est attaché au carbone 5 de la cytosine ; chez les mammifères, la méthylation est restreinte aux îlots CpG (dinucléotides cytosine-guanine). Trois enzymes (DNA méthyltransferases : DNMT) sont indispensables à la mise en place et au maintien de la méthylation (DNMT3a, DNMT3b : méthylation *de novo* ; DNMT1 : maintien de l'empreinte) (Smith et Meissner, 2013). La méthylation de l'ADN est tissu spécifique (Schneider *et al.*, 2010), et est impliquée dans un certain nombre de processus physiologiques clés tels que les phénomènes d'empreinte (Bachmann et Bergmann, 2012), l'inactivation du chromosome X (Okamoto *et al.*, 2004) et la répression de gènes spécifiques des cellules germinales ou de séquences répétitives (Hackett et Surani, 2013).

Le développement des cellules germinales et des embryons préimplantatoires sont des étapes critiques pour les événements épigénétiques, en particulier la méthylation et la mise en place de l'empreinte. Les gènes soumis à empreinte ont une expression monoallélique selon l'origine maternelle ou paternelle de l'allèle. Ils ont un rôle majeur dans le développement fœtal et placentaire (Jammes *et al.*, 2011). Au cours du développement embryonnaire, les cellules germinales primordiales subissent une déméthylation globale ; l'empreinte parentale serait ainsi effacée. Puis, au cours de la gamétogénèse, une reméthylation *de novo*, sexe-spécifique, se produit dans les cellules germinales primordiales. Après la fécondation, la déméthylation du génome entraîne l'activation des gènes du développement et permet la pluripotence, bien que les gènes à empreinte parentale soient protégés de cette déméthylation. Vient ensuite la reprogrammation épigénétique, qui permet l'expression de gènes développementaux spécifiques et l'établissement des différentes lignées dans l'embryon (**Figure 9**), la programmation de la réapposition des marques épigénétiques et de l'activation du génome embryonnaire est espèce-spécifique (Attig *et al.*, 2010; Cantone et Fisher, 2013; Hackett et Surani, 2013). La méthylation de l'ADN fait intervenir des liaisons covalentes ce qui permet une stabilité à long terme. Cette méthylation peut être affectée par l'alimentation dès la période périconceptionnelle.



**Figure 9.** Déméthylation des cellules germinales primordiales et reméthylation sexe spécifique chez la souris (CGP : cellules germinales primordiales)

### *Modification des histones*

Le génome s'organise en nucléosomes, constitués de l'ADN qui entoure un complexe protéique formé de huit protéines d'histones (2 copies des histones H2A, H2B, H3 et H4). L'histone H1 établit le lien entre les nucléosomes (Ray-Gallet *et al.*, 2005). La queue des histones est un site privilégié de modifications épigénétiques.

Plus de 100 modifications d'histones ont été décrites (Kouzarides, 2007), telles que l'acétylation et l'ubiquitination des résidus lysine, la phosphorylation des résidus sérines, la méthylation des lysines ou arginines. L'acétylation qui est la première à avoir été décrite (Phillips, 1963), neutralise les charges positives des résidus de lysines, ce qui affaiblit les interactions charges dépendantes entre l'ADN et les histones. L'accessibilité de l'ADN aux complexes de transcription est donc facilitée, ce qui permet la transcription, et donc l'expression génique. La méthylation des histones va avoir un impact moins important sur la compaction de l'ADN, mais la méthylation des lysines ou arginines des histones est associée indirectement à une activation ou une répression de la transcription selon leur localisation. Un certain nombre d'enzymes sont impliquées dans les modifications d'histone : les histone-acétyltransferases (HATs) et les histone-méthyltransferases (HMTs) interviennent dans la mise en place respective des groupements méthyles et acétyles. Les histones déméthylases (HDMs) et les histones déacétylases (HDACs) interviennent dans la suppression respective des groupements méthyles et acétyles (McKay et Mathers, 2011).

### Les petits ARN non codants

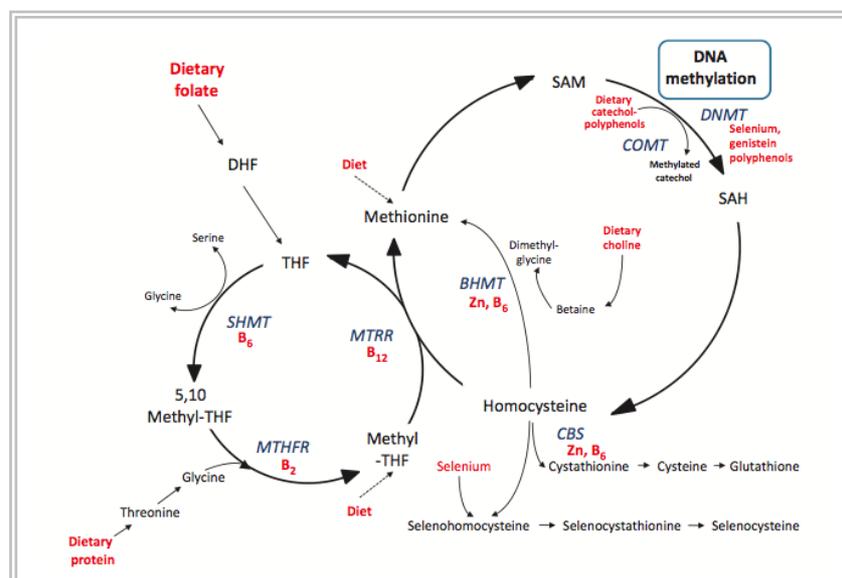
Les microARNs (miARN) sont une grande famille de petits ARN ( $\approx 22$  nucléotides) non codants. Ces miRNA régulent la transcription d'environ un tiers des gènes codants pour des protéines. En se liant à des séquences spécifiques de l'ARN, ils ciblent la région 3' non transcrite de l'ARNm (Esquela-Kerscher et Slack, 2006).

**La modification des histones combinée à la méthylation de l'ADN module un processus dynamique qui affecte le nucléosome et donc la transcription des gènes, en fonction de la présence de miRNA spécifiques (McKay et Mathers, 2011; Zentner et Henikoff, 2013).**

### b. Alimentation et modifications épigénétiques

L'alimentation est un facteur majeur responsable de modifications épigénétiques du fœtus. De nombreuses études évaluant le statut nutritionnel maternel et la programmation fœtale ont établi un lien avec les mécanismes d'épigénétique.

### Cycle de la méthionine



**Figure 10** : Principales voies impliquées dans le métabolisme de la méthionine. En rouge : Nutriments et composés alimentaires pouvant moduler les marques épigénétiques en modifiant la disponibilité de la S-Adénosylméthionine (SAM) (McKay et Mathers, 2011)

L'influence des nutriments sur le cycle de la méthionine a été bien étudiée. Ce cycle fait intervenir de nombreuses vitamines, enzymes et nutriments et a un rôle central dans la synthèse d'ADN, la biosynthèse de protéines et d'histones et la méthylation de molécules, en

particulier celle de l'ADN et des histones. Ces nutriments ou enzymes sont soit directement impliqués dans le cycle de la méthionine (Folates, sélénium...), soit agissent comme cofacteur enzymatique (Vitamine B12, vitamine B6, choline...). Un défaut ou un excès de ces composés peut moduler les marques épigénétiques en modifiant la disponibilité de la S- adénylméthionine (SAM) qui est le donneur méthyle dans l'étape finale de la méthylation (McKay et Mathers, 2011; Steegers-Theunissen *et al.*, 2013).

#### *Modification des enzymes impliquées dans les marques épigénétiques*

L'activité des enzymes impliquées dans les phénomènes épigénétiques (méthylation et acétylation : DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, HATs, HMTs, HDACs, HDMs) peut également être altérée par certains nutriments tels que le sélénium, qui réduisent soit leur expression, soit leur liaison à l'ADN et donc leur action (Handel *et al.*, 1995; Xiang *et al.*, 2008).

#### *IGF2*

*IGF2* (*Insulin-Like Growth factor 2*) est un des gènes soumis à empreinte maternelle qui est le mieux caractérisé. Son expression monoallélique paternelle est opposée à celle du gène *H19* qui est exprimé par l'allèle maternel. *IGF2* est souvent pris en compte dans l'étude des mécanismes de la programmation fœtale. C'est un important promoteur de la croissance fœtale et du développement chez l'humain. La méthylation se fait au niveau de son centre d'empreinte (DMR (differentially methylated region) ou ICR (imprinting control regions)). Une hypométhylation de ce centre d'empreinte conduit à une expression biallélique d'*IGF2*, donc à une expression augmentée de la protéine (Smith *et al.*, 2006).

#### *Environnement prénatal et modification de l'expression d'IgF2*

Il a été observé que les adultes qui avaient été exposés *in utero* à la famine hollandaise au cours de l'hiver 1945, présentaient une diminution de la méthylation du gène *IGF2* de leur ADN sanguin (Heijmans *et al.*, 2008). Par ailleurs, une diminution de la méthylation du centre d'empreinte d'*IGF2* associée à une augmentation des concentrations plasmatiques d'*IGF2* ont été observées dans le sang de cordon d'enfants nés de mères obèses (Hoyo *et al.*, 2012). Il avait d'ailleurs déjà été observé en 1998 que l'expression d'*IGF2* était augmentée dans les placentas d'enfants nés avec un RCIU (Abu-Amero *et al.*, 1998). Ces résultats ne font cependant pas l'unanimité car aucune différence d'expression du gène *IGF2* n'a été retrouvée dans une étude réalisée sur les placentas d'enfants nés avec un retard de croissance (Apostolidou *et al.*, 2007). Il n'a pas non plus été mis en évidence d'association entre le poids

de naissance et la méthylation du centre d’empreinte ICR1 du gène *IGF2* dans le sang de cordon (Burris *et al.*, 2013). Dans une étude plus récente, il a même été observé une diminution de l’expression d’*IGF2* dans des placenta d’enfant nés avec un RCIU, mais les effectifs de cette étude étaient relativement faibles (16 vs 9) (Koukoura *et al.*, 2011).

*IGF2* semble néanmoins être un gène clé impliqué dans la programmation fœtale. Son expression peut être altérée par l’environnement *in utero* qui module la méthylation de son centre d’empreinte et modifie ainsi, de façon durable, son expression. Le phénomène de DOHaD est cependant beaucoup plus complexe et de nombreux autres gènes soumis à empreinte sont impliqués dans la programmation fœtale. Il a été mis en évidence des différences de méthylation de gènes impliqués dans la croissance et les maladies métaboliques (*INSIGF*, *GNASAS*, *MEG3*, *IL10*, *LEP*, *ABCA1*) chez les adultes exposés *in utero* à la famine hollandaise. Ces changements de méthylation étaient liés à la période d’exposition et au sexe de l’individu (Tobi *et al.*, 2009).

### C) Périodes de l’exposition

Les facteurs environnementaux ont un impact important pendant la période de plasticité développementale, au cours de laquelle les marques épigénétiques subissent des modifications critiques.

Quand un tissu ou un système est complètement développé, bien qu’encore modulable, il est moins sensible au stress environnemental. La fenêtre de sensibilité est tissu dépendante et débute dès la période pré-conceptionnelle pour s’étendre jusqu’à l’enfance et même la puberté pour certains organes comme le cerveau ou l’appareil reproducteur (Barouki *et al.*, 2012). **(Figure 11)**

#### 1. Période pré-conceptionnelle

Le stock d’ovocytes est complet et définitif avant la naissance. Les follicules primordiaux quittent leur état de quiescence et commencent leur croissance 26 semaines avant la conception. Quatorze semaines avant la conception, la folliculogenèse s’accélère (Steegers-Theunissen *et al.*, 2013). Ces étapes sont donc des étapes critiques du développement ovocytaire au cours desquelles l’environnement maternel peut affecter la maturation ovocytaire, et entraîner des modifications définitives, notamment des altérations de la

méthylation de l'ADN. L'obésité est associée à des modifications du liquide folliculaire (augmentation en androgènes et en CRP) qui peuvent influencer la maturation et les compétences développementales des ovocytes (Robker *et al.*, 2009; Fleming *et al.*, 2012). Chez la souris obèse, les ovocytes présentent une altération du potentiel de membrane mitochondrial, avec une altération de l'ADN, et une augmentation du stress oxydant conduisant à une altération des compétences développementales (Igosheva *et al.*, 2010). Il a de plus été observé chez les descendants de souris soumises à un régime pauvre en protéines pendant un cycle précédant la saillie, des anomalies cardiovasculaires telles qu'une augmentation de la pression sanguine chez les mâles et les femelles et une altération du développement rénal chez les femelles (Watkins *et al.*, 2008).

## 2. Période préimplantatoire

Les embryons préimplantatoires sont également sensibles aux conditions environnementales. Les nutriments et les hormones présents dans les trompes et l'utérus sont influencés par l'alimentation maternelle (Leese *et al.*, 2008) et peuvent modifier la prolifération embryonnaire, l'apoptose ou l'évolution jusqu'au stade blastocyste (Fleming *et al.*, 2004; Fleming *et al.*, 2012).

Chez le rat, un déficit en protéines pendant la période préimplantatoire perturbe le développement embryonnaire (clivage cellulaire plus lent) conduisant à des blastocystes ayant moins de cellules (Kwong *et al.*, 2000). Des anomalies phénotypiques (hypertension) et épigénétiques ont été observées chez les rats adultes qui en sont issus (Kwong *et al.*, 2006). Il a été montré chez le lapin, qu'un régime maternel hyperlipidique-hypercholestérolémique, altérait l'expression des gènes embryonnaires dès le stade 8-16 cellules, entraînant un RCIU et un surpoids à l'âge adulte (Picone *et al.*, 2011). De plus, la période préimplantatoire est une étape clé pour l'établissement des marques épigénétiques.

## 3. Période fœtale

Le développement et la croissance fœtale dépendent du placenta qui forme l'interface entre la mère et le fœtus. La croissance et la fonctionnalité du placenta sont soumises, entre autre, au statut nutritionnel de la mère (Lager et Powell, 2012). Une grande variété de nutriments, hormones, cytokines et facteurs de croissance sont échangés entre la mère et son fœtus et

régulent le développement intra-utérin en réponse aux variations environnementales (Sandovici *et al.*, 2012). Une insuffisance placentaire entraîne un défaut de transport des nutriments et des hormones de la mère vers le fœtus, et altère son développement.

La régulation épigénétique joue un rôle important dans la réponse adaptative aux facteurs environnementaux, notamment par la méthylation de l'ADN de certains loci (Novakovic *et al.*, 2011).

#### 4. Période néonatale

Chez l'animal, des études ont montré qu'une surnutrition pendant la période néonatale augmente le risque de développer un syndrome métabolique à l'âge adulte. Le risque est d'autant plus important si les animaux sont nés avec un retard de croissance intra utérin. Des altérations de méthylation de l'ADN, acquises en post-natal, au niveau de gènes impliqués dans la balance énergétique, pourraient avoir un rôle central (Plagemann *et al.*, 2012).

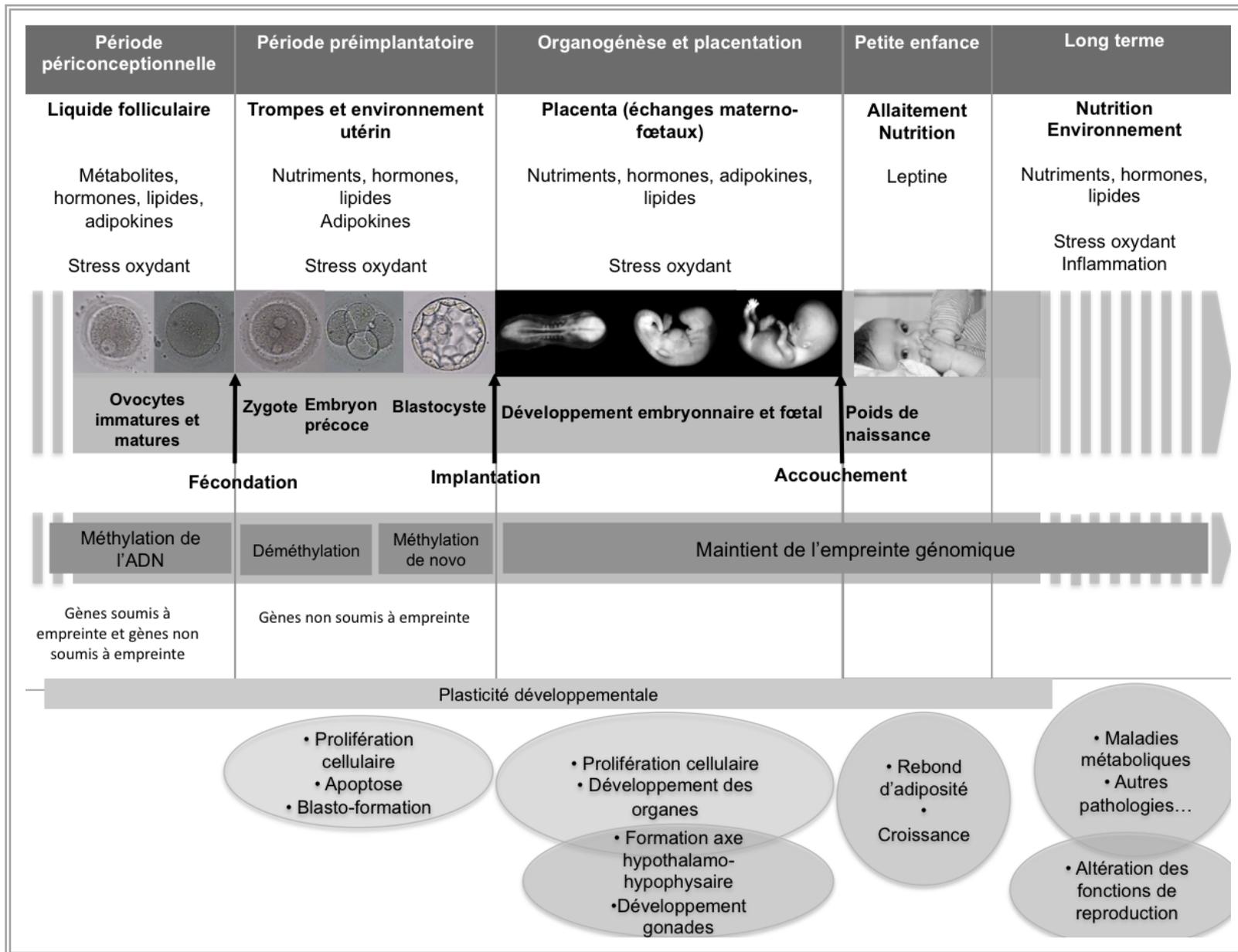
Chez l'homme, comme déjà décrit ci dessus, une croissance post natale trop rapide après une croissance fœtale altérée augmente le risque de complications métaboliques à long terme (Cianfarani *et al.*, 1999).

Des études épidémiologiques ont également montré que l'allaitement maternel exerce un rôle préventif de l'obésité infantile (Singhal et Lanigan, 2007) et la leptine contenue dans le lait pourrait être partiellement responsable de ces effets protecteurs (Uysal *et al.*, 2002).

Les premiers mois après la naissance sont donc une fenêtre critique au cours de laquelle la santé à long terme peut également être programmée.

#### D. Conclusion et perspectives

Le statut nutritionnel maternel en période périconceptionnelle, pendant toute la grossesse et au cours de l'allaitement influence la santé à long terme. Un certain nombre de facteurs de stress, tels que la sous-nutrition, la surnutrition, mais également les phénomènes conduisant à un retard de croissance intra-utérin, ont des conséquences négatives sur le développement de l'individu. Les mécanismes ne sont pas totalement élucidés et l'origine de la programmation est multifactorielle.



**Figure 11** : DOHAD : Mécanismes et périodes critiques d'exposition

## II. Environnement maternel et fonctions de reproduction de la descendance

Des études épidémiologiques chez l'homme et des données expérimentales chez l'animal ont permis de mettre en évidence qu'une malnutrition maternelle, pendant la période périconceptionnelle et la croissance fœtale, pouvait également altérer les fonctions de reproduction des descendants mâles ou femelles.

Dans l'article ci-après (Dupont *et al.*, 2012), nous avons fait une revue de la littérature afin de recenser les effets déjà observés chez l'homme ou l'animal de la nutrition maternelle ou du petit poids de naissance sur la fertilité dans les deux sexes (résumé rapide des conclusions ci-dessous).

### A) Données épidémiologiques

Les études épidémiologiques sont peu nombreuses. Elles sont essentiellement fondées sur les conséquences à long terme d'un retard de croissance intra utérin. Une altération du développement gonadique a été observée dès le stade fœtal ou au moment de la naissance, aussi bien chez les garçons (cryptorchydie) que chez les filles (de Bruin *et al.*, 1998). Au moment de la puberté, le bilan hormonal est altéré (Cicognani *et al.*, 2002; Ibanez et de Zegher, 2006) et peut être responsable d'hypofertilité à l'âge adulte (Francois *et al.*, 1997; Nohr *et al.*, 2009; Vanbillemont *et al.*, 2010).

D'autres études s'intéressent au poids de la mère avant la conception ou au gain de poids pendant la grossesse : elles ont montré l'impact de l'environnement nutritionnel maternel sur la programmation des fonctions de reproduction des descendants. On note en particulier une puberté plus précoce chez les filles (Keim *et al.*, 2009) et une altération des paramètres spermatiques associée à une diminution de la concentration plasmatique en inhibine B chez les hommes (Ramlau-Hansen *et al.*, 2007a), dont les mères avaient un IMC élevé avant la grossesse.

### B) Données chez l'animal

L'impact de la nutrition maternelle a essentiellement été étudié chez le mouton.

Chez les mâles et les femelles, une sous-nutrition maternelle pendant la gestation affecte la réponse hypophysaire à la GnRH, le développement et les fonctions gonadiques, (Rae *et al.*, 2001; Rae *et al.*, 2002; Kotsampasi *et al.*, 2009). Dans un modèle de brebis sur-nourries, un

retard du développement ovarien et une diminution du nombre de follicules primordiaux dans l'ovaire fœtal ont été observés (Da Silva *et al.*, 2002). Chez le mâle, la surnutrition maternelle entraîne un retard du début de la puberté, et une diminution des concentrations plasmatiques en testostérone et du volume testiculaire (Da Silva *et al.*, 2001).

Ces modèles de brebis sous-nourries ou sur-nourries ont donc permis de souligner l'importance de la nutrition maternelle pendant la gestation pour le développement des fonctions de reproduction des descendants. Les effets observés dépendent cependant de la période d'exposition et de l'importance du stress appliqué. A l'heure actuelle, il n'existe pas d'étude publiée sur les conséquences sur la fertilité.

### C) Mécanismes

Les mécanismes impliqués dans ces phénomènes demeurent mal connus, mais doivent faire intervenir des processus similaires à ceux décrits précédemment, tels que le statut hormonal maternel au moment de la conception (O'Shaughnessy et Fowler, 2011), les mécanismes de stress oxydatif, ainsi que la transmission de marques épigénétiques.

Le développement des gonades mâles se met en place *in utero* et les cellules de Sertoli jouent un rôle central dans le développement et les fonctions du testicule. Leur nombre et leur structure sont corrélés au volume du testicule et à la production spermatique (Sharpe *et al.*, 2003). Ces cellules prolifèrent de la vie fœtale jusqu'à la puberté. Un défaut dans leur développement aura aussi un impact sur les autres cellules testiculaires telles que les cellules de Leydig et les cellules germinales entraînant des dysfonctions à l'âge adulte (Sharpe *et al.*, 2003).

### D) Conclusion

En conclusion, il existe encore peu de données sur les effets d'un environnement maternel altéré sur la fonction de reproduction et la fertilité. Des études sont nécessaires, d'autant qu'il a été observé une augmentation du risque d'infertilité chez les hommes nés avec un RCIU. Ces données justifient aussi l'étude de l'impact de la nutrition maternelle sur la fonction de reproduction mâle en utilisant le modèle de lapin dyslipidémique déjà validé dans notre laboratoire.



Review

Maternal environment and the reproductive function of the offspring

C. Dupont<sup>a,b,c,d</sup>, A.G. Cordier<sup>a,b,e</sup>, C. Junien<sup>a,b,f</sup>, B. Mandon-Pépin<sup>a,b</sup>, R. Levy<sup>c,d</sup>, P. Chavatte-Palmer<sup>a,b,g,\*</sup>

<sup>a</sup> INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, Jouy en Josas, France

<sup>b</sup> ENVA, Maisons-Alfort, France

<sup>c</sup> AP-HP, hôpital Jean Verdier, Service d'histologie-embryologie-cytogénétique, pôle femme-et-enfant, Bondy, France

<sup>d</sup> Unité de Recherche en Epidémiologie Nutritionnelle, UMR U557 Inserm, U1125 Inra, Cnam, Université Paris 13, CRNH IdF, Bobigny, France

<sup>e</sup> AP-HP, hôpital Antoine Bécclère, Service de Gynécologie-Obstétrique et Médecine de la Reproduction, Clamart, France

<sup>f</sup> Université Versailles Saint-Quentin, France

<sup>g</sup> PremUp Foundation, Paris, France

Received 26 April 2012; received in revised form 8 June 2012; accepted 10 June 2012

Abstract

Fetal programming of metabolic diseases is now a well established concept. The scope of the Developmental Origins of Health and Disease has, however, widened and led to the identification of new targets of fetal programming, notably effects on reproductive function. Epidemiologic studies about maternal nutrition and effects on offspring's fertility are rare, but a link between impaired fetal growth, possibly caused by maternal malnutrition, and reproductive function, has been established. The methodologic limitations inherent to human epidemiologic studies can be complemented through the use of animal models, which enable experimental studies on maternal environment and its effect on reproductive functions of the offspring. Altogether, an interaction between inappropriate maternal nutrition (excess or reduced nutritional intake, micronutrient unbalance, or alcohol intake) and reproductive maturation of the offspring has been shown in a majority of experiments as summarized in this review. The exact processes through which maternal nutrition or maternal environment affect reproductive function in the offspring remain unclear but epigenetic modifications are a clear link. Further studies are needed to better understand the mechanisms involved, identify the crucial critical periods, and prevent or treat the adverse effects.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: DOHaD; Fetal programming; Reproduction; Sperm; Fertility

Contents

1. Introduction ..... 1406
2. Critical spatiotemporal periods and mechanisms that may affect gonadal development and function ..... 1406
2.1. Gonadal development ..... 1406
2.2. Mechanisms that may affect gonadal development and function ..... 1407
3. Epidemiologic studies ..... 1408
3.1. Intrauterine growth retardation ..... 1408

\* Corresponding author. Tel.: + 33 1 34 65 25 58; fax: +33 1 34 65 23 64. E-mail address: pascale.chavatte@jouy.inra.fr (P. Chavatte-Palmer).

3.2.	Maternal undernutrition .....	1408
3.3.	Maternal weight before pregnancy .....	1409
3.4.	Summary of epidemiologic studies .....	1409
4.	Experimental data from animals .....	1409
4.1.	Maternal undernutrition .....	1409
4.1.1.	Effect on gonads .....	1409
4.1.2.	Effects on the hypothalamo-pituitary-gonadal axis .....	1409
4.1.3.	Effects on fertility and gamete quality in adulthood .....	1409
4.1.4.	Summary of effects of maternal undernutrition .....	1410
4.2.	Maternal overnutrition .....	1410
4.2.1.	Effects on gonads and hypothalamo-pituitary-gonadal axis .....	1410
4.2.2.	Effects on fertility and gamete quality in adulthood .....	1410
4.2.3.	Excess nutrition during adolescence .....	1410
5.	Other nutritional compounds .....	1410
5.1.	Folate and vitamin B12 .....	1411
5.2.	Alcohol .....	1411
6.	Conclusions .....	1411
	References .....	1412

## 1. Introduction

In the 90s, the epidemiologic studies of Barker and coworkers underlined an increased risk of noncommunicable metabolic diseases in people born small for gestational age (SGA) [1,2]. It is now generally admitted that obesity, type 2 diabetes, and hypertension may take root during early development, throughout gestation and lactation, as stated in the Developmental Origins of Health and Disease hypothesis (<http://www.mrc.soton.ac.uk/dohad/>). Indeed, many studies have shown that an individual's nutritional and hormonal status during fetal development and early life plays an important role for long-term control of energy metabolism [3,4]. Epidemiologic and experimental reports suggest that epigenetic mechanisms are the link between early life events and health later in life, with epigenetic marks being considered as long-lasting environmental cues [5,6]. Many organs are affected by this process, including gonads. Because gametogenesis takes place during pregnancy, the maternal nutritional status may also affect the offspring fertility and the quality and epigenetic markings on his/her gametes, thus creating a transgenerational effect [7,8].

This review addresses the influence of maternal nutrition on offspring reproductive function in humans and animals. Consequences on gonadal differentiation, sexual organs, onset of puberty, gamete quality, hormonal status, and fertility have been observed. The critical spatiotemporal periods when gonads and/or gametes may be affected are described, and putative mechanisms presented.

## 2. Critical spatiotemporal periods and mechanisms that may affect gonadal development and function

### 2.1. Gonadal development

It is important to know the timing of gonadal differentiation and gamete production in order to understand and interpret data from human and animal studies.

In females of large mammalian species (e.g., human, sheep, goat, cow, and pig), the pool of oocytes is complete and definitive before birth, based on the resting reserve of primordial follicles established during fetal life, which represent the lifespan supply for the female's fertilizable oocytes, but this is not the case in all species (Fig. 1), hence rendering interspecies comparison somewhat difficult. For example, although meiosis begins during pregnancy in humans, sheep, and mice, gonial mitotic division is only completed in humans and sheep during this period, whereas it continues after birth in mice [9,10]. Subsequently, folliculogenesis and the accompanying steroidogenesis take place during fetal life in humans and sheep, but only shortly after birth in mice. In rabbits, both events take place in the postnatal period [10,11].

In males, the continuous production of spermatozoa requires the proliferation of spermatogonia that begin to proliferate as well as the maintenance of a pool of spermatogonia. This is a continuous process throughout postpubertal life. Sertoli cells play a central role in the development of a functional testis and their numbers are highly correlated with both adult testicular size and sperm production [12]. These cells proliferate during

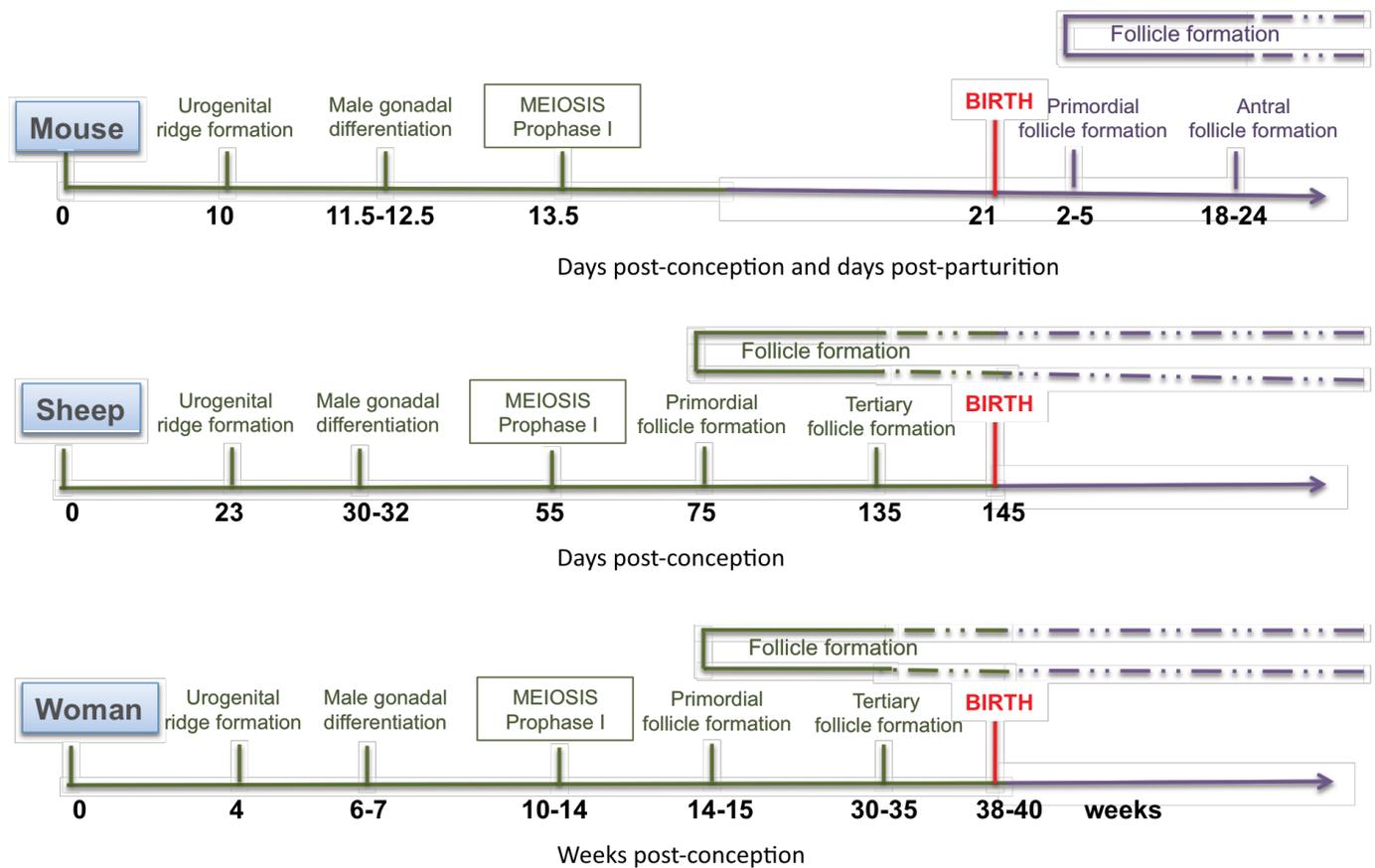


Fig. 1. Schematic representation of the timing of ovarian differentiation in three different mammals (mouse, sheep, and human), showing that although meiosis occurs before birth in all three species, folliculogenesis begins after birth in mouse, in contrast to sheep and human.

pre- and postnatal development, coordinating testicular development [10]. Alterations of Sertoli cell development affect other testicular components, such as Leydig and fetal germ cells, leading to disorders in adulthood [12]. Sertoli cell proliferation may be disturbed through alterations of the development of the hypothalamic–pituitary–gonadal axis during fetal life, linked to the concentration of key hormones, such as FSH, T3, T4, GH, and estrogens. Testicular descent, which is a hormone-dependent process during fetal development, normally occurs at or shortly after birth in most species. Hormonal defects in males lead to incomplete descent of one or both testes (cryptorchidism) and is associated with lower sperm counts in adulthood [13].

## 2.2. Mechanisms that may affect gonadal development and function

Lasting morbidity, including infertility in offspring can be induced through a wide range of mechanisms, such as oxidative stress and epigenetic changes [14]. Furthermore, maternal nutrition can affect the synthesis of endogenous maternal hormones, which are essential during fetal development [7].

Epigenetic marks are candidates for bearing the memory of early life exposure to inadequate nutritional environments by long-term alterations of gene expression programming, with the epigenome acting as an interface between the environment and the genome [15,16]. Epigenetic mechanisms that may be involved in fetal programming have been reviewed [5,6,17,18]. Briefly, germ cells during development and the preimplantation embryo are subjected to intense epigenetic modifications. In germ cells, DNA methylation is erased and new DNA methylation is acquired during the multiplication of spermatogonia (i.e., during fetal life, before meiosis takes place) in the males, whereas in females, it takes place during oocyte growth and maturation (i.e., long after birth and prior to each ovulation) [19] indicating that critical times for disturbance of epigenetic marks are different between males and females, with the males being probably more sensitive than females during fetal life. In contrast, female gametes may be more susceptible to epigenetic perturbation during follicular maturation (i.e., at the time when superovulation treatments, both in humans and animals, or nutritional interventions, such as flushing in animals, or weight loss

in infertile obese women) may be taking place. The importance of this timing has been demonstrated through the use of animal models, such as the mouse knockout for Dnmt3L (DNA methyltransferase 3L, Dnmt3L, a member of the Dnmt3 family, which has been reported to be necessary for gametic methylation and parental imprinting) [19]. In this model, Dnmt3L<sup>-/-</sup> males are infertile with azoospermia and hypogonadism, whereas females are fertile but fetal death occurs at midgestation because of placental dysfunction.

### 3. Epidemiologic studies

Epidemiologic studies about maternal nutrition and its effects on offspring fertility are rare, and the existing reports have generally focused on the long-term effects of low birth weight. Birth weight is, however, a poor surrogate for nutritional status during gestation [20]. Furthermore, environmental disturbances during pregnancy, especially during the periconceptional period, are not necessarily associated with altered growth and low birth weight, although they have been shown in animal models to induce long-term physiologic effects in offspring [3,21].

#### 3.1. Intrauterine growth retardation

In humans, if a birth weight below 2500 g is used as a threshold for defining intrauterine growth retardation (IUGR), the incidence of IUGR is below 7% in developed countries, but can reach 16.5% to 18% of newborns in developing countries [22]. Impaired gonadal development has been observed in IUGR fetuses or stillborn infants. Abnormal ovarian development, characterized by a decreased volume of primordial follicles in the ovarian cortical tissue, was observed in IUGR individuals after placental insufficiency [23]. Moreover, cryptorchidism is common in boys born with IUGR and has been associated with low sperm count in adulthood [13].

Later on in development, the onset of puberty and the age at menarche have been shown to be advanced by approximately 5 to 10 mo in SGA girls compared with those born with an appropriate weight for gestational age (AGA). These girls also have higher FSH concentrations and smaller ovaries and uterus compared with AGA girls [24]. At puberty, the prevalence of anovulation appears higher among SGA compared with AGA girls, with reduced ovulation rates in the relatively small fraction of ovulating SGA girls [25]. It was suggested that insulin resistance could be the mechanism explaining early menarche in SGA girls and

that insulin sensitization may be an approach to reverse these adverse effects [26–28]. In adults, a link between prenatal environment and the onset of polycystic ovary syndrome in adolescence has often been tested, but to date, results remain contradictory [29]. Nevertheless, it was shown that prenatal growth restriction coupled with spontaneous catch-up growth during infancy induces increased insulin resistance and visceral adiposity, associated with elevated plasma dehydroepiandrosterone sulfate and reduced plasma concentrations of sex hormone binding globulin in 8-yr-old girls, which may subsequently predispose these girls to polycystic ovary syndrome [29–31]. Similarly, SGA boys have an increased risk for high plasma FSH and low inhibin B concentrations, with reduced testicular volume in adolescence [30,32]. Further fertility, however, is not documented.

Indeed, so far, relatively few studies linking birth weight and fertility in adulthood are available. Nevertheless, in women, high (> 4500 g) or low (< 2500 g) birth weight is associated with prolonged time to conceive [33]. In a cohort of 347 men, semen quality or hormonal status did not appear to be affected by birth weight [34]. However, in a recent study, it was established that adult males born SGA have lower plasma testosterone concentrations compared with AGA controls, independent of age, weight, and height [35]. Furthermore, it was observed in male partners of subfertile couples that men with idiopathic subfertility had lower birth weight compared with men with subfertility of known etiology or men with normal semen analyses [36].

#### 3.2. Maternal undernutrition

How maternal undernutrition may affect offspring fertility remains unclear. Maternal exposure to nutritional deprivation, specifically during early gestation, as experienced during the late period of the Dutch Hunger Winter of 1944–1945 where the population of Amsterdam was submitted to a severe and well circumscribed famine [37], increased the risk of early onset cardiovascular disease, hypertension, increased body mass index (BMI), and glucose intolerance in the offspring [38]. The fertility of male offspring was not reduced and it appeared to be improved in females, as women born to mothers who were subjected to the famine during pregnancy had children earlier and had more children and more twins than those who were born to contemporary, normally fed mothers [38–40]. Nevertheless, the criteria used to assess fertility in these studies were number of children per woman, maternal age at the first child, twin rate, and percentage of

childless women, which may be influenced by many other factors independent of fertility. Hormonal status, ovarian reserve, time to conceive, or miscarriage antecedents were not considered.

### 3.3. Maternal weight before pregnancy

Maternal BMI before conception and maternal weight gain during pregnancy may be indicators of the maternal nutritional status and are also used as indicators of fetal nutrition [9]. In terms of reproduction, premature onset of puberty was observed in girls born from mothers with high BMI ( $>25 \text{ kg.m}^{-2}$ ) [41]. Furthermore, an epidemiologic study conducted on 328 men from the Danish pregnancy cohort has shown a detrimental influence of high maternal BMI on the sons' semen quality and plasma concentration of inhibin B [42], indicative of decreased Sertoli cell function [43].

### 3.4. Summary of epidemiologic studies

The human epidemiologic studies summarized above indicate small but significant effects of maternal nutrition on gonadal development. Because IUGR, however, is known to predispose to excess weight gain and metabolic disorders in adulthood [44,45], the observed effects on reproduction in both males and females may also be the direct consequences of adult metabolic syndrome and overweight. In any case, age at puberty, gonadotropins, and inhibin B plasma concentrations appear to be affected.

## 4. Experimental data from animals

Despite their obvious limitations (placentation varying according to species, and gonadal development taking place at different times, as shown in Fig. 1), animal models are a very important tool to decipher in utero mechanisms leading to altered gonadal function in the adult offspring.

### 4.1. Maternal undernutrition

#### 4.1.1. Effect on gonads

In sheep, where normal gestation lasts approximately 145 days, the effects of maternal undernutrition during critical stages of ovarian development (day 50—just before the onset of meiosis; day 65—just before primordial follicle formation; day 110—just before the onset of tertiary follicle formation) (Fig. 1) were assessed in sheep fetuses by measuring the granulosa cell layer development. A delay in ovarian follicular development was observed at Day 110 when

undernutrition was applied from mating to Day 50 of gestation [46]. In cattle, heifers were fed a low protein diet during the first or second trimester of pregnancy. The largest prepubertal follicle was smaller in their female offspring compared with controls. Moreover, the female offspring had reduced densities of primordial and primary follicles and healthy antral follicles [47].

In male fetuses, maternal undernutrition in early gestation (Day 0 to Day 50) led to an increased expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a protein involved in the transport of cholesterol to the mitochondria for steroidogenesis, in the testis [48]. Nevertheless, testicular weight was not affected [49]. Another study demonstrated that testes tended to be lighter in newborn lambs whose dams were underfed from 70 days of pregnancy until parturition, compared with overnourished lambs [50]. Postnatally, there was no effect of maternal global nutritional restriction in sheep from 31 to 100 days of gestation on the time of the onset of puberty, neither in female [50] nor in male offspring [51]. In young bulls whose dams were fed a low protein diet during the first or the second trimester of pregnancy, however, prepubertal plasma FSH concentrations and testicular weight were increased [52].

Finally, recent data obtained in sheep did not show evidence of any effect of periconceptional undernutrition (−15 days to +30 days after conception) on the testicular development of male offspring at the time of puberty [53,54].

#### 4.1.2. Effects on the hypothalamo-pituitary-gonadal axis

An increased response to GnRH challenge (increased plasma FSH concentrations) was observed in female offspring of sheep undernourished during the first month of gestation [51], whereas no changes in gonadotropin profiles or pituitary responsiveness were observed in the adult female sheep submitted in utero to maternal undernutrition from conception to Day 95 [54]. Similarly, altered hypothalamo-pituitary responsiveness to GnRH challenge was also observed in male sheep submitted to maternal food restriction from 31 to 100 days of gestation [51] but this was not observed when food restriction was imposed from mating to Day 95 [54].

#### 4.1.3. Effects on fertility and gamete quality in adulthood

Maternal food deprivation in mice induced a small, but significant, effect on the reproductive success of their daughters, whose mean litter size was reduced during their second pregnancy [55]. In female sheep,

reduced ovulation rates were observed in females submitted to fetal undernutrition from conception to Day 95 of gestation [49]. Nutritional restriction during the first month of gestation led to an increased number of small follicles in 10-mo-old ewe offspring. In contrast, nutritional restriction during the second and third months of gestation led to a reduction in the number of large corpora lutea (> 8 mm), indicating a decreased number of ovulations [50]. Furthermore, it has recently been shown in rats that maternal undernutrition throughout gestation significantly reduces primordial, secondary, and antral follicle numbers in adult offspring. This decrease is associated with decreased mRNA levels of genes known as critical for follicle maturation and ovulation (*Gdf9*, *Erb*) and with increased oxidative stress in the ovary (as evidenced by the ovarian protein carbonyl content and Peroxiredoxin 3 mRNA levels) [56].

In adult male sheep, nutritional restriction in the second part of gestation (Day 31 to Day 100) leads to a significant decrease in Sertoli cell numbers and to a reduction of the diameter of seminiferous tubules compared with controls [51]. Furthermore, it was reported in rats that undernutrition from the fetal period to puberty was associated with lower testicular weight and lower Sertoli cell numbers in adult life, showing that nutrition during fetal to early postnatal life may be critical to male reproductive life in adulthood [57]. Altogether, these results indicate that Sertoli cells may be particularly vulnerable to maternal undernutrition during pregnancy.

#### 4.1.4. Summary of effects of maternal undernutrition

In conclusion, there is clear evidence, both in males and females, that maternal undernutrition during pregnancy affects pituitary response to GnRH and gonadal development and function, depending on the timing and magnitude of the undernutrition. More studies are needed to explore specifically the effect of maternal undernutrition before the migration of the primordial germ cells to the gonadal ridge in the fetus. Moreover, direct effects on fertility have not been fully explored, although available data suggest that these effects may not result in a dramatic decrease in fertility in otherwise healthy animals. Further investigation is needed in both human and animal models to answer to these concerns.

### 4.2. Maternal overnutrition

#### 4.2.1. Effects on gonads and hypothalamo-pituitary-gonadal axis

Data on gonadal development and offspring fertility are so far also very limited in rodents. In rats, maternal

exposure to a high fat diet leads to early pubertal onset [58]. Recent data from our laboratory showed that maternal high fat diet induces global hypomethylation of testicular genes in the first, but not the second generation offspring (Attig et al., submitted).

#### 4.2.2. Effects on fertility and gamete quality in adulthood

To our knowledge, the fertility of animals born from obese or overnourished dams has not been reported so far, precluding any hasty conclusion on the reproductive function in adult offspring.

#### 4.2.3. Excess nutrition during adolescence

In the particular case of the adolescent obese ovine model developed by J. Wallace, in which embryos are transferred to the uterus of adolescent ewes induced to ovulate, maternal overnutrition during pregnancy induces fetal IUGR because there is a competition between allocation of energy for maternal growth and fetal development [59]. Effects on gonadal function of the offspring have been well characterized. In the female fetuses, Da Silva et al. observed a delay in ovarian development [60] and a reduction in the number of primordial follicles in the fetal ovary [61]. The pituitary expression of LH $\beta$  mRNA in the last days of gestation was also higher in growth-restricted fetuses from the dams offered a high nutrient intake [61]. In contrast, the structure and weight of the testicles and pituitary gonadotropin expression were not altered in male fetuses [62]. The onset of puberty in the adolescent female offspring was similar to controls and no abnormal ovulations were observed [60]. In contrast, prenatal growth restriction in the male lambs born to dams in the same experiment delayed the onset of puberty [60]. Moreover, these adolescent males had lower plasma testosterone concentrations and a reduced testicular volume from birth until 28 to 35 wk of age compared with controls [60], which may be associated with reduced fertility in adulthood.

## 5. Other nutritional compounds

Micronutrient imbalance has detrimental effects on fertility, conception, implantation, fetal organogenesis, and placentation [14]. Most of the micronutrients are supplied by food but requirements increase throughout pregnancy. Moreover, bariatric surgery, which is used to induce weight loss in cases of morbid obesity, induces chronic malabsorption and vitamin deficiency despite oral vitamin complementation [63].

### 5.1. Folate and vitamin B12

B vitamins are essential during the periconceptional period. Folate (vitamin B9) is a cofactor involved in purine and thymidine nucleotide synthesis and folate unbalance leads to reduced cell division caused by a decrease in DNA synthesis [14]. Folate and B12 vitamin also play a critical role in DNA and histone methylation. Methionine is converted in S-adenosyl methionine, which is a methyl donor. Defects in one-carbon pathways result in homocysteine accumulation leading to DNA hypomethylation [64]. Consequently, alterations in the maternal intake of these micronutrients may directly induce long-term effects in the offspring through epigenetic modifications, as evidenced by studies using the variable yellow agouti mice [65] and vitamin B12 and folate restriction during the periconceptional period in sheep [66]. In terms of reproductive organs, vitamin B12 deficiency throughout gestation in rats has been shown to inhibit the development of seminiferous tubules, with a reduction of the number of spermatogenic cells, and to induce the apoptosis of spermatocytes in male offspring [67]. Importantly, these effects are reversible with vitamin B12 supplementation after weaning. Authors hypothesize that mechanisms may involve the inhibition of meiosis and aplasia of the epithelium of seminiferous tubules.

Conversely, very little is known about B12 vitamin and folic acid excess maternal supplementation; maternal folic acid induces a significantly earlier onset of mammary adenocarcinoma [68]. In humans, periconceptional folic acid intake by mothers is also associated with epigenetic changes in insulin-like growth factor 2 (IGF-2) expression in their children [69]. Long-term effects on offspring development and fertility are not yet described. Selenium is a constituent of selenoproteins, such as glutathione peroxidase and is involved in the prevention of oxidative stress [70]. This micronutrient plays an important role in reproduction because it is essential for sperm production and testosterone synthesis [70]. In goats, maternal supplementation with selenium during gestation and lactation impacts on the oxidative status and the expression of apoptotic genes in the testes of offspring [2,71]. Supplementation with moderate doses of selenium leads to a decrease in apoptotic gene expression and testicular DNA fragmentation. Nevertheless, excess supplementation does not induce advantageous effects [2], although deleterious effects were not documented.

Excessive supplementation with micronutrients may be detrimental for fetal development and programming. The administration of high levels of antioxidant vita-

mins C and E affects both maternal endothelial and placental functions [72] and could explain the observed fetal growth restriction in humans [73]. In rats, excess N-3 fatty acid consumption during pregnancy and lactation leads to reduced body weight in adult offspring and a shorter lifespan associated with sensory/neurological abnormalities (presbycusis) [74].

### 5.2. Alcohol

It is long established that in utero exposure to alcohol affects fetal development and leads to long-term cognitive, neuropsychological, and behavioral issues [75,76]. Prenatal alcohol exposure may also lead to consequences on reproductive functions as maternal alcohol consumption during pregnancy alters Sertoli cell development and is associated with a reduction in the semen quality of the sons [77]. Furthermore, an increased risk of cryptorchidism has been observed in young boys submitted to alcohol prenatally [78], leading to higher risks of subfertility in adulthood [13]. In a recent study conducted in mice, it was demonstrated that in utero exposure to alcohol leads to a decrease in the methylation of the CpG islands of the H19 gene in spermatozoa [79]. These results suggest that epigenetic mechanisms may be involved in long-term consequences of prenatal exposure to alcohol. Furthermore, imprinting defects may be transmitted to offspring as a decrease in the methylation of the CpG islands of the H19 gene was observed in the offspring of males submitted in utero to alcohol (second generation) [79].

## 6. Conclusions

Adult lifestyle and environmental conditions are an important factor affecting the fertility of men and women as well as animals. It is now well established that it also impacts health of their offspring. Both epidemiologic and experimental data summarized in this review suggest that maternal nutrition may also impact offspring reproductive maturation resulting in impaired fertility, but studies aiming specifically at analyzing offspring fertility are lacking.

The very important differences in the kinetics of gonadal development and in the establishment of the epigenetic marks between males and females as well as between species certainly play an important role in the different susceptibility of both males and females to the maternal environment and between species. Systematic evaluation is therefore needed to understand these effects, which may in return shed light on the multigenerational effects of fetal programming [80].

## References

- [1] Barker DJ, Eriksson JG, Forsén T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol* 2002;31:1235–9.
- [2] Shi L, Yue W, Zhang C, Ren Y, Zhu X, Wang Q, et al. Effects of maternal and dietary selenium (Se-enriched yeast) on oxidative status in testis and apoptosis of germ cells during spermatogenesis of their offspring in goats. *Anim Reprod Sci* 2010;119:212–8.
- [3] McMillen IC, MacLaughlin SM, Muhlhausler BS, Gentili S, Duffield JL, Morrison JL. Developmental origins of adult health and disease: the role of periconceptual and foetal nutrition. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;102:82–9.
- [4] Silveira PP, Portella AK, Goldani MZ, Barbieri MA. Developmental origins of health and disease (DOHaD). *J Pediatr (Rio J)* 2007;83:494–504.
- [5] Gabory A, Attig L, Junien C. Developmental programming and epigenetics. *Am J Clin Nutr* 2011;94:1943S–52S.
- [6] Jammes H, Junien C, Chavatte-Palmer P. Epigenetic control of development and expression of quantitative traits. *Reprod Fertil Dev* 2011;23:64–74.
- [7] Sharpe RM, Franks S. Environment, lifestyle and infertility—an inter-generational issue. *Nat Cell Biol* 2002;4(Suppl):s33–40.
- [8] Dunn GA, Bale TL. Maternal high-fat diet effects on third-generation female body size via the paternal lineage. *Endocrinology* 2011;152:2228–36.
- [9] Rhind SM, Rae MT, Brooks AN. Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction* 2001;122:205–14.
- [10] Magre S, Vigier B. Développement et différenciation sexuelle de l'appareil génital. In: La reproduction chez les mammifères et chez l'homme, Thibault C, Levasseur M-C (Eds.). Ellipses, 2001, pp. 235–55.
- [11] Hutt KJ, McLaughlin EA, Holland MK. Primordial follicle activation and follicular development in the juvenile rabbit ovary. *Cell Tissue Res* 2006;326:809–22.
- [12] Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 2003;125:769–84.
- [13] Boisen KA, Main KM, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE. Are male reproductive disorders a common entity? The testicular dysgenesis syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2001;948:90–9.
- [14] Cetin I, Berti C, Calabrese S. Role of micronutrients in the periconceptual period. *Hum Reprod Update* 2010;16:80–95.
- [15] Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:17046–9.
- [16] Szyf M. The early life environment and the epigenome. *Biochim Biophys Acta* 2009;1790:878–85.
- [17] Gabory A, Attig L, Junien C. Sexual dimorphism in environmental epigenetic programming. *Mol Cell Endocrinol* 2009;304:8–18.
- [18] Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 2007;447:425–32.
- [19] Bourc'his D, Proudhon C. Sexual dimorphism in parental imprint ontogeny and contribution to embryonic development. *Mol Cell Endocrinol* 2008;282:87–94.
- [20] Waterland RA, Michels KB. Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. *Annu Rev Nutr* 2007;27:363–88.
- [21] Watkins A, Lucas ES, Fleming T. Impact of the periconceptual environment on the programming of adult disease. *J Dev Orig Health Dis* 2010;1:1–9.
- [22] United Nations Children's Fund and World Health Organization. Low Birthweight: Country, Regional and Global Estimates; UNICEF/WHO, 2004.
- [23] de Bruin JP, Dorland M, Bruinse HW, Spliet W, Nikkels PG, Te Velde ER. Fetal growth retardation as a cause of impaired ovarian development. *Early Hum Dev* 1998;51:39–46.
- [24] Ibáñez L, de Zegher F. Puberty and prenatal growth. *Mol Cell Endocrinol* 2006;254–5:22–5.
- [25] Ibáñez L, Potau N, Ferrer A, Rodríguez-Hierro F, Marcos MV, De Zegher F. Reduced ovulation rate in adolescent girls born small for gestational age. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3391–3.
- [26] de Zegher F, Ibáñez L. Prenatal growth restraint followed by catch-up of weight: a hyperinsulinemic pathway to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2006;86:S4–5.
- [27] Ibáñez L, Ong K, Dunger DB, de Zegher F. Early development of adiposity and insulin resistance after catch-up weight gain in small-for-gestational-age children. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:2153–8.
- [28] Ibáñez L, Potau N, Ferrer A, Rodríguez-Hierro F, Marcos MV, De Zegher F. Anovulation in eumenorrheic, nonobese adolescent girls born small for gestational age: insulin sensitization induces ovulation, increases lean body mass, and reduces abdominal fat excess, dyslipidemia, and subclinical hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:5702–5.
- [29] Sloboda DM, Hickey M, Hart R. Reproduction in females: the role of the early life environment. *Hum Reprod Update* 2010;17:210–27.
- [30] Ibáñez L, Lopez-Bermejo A, Díaz M, Suárez L, de Zegher F. Low-birth weight children develop lower sex hormone binding globulin and higher dehydroepiandrosterone sulfate levels and aggravate their visceral adiposity and hypoadiponectinemia between six and eight years of age. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:3696–9.
- [31] Verkauskienė R, Beltrand J, Claris O, Chevenne D, Deghmoon S, Dorgeret S, et al. Impact of fetal growth restriction on body composition and hormonal status at birth in infants of small and appropriate weight for gestational age. *Eur J Endocrinol* 2007;157:605–12.
- [32] Cicognani A, Alessandrini R, Pasini A, Pirazzoli P, Cassio A, Barbieri E, et al. Low birth weight for gestational age and subsequent male gonadal function. *J Pediatr* 2002;141:376–9.
- [33] Nohr EA, Vaeth M, Rasmussen S, Ramlau-Hansen CH, Olsen J. Waiting time to pregnancy according to maternal birthweight and prepregnancy BMI. *Hum Reprod* 2009;24:226–32.
- [34] Ramlau-Hansen CH, Hansen M, Jensen CR, Olsen J, Bonde JP, Thulstrup AM. Semen quality and reproductive hormones according to birthweight and body mass index in childhood and adult life: two decades of follow-up. *Fertil Steril* 2010;94:610–8.
- [35] Vanbillemont G, Lapauw B, Bogaert V, De Naeyer H, De Bacquer D, Ruige J, et al. Birth weight in relation to sex steroid status and body composition in young healthy male siblings. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:1587–94.

- [36] François I, de Zegher F, Spiessens C, D'Hooghe T, Vander-schueren D. Low birth weight and subsequent male subfertility. *Pediatr Res* 1997;42: 899–901.
- [37] Painter RC, Roseboom TJ, Bleker OP. Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview. *Reprod Toxicol* 2005;20:345–52.
- [38] Lumey LH. Reproductive outcomes in women prenatally exposed to undernutrition: a review of findings from the Dutch famine birth cohort. *Proc Nutr Soc* 1998;57:129–35.
- [39] Lumey LH, Stein AD. In utero exposure to famine and subsequent fertility: the Dutch famine birth cohort study. *Am J Public Health* 1997;87:1962–6.
- [40] Painter RC, Westendorp RG, de Rooij SR, Osmond C, Barker DJ, Roseboom TJ. Increased reproductive success of women after prenatal undernutrition. *Hum Reprod* 2008;23:2591–5.
- [41] Keim SA, Branum AM, Klebanoff MA, Zemel BS. Maternal body mass index and daughters' age at menarche. *Epidemiology* 2009;20:677–81.
- [42] Ramlau-Hansen CH, Nohr EA, Thulstrup AM, Bonde JP, Storgaard L, Olsen J. Is maternal obesity related to semen quality in the male offspring? A pilot study. *Hum Reprod* 2007;22:2758–62.
- [43] Toulis KA, Iliadou PK, Venetis CA, Tsametsis C, Tarlatzis BC, Papadimas I, et al. Inhibin B and anti-Mullerian hormone as markers of persistent spermatogenesis in men with non-obstructive azoospermia: a meta-analysis of diagnostic accuracy studies. *Hum Reprod Update* 2010;16:713–24.
- [44] Bateson P, Barker D, Clutton-Brock T, Deb D, D'Udine B, Foley RA, et al. Developmental plasticity and human health. *Nature* 2004;430:419–21.
- [45] Rooney K, Ozanne SE. Maternal over-nutrition and offspring obesity predisposition: targets for preventative interventions. *Int J Obes (Lond)* 2011;35:883–90.
- [46] Rae MT, Palassio S, Kyle CE, Brooks AN, Lea RG, Miller DW, et al. Effect of maternal undernutrition during pregnancy on early ovarian development and subsequent follicular development in sheep fetuses. *Reproduction* 2001;122:915–22.
- [47] Sullivan TM, Micke GC, Greer RM, Irving-Rodgers HF, Rodgers RJ, Perry VEA. Dietary manipulation of *Bos indicus* × heifers during gestation affects the reproductive development of their heifer calves. *Reprod Fertil Dev* 2009;21:773–84.
- [48] Stocco DM. The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *J Endocrinol* 2000;164:247–53.
- [49] Rae MT, Kyle CE, Miller DW, Hammond AJ, Brooks AN, Rhind SM. The effects of undernutrition, in utero, on reproductive function in adult male and female sheep. *Anim Reprod Sci* 2002;72:63–71.
- [50] Kotsampasi B, Chadio S, Papadomichelakis G, Deligeorgis S, Kalogiannis D, Menegatos I, et al. Effects of maternal undernutrition on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis function in female sheep offspring. *Reprod Domest Anim* 2009;44:677–84.
- [51] Kotsampasi B, Balaskas C, Papadomichelakis G, Chadio SE. Reduced Sertoli cell number and altered pituitary responsiveness in male lambs undernourished in utero. *Anim Reprod Sci* 2009;114:135–47.
- [52] Sullivan TM, Micke GC, Greer RM, Perry VE. Dietary manipulation of *Bos indicus* × heifers during gestation affects the prepubertal reproductive development of their bull calves. *Anim Reprod Sci* 2010;118:131–9.
- [53] Roséfort A, Debus N, Viudes G, Camous S, Pailhoux E, Hassoun P, et al. Effect of maternal periconceptional undernutrition on male offspring physiology and testicular development [Abstract]. *Reprod Fertil Dev* 2010;23:219.
- [54] Rae MT, Rhind SM, Fowler PA, Miller DW, Kyle CE, Brooks AN. Effect of maternal undernutrition on fetal testicular steroidogenesis during the CNS androgen-responsive period in male sheep fetuses. *Reproduction* 2002;124:33–9.
- [55] Meikle D, Westberg M. Maternal nutrition and reproduction of daughters in wild house mice (*Mus musculus*). *Reproduction* 2001;122:437–42.
- [56] Bernal AB, Vickers MH, Hampton MB, Poynton RA, Sloboda DM. Maternal undernutrition significantly impacts ovarian follicle number and increases ovarian oxidative stress in adult rat offspring. *PLoS One* 2010;5:e15558.
- [57] Genovese P, Núñez ME, Pombo C, Bielli A. Undernutrition during foetal and post-natal life affects testicular structure and reduces the number of Sertoli cells in the adult Rat. *Reprod Domest Anim* 2010;45:233–6.
- [58] Sloboda DM, Howie GJ, Pleasants A, Gluckman PD, Vickers MH. Pre- and postnatal nutritional histories influence reproductive maturation and ovarian function in the Rat. *PLoS One* 2009;4:e6744.
- [59] Wallace JM, Aitken RP, Cheyne MA. Nutrient partitioning and fetal growth in rapidly growing adolescent ewes. *J Reprod Fertil* 1996;107:183–90.
- [60] Da Silva P, Aitken RP, Rhind SM, Racey PA, Wallace JM. Influence of placentally mediated fetal growth restriction on the onset of puberty in male and female lambs. *Reproduction* 2001;122:375–83.
- [61] Da Silva P, Aitken RP, Rhind SM, Racey PA, Wallace JM. Impact of maternal nutrition during pregnancy on pituitary gonadotrophin gene expression and ovarian development in growth-restricted and normally grown late gestation sheep fetuses. *Reproduction* 2002;123:769–77.
- [62] Da Silva P, Aitken RP, Rhind SM, Racey PA, Wallace JM. Effect of maternal overnutrition during pregnancy on pituitary gonadotrophin gene expression and gonadal morphology in female and male foetal sheep at day 103 of gestation. *Placenta* 2003;24:248–57.
- [63] Xanthakos SA. Nutritional deficiencies in obesity and after bariatric surgery. *Pediatr Clin North Am* 2009;56:1105–21.
- [64] Stover PJ. Physiology of folate and vitamin B12 in health and disease. *Nutr Rev* 2004;62:S3–12.
- [65] Wolff GL, Kodell RL, Moore SR, Cooney CA. Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in *Ay/a* mice. *FASEB J* 1998;12:949–57.
- [66] Sinclair KD, Allegrucci C, Singh R, Gardner DS, Sebastian S, Bispham J, et al. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:19351–6.
- [67] Watanabe T, Ebara S, Kimura S, Maeda K, Watanabe Y, Watanabe H, et al. Maternal vitamin B12 deficiency affects spermatogenesis at the embryonic and immature stages in rats. *Congenit Anom (Kyoto)* 2007;47:9–15.
- [68] Ly A, Lee H, Chen J, Sie KKY, Renlund R, Medline A, et al. Effect of maternal and postweaning folic acid supplementation on mammary tumor risk in the offspring. *Cancer Res* 2011;71: 988–97.
- [69] Steegers-Theunissen RP, Obermann-Borst SA, Kremer D, Lindemans J, Siebel C, Steegers EA, et al. Periconceptional maternal folic acid use of 400 microg per day is related to increased

- methylation of the IGF2 gene in the very young child. *PLoS One* 2009;4:e7845.
- [70] Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet* 2000;356:233–41.
- [71] Ren Y, Wang Q, Shi L, Yue W, Zhang C, Lei F. Effects of maternal and dietary selenium (Se-enriched yeast) on the expression of p34(cdc2) and CyclinB1 of germ cells of their offspring in goats. *Anim Reprod Sci* 2011;123:187–91.
- [72] Aris A, Leblanc S, Ouellet A, Moutquin JM. Detrimental effects of high levels of antioxidant vitamins C and E on placental function: considerations for the vitamins in preeclampsia (VIP) trial. *J Obstet Gynaecol Res* 2008;34:504–11.
- [73] Poston L, Briley AL, Seed PT, Kelly FJ, Shennan AH, Vitamins in Pre-eclampsia (VIP) Trial Consortium. Vitamin C and vitamin E in pregnant women at risk for pre-eclampsia (VIP trial): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2006;367:1145–54.
- [74] Church MW, Jen KL, Anumba JI, Jackson DA, Adams BR, Hotra JW. Excess omega-3 fatty acid consumption by mothers during pregnancy and lactation caused shorter life span and abnormal ABRs in old adult offspring. *Neurotoxicol Teratol* 2010;32:171–81.
- [75] Hellemans KG, Sliwowska JH, Verma P, Weinberg J. Prenatal alcohol exposure: fetal programming and later life vulnerability to stress, depression and anxiety disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 2010;34:791–807.
- [76] Ornoy A, Ergaz Z. Alcohol abuse in pregnant women: effects on the fetus and newborn, mode of action and maternal treatment. *Int J Environ Res Public Health* 2010;7:364–79.
- [77] Ramlau-Hansen CH, Toft G, Jensen MS, Strandberg-Larsen K, Hansen ML, Olsen J. Maternal alcohol consumption during pregnancy and semen quality in the male offspring: two decades of follow-up. *Hum Reprod* 2010;25:2340–5.
- [78] Damgaard IN, Jensen TK, Petersen JH, Skakkebaek NE, Toppari J, Main KM. Cryptorchidism and maternal alcohol consumption during pregnancy *Environ Health Perspect* 2007;115:272–7.
- [79] Stouder C, Somm E, Paoloni-Giacobino A. Prenatal exposure to ethanol: a specific effect on the H19 gene in sperm. *Reprod Toxicol* 2011;31:507–12.
- [80] Dunn GA, Morgan CP, Bale TL. Sex-specificity in transgenerational epigenetic programming. *Horm Behav* 2011;59:290–5.

## Objectifs

L'infertilité est un problème de santé publique qui concerne 15% des couples en âge de procréer, un facteur masculin étant impliqué dans 50% des cas. L'inquiétude quant à l'altération des paramètres spermatiques observée depuis quelques décennies a amené certaines équipes à en rechercher les causes possibles. Un intérêt croissant est porté aux origines environnementales et plus particulièrement à la nutrition, au surpoids et à l'obésité. De plus, l'environnement très précoce, pourrait programmer à long terme la fertilité d'un individu.

L'objectif de cette thèse est donc d'apporter, à l'aide d'études chez l'homme et de données chez l'animal, des éléments de réponse aux questions suivantes :

- De quelle manière le surpoids et l'obésité contribuent-ils à l'infertilité masculine?
- Existe-t-il un moyen de prévenir et/ou de réverser ces effets?
- Est-ce que la croissance *in utero* et l'environnement maternel peuvent influencer les fonctions de reproduction masculine à l'âge adulte?

### **Partie 1 : Nutrition et fonctions de reproduction masculine**

*Question 1* : De quelle manière le surpoids et l'obésité contribuent-ils à l'infertilité masculine ?

Article 1 :

#### **Obesity leads to higher risk of sperm DNA damage, in infertile patients**

C. Dupont, C. Faure, N. Sermondade, M. Boubaya, F. Eustache, P. Clément, P. Briot, I. Berthaut, V. Levy, I. Cedrin-Durnerin, B. Benzacken, P. Chavatte-Palmer, R. Levy (2013 Asian Journal of Andrologie)

Article 2 :

#### **Association between male anthropometric data, metabolic status and semen parameters**

C. Dupont, C. Faure, N. Sermondade, B. Gautier, I. Cedrin-Durnerin, S. Czernichow, B. Benzacken, S. Czernichow, P. Chavatte-Palmer, R. Lévy and the ALIFERT collaborative group (En cours)

Article 3 :

**Body mass index is not associated with sperm-zona pellucida binding ability in subfertile mâles.**

N. Sermondade, C. Dupont, C. Faure, M. Boubaya, I. Cédric-Durnerin, P. Chavatte-Palmer, C. Sifer, R. Lévy (2013 Asian Journal of Andrologie)

*Question 2* : Existe t-il un moyen de prévenir et/ou de réverser ces effets ?

Article 4 :

**In subfertile men, abdominal fat loss is associated with improvement of sperm quality and pregnancy: a case series**

C. Faure, C. Dupont, N. Sermondade, I. Cedrin-Durnerin, J-P. Wolf, R. Lévy (Révision majeure dans PLOS ONE)

## **Partie 2: DOHAD et fonctions de reproduction masculine**

*Question 3* : Est ce que la croissance *in utero* et l'environnement maternel peuvent influencer les fonctions de reproduction masculine à l'âge adulte ?

Article 5 :

**Are semen parameters related to birthweight ?**

C. Faure, C. Dupont, B. Gautier, R. Lévy and the ALIFERT collaborative group (Soumis)

Article 6 :

**Impact of maternal hyperlipidic hypercholesterolemic diet on male reproductive organs in rabbits.**

C. Dupont, D. Ralliard-Rousseau, A. Tarrade, C. Faure, M. Dahirel, B. Sion, F. Brugnon, R. Levy, P. Chavatte-Palmer (soumis).

# Présentation des travaux

## Partie 1 : Nutrition et fonctions de reproduction masculine

### I. Relation entre le statut nutritionnel et les paramètres spermatiques

#### A) IMC et noyaux spermatiques

##### 1- IMC et intégrité de l'ADN spermatique

###### *Introduction*

Si l'impact négatif du surpoids et de l'obésité sur les paramètres spermatiques conventionnels semble reconnu, il persiste une controverse concernant les dommages qu'un IMC élevé pourrait provoquer sur l'intégrité du noyau des spermatozoïdes. L'objectif de l'étude suivante était donc d'apporter de nouvelles données sur le sujet qui permettraient d'aboutir à un consensus.

###### *Matériel et méthodes*

Une étude multicentrique a été réalisée dans 4 centres d'assistance médicale à la procréation. Trois cent trente hommes, partenaires de couple infertile, ont été inclus. Leur taille et leur poids ont été recueillis le jour de l'examen de sperme et l'IMC calculé. Les patients étaient interrogés sur leurs antécédents médicaux et leur consommation de tabac.

Le recueil de sperme était réalisé par masturbation dans un réceptacle stérile. Après 30 minutes de liquéfaction à température ambiante, les paramètres spermatiques conventionnels (volume, concentration, mobilité et vitalité) ont évalués selon les recommandations de l'OMS. La fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes a été mesurée par la technique TUNEL (Terminal Uridine Nick End Labeling). La lecture s'est faite sur lame grâce à un microscope à fluorescence. Deux cents spermatozoïdes ont été évalués par deux opérateurs.

### *Analyses statistiques*

La médiane et les premier et troisième quartiles ont été calculés pour les données continues. Les patients ont été classés en différents groupes selon leur IMC : poids normal (IMC 18,5-29,9 kg.m<sup>-2</sup>), surpoids (IMC 25,0-29,9 kg.m<sup>-2</sup>) ou obèses (IMC ≥30 kg.m<sup>-2</sup>). L'association entre les paramètres spermatiques et l'IMC a été analysée à l'aide d'une régression linéaire.

Dans un deuxième temps, les résultats de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes ont été classés selon le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes : normal (<14%), intermédiaire (14-29%) et pathologique (≥30%). Une régression logistique a été réalisée pour étudier l'impact de l'IMC sur la distribution dans les différentes catégories de résultat de fragmentation de l'ADN.

Les analyses statistiques ont été ajustées en fonctions de la consommation de tabac et de l'âge des patients.

Les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel de statistique « R », version 2.14.1.

### *Résultats*

Aucune association statistiquement significative entre l'IMC et la numération spermatique ou la morphologie n'a été mise en évidence dans cette population.

Une diminution de la mobilité spermatique a été observée chez les patients obèses par rapport aux patients de poids normal (Différence des moyennes [95%CI] : -7.2 [-12.7; -1.7]). Il n'y avait, en revanche, aucune diminution significative de la mobilité chez les patients en surpoids (Différence des moyennes [95%CI] : -3.8 [-7.6; 0.1]). Les résultats étaient similaires après ajustement sur l'âge et la consommation de tabac (Différence des moyennes [95%CI] : -8.6 [-14.6; -2.6] and -2.7 [-6.9; 1.49] respectivement.

Comparé aux hommes ayant un poids normal, le taux de fragmentation de l'ADN spermatique était augmenté chez les hommes obèses (18.3 ± 13.2%) (OR [95%CI] : 3.9 [0.2; 7.6]), mais pas chez ceux en surpoids (15.4 ± 11.4%) (OR [95%CI] : 1.1 [-1.4 ; 3.6]). Les résultats étaient similaires après ajustement sur l'âge et la consommation de tabac (obèses : OR [95%CI] : 4.2 [0.4 ; 7.9]); surpoids : OR [95%CI] : 1.2 [-1.4 ; 3.8]).

Le risque de passer dans la catégorie de fragmentation de l'ADN spermatique plus pathologique est significativement plus élevé chez les hommes obèses : OR [95%CI] : 2.4 [1.2 ; 4.7] et 2.5 [1.2 ; 5.1] après ajustement. Pour les hommes en surpoids, le risque était peu augmenté : OR [95%CI] 1.3 [0.8 ; 2.1] et 1.4 [0.8 ; 2.4] après ajustement.

### *Conclusion*

Nous avons confirmé que l'obésité masculine est associée à une augmentation du risque de présenter un taux de fragmentation de l'ADN spermatique plus élevé. C'est un élément important, considérant l'effet négatif que la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes a sur les chances de concevoir un enfant. Le stress oxydatif est probablement un des mécanismes clé liant l'obésité et l'altération de l'ADN spermatique. Ce mécanisme expliquerait également la baisse de la mobilité spermatique observée chez les hommes obèses.

## ORIGINAL ARTICLE

# Obesity leads to higher risk of sperm DNA damage in infertile patients

Charlotte Dupont<sup>1,2,3,4</sup>, Céline Faure<sup>1,2</sup>, Nathalie Sermondade<sup>1,2</sup>, Marouane Boubaya<sup>5</sup>, Florence Eustache<sup>1</sup>, Patrice Clément<sup>6</sup>, Pascal Briot<sup>7</sup>, Isabelle Berthaut<sup>8</sup>, Vincent Levy<sup>5</sup>, Isabelle Cedrin-Durnerin<sup>9</sup>, Brigitte Benzacken<sup>1</sup>, Pascale Chavatte-Palmer<sup>3,4</sup> and Rachel Levy<sup>1,2</sup>

There has been a growing interest over the past few years in the impact of male nutrition on fertility. Infertility has been linked to male overweight or obesity, and conventional semen parameter values seem to be altered in case of high body mass index (BMI). A few studies assessing the impact of BMI on sperm DNA integrity have been published, but they did not lead to a strong consensus. Our objective was to explore further the relationship between sperm DNA integrity and BMI, through a 3-year multicentre study. Three hundred and thirty male partners in subfertile couples were included. Using the terminal uridine nick-end labelling (TUNEL) assay, we observed an increased rate of sperm DNA damage in obese men (odds ratio (95% confidence interval): 2.5 (1.2–5.1)).

*Asian Journal of Andrology* advance online publication, \*\* \* 2013; doi:10.1038/aja.2013.65

**Keywords:** male infertility; obesity; overweight; sperm; sperm DNA fragmentation

## INTRODUCTION

Infertility is a public health problem concerning 15% of couples of child-bearing age. Male factors are involved in almost 50% of cases. Many studies have highlighted impairments of sperm quality for patients with a high or very high body mass index (BMI), notably a decrease in seminal sperm concentration.<sup>1–4</sup> Two recent meta-analyses including, respectively 14 and 21 studies, demonstrated an increased risk of azoospermia or oligozoospermia in overweight or obese males.<sup>5,6</sup>

Sperm DNA integrity is another factor that may be affected in obese subjects, possibly resulting from increased damage due to oxidative stress. A reduced number of studies have assessed the impact of BMI on sperm DNA integrity, with controversial results due to low numbers of cases studied and disparity in the techniques used.<sup>1–4,7–9</sup> The objective of the present study was to explore this relationship further through a 3-year multicentre study.

## MATERIALS AND METHODS

Data collection involved four centres during the period 2009–2012. Three hundred and thirty male partners of subfertile couples, presenting for semen analysis, were included, after providing written and informed consent. Height and weight were recorded on the day of semen collection and the BMI was calculated ( $\text{kg m}^{-2}$ ). Patients provided information on their tobacco consumption. Patients who smoked more than two cigarettes per day were designated as smokers.

Semen samples were collected by masturbation into a sterile plastic cup in the laboratory. Samples were allowed to liquefy at room temperature for 30 min and conventional semen quality (semen volume, sperm concentration and mobility) was evaluated according to WHO guidelines.<sup>10</sup> Sperm morphology was assessed by using David's criteria.<sup>11</sup>

Sperm DNA fragmentation was detected with the terminal uridine nick-end labelling (TUNEL) technique with an *In Situ* Cell Death Detection Kit (Fluorescein, Roche Applied Science, Meylan, France). Briefly, after trypsinization (Trypsin EDTA, Eurobio, Les Ulis, France), spermatozoa were immediately fixed in Carnoy solution (2:1 methanol/acetic acid) and stored at  $-20^\circ\text{C}$  for at least 60 min. After being washed with phosphate-buffered solution, sperm pellets were permeabilized for 20 min with 0.1% ( $v/v$ ) Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) in sodium citrate solution (sodium citrate dihydrate, VWR, Fontenay sous Bois, France;  $3.4\text{ mmol l}^{-1}$ , pH 6.8) and washed again with phosphate-buffered solution. The cells were then incubated with FITC-labelled dUTP and a terminal deoxyribonucleotidyl transferase (TUNEL solution). The positive control sample was treated with  $100\ \mu\text{l}$  of DNase ( $1\ \text{U}\ \mu\text{l}^{-1}$ ) (Fermentas, Saint Léon Rot, France) for 1 h at  $37^\circ\text{C}$  before incubation with the TUNEL solution and the deoxyribonucleotidyl transferase enzyme was omitted for the negative control. Cells were then washed twice in phosphate-buffered solution and spread over glass slides. The slides were dried at room temperature in the dark

<sup>1</sup>AP-HP, Jean Verdier hospital, Reproductive Biology unit-CECOS, F-93140 Bondy, France; <sup>2</sup>Paris 13 University, Sorbonne Paris Cité, Nutritional epidemiology unit (UREN, UMR U557 Inserm, U1125 Inra, Cnam, CRNH IdF), F-93017 Bobigny, France; <sup>3</sup>INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction (Biology of Reproductive and development unit), F-78352 Jouy en Josas, France; <sup>4</sup>ENVA, veterinary school, F-94704 Maisons-Alfort, France; <sup>5</sup>AP-HP, Avicenne hospital, Clinical research unit, F-93000 Bobigny, France; <sup>6</sup>Clément laboratory, Laboratoire Clément, F-93150 Le Blanc Mesnil, France; <sup>7</sup>American hospital of Paris, Reproductive Biology unit, F-92200 Neuilly sur seine, France; <sup>8</sup>AP-HP, Tenon hospital, Reproductive Biology unit-CECOS, F-75020 Paris, France and <sup>9</sup>AP-HP, Jean Verdier hospital, Reproductive medicine unit, Paris 13 University, F-93140 Bondy, France

Correspondence: Dr C Dupont (charlotte.dupont@jvr.aphp.fr)

Received: 16 January 2013; Revised: 26 March 2013; Accepted: 30 April 2013

and DAPI solution (VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI, 1.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; Vector Laboratories, Paris, France) was added to the spermatozoa. Slides were examined by fluorescence microscopy. At least 200 spermatozoa were assessed blindly by two biologists and the total DNA fragmentation rate was calculated as the number of FITC-positive cells divided by the total number of sperm nuclei (labelled with DAPI).

### Statistical analyses

Data are summarized as the median, the first quartile and third quartile for continuous data. Categorical variables are presented as absolute and relative frequencies. Patients were assigned to different groups according to their BMI: normal weight (BMI: 18.5–24.9  $\text{kg m}^{-2}$ ), overweight (25.0–29.9  $\text{kg m}^{-2}$ ) or obese ( $\geq 30.0 \text{ kg m}^{-2}$ ).<sup>12</sup> Association between sperm parameter values and BMI was analysed by using linear regression. Secondly, data were categorized according to the DNA fragmentation rate as normal (<14%), borderline (14%–29%) and pathological ( $\geq 30\%$ ). Ordinal logistic regression was performed to assess the impact of BMI across DNA fragmentation categories. Since age and tobacco can affect sperm DNA integrity,<sup>1,13</sup> unadjusted and adjusted analyses for age and smoking status were performed. Data were analysed by the free available R statistical software version 2.14.1.

### RESULTS

The mean age and BMI were  $37.6 \pm 6.2$  years and  $25.8 \pm 4.0 \text{ kg m}^{-2}$ , respectively. Abstinence was not different between groups ( $3.9 \pm 1.8$ ,  $4.3 \pm 4.9$  and  $3.8 \pm 2.8$  days, respectively, for normal, overweight and obese patients). No association between BMI and total sperm count or percentage of morphologically normal spermatozoa could be established. In contrast, sperm motility was low in obese patients compared with that in normal and overweight patients (mean differences (95% CI):  $-7.2$  ( $-12.7$ ,  $-1.7$ ) and mean differences (95% CI):  $-3.8$  ( $-7.6$ ,  $0.1$ ), respectively), even after adjustment for age and smoking status (mean differences (95% CI):  $-8.6$  ( $-14.6$ ,  $-2.6$ ) and  $-2.7$  ( $-6.9$ ,  $1.49$ ), respectively). Compared with men with normal BMI, the DNA fragmentation rate was significantly higher in obese men, (mean differences (95% CI):  $3.9$  ( $0.2$ ,  $7.6$ )), but not in overweight men (mean differences (95% CI):  $1.1$  ( $-1.4$ ,  $3.6$ )). Comparable results were obtained after adjustment for age and tobacco use (obese *vs.* normal: mean differences (95% CI):  $4.2$  ( $0.4$ ,  $7.9$ )); overweight *vs.* normal: mean differences (95% CI):  $1.2$  ( $-1.4$ ,  $3.8$ )) (Table 1).

In a second analysis, data were stratified according to the DNA fragmentation rate as normal (<14.0%), borderline (14.0%–29.9%) and pathological ( $\geq 30.0\%$ ). Compared with men with normal BMI,

OR (95% CI) for moving from one DNA fragmentation category to the next was 1.3 (0.8, 2.1) for overweight and 2.4 (1.2, 4.7) for obese men. After adjustment for age and smoking status, OR (95% CI) for moving from one DNA fragmentation category to the next was 1.4 (0.8, 2.4) for overweight and 2.5 (1.2, 5.1) for obese men (Table 2).

### DISCUSSION

Over the past few years, there has been a growing interest on the link between male nutrition and infertility. It is important to evaluate the potential effect of overweight or obesity on DNA integrity, since lower pregnancy rates or higher miscarriage rates have been reported in cases of increased sperm DNA fragmentation.<sup>13</sup> Six studies have been published with conflicting results because of the heterogeneity of the techniques and the small samples used in some studies (Table 3). Kort *et al.*<sup>3</sup> reported an increased sperm DNA fragmentation rate, determined by the sperm chromatin structure assay (SCSA), in overweight and obese patients. Chavarro *et al.*<sup>1</sup> and Farriello *et al.*<sup>8</sup> using the Single Cell Gel Electrophoresis assay method (comet assay), and LaVignera *et al.*,<sup>9</sup> using the TUNEL assay with flow cytometry, observed higher sperm DNA damage in obese, but not in overweight men. Tunc *et al.*,<sup>4</sup> Hammiche *et al.*<sup>2</sup> and Rybar *et al.*<sup>7</sup> using respectively the TUNEL<sup>4</sup> and SCSA<sup>2,7</sup> methods, did not find any significant association between BMI and sperm DNA integrity, but only small populations (ranging from 81 to 175) were used in these studies.

In the present work, with the TUNEL assay performed on a large population, an increased risk of sperm DNA damage was observed in obese, but not in overweight men, confirming previous observations.<sup>1,8,9</sup> This increased risk was confirmed after adjustment for age and tobacco consumption, whereas these adjustments were usually lacking in previous studies, despite the fact that age and tobacco consumption are known to increase sperm DNA fragmentation.<sup>1,13</sup>

Although there were no significant differences in sperm concentration or percentage of morphologically normal spermatozoa between BMI classes, sperm motility was also significantly diminished in obese men as previously described.<sup>9</sup>

The negative impact of male obesity on sperm DNA integrity could lead to serious consequences for fertility.<sup>14</sup> Indeed, sperm DNA alteration has been linked to impaired fertilization,<sup>13</sup> altered embryo and blastocyst development,<sup>15</sup> lower implantation rates and a higher incidence of miscarriage.<sup>16</sup> Moreover, a recent link between high paternal BMI and decreased live birth outcomes after assisted reproduction treatment has been highlighted,<sup>17–20</sup> possibly due to reduced blastocyst development, reduced implantation rates and higher pregnancy loss.<sup>19</sup>

**Table 1** Conventional semen parameter values and sperm DNA fragmentation rate across BMI categories

	Normal (18.5–24.9 $\text{kg m}^{-2}$ ) (n=151)	Overweight (25.0–29.9 $\text{kg m}^{-2}$ ) (n=137)	Obese ( $\geq 30.0 \text{ kg m}^{-2}$ ) (n=43)	Linear regression	Normal	Overweight	Obese
	Median (Q1–Q3)				Mean difference (95% CI)		
Total sperm count (TSC) ( $10^6$ )	74 (30–173.2)	73.5 (27.04–111.7)	32.48 (7.198–134.4)	Univariate	0 (reference)	$-36.7$ ( $-93.6$ , $20.2$ )	$-10.4$ ( $-88.4$ , $67.6$ )
				Adjusted	0 (reference)	$-43.1$ ( $-103.8$ , $17.6$ )	$-7.6$ ( $-88.8$ , $73.6$ )
Motility (%)	45 (30–50)	40 (30–50)	35 (30–50)	Univariate	0 (reference)	$-3.8$ ( $-7.6$ , $0.1$ )	$-7.2$ ( $-12.7$ , $-1.7$ )
				Adjusted	0 (reference)	$-2.7$ ( $-6.9$ , $1.49$ )	$-8.6$ ( $-14.6$ , $-2.6$ )
Normal morphology (%)	21 (11.5–29.25)	16 (8–27)	18.5 (13.25–31.75)	Univariate	0 (reference)	$-3.3$ ( $-7.0$ , $5.34$ )	$-0.8$ ( $-1.4$ , $4.8$ )
				Adjusted	0 (reference)	$-1.3$ ( $-6.3$ , $3.7$ )	$0.5$ ( $-6.3$ , $3.7$ )
DNA fragmentation rate (%)	13 (10–15)	13 (7.4–19)	13 (13–21.9)	Univariate	0 (reference)	$1.1$ ( $-1.4$ , $3.6$ )	$3.9$ ( $0.2$ , $7.6$ )
				Adjusted	0 (reference)	$1.2$ ( $-1.4$ , $3.8$ )	$4.2$ ( $0.4$ , $7.9$ )

Abbreviation: BMI, body mass index.

**Table 2 Prevalence of subjects in each BMI and sperm DNA fragmentation category**

	n (%)			Ordinal logistic regression	OR (95% CI)		
DNA fragmentation rate <14.0%	110 (72.8%)	93 (67.9%)	22 (51.2%)	Univariate	1 (reference)	1.3 (0.8, 2.1)	2.4 (1.2, 4.7)
DNA fragmentation rate 14.0%–29.9%	30 (19.9%)	30 (21.9%)	16 (37.2%)	Adjusted	1 (reference)	1.4 (0.8, 2.4)	2.5 (1.2, 5.1)
DNA fragmentation rate ≥30%	11 (7.3%)	14 (10.2%)	5 (11.6%)				

Abbreviation: BMI, body mass index.

ORs for moving from one DNA fragmentation category to the next. Results are presented as unadjusted, and adjusted for age and tobacco use.

**Table 3 Summary of the main studies comparing BMI and sperm DNA fragmentation**

	Population	N	Technique	Observations
Kort <i>et al.</i> (2006) <sup>3</sup>	Male partner in subfertile couples	520	SCSA (flow cytometry)	Higher sperm DNA fragmentation rate in overweight and obese men compared with men with normal BMI
Chavarro <i>et al.</i> (2010) <sup>1</sup>	Male partner in subfertile couples	413	COMET assay	Higher sperm DNA fragmentation rate in obese men compared with men with normal BMI
Fariello <i>et al.</i> (2012) <sup>8</sup>	Male partner in subfertile couples	305	COMET assay	
LaVignera <i>et al.</i> (2012) <sup>9</sup>	Healthy non smoking men	150	TUNEL assay (flow cytometry)	BMI
Tunc <i>et al.</i> (2010) <sup>4</sup>	Male partner in subfertile couples	81	TUNEL assay (slides)	No association between BMI and DNA fragmentation
Rybar <i>et al.</i> (2011) <sup>7</sup>	Male partner in subfertile couples	153	SCSA (flow cytometry)	
Hammiche <i>et al.</i> (2011) <sup>2</sup>	Male partner in subfertile couples	175	SCSA (flow cytometry)	

Abbreviations: BMI, body mass index; COMET assay, also know as single-cell gel electrophoresis assay; SCSA, sperm chromatin structure assay; TUNEL, terminal uridine nick-end labelling.

Further studies are needed to investigate the underlying mechanisms involved.<sup>21</sup> Oxidative stress may be the key mechanism linking overweight or obesity with male infertility, inducing increased sperm DNA damage. Indeed, BMI and abdominal obesity have been correlated to systemic oxidative stress assessed in plasma and urine.<sup>22</sup> In addition, the testicular microenvironment is also exposed to oxidative stress and a positive correlation between BMI and seminal oxidative stress has been observed.<sup>4</sup>

Finally, consequences of paternal overweight or obesity may not be limited to fertility. Indeed, offspring development may be altered by paternal health and nutrition, as recently demonstrated in animal models.<sup>23</sup> A link between oxidative stress, sperm DNA fragmentation and sperm DNA methylation has been demonstrated in men,<sup>24</sup> and these findings may play a role in subsequent offspring development and epigenetic markers.

## CONCLUSION

Male obesity is associated with an increased risk of sperm DNA damage and lower sperm motility and thus reduced sperm quality. BMI, which is an easy and widely-used indicator of nutritional status, should be considered in male fertility assessment and prognosis, both in spontaneous conception and after assisted reproductive techniques. Overweight or obese male patients of couples planning to conceive should be informed and educated on this subject. Whether weight normalization could improve sperm DNA integrity should also be further investigated.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

CD, CF and NS participated in study conception and design, acquisition, interpretation and analysis of data, and drafting of the manuscript. MB and VL participated in study design, performed statistical analyses and participated in critical revision of the manuscript for intellectual content. FE, PC, PB, IB, ICD, BB and PCP participated in acquisition of data and critical revision of the manuscript for intellectual content. RL participated in study conception and design,

interpretation of data, critical revision of the manuscript for intellectual content and supervised the study.

## COMPETING FINANCIAL INTERESTS

All authors declare that there are no competing financial interests.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank A C Marty for technical assistance.

- Chavarro JE, Toth TL, Wright DL, Meeker JD, Hauser R. Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. *Fertil Steril* 2010; **93**: 2222–31.
- Hammiche F, Laven JS, Boxmeer JC, Dohle GR, Steegers EA *et al.* Sperm quality decline among men below 60 years of age undergoing IVF or ICSI treatment. *J Androl* 2011; **32**: 70–6.
- Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB *et al.* Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl* 2006; **27**: 450–2.
- Tunc O, Bakos HW, Tremellen K. Impact of body mass index on seminal oxidative stress. *Andrologia* 2011; **43**: 121–8.
- Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Levy R, Czernichow S. Obesity and increased risk for oligozoospermia and azoospermia. *Arch Intern Med* 2012; **172**: 440–2.
- Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Shayeb AG, Bonde JP *et al.* BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2013; **19**: 221–31.
- Rybar R, Kopecka V, Prinosilova P, Markova P, Rubes J. Male obesity and age in relationship to semen parameters and sperm chromatin integrity. *Andrologia* 2011; **43**: 286–91.
- Fariello RM, Pariz JR, Spaine DM, Cedenho AP, Bertolla RP *et al.* Association between obesity and alteration of sperm DNA integrity and mitochondrial activity. *BJU Int* 2012; **110**: 863–7.
- La Vignera S, Condorelli RA, Vicari E, Calogero AE. Negative effect of increased body weight on sperm conventional and nonconventional flow cytometric sperm parameters. *J Androl* 2012; **33**: 53–8.
- World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm–Cervical Mucus Interaction. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.
- Auger J, Eustache F, Andersen AG, Irvine DS, Jorgensen N *et al.* Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Hum Reprod* 2001; **16**: 2710–7.
- World Health Organization. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1995; **854**: 1–452.

- 13 Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010; **93**: 1027–36.
- 14 Tamburrino L, Marchiani S, Montoya M, Elia Marino F, Natali I *et al*. Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. *Asian J Androl* 2012; **14**: 24–31.
- 15 Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 2004; **82**: 378–83.
- 16 Frydman N, Prisant N, Hesters L, Frydman R, Tachdjian G *et al*. Adequate ovarian follicular status does not prevent the decrease in pregnancy rates associated with high sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 2008; **89**: 92–7.
- 17 Colaci DS, Afeiche M, Gaskins AJ, Wright DL, Toth TL *et al*. Men's body mass index in relation to embryo quality and clinical outcomes in couples undergoing *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 2012; **98**: 1193–9.e1.
- 18 Anifandis G, Dafopoulos K, Messini CI, Polyzos N, Messinis IE. The BMI of men and not sperm parameters impact on embryo quality and the IVF outcome. *Andrology* 2013; **1**: 85–9.
- 19 Bakos HW, Henshaw RC, Mitchell M, Lane M. Paternal body mass index is associated with decreased blastocyst development and reduced live birth rates following assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2011; **95**: 1700–4.
- 20 Petersen GL, Schmidt L, Pinborg A, Kamper-Jorgensen M. The influence of female and male body mass index on live births after assisted reproductive technology treatment: a nationwide register-based cohort study. *Fertil Steril* 2013; **99**: 1654–62.
- 21 Aitken RJ, Koppers AJ. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl* 2011; **13**: 36–42.
- 22 Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y *et al*. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004; **114**: 1752–61.
- 23 Ferguson-Smith AC, Patti ME. You are what your dad ate. *Cell Metab* 2011; **13**: 115–7.
- 24 Tunc O, Tremellen K. Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. *J Assist Reprod Genet* 2009; **26**: 537–44.

## 2- Paramètres anthropométriques, bilan métabolique et qualité spermatique

### *Introduction*

La mesure de l'IMC est communément utilisée pour évaluer le surpoids et l'obésité. La répartition de la masse grasse et plus précisément l'obésité abdominale est néanmoins un paramètre important à prendre en compte dans l'évaluation des risques de comorbidités associées à l'obésité. Peu de données évaluant l'association entre l'obésité abdominale et les paramètres spermatiques sont cependant disponibles dans la littérature.

L'objectif de cette étude était d'analyser la corrélation entre l'obésité abdominale et la qualité spermatique (spermogramme, spermocytogramme et fragmentation de l'ADN spermatique).

### *Matériel et méthodes*

Les données de 65 hommes recrutés dans l'étude ALIFERT (biomedical research P071224) ont été analysées. Ces hommes étaient partenaires de couples infertiles présentant une infertilité primaire idiopathique. Le jour de la visite d'inclusion, l'IMC et le tour de taille ont été mesurés. La graisse viscérale a été évaluée par impédancemétrie. Un bilan métabolique (Cholestérol total, cholestérol LDL, cholestérol HDL, triglycérides et glycémie), l'analyse des paramètres spermatiques (WHO, 2010) et une étude de la fragmentation de l'ADN (méthode TUNEL) ont été réalisés. Les pourcentages de spermatozoïdes présentant une fragmentation partielle (30 à 50% de la surface de la tête) et de ceux présentant une fragmentation totale (>50%) ont été mesurés.

### *Résultats*

L'IMC des patients était significativement négativement corrélé au nombre total de spermatozoïdes (NTS) ( $P=0.01$ ), à la mobilité spermatique ( $P=0.02$ ) et positivement corrélés à la fragmentation partielle ( $P<0,001$ ) mais pas à la fragmentation totale de l'ADN spermatique ( $P=0.43$ ).

Le nombre total de spermatozoïde tend à être diminué quand l'obésité abdominale augmente, qu'elle soit évaluée par impédancemétrie ( $P=0.08$ ) ou par la mesure du tour de taille ( $P=0.09$ ). L'obésité abdominale évaluée par impédancemétrie et par la mesure du tour de taille est négativement corrélée à la mobilité spermatique ( $P=0.04$  (Impédancemétrie) et  $P=0.02$  (TT)) et à la fragmentation partielle de l'ADN spermatique ( $P=0.04$

(Impédancemétrie) et  $P=0.03$  (TT)). Aucun lien entre le statut métabolique et la qualité spermatique n'a été observé.

### *Conclusion*

L'obésité abdominale est décrite comme un bon facteur prédictif du risque individuel de développer un syndrome métabolique. Notre étude, ne nous a pas permis de montrer que c'était un meilleur indicateur que l'IMC pour évaluer le risque d'altération des paramètres spermatiques. Néanmoins, seuls 5 patients présentaient un IMC normal et une obésité abdominale (Impédancemétrie Score  $>4$ ) ; donc une étude similaire ciblant cette catégorie de patients métaboliquement à risque devrait être entreprise.

Dans cette étude, nous avons également observé qu'un IMC élevé ou une obésité abdominale entraînaient une augmentation significative de la fragmentation partielle spermatique, mais pas de la fragmentation totale. L'évaluation de la fragmentation partielle de l'ADN spermatique, habituellement non prise en compte, pourrait constituer un nouveau marqueur spermatique modifié par le surpoids ou l'obésité, qui pourrait être le signe précoce de l'apoptose spermatique.

3 **TITLE**

4 **Association between male anthropometric data, metabolic status and semen parameters**

6 **AUTHORS**

7 Charlotte Dupont<sup>1,2,3,4\*</sup>, Céline Faure<sup>1,2\*</sup>, Benoit Gautier<sup>2</sup>, Nathalie Sermondade<sup>1,2</sup>, Sébastien  
8 Czernichow<sup>6</sup>, Isabelle Cedrin-Durnerin<sup>2,5</sup>, Pascale Chavatte-Palmer<sup>3,4</sup>, Rachel Lévy<sup>1,2</sup> and the  
9 ALIFERT collaborative group<sup>7</sup>

11 \* These authors are similar in author order

13 <sup>1</sup> AP-HP, hôpital Jean Verdier, HUPSSD, Service d'histologie-embryologie-cytogénétique-BDR-  
14 CECOS, pôle femme-et-enfant, 93140 Bondy, France

15 <sup>2</sup> Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Unité de Recherche en Epidémiologie Nutritionnelle,  
16 UMR U557 Inserm, U1125 Inra, Cnam, CRNH IdF, 93017 Bobigny, France

17 <sup>3</sup> INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, 78352 Jouy en Josas, France

18 <sup>4</sup> ENVA, 94704 Maisons-Alfort, France

19 <sup>5</sup> AP-HP, hôpital Jean Verdier, HUPSSD, Service de médecine de la reproduction, pôle femme-et-  
20 enfant, F-93140 Bondy, France

21 <sup>6</sup> AP-HP, hôpital Ambroise Paré, Service Nutrition, 92100 Boulogne-Billancourt, France

22 <sup>7</sup> **Alifert Collaborative Group:** *Isabelle Aknin* : Unité fonctionnelle de biologie de la reproduction, histologie –  
23 embryologie – cytogénétique, hôpital Nord, Saint-Étienne, France ; *Brigitte Benzacken* : d'Histologie-  
24 Embryologie-Cytogénétique-CECOS, Hôpital Jean Verdier, Assistance Publique, Bondy, France, *Isabelle*  
25 *Cedrin-Durnerin* : Service de Médecine de la Reproduction, Hôpital Jean Verdier, Assistance Publique—  
26 Hôpitaux de Paris, Université Paris XIII, Bondy, France ; *Pascale Chavatte-Palmer* : INRA, UMR1198 Biologie  
27 du Développement et Reproduction, Jouy en Josas, France ; *Sébastien Czernichow* : Service Nutrition, Hôpital  
28 Ambroise Paré, Boulogne-Billancourt, France ; *Charlotte Dupont* : Service d'Histologie-Embryologie-  
29 Cytogénétique-CECOS, Hôpital Jean Verdier, Assistance Publique, Bondy, France ; *Céline Faure* : Service  
30 d'Histologie-Embryologie-Cytogénétique-CECOS, Hôpital Jean Verdier, Assistance Publique, Bondy, France ;  
31 *Serge Herberg* : Unité de Recherche en Epidémiologie Nutritionnelle, INSERM U557; INRA; CNAM;  
32 Université Paris 13, CRNH IdF, 93017 Bobigny, France ; *Jean-Noël Hugues* : Service de Médecine de la  
33 Reproduction, Hôpital Jean Verdier, Assistance Publique—Hôpitaux de Paris, Université Paris XIII, Bondy,  
34 France ; *Jean-Philippe Klein*: Unité fonctionnelle de biologie de la reproduction, histologie – embryologie –  
35 cytogénétique, hôpital Nord, Saint-Étienne, France ; *Rachel Lévy* : Service d'Histologie-Embryologie-  
36 Cytogénétique-CECOS, Hôpital Jean Verdier, Assistance Publique, Bondy, France ; *Nathalie Sermondade* :  
37 Service d'Histologie-Embryologie-Cytogénétique-CECOS, Hôpital Jean Verdier, Assistance Publique, Bondy,  
38 France ; *Christophe Sifer* : Service d'Histologie-Embryologie-Cytogénétique-CECOS, Hôpital Jean Verdier,  
39 Assistance Publique, Bondy, France ; *Jean-Philippe Wolf* : Service d'Histologie-Embryologie-Biologie de la  
40 Reproduction

43 **AUTHOR FOR CORRESPONDENCE, PROOF-READING AND REPRINT**

44 **REQUESTS**

45 Dr Charlotte DUPONT

46 Service d'Histologie-Embryologie-Cytogénétique-CECOS, Hôpital Jean Verdier (AP-HP),  
47 93143 Bondy, France

48 Tel: +33 1 48 02 68 80 Fax: +33 1 48 02 58 64

49 E-mail: charlotte.dupont@jvr.aphp.fr

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the impact of abdominal obesity and metabolic status on conventional semen parameters and sperm DNA integrity.

**Design:** Cross-sectional study.

**Setting:** University hospital assisted reproduction unit.

**Patient(s):** Sixty-five men, partners of couples presenting for a primary idiopathic infertility, who were recruited within the ALIFERT study.

**Intervention(s):** None.

**Main Outcome Measure(s):** BMI and waist circumference (WC) were measured and visceral adiposity was assessed by impedancemetry. Serum triglycerides, cholesterol (total, HDL and LDL cholesterol) and glucose were determined. Semen analyses (conventional semen parameters and sperm DNA fragmentation) were also performed.

**Result(s):** BMI was negatively correlated to total sperm count ( $P=0.01$ ), sperm motility ( $P=0.02$ ) and partial sperm DNA fragmentation ( $P<0.001$ ). Total sperm count tended to be decreased with increasing abdominal fat as assessed by visceral adiposity ( $P=0.08$ ) and WC ( $P=0.09$ ). Abdominal adiposity was negatively correlated to sperm motility ( $P=0.04$  (visceral adiposity) and  $P=0.02$  (WC)) and partial sperm DNA damages ( $P=0.04$  (visceral adiposity);  $P=0.03$  (WC)) but there was no link between metabolic status and semen parameters.

**Conclusion(s):** Altogether, these data indicate that BMI and anthropometric parameters should be considered in male fertility assessment and prognosis.

**Key Words:** BMI, Abdominal obesity, male fertility, semen parameters, sperm DNA fragmentation

## 80 Introduction

81 Overweight and obesity represent major health concerns worldwide, with their prevalence  
82 increasing in both developed and developing countries. Overweight and obesity are defined  
83 by abnormal or excessive fat accumulation leading to high risk of comorbidities such as  
84 cardiovascular diseases, metabolic syndrome and major impact on quality of life. BMI is  
85 defined as a person's weight in kilograms divided by the square of his heights in meters  
86 ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). The WHO definition is: "a BMI greater or equal to 25 is overweight and a BMI  
87 greater than or equal to 30 is obesity<sup>1</sup>. Because it is correlated to fat accumulation, body mass  
88 index (BMI) is commonly used as tool for assessing body corpulence<sup>1-4</sup>. Overweight and  
89 obesity are known to impact fertility of couples, with large cohort studies linking high or very  
90 high BMI and infertility in both males and females<sup>5</sup>. In males, although some reports did not  
91 show any association between BMI and conventional semen parameters<sup>6, 7</sup>, most studies  
92 demonstrated an alteration in sperm parameters, especially a decrease in sperm concentration  
93 or numeration, in case of overweight or obesity<sup>8-11</sup>. These conflicting observations may be  
94 explained by variations in the study populations and different methodological approaches.  
95 Nevertheless, two recent meta-analysis highlighted an increased risk of azoospermia or  
96 oligozoospermia in patients with  $\text{BMI} > 25 \text{ kg}/\text{m}^2$ <sup>12, 13</sup>. Although this remains controversial<sup>7,</sup>  
97<sup>9, 11</sup>, most studies suggest that sperm DNA fragmentation rates must be increased in patients  
98 with high ( $>25\text{kg}/\text{m}^2$ )<sup>10</sup> or very high ( $>30\text{kg}/\text{m}^2$ ) BMI<sup>8, 14-16</sup>.

99 BMI, however, may not be the most accurate tool to assess excess of intra-abdominal fat  
100 accumulation since it does not take into account fat and lean body mass and can not  
101 discriminate between subcutaneous and visceral fat<sup>17</sup>. Other markers may be used such as  
102 waist circumference (WC), which is used as a proxy for abdominal fat and is reliable to  
103 predict pathological risk such as metabolic syndrome<sup>18</sup>. The bioelectrical impedance  
104 measurement relies on the differences in resistance after the conduction of an electrical

105 current through the body. It enables a rapid assessment of body composition without radiation.  
1  
2 106 Although this method is not as specific as DXA (Dual-Energy X-Ray Absorptiometry), CT  
3  
4 107 scan (computed tomography scan) or MRI (Magnetic resonance imaging), it can provide  
5  
6  
7 108 reliable information on body composition and visceral fat <sup>17</sup>.  
8  
9  
10 109 Recently, a Japanese study showed that intra-abdominal fat assessment is a reliable predictor  
11  
12 110 of an individual's risk of developing the metabolic syndrome, even in people with a BMI  
13  
14 111 <25kg/m<sup>2</sup> <sup>19</sup>. If abdominal obesity is now frequently used as a predictor of metabolic  
15  
16 112 syndrome and comorbidities, this criterion is still rarely included in infertility diagnosis or  
17  
18  
19 113 assessment.  
20  
21  
22 114 Only two studies have evaluated the association between conventional semen parameters and  
23  
24 115 abdominal fat, as assessed by waist circumference <sup>20,21</sup>. In the first study, it was observed an  
25  
26 116 association between waist/hip ratio and the testosterone level, the prolactin level, the SHBG  
27  
28  
29 117 level and the testosterone/17b-oestradiol ratio. They also highlighted an impact of waist  
30  
31 118 circumference and hip circumference on sperm concentration and sperm motility <sup>20</sup>. The  
32  
33  
34 119 second study found a decrease in sperm concentration and total mobile sperm counts for  
35  
36 120 patients with a waist circumference  $\geq 102$  cm <sup>21</sup>.  
37

38  
39 121  
40  
41 122 The objective of the present study was to analyse the association between abdominal fat, as  
42  
43 123 assessed by waist circumference or bioelectrical impedance measurement and semen  
44  
45  
46 124 parameters. The impact of the metabolic status on semen parameters was also assessed.  
47

48  
49 125

## 50 51 126 **Materials and methods**

52  
53 127

54  
55  
56 128 *Patients*

57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

129 Data from Caucasian men recruited in the ALIFERT study were recorded between September  
1  
2 130 2009 and December 2012. They were partner of infertile couples attending a Reproductive  
3  
4  
5 131 Biomedicine centre. Couples were eligible for the study if they presented with a primary  
6  
7 132 idiopathic infertility and met the following inclusion criteria: (i) age < 38 years for women  
8  
9 133 and < 45 years for men, (ii) semen parameters compatible with a natural pregnancy, (iii) no  
10  
11 134 female factors of infertility, (iv) no alterations of male reproductive organs such as  
12  
13 135 undescended testis, varicocele or infection. Written informed consent was collected. The  
14  
15 136 ethics committee (Comité de Protection des Personnes) approved the study. ALIFERT study  
16  
17 137 (national biomedical research P071224/AOM 08180:N EudraCT 2009-A00256-51/clinical  
18  
19 138 trials NCT01093378).

20  
21  
22  
23  
24 139  
25  
26 140 *Anthropometric assessment*  
27  
28  
29 141 Height and weight were measured by the same trained investigator using a metric tape. Waist  
30  
31 142 circumference was measured at the narrowest point between the lower border of the ribs and  
32  
33 143 the iliac crest. Weight and body composition were evaluated using the Tanita BC-420MA  
34  
35 144 analyzer<sup>22, 23</sup>. This bioimpedance device gives a score of visceral fat ranging from 1 to 30.  
36  
37 145 Score 4 was used as a threshold according to the manufacturer, with scores 1-4 indicating a  
38  
39 146 normal level of visceral fat and scores >4 indicating a high or very high level<sup>23</sup>.

40  
41  
42  
43 147  
44  
45  
46 148 *Measurement of expired-air carbon monoxide concentrations*  
47  
48  
49 149 The concentration of carbon monoxide (CO) in expired air was measured using a portable CO  
50  
51 150 monitor (Tabataba analyser-FIM medical). Patients were asked to exhale completely, inhale  
52  
53 151 fully and exhale completely in the Tabataba analyser, after holding their breath for 10 s.  
54  
55 152 Results are expressed in parts per million (ppm). According to the manufacturer, 8 ppm is

153 used as the cutoff between smokers and nonsmokers. Intermediate values between 4 and  
1  
2 154 8 ppm are due to air pollution or passive smoking.

3  
4  
5 155  
6  
7 156 *Blood samples and analyses*  
8  
9 157 Blood samples were collected after a 12-hour fasting period. Plasma total cholesterol, high-  
10  
11  
12 158 density lipoprotein (HDL-cholesterol), low-density lipoprotein (LDL-cholestérol),  
13  
14 159 triglycerides and glucose concentrations were measured.

15  
16  
17 160  
18  
19 161 *Semen analysis*  
20  
21 162 Semen samples were collected by masturbation in a sterile plastic cup after 3-5 days of sexual  
22  
23  
24 163 abstinence. After semen liquefaction, conventional sperm parameters (volume, concentration  
25  
26 164 and mobility) were evaluated according to WHO guidelines <sup>24, 25</sup>. Sperm morphology was  
27  
28  
29 165 assessed using David's criteria <sup>26</sup>.

30  
31 166  
32  
33  
34 167 *Determination of sperm DNA integrity*  
35  
36 168 Sperm DNA fragmentation was detected with the TUNEL (Terminal Uridine Nick End  
37  
38  
39 169 Labeling) technique using an *In Situ* Cell Death Detection Kit (In Situ Cell Death Detection  
40  
41 170 Kit, Fluorescein, Roche Applied Science)<sup>16</sup>. First, spermatozoa were incubated with trypsin  
42  
43  
44 171 for 20 minutes and washed with PBS. Then, they were fixed in Carnoy solution (2:1  
45  
46 172 methanol/acetic acid) and stored at -20°C for at least 60 minutes. After washing with PBS and  
47  
48  
49 173 centrifugation, spermatozoon pellets were permeabilized for 20 minutes in a 0.1% Triton X-  
50  
51 174 100 in sodium citrate solution and washed again with PBS. The cells were then incubated  
52  
53 175 with dUTP FITC-labelled and a terminal deoxyribonucleotidyl tranferase (TdT) (TUNEL  
54  
55  
56 176 solution) for one hour. The positive control was obtained after one hour incubation at 37°C of  
57  
58 177 one million of spermatozoa with 100µl of DNase (0,5mM) (DNase I, RNase-free. Fermentas

178 Life Science). To obtain the negative control, the TdT enzyme was omitted. Cells were then  
179 washed twice in PBS and spread out over glass slides. The dry slides were overlaid with 5  $\mu$ l  
180 DAPI solution and examined using fluorescence microscopy. At least 200 spermatozoa were  
181 blind counted by the same two trained biologists. Spermatozoa were classified into three  
182 categories according their labelling and ratios were calculated as the number of FITC-positive  
183 cells over the total number of sperm nuclei labelled with DAPI (4(6-diamidino-2-  
184 phenylindole)). FITC-negative spermatozoa were classified as having no DNA fragmentation.  
185 Spermatozoa with partially labelled heads (20-50% of the surface of the head) were classified  
186 as having a partial DNA fragmentation. Spermatozoa with >50% FITC-labelled heads were  
187 classified as having a total DNA fragmentation (Figure 1). We used an ocular micrometer to  
188 estimate the surface of labelling.

189  
190 **Statistical analyses**  
191  
192 Patients were categorized according to their BMI: normal weight (BMI 18.5-24.9 kg.m<sup>-2</sup>),  
193 overweight (25.0-29.9 kg.m<sup>-2</sup>) or obese ( $\geq$ 30.0 kg.m<sup>-2</sup>). Data are summarized as the median,  
194 the first and the third quartile. The Kruskal–Wallis test was used to test differences between  
195 BMI categories. The association between anthropometric and metabolic data and semen  
196 parameters was analysed using linear regression. Since age, tobacco and pollution are known  
197 to impact semen parameters and sperm DNA integrity, results were standardized by age,  
198 tobacco and expired-air CO level.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

199  
200 **Results**  
201  
202 *Population description (Table 1)*

203

1  
2 204 Data were available from 65 patients. Patient characteristics are summarized in Table 1.  
3  
4 205 Overweight and obese patients presented with higher levels of abdominal obesity, as assessed  
5  
6  
7 206 by visceral adiposity and waist circumference ( $P<0.001$ ). Considering age, metabolic status,  
8  
9  
10 207 expired CO levels and tobacco use, no statistically significant differences were found between  
11  
12 208 BMI categories.

13  
14 209

15  
16  
17 210 *Association between BMI and semen parameters (Table 2 and 3, Figure 2)*

18  
19 211

20  
21  
22 212 BMI was negatively correlated with total sperm count ( $P=0.01$ ) and sperm motility ( $P=0.02$ ).  
23  
24 213 A negative correlation was observed between increased BMI and partial sperm DNA  
25  
26  
27 214 fragmentation ( $P<0.001$ ) (Figure 2), but not with total sperm DNA fragmentation ( $P=0.43$ ).

28  
29 215

30  
31 216 *Association between anthropometric parameters and semen parameters (Table 3)*

32  
33  
34 217

35  
36 218 Total sperm counts tended to decrease with increasing abdominal fat measured with  
37  
38  
39 219 bioelectrical impedance ( $P=0.08$ ) and with increasing waist circumference ( $P=0.09$ ). Visceral  
40  
41 220 adiposity and waist circumference were both negatively correlated to sperm motility ( $P=0.04$   
42  
43  
44 221 and  $P=0.02$  respectively). Partial sperm DNA damage increased significantly with increasing  
45  
46 222 visceral adiposity and waist circumference ( $P=0.04$  and  $P=0.03$ , respectively), but this  
47  
48  
49 223 association was not observed with total sperm DNA damages ( $P=0.62$  and  $P=0.33$ ).

50  
51 224

52  
53 225 *Association between metabolic status and semen parameters (Table 3)*

54  
55  
56 226

57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

227 There was no correlation between glycaemia, serum triglycerides, total, LDL and HDL  
228 cholesterol serum concentrations and semen parameters.

229

## 230 **Discussion**

231

232 Because infertility and overweight both represent public health issues, a growing interest has

233 been placed on the impact of male nutrition on fertility over the past few years. The present

234 study is the first where anthropometric data, as assessed by waist circumference and

235 bioelectrical impedance, and metabolic balance were studied in relation to semen parameters.

236 Here, high BMI was correlated to a decrease in total sperm count and sperm motility. There

237 was an association between abdominal adiposity and semen parameters, as previously

238 suggested by Fejes *et al.* and Michalakis *et al.* <sup>20, 21</sup>, with a tendency for a decrease in total

239 sperm count in men with abdominal obesity, without reaching statistical significance.

240 Moreover, high abdominal adiposity led to lower sperm motility. So far, the association

241 between metabolic syndrome and male reproductive functions was poorly investigated but a

242 negative impact was suspected <sup>27-29</sup>. In the present study, there was no strong correlation

243 between metabolic parameters and conventional semen evaluation. The metabolic status of

244 the patients, however, was not severely altered. Furthermore, patients with severe alteration of

245 semen parameters were not included in the study leading to less significant correlation

246 between anthropometric and metabolic data and conventional semen parameters.

247 It is important to evaluate the potential effect of increased BMI or abdominal adiposity on

248 DNA integrity since the genetic integrity of spermatozoa is important for successful

249 fertilization and pregnancy outcome <sup>30-32</sup>. Whereas no strong consensus could be established

250 between BMI and sperm DNA integrity, most studies suggested an increased risk of higher

251 sperm DNA fragmentation in case of overweight and/or obesity <sup>8, 10, 14, 15</sup>, as a result of

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

252 increased oxidative stress. In the present study, there was no significant association between  
253 abdominal adiposity and total sperm DNA fragmentation.  
254 Partial DNA fragmentation is usually not taken into account in the evaluation of sperm DNA  
255 fragmentation and only spermatozoa with more than 50% labelling are considered positive for  
256 the TUNEL assay. Interestingly, here we observed a positive correlation between BMI,  
257 abdominal obesity and partial sperm DNA fragmentation. Considering these associations,  
258 partial sperm DNA fragmentation as assessed by the TUNEL assay may be used as a novel  
259 sperm quality marker, which is modified by obesity and abdominal obesity, although the  
260 clinical significance of this marker is currently unknown. Nevertheless, it seems affected by  
261 BMI and abdominal adiposity. This might be the premature mark of sperm apoptosis. This  
262 hypothesis should be further evaluated. La Vignera *et al.* have observed high sperm DNA  
263 damage in obese men, in association with an increased proportion of spermatozoa with low  
264 mitochondrial potential and phosphatidyl serine externalization compared to control men <sup>15</sup>.  
265 These are early signs of apoptosis, which may also be the case for partial DNA fragmentation.  
266 In addition, sperm mitochondrial activity is correlated to sperm motility <sup>33</sup>, which is consistent  
267 with the decrease motility observed in patients with high BMI and abdominal obesity. BMI  
268 and abdominal obesity are strongly associated with systemic oxidative stress <sup>34</sup>, which could  
269 also affect the testicular microenvironment. Indeed, high oxidative stress in semen has been  
270 observed with increasing BMI <sup>11</sup>. Oxidative stress is known to impact male reproductive  
271 functions and is commonly observed in infertile men <sup>35</sup>.  
272 Low grade inflammation is also associated with obesity and could affect sperm quality.  
273 Although proinflammatory cytokines were not explored in the present study, there is a need  
274 for further exploration of these parameters in relation to sperm.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

276 Intra-abdominal fat assessment has been described as a reliable predictor of an individual's  
277 risk of developing the metabolic syndrome independently of BMI <sup>17, 18</sup>. Considering this, we  
278 have hypothesized that abdominal fat could be a better indicator than BMI to assess the risk  
279 of altered semen parameters. WC and bioelectrical impedance measurements are reliable and  
280 essential tools to identify men who suffer from normal-weight obese syndrome <sup>36, 37</sup>.  
281 However, only five men included in the study presented with this situation. A similar study  
282 specifically targeting men with normal-weight obese syndrome would be useful.

283  
284 **Conclusion**

285  
286 This study confirmed the impact of overweight and obesity on semen parameters and showed  
287 that abdominal obesity is associated with altered semen parameters, although it was not  
288 possible to discriminate between normal weight obese syndrome and obesity. Altogether,  
289 BMI, but also anthropometric parameters, should be considered in male fertility assessment  
290 and prognosis. Patients who plan to conceive should be informed about these data and the  
291 consequences of weight loss or abdominal fat loss should be assessed. Partial sperm DNA  
292 fragmentation should be evaluated as a new predictive marker of altered sperm in case of  
293 overweight or metabolic syndrome.

294  
295 **Acknowledgments**

296 The authors thank A.C. Marty for technical assistance.

297  
298 **Conflict of interest**

299 Financial support: this study was supported by national biomedical research P071224  
300 ALIFERT

301

1  
2 **302 Authors' roles**

3  
4 **303** C.D., C.F. participated in study conception and design, in patients' recruitment, in acquisition,  
5  
6  
7 **304** interpretation and analysis of data, and drafting of the manuscript. B.G. participated in study  
8  
9  
10 **305** design, performed statistical analyses and participated in critical revision of the manuscript  
11  
12 **306** for intellectual content. N.S., C.S, I.C.D., P.C.P. participated in study conception and design,  
13  
14 **307** in patients' recruitment and critical revision of the manuscript for intellectual content. R.L.  
15  
16  
17 **308** participated in study conception and design, interpretation of data, critical revision of the  
18  
19 **309** manuscript for intellectual content and supervised the study. The collaborators of the  
20  
21  
22 **310** ALIFERT collaborative group participated in study design and were involved in patients'  
23  
24 **311** recruitment.

25  
26 **312**

27  
28  
29 **313 References**

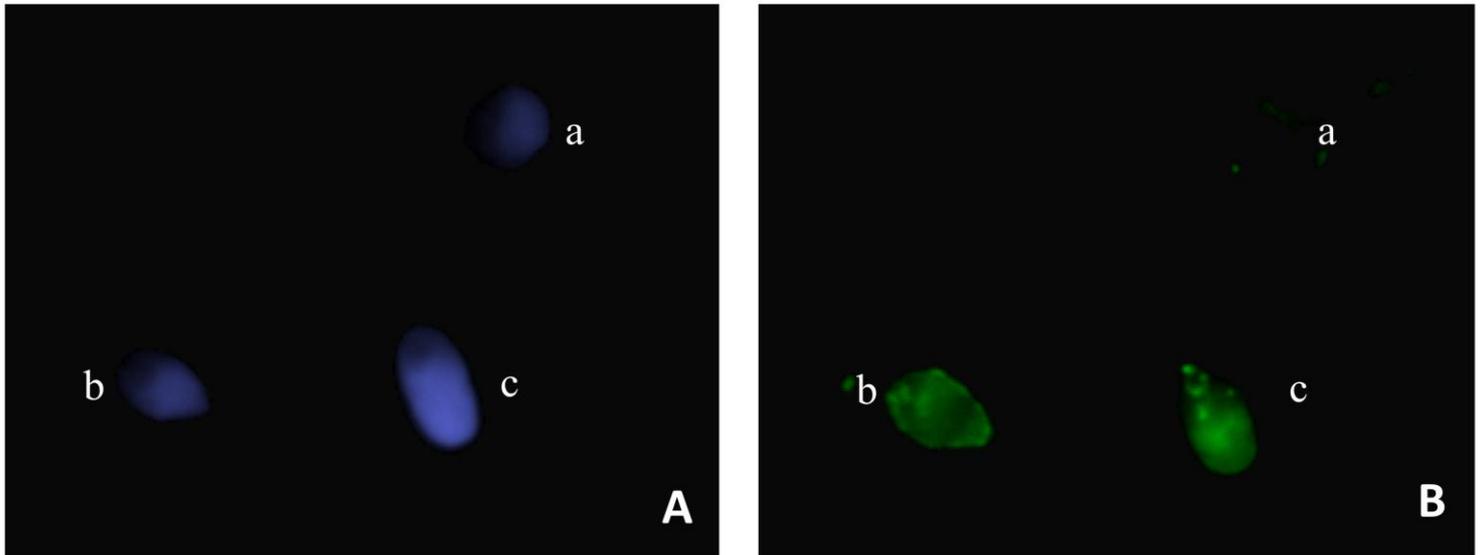
30  
31 **314**

- 32  
33  
34 **315** 1. World Health Organization. Physical status: the use and interpretation of  
35 **316** anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ Tech Rep*  
36 **317** *Ser.* 1995; 854, 1-452.  
37 **318**  
38  
39 **319** 2. Nguyen RH, Wilcox AJ, Skjaerven R, Baird DD. Men's body mass index and  
40 **320** infertility. *Hum Reprod.* 2007; 22, 2488-2493.  
41 **321**  
42 **322** 3. Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Nohr EA et al. Subfecundity in overweight and  
43 **323** obese couples. *Hum Reprod.* 2007; 22, 1634-1637.  
44 **324**  
45 **325** 4. Sallmen M, Sandler DP, Hoppin JA, Blair A, Baird DD. Reduced fertility among  
46 **326** overweight and obese men. *Epidemiology.* 2006; 17, 520-523.  
47 **327**  
48  
49 **328** 5. Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Meikle AW, Carrell DT. Impact of male  
50 **329** obesity on infertility: a critical review of the current literature. *Fertil Steril.* 2008; 90,  
51 **330** 897-904.  
52 **331**  
53  
54 **332** 6. Aggerholm AS, Thulstrup AM, Toft G, Ramlau-Hansen CH, Bonde JP. Is overweight  
55 **333** a risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone profile? *Fertil*  
56 **334** *Steril.* 2008; 90, 619-626.  
57 **335**

- 336 7. Rybar R, Kopecka V, Prinosilova P, Markova P, Rubes J. Male obesity and age in  
1 337 relationship to semen parameters and sperm chromatin integrity. *Andrologia*. 2011;  
2 338 43, 286-291.  
3 339
- 4 340 8. Chavarro JE, Toth TL, Wright DL, Meeker JD, Hauser R. Body mass index in relation  
5 341 to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels  
6 342 among men attending an infertility clinic. *Fertil Steril*. 2010; 93, 2222-2231.  
7 343
- 8 344 9. Hammiche F, Laven JS, Boxmeer JC et al. Sperm quality decline among men below  
9 345 60 years of age undergoing IVF or ICSI treatment. *J Androl*. 2011; 32, 70-76.  
10 346
- 11 347 10. Kort HI, Massey JB, Elsner CW et al. Impact of body mass index values on sperm  
12 348 quantity and quality. *J Androl*. 2006; 27, 450-452.  
13 349
- 14 350 11. Tunc O, Bakos HW, Tremellen K. Impact of body mass index on seminal oxidative  
15 351 stress. *Andrologia*. 2011; 43, 121-128.  
16 352
- 17 353 12. Sermondade N, Faure C, Fezeu L et al. BMI in relation to sperm count: an updated  
18 354 systematic review and collaborative meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2012.  
19 355
- 20 356 13. Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Levy R, Czernichow S. Obesity and increased risk  
21 357 for oligozoospermia and azoospermia. *Arch Intern Med*. 2012; 172, 440-442.  
22 358
- 23 359 14. Fariello RM, Pariz JR, Spaine DM et al. Association between obesity and alteration of  
24 360 sperm DNA integrity and mitochondrial activity. *BJU Int*. 2012; 110, 863-867.  
25 361
- 26 362 15. La Vignera S, Condorelli RA, Vicari E, Calogero AE. Negative effect of increased  
27 363 body weight on sperm conventional and nonconventional flow cytometric sperm  
28 364 parameters. *J Androl*. 2012; 33, 53-58.  
29 365
- 30 366 16. Dupont C, Faure C, Sermondade N et al. Obesity leads to higher risk of sperm DNA  
31 367 damage in infertile patients. *Asian J Androl*. 2013.  
32 368
- 33 369 17. Shuster A, Patlas M, Pinthus JH, Mourtzakis M. The clinical importance of visceral  
34 370 adiposity: a critical review of methods for visceral adipose tissue analysis. *Br J*  
35 371 *Radiol*. 2012; 85, 1-10.  
36 372
- 37 373 18. Onat A, Avci GS, Barlan MM et al. Measures of abdominal obesity assessed for  
38 374 visceral adiposity and relation to coronary risk. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004;  
39 375 28, 1018-1025.  
40 376
- 41 377 19. Nakao YM, Miyawaki T, Yasuno S et al. Intra-abdominal fat area is a predictor for  
42 378 new onset of individual components of metabolic syndrome: METabolic syndROME  
43 379 and abdominaL ObesiTy (MERLOT study). *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2012;  
44 380 88, 454-461.  
45 381
- 46 382 20. Fejes I, Koloszar S, Szollosi J, Zavaczki Z, Pal A. Is semen quality affected by male  
47 383 body fat distribution? *Andrologia*. 2005; 37, 155-159.  
48 384  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- 385 21. Hammiche F, Laven JS, Twigt JM et al. Body mass index and central adiposity are  
1 386 associated with sperm quality in men of subfertile couples. *Hum Reprod.* 2012; 27,  
2 387 2365-2372.  
3 388
- 4 389 22. Nunez C, Gallagher D, Visser M et al. Bioimpedance analysis: evaluation of leg-to-leg  
5 390 system based on pressure contact footpad electrodes. *Medicine and science in sports  
6 391 and exercise.* 1997; 29, 524-531.  
7 392
- 8 393 23. Pietrobelli A, Rubiano F, St-Onge MP, Heymsfield SB. New bioimpedance analysis  
9 394 system: improved phenotyping with whole-body analysis. *European journal of  
10 395 clinical nutrition.* 2004; 58, 1479-1484.  
11 396
- 12 397 24. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human  
13 398 Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 4th edn. . *Cambridge: Cambridge  
14 399 University Press.* 1999.  
15 400
- 16 401 25. WHO. World Health Organization Laboratory Manual for the Examination of Human  
17 402 Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction, 5th edn. 2010.  
18 403
- 19 404 26. Auger J, Eustache F, Andersen AG et al. Sperm morphological defects related to  
20 405 environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women  
21 406 from four European cities. *Hum Reprod.* 2001; 16, 2710-2717.  
22 407
- 23 408 27. Leisegang K, Udodong A, Bouic PJ, Henkel RR. Effect of the metabolic syndrome on  
24 409 male reproductive function: a case-controlled pilot study. *Andrologia.* 2012.  
25 410
- 26 411 28. Padron RS, Mas J, Zamora R et al. Lipids and testicular function. *Int Urol Nephrol.*  
27 412 1989; 21, 515-519.  
28 413
- 29 414 29. Ramirez-Torres MA, Carrera A, Zambrana M. [High incidence of hyperestrogenemia  
30 415 and dyslipidemia in a group of infertile men]. *Ginecol Obstet Mex.* 2000; 68, 224-229.  
31 416
- 32 417 30. Santiso R, Tamayo M, Gosalvez J et al. Simultaneous determination in situ of DNA  
33 418 fragmentation and 8-oxoguanine in human sperm. *Fertility and sterility.* 2010; 93,  
34 419 314-318.  
35 420
- 36 421 31. Bungum M, Humaidan P, Axmon A et al. Sperm DNA integrity assessment in  
37 422 prediction of assisted reproduction technology outcome. *Human reproduction  
38 423 (Oxford, England).* 2007; 22, 174-179.  
39 424
- 40 425 32. Velez de la Calle JF, Muller A, Walschaerts M et al. Sperm deoxyribonucleic acid  
41 426 fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted  
42 427 reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study.  
43 428 *Fertility and sterility.* 2008; 90, 1792-1799.  
44 429
- 45 430 33. Ruiz-Pesini E, Diez C, Lapena AC et al. Correlation of sperm motility with  
46 431 mitochondrial enzymatic activities. *Clin Chem.* 1998; 44, 1616-1620.  
47 432
- 48 433 34. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M et al. Increased oxidative stress in obesity and  
49 434 its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004; 114, 1752-1761.  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

435  
 1 436 35. Tremellen K, Miari G, Froiland D, Thompson J. A randomised control trial examining  
 2 437 the effect of an antioxidant (Menevit) on pregnancy outcome during IVF-ICSI  
 3 438 treatment. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2007; 47, 216-221.  
 4 439  
 5 440 36. De Lorenzo A, Del Gobbo V, Premrov MG et al. Normal-weight obese syndrome:  
 6 441 early inflammation? *Am J Clin Nutr.* 2007; 85, 40-45.  
 7 442  
 8 443 37. Di Renzo L, Galvano F, Orlandi C et al. Oxidative stress in normal-weight obese  
 9 444 syndrome. *Obesity (Silver Spring).* 2010; 18, 2125-2130.  
 10 445  
 11 446  
 12 447  
 13  
 14  
 15  
 16  
 17  
 18  
 19  
 20  
 21  
 22  
 23  
 24  
 25  
 26  
 27  
 28  
 29  
 30  
 31  
 32  
 33  
 34  
 35  
 36  
 37  
 38  
 39  
 40  
 41  
 42  
 43  
 44  
 45  
 46  
 47  
 48  
 49  
 50  
 51  
 52  
 53  
 54  
 55  
 56  
 57  
 58  
 59  
 60  
 61  
 62  
 63  
 64  
 65



**Figure 1.** Spermatozoa after DAPI and TUNEL staining

A. Sperm nuclei labelled with DAPI

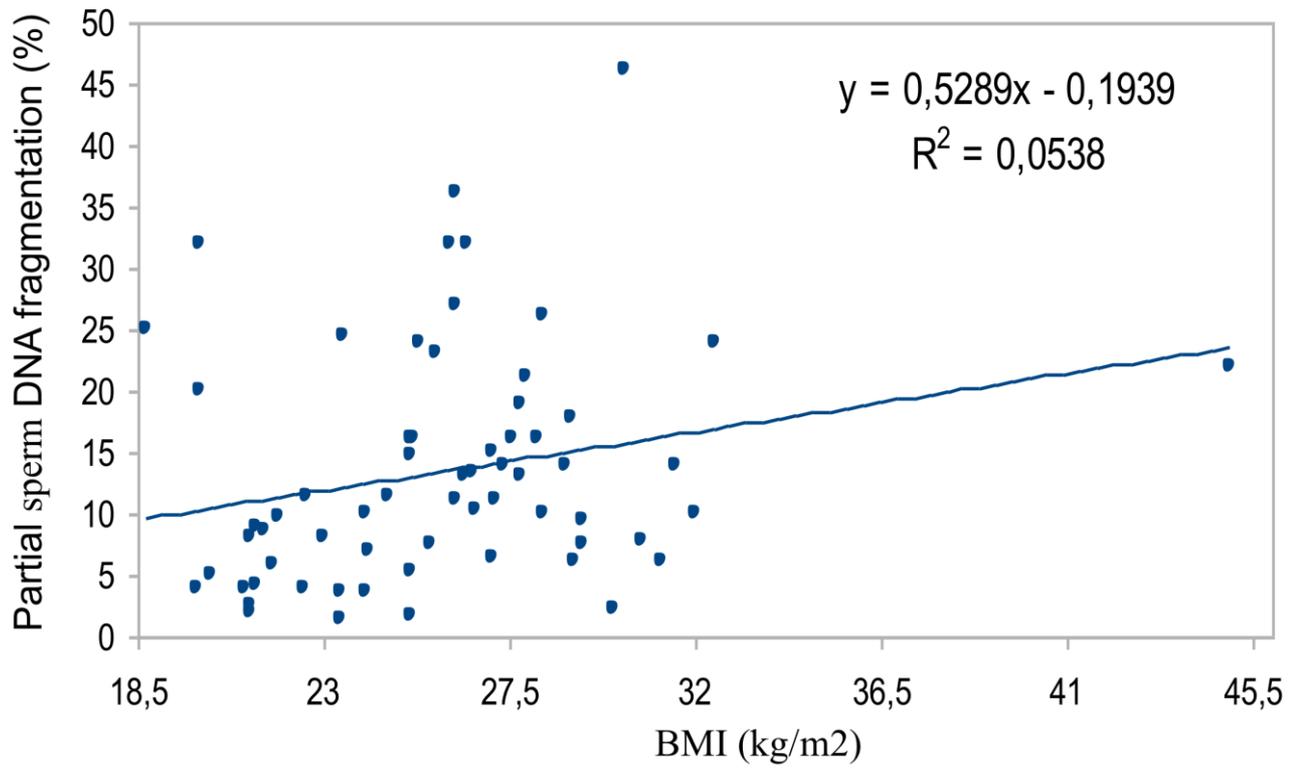
B. TUNEL labelling :

a: spermatozoon presenting “DNA integrity” ; <20% FITC-labelled head

b: spermatozoon presenting “Partial DNA fragmentation” : partially labelled head (20-50% of the surface)

c: spermatozoon presenting “Total DNA fragmentation” : >50% FITC-labelled head

Figure



**Figure 2.** Correlation between BMI and partial sperm DNA fragmentation

	BMI <25 (n=24)	25-29.9 (n=33)	>30 (n=8)	<i>P</i>
Age	31.5 (30.0-35.25)	33 (29.5-37.5)	35 (33-37)	0.35
BMI	21.7 (21.2-23.4)	27.1 (26.1-28.2)	31.4 (30.6-32.1)	<0.001
Visceral adiposity	4 (3-4)	7 (6-10)	12 (11.5-12.3)	<0.001
Waist circumference	83 (79-87)	93.5 (89.3-98.8)	105 (101-109.5)	<0.001
Triglyceride	0.9 (0.6-1.2)	1.1 (0.8-1.3)	1.5 (1.1-2.4)	0.11
Total cholesterol	1.9 (1.7-2.3)	2.1 (1.9-2.2)	2.1 (1.8-2.3)	0.53
HDL cholesterol	0.5 (0.5-0.7)	0.5 (0.4-0.6)	0.4 (0.4-0.5)	0.07
LDL cholesterol	1.2 (0.9-1.5)	1.3 (1.1-1.5)	1.4 (1.1-1.4)	0.48
Glycaemia	4.9 (4.6-5.0)	5.0 (4.8-5.3)	4.6 (4.6-5.3)	0.51
CO (ppm)	5.5 (3-11)	4.0 (2.8-6)	3.0 (2.0-4.0)	0.11
Smokers (%)	42	25	12.5	0.16

**Table 1.** Patients' characteristics by body mass index levels (median [25th–75% percentile]).  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

**Table**

	BMI <25	25-29.9	>30	<i>P</i>
Abstinence Delay (day)	3 (3-4)	3 (3-3)	3 (3-4)	0.51
Volume (ml)	3.6 (2.5-5)	3.1 (2.3-3.7)	2.7 (1.6-5.0)	0.26
Total sperm count (10 <sup>6</sup> )	123.1 (63.7-254.2)	106.8 (67.4-225.2)	58.4 (30.7-183.8)	0.59
Sperm motility (%)	40 (35-45)	40 (35-50)	35 (30-37.5)	0.27
Vitality (%)	68.5 (56.7-75.0)	66 (52-74)	66 (60.8-70.8)	0.97
Normal morphology (%)	22.5 (13-26.8)	23 (15-31)	19 (12.5-33.5)	0.73
Partial sperm DNA fragmentation (%)	7.5 (4-10.35)	14.3 (10.3-19.5)	12 (7.4-22.5)	0.004
Total sperm DNA fragmentation (%)	6.9 (4.5-13.6)	13.4 (8.1-19.3)	14 (8.3-19.0)	0.17

Table 2. Semen quality parameters (median [25th–75% percentile]) by body mass index levels.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

**Table**

	Total sperm count	Sperm motility	Partial sperm DNA fragmentation	Total sperm DNA fragmentation
BMI	0.01	0.02	<0.001	0.43
Visceral adiposity	0.08	0.04	0.04	0.62
Waist circumference	0.09	0.02	0.03	0.33
Triglyceride	0.25	0.68	0.80	0.94
Total cholesterol	0.74	0.09	0.31	0.27
HDL cholesterol	0.29	0.10	0.20	0.40
LDL cholesterol	0.63	0.13	0.42	0.32
Glycaemia	0.41	0.70	0.25	0.24

**Table 3.** Association between BMI, abdominal adiposity and metabolic status with semen parameters.  $P < 0.05$  was considered statistically significant. Results were standardized by age, tobacco and expired-air CO level.

## B) IMC et pouvoir fécondant des spermatozoïdes

### *Introduction*

En plus d'un impact sur les paramètres spermatiques conventionnels et l'intégrité du noyau, le surpoids et l'obésité pourraient avoir un impact sur les capacités fécondantes des spermatozoïdes. Le test de fixation des spermatozoïdes à la zone pellucide (ZB test) permet d'étudier les premières étapes de la fécondation, et plus particulièrement la fixation des spermatozoïdes à la zone pellucide. Ce test est utilisé en routine dans notre laboratoire pour les couples présentant une infertilité primaire idiopathique ou masculine modérée. Cet outil permet de prédire le risque d'échec de fécondation au cours d'une fécondation *in vitro* conventionnelle (FIVc).

L'objectif de cet article est d'étudier l'impact de l'IMC des hommes sur la capacité de leurs spermatozoïdes à se fixer à la zone pellucide.

### *Matériel et méthodes*

Cette étude rétrospective a porté sur 306 patients consultant pour une infertilité primaire, idiopathique ou masculine modérée. Un recueil de sperme a été réalisé au laboratoire après 3 à 5 jours d'abstinence sexuelle. L'analyse des paramètres spermatiques a été faite selon les recommandations de l'OMS.

Dans le même temps, le ZB test a été réalisé. Quatre zones pellucides intactes étaient inséminées séparément par 4000 spermatozoïdes mobiles du patient et 4000 spermatozoïdes marqués par du FITC provenant d'un témoin dont la fertilité était prouvée. Après 18 heures d'incubation et lavages des zones pellucides, le nombre total de spermatozoïdes et le nombre de spermatozoïdes marqués par le FITC fixés sur les zones pellucides étaient comptés, permettant de calculer un indice de fixation des spermatozoïdes. Le ZB test est considéré comme négatif quand l'indice de fixation est  $< 70\%$  et positif quand il est  $\geq 70\%$ . Si la mobilité progressive rapide était  $< 5\%$ , le test était considéré comme négatif.

### *Résultats*

Aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre l'IMC et le résultat du ZB test. La fréquence des tests positifs et négatifs était similaire parmi les catégories d'IMC même après ajustement en fonction de l'âge et de la consommation de tabac.

### *Conclusion*

Notre étude a évalué l'impact de l'IMC sur la capacité des spermatozoïdes à se fixer à la zone pellucide. Nos résultats ne confirment pas ceux observés par Wegner qui montrait une corrélation négative entre l'IMC et la capacité des spermatozoïdes à se fixer à l'acide hyaluronique (Wegner *et al.*, 2010), ni ceux décrits chez la souris (Bakos *et al.*, 2011b).

Cependant, l'effectif de notre population était relativement faible et ne concernait que des couples consultant pour infertilité idiopathique ou masculine modérée. Le ZB test ne permet qu'une évaluation indirecte des capacités fécondantes des spermatozoïdes. Afin d'étudier de manière plus précise l'impact de l'IMC des hommes sur les capacités fécondantes des spermatozoïdes, l'analyse des résultats biologiques des FIVc pourrait être pertinente.

## ORIGINAL ARTICLE

# Body mass index is not associated with sperm–zona pellucida binding ability in subfertile males

Nathalie Sermondade<sup>1,2</sup>, Charlotte Dupont<sup>1,2,3</sup>, Céline Faure<sup>1,2</sup>, Marouane Boubaya<sup>4</sup>,  
Isabelle Cédric-Durnerin<sup>2,5</sup>, Pascale Chavatte-Palmer<sup>3</sup>, Christophe Sifer<sup>1</sup> and Rachel Lévy<sup>1,2</sup>

Lifestyle factors, such as weight and nutritional status may affect male fertility, including sperm fertilization ability. The objective of this retrospective study was to evaluate the association between body mass index (BMI) and sperm–zona pellucida binding ability assessed according to the zona binding (ZB) test, which has been described to be a relevant diagnostic tool for the prediction of *in vitro* fertilization (IVF) ability. Three hundred and six male patients from couples diagnosed with primary idiopathic or mild male factor infertility were included. Correlations between BMI and semen parameters according to ZB test indices were assessed, together with frequencies of positive and negative tests across the BMI categories. In this selected population, BMI was not related to conventional semen parameters or sperm quality assessed according to the ability of spermatozoa to bind to the zona pellucida. The previously described poor outcomes of IVF procedures in cases of male obesity could be due to other sperm defects, such as alterations of sperm capacitation or acrosome reaction. The link between male BMI and biological outcomes during IVF procedures, such as fertilization rates, should be further evaluated.

Asian Journal of Andrology advance online publication, \*\* \*\* 2013; doi:10.1038/aja.2013.10

**Keywords:** body mass index (BMI); fertilization ability; obesity; semen quality; zona binding test

## INTRODUCTION

Many lifestyle or environmental factors may have deleterious quantitative or qualitative effects on spermatozoa, leading to a negative influence on male fertility. Among those factors, a recent and growing interest has been placed on weight and nutritional status, particularly as overweight and obesity concern more than half of all men.

Although controversial, recent data seem to confirm an association between increased body mass index (BMI) and altered sperm parameters.<sup>1</sup> However, conventional quantitative sperm parameter values are not sufficient to predict sperm fertilization ability, as unexplained fertilization failure can be observed with a completely normal semen analysis.<sup>2</sup>

Recently, data obtained from animal models suggest that male BMI could have an impact on sperm function and fertilization ability, including altered sperm binding to the zona pellucida (ZP),<sup>3</sup> which is reversible in the presence of diet or exercise.<sup>4</sup> In humans, only one publication has shown a significant negative correlation between BMI and hyaluronic acid (HA) binding scores in men from infertile couples.<sup>5</sup> However, the population was not selected, and included all types and causes of infertility, and the HA binding test only provides an indirect assessment of the ability of spermatozoa to bind to the ZP.

The sperm–zona binding (ZB) test allows the assessment of the first steps of fertilization, recognition and binding of spermatozoa to the oocyte's ZP. The test compares the binding ability of spermatozoa

from the studied population to those from a fertile control population.<sup>6</sup> Data in the literature confirm that it is a relevant diagnostic tool for the prediction of *in vitro* fertilization (IVF) ability,<sup>7,8</sup> especially in case of idiopathic or mild male factor infertility.<sup>2</sup>

The aim of this study was to evaluate whether BMI was related to sperm–ZP binding ability, as assessed by the ZB test.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

This retrospective observational study included 306 patients between January 2005 and April 2012. Men came from couples diagnosed with primary idiopathic or primary mild male factor infertility. They presented normal or subnormal semen parameters according to the 2010 World Health Organization (WHO) reference values.<sup>6</sup> Men with cancer, vasectomy reversal or varicocele were excluded, as were men from couples presenting with a female cause of infertility. In our centre, a ZB test is routinely performed after the failure of three cycles of ovulation induction or intrauterine insemination in idiopathic or mild male factor indications.

Age, tobacco use (smoking/non smoking) and BMI were recorded at the time of the ZB test. Subjects were grouped according to the following WHO BMI categories: 18.5–24.9 kg m<sup>-2</sup> (normal weight), 25.0–29.9 kg m<sup>-2</sup> (overweight), ≥ 30.0 kg m<sup>-2</sup> (obese).<sup>9</sup> The reference group was defined by a BMI between 18.5 kg m<sup>-2</sup> and 24.9 kg m<sup>-2</sup>.

<sup>1</sup>Service d'Histologie-Embryologie-Cytogénétique-Biologie de la Reproduction-CECOS, Hôpital Jean Verdier (AP-HP), HUPSSD, Bondy 93143, France; <sup>2</sup>INSERM U557; INRA U1125; CNAM EA3200; Univ Paris 13; CRNH IdF, Unité de Recherche en Epidémiologie Nutritionnelle, Bobigny, 93017, France; <sup>3</sup>INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, Jouy-en-Josas 78352, France; <sup>4</sup>Unité de Recherche Clinique, Hôpital Avicenne, Bobigny 93009, France and <sup>5</sup>Service d'Assistance Médicale à la Procréation, Hôpital Jean Verdier (AP-HP), Bondy 93143, France

Correspondence: Dr N Sermondade (nathalie.sermondade@jvr.aphp.fr)

Received: 4 November 2012; Revised: 24 December 2012; Accepted: 20 January 2013

### Semen analysis

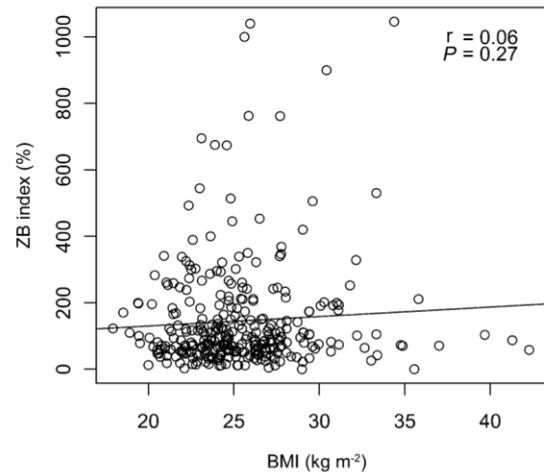
Semen samples were collected at the laboratory after 2–5 days of sexual abstinence. Semen volume, sperm concentration, sperm motility were analyzed according to the WHO guidelines,<sup>6</sup> and percentage normal morphology was assessed according to David's modified criteria.<sup>10</sup> The analyses were performed in one single laboratory, which is ISO9001 certified.

### ZB test

Semen samples of proven fertile donors, known to have fertilized a pregnancy within 2 years were also collected and used as controls for the ZB test. Discontinuous PureSperm (Nidacon International, Gothenburg, Sweden) gradient centrifugal separation was performed on control and patient semen samples with two layers of density gradients (90% and 45%). Following two centrifugations (20 min at 300g and 10 min at 600g), the pellet was resuspended in Ferticult Hepes (FertiPro, Beernem, Belgium). Salt-stored human oocytes were used: these were either metaphase I oocytes or metaphase II oocytes that were unfertilized after intracytoplasmic sperm injection. The ZB test was performed as previously described.<sup>2</sup> Briefly, four intact ZP were rinsed and incubated separately in 20  $\mu$ l culture media droplets. Individual ZP were inseminated with a mixture of 4000 FITC-stained control and 4000 unstained test motile spermatozoa under classical IVF culture conditions (i.e. in equilibrated drops of appropriate culture media at 37 °C in a 6% CO<sub>2</sub> atmosphere). After 18 h incubation, each ZP was washed to remove loosely bound sperm cells and mounted on a glass slide in a 5- $\mu$ l 5% glycerol–PBS droplet. Each ZP was observed at  $\times$ 400 magnification: first under a fluorescence microscope (Axiophot; Zeiss, Le Peck, France) to count the number of FITC-stained bound control spermatozoa, and second under a phase-contrast microscope (Optiphot-2; Nikon, Champigny sur Marne, France) to determine the number of total bound spermatozoa resulting from both controls and patients. A sperm–ZP binding index (the number of spermatozoa from patients bound per zona divided by the number from controls  $\times$ 100) was calculated. As previously published,<sup>2</sup> ZB was considered negative when the index was  $<$ 70% or when grade 'a' motility was  $<$ 5%, and positive when the index was  $\geq$ 70% and associated with a grade 'a' motility  $\geq$ 5%.

### Statistical analysis

Sperm parameters, including the ZB index, are given as the median (25th and 75th percentiles) and comparisons among the BMI categories were analyzed using the Kruskal–Wallis test. ZB was considered a binary variable, and logistical regression was used to compare negative and positive test frequencies across the BMI categories. Adjustment for age and tobacco use was made. Statistical analyses were performed using the R statistical software version 2.14.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <http://www.r-project.org>).



**Figure 1** Correlation between male BMI and ZB index. BMI, body mass index; ZB, zona binding.

### RESULTS

There were 159 men with normal BMI, 120 overweight and 27 obese (respectively 52%, 39% and 9%). In this specific population, conventional semen parameter values were similar across BMI categories. No significant difference between the groups was observed regarding to semen volume, sperm concentration, sperm motility and morphology (**Table 1**).

No statistically significant association was observed between BMI and the results of the ZB index (**Table 1**). When considered as continuous variables, there was no correlation between BMI and the ZB index ( $r=0.06$ ;  $P=0.27$ ) (**Figure 1**). Frequencies of positive and negative tests were similar across the BMI categories, without or with adjustment for age and tobacco use (**Table 2**).

### DISCUSSION

In the present study, we found no association between BMI and conventional semen parameter values or the ability of sperm to bind to the ZP in a population of men from subfertile couples diagnosed with idiopathic or mild male factor infertility.

The link between BMI and sperm quality remains controversial. Defects in spermatozoa associated with abnormal BMI have been described,<sup>11,12</sup> including decreases in sperm concentration or total sperm count, a decrease in sperm motility, and an increase in the percentage of morphological abnormalities. Others have failed to document this association<sup>13,14</sup> and our results are consistent with these studies. However, conventional semen parameters are not sufficient to evaluate sperm function. In order to address the potential

**Table 1** Relationship between male BMI and semen quality

	BMI categories			P
	Normal (n=159)	Overweight (n=120)	Obese (n=27)	
Age (year)	35.3 (31.2; 38.5)	35.9 (31.9; 39.3)	35.4 (32.5; 38.6)	0.58
Semen volume (ml)	2.9 (2.1; 4.2)	3.0 (2.0; 4.3)	2.7 (2.1; 4.0)	0.81
Sperm concentration ( $\times 10^6$ ml <sup>-1</sup> )	36.2 (19.9; 71.2)	37.2 (21.9; 68.3)	48.0 (22.0; 82.2)	0.55
Sperm progressive motility (a+b) (%)	40 (30; 50)	40 (30; 45)	40 (35; 50)	0.27
Normal sperm morphology (%)	19 (13; 26.5)	19.5 (12.7; 27)	19 (18; 27)	0.51
ZB index (%)	87.5 (57.3; 176.7)	88.4 (54.4; 154.5)	103.7 (70.3; 200.7)	0.45

Abbreviations: BMI, body mass index; ZB, zona binding.

Medians (25th and 75th percentiles) for age, semen parameters and ZB indices are presented according to BMI category.

**Table 2 Relationship between male BMI and the results of ZB tests**

		BMI categories			P	
		Normal (n=159)	Overweight (n=120)	Obese (n=27)	Univariate model	Adjusted model*
ZB test	Negative	38.4%	38.3%	25.9%	0.43	0.43
	Positive	61.6%	61.7%	74.1%		

Abbreviations: BMI, body mass index; ZB, zona binding.

\*Adjusted for age and tobacco use.

Frequencies of negative or positive ZB tests across the BMI categories are presented.

link between BMI and sperm fertilizing ability, we used the ZB assay, which is a proven indirect indicator of sperm defects<sup>6</sup> and has previously been described as a relevant diagnostic tool for the prediction of IVF ability.<sup>7,8</sup>

To our knowledge, this is the first study to directly assess the ZB ability of spermatozoa in relation to BMI. We could not find any significant association between BMI and the results of the ZB test. Our findings are in contrast with previous results obtained from animal models,<sup>3</sup> suggesting that male BMI could have an impact on sperm function and fertilization ability. In mice, a high-fat diet induces significant decreases of sperm capacitation and binding to the ZP of oocytes, resulting in significantly lower fertilization rates.<sup>3</sup> This perturbed sperm function is reversible after dietary change or exercise, with a 1.4-fold increase in sperm binding.<sup>4</sup> Moreover, we could not confirm the only available publication in men<sup>5</sup> that studied the ability of spermatozoa from 107 non-selected infertile men to bind to HA. Indeed, Wegner *et al.*<sup>5</sup> showed a negative correlation between BMI and the HA binding score, and significantly lower scores in overweight and obese men compared to those of normal weight men. However, motile sperm concentration and percentage normal morphology were also positively correlated to HA binding in this non-selected population, which includes all types and causes of infertility, so these altered sperm parameters could have confounded the interpretation. Furthermore, the HA binding test does not appear in the 2010 WHO laboratory manual (World Health Organization, 2010), and only provides an indirect assessment of the sperm–ZP binding ability. Finally, recent studies have reported the low relevance of the HA binding test, which fails to provide a prognostic threshold for fertilization rate during IVF procedures.<sup>15–17</sup>

A limitation of our study is that the group of obese men was relatively small. Moreover, our population consisted of men from subfertile couples diagnosed with idiopathic or mild male factor infertility, so our results cannot be extended to other infertility causes. Finally, BMI may not be the best indicator of adiposity, as suggested by the questions about its thresholds and its inability to distinguish body composition or fat distribution.<sup>18,19</sup> On the other hand, our study has several strengths, including the use of the sperm–ZB assay in a population for which it has been described to be relevant.<sup>2</sup> Fertilization failure during IVF procedures is known to be much more frequent in cases of idiopathic or mild male factor infertility than for female indications, such as tubal defects or endometriosis.<sup>2</sup> Lack of sperm penetration into the oocyte has been shown to be the major cause of those fertilization failures.<sup>20</sup> This suggests the existence of sperm defects that are not evaluated by conventional semen analysis, but that are detectable by the ZB test. Our results indicate that these defects may not be linked with obesity.

Finally, recent data suggest that increased male BMI can affect reproductive outcomes,<sup>21,22</sup> including blastocyst development, clinical pregnancy and live birth rates during conventional IVF

attempts,<sup>21</sup> IVF and intracytoplasmic sperm injection.<sup>22</sup> These poor reproductive outcomes could be due to alterations in sperm functions, such as sperm capacitation or acrosome reaction. This hypothesis is supported by results obtained from animal models.<sup>3,23</sup> These show that sperm capacitation is decreased in diet-induced obese mice<sup>3</sup> and that diet-induced hypercholesterolemia adversely affects capacitation and the acrosome reaction in rabbits, probably due to sperm membrane defects linked to an increase in intramembranous cholesterol.<sup>23</sup>

In conclusion, in our population, BMI was not associated with any deleterious conventional semen parameter values or sperm quality assessed by the ability of spermatozoa to bind to the ZP. The link between male BMI and biological outcomes during IVF procedures, such as fertilization rates, should be further evaluated.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

NS, CD, MB, CS, RL participated in study conception and design. NS, CD, CF, ICD participated in acquisition of data. NS, CD, PCP, CS, RL participated in interpretation and analysis of data. MB performed statistical analyses. NS and CD drafted the manuscript. CF, MB, ICD, PCP, CS and RL participated in critical revision of the manuscript for important intellectual content. RL supervised the study. All authors read and approved the manuscript.

#### COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare that they have no competing financial interests.

- Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Lévy R, Czernichow S *et al.* Obesity and increased risk for oligozoospermia and azoospermia. *Arch Intern Med* 2012; **172**: 440–2.
- Sifer C, Sasportes T, Barraud V, Poncelet C, Rudant J *et al.* World Health Organization grade 'a' motility and zona-binding test accurately predict IVF outcome for mild male factor and unexplained infertilities. *Hum Reprod* 2005; **20**: 2769–75.
- Bakos HW, Mitchell M, Setchell BP, Lane M. The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *Int J Androl* 2011; **34**: 402–10.
- Palmer NO, Bakos HW, Owens JA, Setchell BP, Lane M. Diet and exercise in an obese mouse fed a high-fat diet improve metabolic health and reverse perturbed sperm function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; **302**: E768–80.
- Wegner CC, Clifford AL, Jilbert PM, Henry MA, Gentry WL. Abnormally high body mass index and tobacco use are associated with poor sperm quality as revealed by reduced sperm binding to hyaluronan-coated slides. *Fertil Steril* 2010; **93**: 332–4.
- World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 5th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2010.
- Liu DY, Baker HW. High frequency of defective sperm–zona pellucida interaction in oligozoospermic infertile men. *Hum Reprod* 2004; **19**: 228–33.
- Oehninger S, Mahony M, Ozgur K, Kolm P, Kruger T *et al.* Clinical significance of human sperm–zona pellucida binding. *Fertil Steril* 1997; **67**: 1121–7.
- World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. In: Roa W, editor. Technical report series no. 894. Geneva: World Health Organization; 2000.
- Auger J, Eustache F. Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. *Andrologie* 2000; **10**: 358–73.
- Hammoud AO, Wilde N, Gibson M, Parks A, Carrell DT *et al.* Male obesity and alteration in sperm parameters. *Fertil Steril* 2008; **90**: 2222–5.
- Paasch U, Grunewald S, Kratzsch J, Glander HJ. Obesity and age affect male fertility potential. *Fertil Steril* 2010; **94**: 2898–901.



- 13 Aggerholm AS, Thulstrup AM, Toft G, Ramlau-Hansen CH, Bonde JP. Is overweight a risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone profile? *Fertil Steril* 2008; **90**: 619–26.
- 14 Duits FH, van Wely M, van der Veen F, Gianotten J. Healthy overweight male partners of subfertile couples should not worry about their semen quality. *Fertil Steril* 2010; **94**: 1356–9.
- 15 Kovacs P, Kovats T, Sajgo A, Szollosi J, Matyas S *et al*. The role of hyaluronic acid binding assay in choosing the fertilization method for patients undergoing IVF for unexplained infertility. *J Assist Reprod Genet* 2010; **28**: 49–54.
- 16 Nijs M, Creemers E, Cox A, Franssen K, Janssen M *et al*. Chromomycin A3 staining, sperm chromatin structure assay and hyaluronic acid binding assay as predictors for assisted reproductive outcome. *Reprod Biomed Online* 2009; **19**: 671–84.
- 17 Tarozzi N, Nadalini M, Bizzaro D, Serrao L, Fava L *et al*. Sperm-hyaluronan-binding assay: clinical value in conventional IVF under Italian law. *Reprod Biomed Online* 2009; **19** Suppl 3: 35–43.
- 18 Akpınar E, Bashan I, Bozdemir N, Saatci E. Which is the best anthropometric technique to identify obesity: body mass index, waist circumference or waist-hip ratio? *Coll Antropol* 2007; **31**: 387–93.
- 19 Prentice AM, Jebb SA. Beyond body mass index. *Obes Rev* 2001; **2**: 141–7.
- 20 Miyara F, Aubriot FX, Glissant A, Nathan C, Douard S *et al*. Multiparameter analysis of human oocytes at metaphase II stage after IVF failure in non-male infertility. *Hum Reprod* 2003; **18**: 1494–503.
- 21 Keltz J, Zapantis A, Jindal SK, Lieman HJ, Santoro N *et al*. Overweight men: clinical pregnancy after ART is decreased in IVF but not in ICSI cycles. *J Assist Reprod Genet* 2010; **27**: 539–44.
- 22 Bakos HW, Henshaw RC, Mitchell M, Lane M. Paternal body mass index is associated with decreased blastocyst development and reduced live birth rates following assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2011; **95**: 1700–4.
- 23 Saez Lancelotti TE, Boarelli PV, Monclus MA, Cabrilla ME, Clementi MA *et al*. Hypercholesterolemia impaired sperm functionality in rabbits. *PLoS One* 2010; **5**: e13457.

## II. Réversibilité de l'impact du surpoids sur les fonctions de reproduction

Diminution de la graisse viscérale grâce à une prise en charge hygiéno-diététique

### *Introduction*

Un nombre croissant d'arguments montre l'impact négatif du surpoids, de l'obésité et de l'obésité abdominale sur les paramètres spermatiques et la fertilité masculine. La question est de savoir si la perte de poids, ou la perte plus ciblée de graisse viscérale, permettrait d'améliorer la fertilité des hommes. Peu de données sont disponibles sur ce sujet. Nous rapportons ici l'histoire de six couples dont les hommes, en surpoids ou obèses, présentaient une augmentation de la fragmentation de l'ADN spermatique. Tous ont suivi des recommandations hygiéno-diététiques afin de perdre du poids, en ciblant plus particulièrement leur obésité abdominale.

### *Patients et méthodes*

Quinze couples suivis pour infertilité primaire idiopathique inclus dans l'étude ALIFERT ont été sélectionnés. Les hommes devaient répondre aux critères suivants :

- Présenter un surpoids ou une obésité associée à une obésité abdominale (graisse viscérale mesurée par impédancemétrie  $\geq 4$ ).
- Présenter une augmentation de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes ( $\geq 25\%$ ).

Huit des 15 hommes qui répondaient à ces critères ont accepté de suivre des mesures hygiéno-diététiques personnalisées. Six patients sont revenus pour des analyses complémentaires après avoir suivi les recommandations.

### *Résultats*

Tous les hommes ont perdu du poids : pour certains, la perte restait minime. Aucun des patients n'a changé de catégorie d'IMC. Néanmoins, une diminution significative de l'obésité abdominale évaluée par la mesure du tour de taille et par impédancemétrie a été observée. Les patients présentaient une discrète amélioration du bilan lipidique. Concernant le bilan hormonal, on observait une nette amélioration du rapport testostérone/œstradiol. Cette amélioration n'était pas associée à une amélioration des paramètres spermatiques conventionnels, mais à une diminution significative du taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes. Les protéines carbonylées (marqueur du stress oxydant) et la protéine

superoxyde dismutase 2 (SOD 2) (marqueur anti-oxydant) ont été dosés dans le plasma séminal. Après la diminution de l'obésité abdominale, une augmentation de la protéine SOD2 associée une diminution des protéines carbonylées a été observée. Ces résultats suggèrent une amélioration de l'équilibre oxydatif au niveau local pouvant expliquer l'amélioration de l'intégrité de l'ADN spermatique.

Même si le lien de cause à effet ne peut être établi avec certitude, tous les couples ont obtenu une grossesse et une naissance vivante à la suite de cette prise en charge.

### *Conclusion*

Malgré le nombre limité de patients, ces cas montrent pour la première fois que chez des hommes présentant une augmentation de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, la diminution de l'obésité abdominale permet d'améliorer ce paramètre et que le stress oxydant est probablement un élément clé dans ce processus. D'autres études interventionnelles prospectives seront nécessaires pour établir avec certitude que le suivi de mesures hygiéno-diététiques en période pré-conceptionnelle, si elles sont indiquées, permettent d'augmenter les chances de conception et d'aboutir à une naissance vivante.

# PLOS ONE

## In subfertile men, abdominal fat loss is associated with improvement of sperm quality and pregnancy: a case-series --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	PONE-D-13-24990R1
<b>Article Type:</b>	Clinical Trial
<b>Full Title:</b>	In subfertile men, abdominal fat loss is associated with improvement of sperm quality and pregnancy: a case-series
<b>Short Title:</b>	Abdominal fat loss and sperm quality improvement
<b>Corresponding Author:</b>	Céline Faure, Ph.D Hôpital Jean Verdier BONDY, FRANCE
<b>Keywords:</b>	abdominal fat; lifestyle; Body Mass Index; sperm quality; oxidative stress
<b>Abstract:</b>	<p><b>BACKGROUND:</b> The impact of overweight among men of reproductive-age men, which may affect fertility. Abdominal fat, more than body mass index, is an indicator of higher metabolic risk, which seems to be involved in decreasing sperm quality. Therefore, this study aims to assess the relationship between abdominal fat and sperm DNA fragmentation among 6 men in subfertile couples.</p> <p><b>METHODS:</b> Sperm DNA fragmentation, abdominal fat and metabolic and hormonal profiles were measured in 6 men of subfertile couples before and after dietary advices.</p> <p><b>RESULTS:</b> After several months of a lifestyle program, all 6 men lost abdominal fat without changing BMI class (patient 1: loss of 3 points of abdominal fat, patient 2: loss of 3 points, patient 3: loss of 2 points, patient 4: loss of 1 point, patient 5: loss of 4 points and patient 6: loss of 13 points). At the same time, their rate of sperm DNA fragmentation decreased, respectively: 9.5 % vs 31 %, 24 % vs 43 %, 18 % vs 47 %, 26.3 % vs 66 %, 25.4 % vs 35 % and 1.7 % vs 25 %. Also, an improvement in both metabolic (significant decrease in triglycerides and total cholesterol; <math>p=0,0139</math>) and hormonal (significant increase in testosterone/oestradiol ratio; <math>p=0,0139</math>) profiles was observed after following the lifestyle program.</p> <p>Furthermore, all spouses got pregnant. All pregnancies were brought to term.</p> <p><b>CONCLUSIONS:</b> This study shows specifically that sperm DNA fragmentation among men in subfertile couples could be dramatically affected by abdominal fat. The effect of specific abdominal fat loss on sperm quality needs further investigation.</p>
<b>Order of Authors:</b>	<p>Céline Faure, Ph.D</p> <p>Charlotte Dupont</p> <p>Martin A Baraibar</p> <p>Romain Ladouce</p> <p>Isabelle Cédrin-Durnerin</p> <p>Jean Philippe Wolf</p> <p>Rachel Lévy</p>
<b>Suggested Reviewers:</b>	<p>Pascale CHAVATTE-PALMER INRA pascale.chavatte@jouy.inra.fr</p> <p>Walter Kuchenbecker University Medical Center Groningen w.k.h.kuchenbecker@isala.nl</p>
<b>Opposed Reviewers:</b>	
<b>Response to Reviewers:</b>	<p>REBUTTAL LETTER</p> <p>Reviewer #1 -Number of patients: we offered the dietary program to the patients included the first</p>

# In subfertile men, abdominal fat loss is associated with improvement of sperm quality and pregnancy: a case-series

Céline Faure<sup>1,2</sup>, Charlotte Dupont<sup>1,2,3</sup>, Martin A Baraibar<sup>4</sup>, Romain Ladouce<sup>4</sup>, Isabelle Cedrin-Durnerin<sup>2,5</sup>, Jean Philippe Wolf<sup>6</sup>, Rachel Lévy<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Service d'Histologie-Embryologie-Cytogénétique-CECOS, Hôpital Jean Verdier (AP-HP), Avenue du 14 Juillet, 93143 Bondy, France

<sup>2</sup> Unité de Recherche en Epidémiologie Nutritionnelle, INSERM U557; INRA; CNAM; Université Paris 13, CRNH IdF, 93017 Bobigny, France

<sup>3</sup> INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78352 Jouy en Josas

<sup>4</sup> Laboratoire de Biologie Cellulaire du Vieillessement, UR4-IFR83, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, 4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France

<sup>5</sup> Service de Médecine de la Reproduction, Hôpital Jean Verdier, Assistance Publique—Hôpitaux de Paris, Université Paris XIII, Bondy, France

<sup>6</sup> Service d'Histologie-Embryologie-Biologie de la Reproduction, Hôpital Cochin, Université Paris Descartes, Paris, France

## Abstract

**Background:** The impact of overweight among men of reproductive-age, which may affect fertility. Abdominal fat, more than body mass index, is an indicator of higher metabolic risk, which seems to be involved in decreasing sperm quality.

Therefore, this study aims to assess the relationship between abdominal fat and sperm DNA fragmentation, and the effect of abdominal fat loss, among 6 men in subfertile couples.

**Methods:** Sperm DNA fragmentation, abdominal fat and metabolic and hormonal profiles were measured in 6 men of subfertile couples before and after dietary advices. Seminal oxidative stress and antioxidant markers: carbonylated proteins and superoxide dismutase protein were determined.

**Results:** After several months of a lifestyle program, all 6 men lost abdominal fat without changing BMI class (patient 1: loss of 3 points of abdominal fat, patient 2: loss of 3 points, patient 3: loss of 2 points, patient 4: loss of 1 point, patient 5: loss of 4 points and patient 6: loss of 13 points). At the same time, their rate of sperm DNA fragmentation decreased, respectively: 9.5 % vs 31 %, 24 % vs 43 %, 18 % vs 47 %, 26.3 % vs 66 %, 25.4 % vs 35 % and 1.7 % vs 25 %. Also, an improvement in both metabolic (significant decrease in triglycerides and total cholesterol;  $p=0.0139$ ) and hormonal (significant increase in

35 testosterone/oestradiol ratio;  $p=0.0139$ ) blood profiles was observed after following the  
36 lifestyle program. In seminal plasma, the amount of SOD2 has significantly increased  
37 ( $p=0.0139$ ) while in parallel carbonylated proteins have substantially decreased. Furthermore,  
38 all spouses got pregnant. All pregnancies were brought to term.

39 **Conclusion:** This study shows specifically that sperm DNA fragmentation among men in  
40 subfertile couples could be dramatically affected by abdominal fat, but improvement of  
41 lifestyle factor may correct this alteration. The effect of specific abdominal fat loss on sperm  
42 quality needs further investigation. The reduction of oxidative stress may be a contributing  
43 factor.

44

45 **Key words:** abdominal fat / lifestyle/ body mass index / sperm quality

46

47

## 48 **Introduction**

49 Infertility affects about 15% of couples in reproductive age. A male factor, usually of  
50 unknown origin, is involved in 40 % of cases [1].

51 The high prevalence of overweight and obesity is significantly contributing to the overall  
52 burden of diseases worldwide, including infertility. In women, deleterious effects of obesity  
53 on reproductive functions are well documented and extensively published, dealing especially  
54 with higher frequency of ovulatory disorders and menstrual irregularities [2,3]. Within this  
55 context, abdominal fat accumulation contributes to reproductive dysfunction [4,5].

56 Although there are still controversies about the effect on males, we recently show an  
57 increased risk of azoospermia or oligozoospermia in male with high body mass index (BMI)  
58 [6,7]. Overweight or obesity may also alter sperm function, as an increase in sperm DNA  
59 fragmentation has been observed [8,9,10,11]. Abdominal fat accumulation appears to be a  
60 better indicator of high risk for developing an abnormal metabolic profile than body mass  
61 index. A recent study showed that central adiposity, defined by a high waist circumference  
62 [12], negatively affects sperm concentration and total motile sperm count.

63 Indeed, adipose tissue accumulation is associated with increased oxidative stress, one of the  
64 potential mechanisms to explain sperm damages in obese patients [13,14]. Decreased seminal  
65 plasma antioxidant and increased ROS production can be responsible for idiopathic male  
66 infertility [15].

67

68  
69 Protein carbonyls, formed by a variety of oxidative mechanisms, are sensitive indices and the  
70 most general and commonly used biomarker of oxidative injury [16]. By contrast, it is  
71 interesting to evaluate SOD2, a ROS scavenger.

72 In women, abdominal fat loss results in an improvement of fertility [17,18]. In men, only one  
73 publication is available and suggests an improvement of sperm parameters following weight  
74 loss [19].

75  
76 The aim of this report is to investigate the association between abdominal fat loss in subfertile  
77 men and sperm quality. We also report the achievement of pregnancy following dietary  
78 advices in six subfertile men and analysis improvement of their sperm parameters, seminal  
79 antioxidant and oxidative stress markers and metabolic and hormonal profiles after abdominal  
80 fat loss.

81

82

## 83 **Materials and methods**

### 84 *Subjects*

85 A cohort of couples attending an infertility centre for a primary idiopathic infertility (n=36)  
86 was recruited for the ALIFERT study (biomedical research P071224 / AOM 08180 /  
87 N°EudraCT 2009-A00256-51 / clinical trials NCT01093378). A sub-cohort of men was asked  
88 to participate to a personalized dietary program, including individualized nutritional advice  
89 aiming at reducing intra-abdominal fat and increasing exercise.

90 In this sub-cohort, we selected non smoking men, presenting with a percentage of sperm DNA  
91 fragmentation  $\geq 25\%$ , with abdominal fat  $\geq 4$  as measured by impedancemetry (see below)  
92 and still in a facto relationship.

93 Out of 15 men responding to the above criteria, 8 accepted to follow the dietary program.  
94 Among them, only 6 agreed to provide samples before and after the intervention (Figure 1).

95 Before and after the dietary program, anthropometric measures, abdominal fat, sperm  
96 parameters and sperm DNA fragmentation were evaluated. Hormonal and metabolic profiles  
97 could be obtained. Occurrence and outcome of pregnancies, obtained either spontaneously or  
98 following Assisted Reproductive Technology, were recorded.

99 The men received no incentives and participation was conditional to written and informed  
100 consent. The local ethics committee (Comité de Protection des Personnes) approved the study.

101 **Each of the 6 patients gave written consent to publication of these case details.**

102

103

104 *Anthropometric assessment*

105 Height was measured to the nearest 5 mm, without shoes, using a metric, by the same trained  
106 investigator. Waist circumference was measured at the narrowest point between the lower  
107 border of the ribs and the iliac crest. Weight and body composition were evaluated using the  
108 Tanita BC-420MA Analyzer. The bioelectrical impedance measurement combines a digital  
109 scale with stainless steel pressure-contact foot-pad electrodes for standing impedance and  
110 body weight measurements [20]. Details of the validation and performance characteristics of  
111 this bioimpedance analysis model have been reported previously [21]. The bioimpedance  
112 supplies a level of visceral fat: the purpose is to be as close to 1; rating from 1 to 4 indicates a  
113 low level of visceral fat; rating 5 to 12 indicates a high level of visceral fat ; >12 indicates a  
114 very excessive level.

115

116 *Semen analysis*

117 Sperm samples were collected at the laboratory after 3-5 days of sexual abstinence. After  
118 semen liquefaction, semen analysis was performed according to World Health Organization  
119 guidelines (WHO, 2010) assessing semen volume, sperm concentration, sperm motility. Total  
120 sperm count (TSC) was calculated.

121

122 *Determination of sperm DNA integrity*

123 To evaluate sperm nuclear DNA integrity, the TUNEL (Terminal Uridine Nick End Labeling)  
124 technique was performed on semen samples using In Situ Cell Death Detection Kit (In situ  
125 Cell Death Detection kit, Fluorescein, Roche Applied Science). Briefly, after trypsinization,  
126 spermatozoa were fixed in Carnoy solution (2:1 methanol/acetic acid) and stored at -20°C.  
127 Spermatozoon pellets were permeabilised for 20 minutes with 0,1% Triton X-100 in sodium  
128 citrate solution and washed with PBS. Then cells were incubated with dUTP FITC-labelled  
129 and terminal deoxyribonucleotidyl tranferase (TdT) (TUNEL solution). The positive control  
130 sample was treated with 100µl of DNase (0,5mM) for one hour at 37°C before incubation  
131 with the TUNEL solution and the TdT enzyme was omitted for the negative control. Cells

132 were then washed twice in PBS and spread out over slides. Slides were dried at room  
133 temperature in the dark and DAPI solution was added over the spermatozoa. Slides were  
134 examined using fluorescence microscopy. At least 200 spermatozoa were counted and total  
135 sperm DNA fragmentation rate was calculated as the number of FITC-positive cells from the  
136 total number of sperm nuclei (labelled with DAPI). Two investigators blinded to the exposure  
137 and other covariates performed twice the analyses.

138

#### 139 *Seminal markers assays*

140 Liquefied semen was centrifuged to separate sperm from seminal plasma. Seminal plasma  
141 was immediately stored in aliquots at -80°C for further analysis without freezing–thawing.

142

#### 143 *Superoxide dismutase*

144 SOD2 was quantified by ELISA using the “Human Superoxyde Dismutase 2 ELISA” kit  
145 (Abfrontier) according to manufacturer’s instructions.

146

#### 147 *Detection of carbonylated proteins*

148 Carbonylated proteins were labeled with CyDye™ hydrazides (GE Healthcare) as described  
149 previously [22]. Briefly, samples were homogenized using a lysis buffer (10 mM tris-HCl (pH  
150 7.4), 8 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 10mM dithiothreitol (DTT)) and clarified by  
151 centrifugation. Protein quantification was performed by the Bradford method (Bio-Rad  
152 protein assay), using BSA as standard. Carbonylated proteins were labeled with Cy5  
153 hydrazides (GE Healthcare) and total proteins were precipitated using the 2-D Clean-Up kit  
154 (GE Healthcare), following the manufacturer instructions. Protein precipitates were  
155 resuspended in loading buffer and separated by SDS-PAGE (4-20%). Total proteins were  
156 post-stained with ProteinGOLD (gel company). Fluorescent scanning was performed using  
157 Ettan Dalt system (GE Healthcare) at excitation and emission wavelengths of 635/680 for the  
158 Cy5 hydrazide and 390/595 for total proteins, respectively. Semiquantification of  
159 carbonylated proteins were performed on digitalized images by densitometric analysis using  
160 total protein staining as loading control.

161

#### 162 *Dietary program*

163 All participants received individualized dietary advice by a nutritionist after a complete  
164 nutritional assessment. Program was based on a healthy, balanced diet, aiming for reduction

165 in abdominal fat according to the French national nutrition and health programme. They were  
166 encouraged to practice 1h of weekly exercise. Spouses did not change neither their diet nor  
167 their lifestyle.

168  
169 *Blood collection*

170 Blood samples were used to estimate fasting glucose, lipid profile (triglycerides (TG), total  
171 cholesterol, HDL and LDL) and for sex hormone assays (FSH, LH, oestradiol and  
172 testosterone). The testosterone/oestradiol (T/E) ratio was calculated.

173  
174 *Statistical analysis*

175 To determine whether there is an overall difference in pre- and post-intervention,  
176 anthropometric and sperm parameters, metabolic and sex hormones values were compared  
177 between the pre-test and the post-test using the Wilcoxon test. Value of 0.05 or less was  
178 considered statistically significant.

179  
180

## 181 **Results**

182 The characteristics of the six patients at baseline and after diet are presented in Table 1 and  
183 Figure 2.

184  
185 Patient 1

186 Patient 1 was a 30-year-old man with a 21-month history of primary idiopathic infertility. His  
187 partner was 30 years old and had a BMI at 26.3 kg/m<sup>2</sup>; her ovulatory status, hormonal profile  
188 and pelvic examination were within normal values.

189 At the time of the visit, male BMI was 25.3 kg/m<sup>2</sup>, abdominal fat was 6, sperm DNA  
190 fragmentation rate was 31% and sperm parameters were: TSC 28.4 x 10<sup>6</sup>, progressive motility  
191 40% and 31% normal spermatozoa. In seminal plasma concentration of SOD2 was 1191.5  
192 pg/ml. Ratio of sex hormones was: T/E 44.6 and lipid profile: TG 0.82 g/l and total  
193 cholesterol 2.01 g/l. The couple had previously benefited from one ovarian stimulation, and  
194 one intrauterine insemination (IUI) without any pregnancy.

195 After 3 months on the dietary program, a pregnancy was obtained following the second IUI.  
196 At this time, male BMI was 24.9 kg/m<sup>2</sup>, abdominal fat was at 3, sperm DNA fragmentation  
197 rate was 9.5% and sperm parameters were: TSC 16.9 x 10<sup>6</sup>, progressive motility 40 % and

198 27% normal spermatozoa. In seminal plasma concentration of SOD2 was 2741.5 pg/ml. Ratio  
199 of sex hormones was: T/E 144.4 and lipid profile: TG 0.7 g/l and total cholesterol 1.72 g/l.

200

201 Patient 2

202 Patient 2 was a 28-year-old man with a 36-months history of primary idiopathic infertility.  
203 His partner was 31 years old and had a BMI at 19 kg/m<sup>2</sup>; her ovulatory status, hormonal  
204 profile and pelvic examination were within normal values.

205 At the time of the visit, male BMI was 26.6 kg/m<sup>2</sup>, abdominal fat was at 6, sperm DNA  
206 fragmentation rate was 43% and sperm parameters were: TSC 74 x 10<sup>6</sup>, progressive motility  
207 40% and 26% normal spermatozoa. In seminal plasma concentration of SOD2 was 809 pg/ml.

208 Ratio of carbonylated proteins to total proteins was 0.16. Ratio of sex hormones was: T/E  
209 154.6 and lipid profile: TG 1.02 g/l and total cholesterol 2.01 g/l. The couple had previously  
210 benefited from one ovarian stimulation cycle and three IUI without any pregnancy.

211 After 4 months on the dietary program, a pregnancy was obtained following the fourth IUI. At  
212 this time, male BMI was 26.2 kg/m<sup>2</sup>, abdominal fat was at 3, sperm DNA fragmentation rate  
213 was 24% and sperm parameters were: TSC 199.6 x 10<sup>6</sup>, progressive motility 25% and 19%  
214 normal spermatozoa. In seminal plasma concentration of SOD2 was 3621.5 pg/ml. Ratio of  
215 carbonylated proteins to total proteins was 0.06. Ratio of sex hormones was: T/E 223.8 and  
216 lipid profile: TG 0.7 g/l and total cholesterol 1.69 g/l.

217

218 Patient 3

219 Patient 3 was a 27-year-old man with an 18-months history of primary idiopathic infertility.  
220 His partner was 31 years old and had a BMI at 27.7 kg/m<sup>2</sup>; her ovulatory status, hormonal  
221 profile and pelvic examination were within normal values.

222 At the time of the visit, male BMI was 27.2 kg/m<sup>2</sup>, abdominal fat was at 7, sperm DNA  
223 fragmentation rate was 47% and sperm parameters were: TSC 29 x 10<sup>6</sup>, progressive motility  
224 25% and 7% normal spermatozoa. In seminal plasma concentration of SOD2 was 1819

225 pg/ml. Ratio of carbonylated proteins to total proteins was 0.04. Ratio of sex hormones was:  
226 T/E 68.3 and lipid profile: TG 1.21 g/l and total cholesterol 1.86 g/l. The couple had  
227 previously benefited from 2 ovarian stimulations without any pregnancy.

228 After 5 months on the dietary program, a spontaneous pregnancy was obtained. At this time,  
229 male BMI was 26.8 kg/m<sup>2</sup>, abdominal fat was at 5, sperm DNA fragmentation rate was 18%  
230 and sperm parameters were: TSC 176.6 x 10<sup>6</sup>, progressive motility 45% and 14% normal  
231 spermatozoa. In seminal plasma concentration of SOD2 was 3311.5 pg/ml. Ratio of

232 carbonylated proteins to total proteins was 0.05. Ratio of sex hormones was: T/E 135.7 and  
233 lipid profile: TG 1.1 g/l and total cholesterol 1.64 g/l.

234

235 Patient 4

236 Patient 4 was a 29-year-old man with a 25-month history of primary idiopathic infertility. His  
237 partner was 29 years old and had a BMI at 25.7 kg/m<sup>2</sup>; her ovulatory status, hormonal profile  
238 and pelvic examination were within normal values.

239 At the time of the visit, male BMI was 28.3 kg/m<sup>2</sup>, abdominal fat was at 4, DNA  
240 fragmentation rate was 66% and sperm parameters were: TSC 76.2 x 10<sup>6</sup>, progressive motility  
241 30% and 14% normal spermatozoa. In seminal plasma concentration of SOD2 was 4191.5  
242 pg/ml. Ratio of carbonylated proteins to total proteins was 0.26. Ratio of sex hormones was:  
243 T/E 48.4 and lipid profile: TG 0.89 g/l and total cholesterol 2.2 g/l. The couple had previously  
244 benefited from one ovarian stimulation cycle without any pregnancy.

245 After 4.5 months on the dietary program, a pregnancy was obtained following the first IUI. At  
246 this time, male BMI was 26.5 kg/m<sup>2</sup>, abdominal fat was at 3, sperm DNA fragmentation rate  
247 was 26.3% and sperm parameters were: TSC 31.9 x 10<sup>6</sup>, progressive motility 30% and 15%  
248 normal spermatozoa. In seminal plasma concentration of SOD2 was more than 4399 pg/ml.  
249 Ratio of carbonylated proteins to total proteins was 0.12. Ratio of sex hormones was: T/E  
250 250.9 and lipid profile: TG 0.59 g/l and total cholesterol 1.64 g/l.

251

252 Patient 5

253 Patient 5 was a 44-year-old man with a 36-months history of primary idiopathic infertility.  
254 His partner was 37 years old and had a BMI at 28.5 kg/m<sup>2</sup>; her ovulatory status, hormonal  
255 profile and pelvic examination were normal.

256 At the time of the visit, male BMI was 31.2 kg/m<sup>2</sup>, abdominal fat was at 13, sperm DNA  
257 fragmentation rate was 35% and sperm parameters were: TSC 21.9 x 10<sup>6</sup>, progressive motility  
258 8% and 11% normal spermatozoa. In seminal plasma concentration of SOD2 was 754 pg/ml.  
259 Ratio of carbonylated proteins to total proteins was 0.10. Ratio of sex hormones was: T/E  
260 57.3 and lipid profile: TG 3.07 g/l and total cholesterol 3.17 g/l. The couple had previously  
261 benefited from 3 IUI without any pregnancy.

262 After 8 months on the dietary program, a pregnancy was obtained following the fourth IUI. At  
263 this time, male BMI was 30.7 kg/m<sup>2</sup>, abdominal fat was at 9, sperm DNA fragmentation rate  
264 was 25.4% and sperm parameters were: TSC 32 x 10<sup>6</sup>, progressive motility 35% and 16%  
265 normal spermatozoa. In seminal plasma concentration of SOD2 was 3499 pg/ml. Ratio of

266 carbonylated proteins to total proteins was 0.04. Ratio of sex hormones was: T/E 113.8 and  
267 lipid profile: TG 2.19 g/l and total cholesterol 2.63 g/l.

268

269 Patient 6

270 Patient 6 was a 33-year-old man with a 24-months history of primary idiopathic infertility.  
271 His partner was 31 years old and had a BMI at 29.6 kg/m<sup>2</sup>; her ovulatory status, hormonal  
272 profile and pelvic examination were within normal values.

273 At the time of the visit, male BMI was 44.9 kg/m<sup>2</sup>, abdominal fat was at 26, sperm DNA  
274 fragmentation rate was 25% and sperm parameters were: TSC 35.6 x 10<sup>6</sup>, progressive motility  
275 8% and 11% normal spermatozoa. In seminal plasma concentration of SOD2 was 2939 pg/ml.

276 Ratio of carbonylated proteins to total proteins was 0.32. Ratio of sex hormones was: T/E  
277 52.9 and lipid profile: TG 1.87 g/l and total cholesterol 1.75 g/l. The couple had previously  
278 benefited from 2 ovarian stimulations and one IUI without any pregnancy.

279 After 8 months on the dietary program, a pregnancy was obtained after the third IUI. At this  
280 time, male BMI was 41.1 kg/m<sup>2</sup>, abdominal fat was at 13, sperm DNA fragmentation rate  
281 was 1.7% and sperm parameters were: TSC 87 x 10<sup>6</sup>, progressive motility 10% and 21%  
282 normal spermatozoa. In seminal plasma concentration of SOD2 was 4484 pg/ml. Ratio of

283 carbonylated proteins to total proteins was 0.06. Ratio of sex hormones was: T/E 87.8 and  
284 lipid profile: TG 1.39 g/l and total cholesterol 1.62 g/l.

285 General comment: All participants lost abdominal fat (in terms of body composition and waist  
286 circumference) with no change of BMI categories after following the lifestyle program.  
287 Furthermore, there was no substantial change in conventional sperm parameters, whereas a  
288 significant improvement of sperm DNA integrity was observed for all patients (p=0.0139). In  
289 seminal plasma we observed a large increase of SOD2 protein and a decrease of carbonylated  
290 proteins.

291 At baseline, none had impaired fasting glucose while increased triglycerides were observed  
292 for the two obese men with concomitant increase in total cholesterol for one of them. All men  
293 except one had decreased levels of testosterone. An improvement in both metabolic  
294 (significant decrease in triglycerides and total cholesterol; p=0,0139) and hormonal  
295 (significant increase in testosterone/oestradiol ratio; p=0,0139) profiles was observed after  
296 following the dietary/lifestyle program.

297

298 All female partners achieved pregnancy and delivered a healthy child. Delivery and neonatal  
299 characteristics are presented in Table 2.

300

## 301 **Discussion**

302 Although some studies failed to link BMI and semen analyses [23,24,25], most of them  
303 reported a detrimental impact of male BMI on sperm parameters, notably a decrease in sperm  
304 concentration [6,7,9,10]. Consequently, the possibility to improve semen quality through  
305 weight reduction was also considered. Improvement of hormonal status was mainly observed  
306 after weight loss [26,27]. Furthermore, a positive impact on semen parameters was observed  
307 by Hakonsen et al. [28].

308 However, abdominal fat, regardless of BMI, is a reliable predictor of individual risk of  
309 comorbidities such as metabolic syndrome [29,30,31]. Likewise, abdominal fat could be a  
310 good indicator to assess the risk of altered semen parameters. Until now, only 2 studies have  
311 shown a negative impact of abdominal fat (measured by waist circumference) on conventional  
312 semen parameters [12,32] and none have assessed the impact of abdominal fat loss on male  
313 reproductive function.

314 Our report suggests, for the first time, that reduction of abdominal fat is associated with sperm  
315 DNA integrity improvement, regardless of BMI. Fat loss was also associated with an  
316 improvement of metabolic and sex steroid profiles. All 8 non smoking patients who followed  
317 the dietary program (6 agreed to provide samples after the intervention and 2 did not) have  
318 lost weight and their WC have decreased. Of the 7 patients who wished not to participate on  
319 the dietary program, no anthropometric change was observed.

320

321 Sperm DNA integrity is essential for a successful pregnancy [33]. High rates of sperm DNA  
322 fragmentation are associated with lower implantation rates and higher miscarriage rates  
323 [34,35]. In this report, a successful pregnancy was obtained for the six couples after sperm  
324 DNA integrity improvement. The 2 other couples whose male partners followed the dietary  
325 program conceived healthy children. After one year, of the 7 patients who did not participate,  
326 six could not achieve pregnancy and one conceived a child after IVF. Information about  
327 sperm quality was not available.

328

329 Abdominal fat is associated with increased oxidative stress [36,37]. Although, seminal plasma  
330 and sperm contain antioxidants, these defense systems can be overwhelmed [38]. Oxidative  
331 stress is known to impact male fertility. ROS (reactive oxygen species) can alter sperm  
332 membrane and sperm nucleus leading to sperm DNA damage [39,40,41]. **Decreased SOD**

333 might be involved in abnormal semen quality [42]. Several studies in humans and in mice  
334 have established a link between being overweight or obese and oxidative stress and sperm  
335 DNA damages [43,44]. In the present study, significantly higher levels of SOD2 protein have  
336 been observed in seminal plasma after the dietary program. Moreover an important decrease  
337 of carbonylated proteins has been evidenced, indicating an increased quality of the seminal  
338 proteome. Whether an improvement of the balance between oxidative/anti-oxidative  
339 substances in the seminal plasma due to the dietary program remains to be determined in  
340 future studies.

341  
342 Moreover, an improvement of the testosterone/oestradiol ratio was observed in parallel with  
343 decreased abdominal fat. Central adiposity has been associated with lower levels of  
344 testosterone [45], and oestradiol levels positively correlate with visceral fat, but not with  
345 subcutaneous, adipose tissue. Therefore, visceral adipose tissue strongly correlates with  
346 testosterone/oestradiol ratio [46]. Based on an experimental mouse model, obesity,  
347 inflammation and visceral fat concentrations of aromatase appear to be linked [47]. The  
348 aromatization process, leading to the conversion of testosterone into oestradiol, is mediated by  
349 visceral fat inflammation. Obesity is associated with elevated of pro-inflammatory molecules  
350 that are known to induce the aromatase gene transcription and the aromatase activity [48,49]

351

## 352 **Conclusion**

353 In conclusion, even a limited number of patients, these original findings suggest that  
354 abdominal fat loss may improve sperm DNA integrity, blood hormonal profile and pregnancy  
355 outcome. Oxidative stress should be involved in this phenomenon since an increase of SOD2  
356 level and a decrease of oxidatively damaged proteins have been evidenced in seminal plasma  
357 of these patients after the dietary program.

358 Further prospective controlled interventional studies are needed to observe the effect of  
359 losing abdominal fat on sperm quality in a larger cohort of infertile men with high sperm  
360 fragmentation and imbalance between oxidative and anti-oxidative substances in semen. If  
361 these results were confirmed, future prevention of subfertility should target abdominal fat and  
362 oxidative stress mainly in men with high sperm fragmentation.

363 Further studies are also needed to understand mechanisms and the effect on fertility outcome.

364

## 365 **Acknowledgments**

366 The authors want to acknowledge and thank all the patients who participated in the study.  
367 Thanks and appreciation to AC Marty for performing the second lecture of sperm DNA  
368 fragmentation and C Camelin and L Edinburgh who were involved in the paper review.

369

370 **Conflict of interest:** none declared

371 **References**

- 372 1. Wong WY, Thomas CM, Merkus JM, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP (2000)  
373 Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. *Fertil*  
374 *Steril* 73: 435-442.  
375
- 376 2. Rich-Edwards JW, Goldman MB, Willett WC, Hunter DJ, Stampfer MJ, et al. (1994)  
377 Adolescent body mass index and infertility caused by ovulatory disorder. *Am J Obstet*  
378 *Gynecol* 171: 171-177.  
379
- 380 3. Zain MM, Norman RJ (2008) Impact of obesity on female fertility and fertility  
381 treatment. *Womens Health (Lond Engl)* 4: 183-194.  
382
- 383 4. Zaadstra BM, Seidell JC, Van Noord PA, te Velde ER, Habbema JD, et al. (1993) Fat  
384 and female fecundity: prospective study of effect of body fat distribution on  
385 conception rates. *Bmj* 306: 484-487.  
386
- 387 5. Pasquali R, Gambineri A, Pagotto U (2006) The impact of obesity on reproduction in  
388 women with polycystic ovary syndrome. *Bjog* 113: 1148-1159.  
389
- 390 6. Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Levy R, Czernichow S (2012) Obesity and  
391 increased risk for oligozoospermia and azoospermia. *Arch Intern Med* 172: 440-442.  
392
- 393 7. Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Shayeb AG, Bonde JP, et al. (2012) BMI in relation  
394 to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Hum*  
395 *Reprod Update*.  
396
- 397 8. Fariello RM, Pariz JR, Spaine DM, Cedenho AP, Bertolla RP, et al. Association  
398 between obesity and alteration of sperm DNA integrity and mitochondrial activity.  
399 *BJU Int*.  
400
- 401 9. Chavarro JE, Toth TL, Wright DL, Meeker JD, Hauser R (2010) Body mass index in  
402 relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone  
403 levels among men attending an infertility clinic. *Fertil Steril* 93: 2222-2231.  
404
- 405 10. Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, et al. (2006) Impact of  
406 body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl* 27: 450-452.  
407
- 408 11. Dupont C, Faure C, Sermondade N, Boubaya M, Eustache F, et al. (2013) Obesity  
409 leads to higher risk of sperm DNA damage in infertile patients. *Asian J Androl* 15:  
410 622-625.  
411
- 412 12. Hammiche F, Laven JS, Twigt JM, Boellaard WP, Steegers EA, et al. (2012) Body  
413 mass index and central adiposity are associated with sperm quality in men of subfertile  
414 couples. *Hum Reprod*.  
415
- 416 13. Tremellen K (2008) Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Hum*  
417 *Reprod Update* 14: 243-258.  
418

- 419 14. Ebisch IM, Peters WH, Thomas CM, Wetzels AM, Peer PG, et al. (2006)  
420 Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the  
421 (sub)fertile couple. *Hum Reprod* 21: 1725-1733.  
422
- 423 15. Alkan I, Simsek F, Haklar G, Kervancioglu E, Ozveri H, et al. (1997) Reactive oxygen  
424 species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility:  
425 relationship to seminal plasma antioxidants. *J Urol* 157: 140-143.  
426
- 427 16. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R (2003) Protein carbonyl  
428 groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 329: 23-38.  
429
- 430 17. Thomson RL, Buckley JD, Noakes M, Clifton PM, Norman RJ, et al. (2008) The  
431 effect of a hypocaloric diet with and without exercise training on body composition,  
432 cardiometabolic risk profile, and reproductive function in overweight and obese  
433 women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 3373-3380.  
434
- 435 18. Kuchenbecker WK, Groen H, van Asselt SJ, Bolster JH, Zwerver J, et al. (2011) In  
436 women with polycystic ovary syndrome and obesity, loss of intra-abdominal fat is  
437 associated with resumption of ovulation. *Hum Reprod* 26: 2505-2512.  
438
- 439 19. Hakonsen LB, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Olsen J, Bonde JP, et al. Does weight  
440 loss improve semen quality and reproductive hormones? Results from a cohort of  
441 severely obese men. *Reprod Health* 8: 24.  
442
- 443 20. Nunez C, Gallagher D, Visser M, Pi-Sunyer FX, Wang Z, et al. (1997) Bioimpedance  
444 analysis: evaluation of leg-to-leg system based on pressure contact footpad electrodes.  
445 *Med Sci Sports Exerc* 29: 524-531.  
446
- 447 21. Pietrobelli A, Rubiano F, St-Onge MP, Heymsfield SB (2004) New bioimpedance  
448 analysis system: improved phenotyping with whole-body analysis. *Eur J Clin Nutr* 58:  
449 1479-1484.  
450
- 451 22. Baraibar MA, Ladouce R, Friguet B (2013) Proteomic quantification and  
452 identification of carbonylated proteins upon oxidative stress and during cellular aging.  
453 *J Proteomics*.  
454
- 455 23. Duits FH, van Wely M, van der Veen F, Gianotten J (2009) Healthy overweight male  
456 partners of subfertile couples should not worry about their semen quality. *Fertil Steril*  
457 94: 1356-1359.  
458
- 459 24. Li Y, Lin H, Ma M, Li L, Cai M, et al. (2009) Semen quality of 1346 healthy men,  
460 results from the Chongqing area of southwest China. *Hum Reprod* 24: 459-469.  
461
- 462 25. Aggerholm AS, Thulstrup AM, Toft G, Ramlau-Hansen CH, Bonde JP (2008) Is  
463 overweight a risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone  
464 profile? *Fertil Steril* 90: 619-626.  
465
- 466 26. Kaukua J, Pekkarinen T, Sane T, Mustajoki P (2003) Sex hormones and sexual  
467 function in obese men losing weight. *Obes Res* 11: 689-694.  
468

- 469 27. Niskanen L, Laaksonen DE, Punnonen K, Mustajoki P, Kaukua J, et al. (2004)  
470 Changes in sex hormone-binding globulin and testosterone during weight loss and  
471 weight maintenance in abdominally obese men with the metabolic syndrome. *Diabetes*  
472 *Obes Metab* 6: 208-215.  
473
- 474 28. Hakonsen LB, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Olsen J, Bonde JP, et al. (2011) Does  
475 weight loss improve semen quality and reproductive hormones? Results from a cohort  
476 of severely obese men. *Reprod Health* 8: 24.  
477
- 478 29. Canoy D, Boekholdt SM, Wareham N, Luben R, Welch A, et al. (2007) Body fat  
479 distribution and risk of coronary heart disease in men and women in the European  
480 Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition in Norfolk cohort: a population-  
481 based prospective study. *Circulation* 116: 2933-2943.  
482
- 483 30. Heber D (2010) An integrative view of obesity. *Am J Clin Nutr* 91: 280S-283S.  
484
- 485 31. Lee CM, Huxley RR, Wildman RP, Woodward M (2008) Indices of abdominal  
486 obesity are better discriminators of cardiovascular risk factors than BMI: a meta-  
487 analysis. *J Clin Epidemiol* 61: 646-653.  
488
- 489 32. Fejes I, Koloszar S, Szollosi J, Zavaczki Z, Pal A (2005) Is semen quality affected by  
490 male body fat distribution? *Andrologia* 37: 155-159.  
491
- 492 33. Santiso R, Tamayo M, Gosalvez J, Meseguer M, Garrido N, et al. (2010)  
493 Simultaneous determination in situ of DNA fragmentation and 8-oxoguanine in human  
494 sperm. *Fertil Steril* 93: 314-318.  
495
- 496 34. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, et al. (2007) Sperm DNA  
497 integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum*  
498 *Reprod* 22: 174-179.  
499
- 500 35. Velez de la Calle JF, Muller A, Walschaerts M, Clavere JL, Jimenez C, et al. (2008)  
501 Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin  
502 dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large  
503 prospective multicenter study. *Fertil Steril* 90: 1792-1799.  
504
- 505 36. Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R (2005) Metabolic syndrome:  
506 a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and  
507 inflammation. *Circulation* 111: 1448-1454.  
508
- 509 37. Davi G, Falco A (2005) Oxidant stress, inflammation and atherogenesis. *Lupus* 14:  
510 760-764.  
511
- 512 38. Aitken RJ, De Iuliis GN (2007) Origins and consequences of DNA damage in male  
513 germ cells. *Reprod Biomed Online* 14: 727-733.  
514
- 515 39. Ebisch IM, Thomas CM, Wetzels AM, Willemsen WN, Sweep FC, et al. (2008)  
516 Review of the role of the plasminogen activator system and vascular endothelial  
517 growth factor in subfertility. *Fertil Steril* 90: 2340-2350.  
518

- 519 40. Blumer CG, Fariello RM, Restelli AE, Spaine DM, Bertolla RP, et al. (2008) Sperm  
520 nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. *Fertil*  
521 *Steril* 90: 1716-1722.  
522
- 523 41. Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, Agarwal A (2007) Clinical relevance of oxidative  
524 stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *Int*  
525 *Braz J Urol* 33: 603-621.  
526
- 527 42. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT (1987) Spontaneous lipid  
528 peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human  
529 spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen  
530 toxicity. *J Androl* 8: 338-348.  
531
- 532 43. Bakos HW, Mitchell M, Setchell BP, Lane M (2011) The effect of paternal diet-  
533 induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *Int J Androl* 34:  
534 402-410.  
535
- 536 44. Tunc O, Bakos HW, Tremellen K (2011) Impact of body mass index on seminal  
537 oxidative stress. *Andrologia* 43: 121-128.  
538
- 539 45. Derby CA, Zilber S, Brambilla D, Morales KH, McKinlay JB (2006) Body mass  
540 index, waist circumference and waist to hip ratio and change in sex steroid hormones:  
541 the Massachusetts Male Ageing Study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 65: 125-131.  
542
- 543 46. Gautier A, Bonnet F, Dubois S, Massart C, Grosheny C, et al. (2013) Associations  
544 between visceral adipose tissue, inflammation and sex steroid concentrations in men.  
545 *Clin Endocrinol (Oxf)* 78: 373-378.  
546
- 547 47. Subbaramaiah K, Howe LR, Bhardwaj P, Du B, Gravaghi C, et al. (2011) Obesity is  
548 associated with inflammation and elevated aromatase expression in the mouse  
549 mammary gland. *Cancer Prev Res (Phila)* 4: 329-346.  
550
- 551 48. Zhao Y, Agarwal VR, Mendelson CR, Simpson ER (1997) Transcriptional regulation  
552 of CYP19 gene (aromatase) expression in adipose stromal cells in primary culture. *J*  
553 *Steroid Biochem Mol Biol* 61: 203-210.  
554
- 555 49. Irahara N, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S (2006) Quantitative analysis  
556 of aromatase mRNA expression derived from various promoters (I.4, I.3, PII and I.7)  
557 and its association with expression of TNF-alpha, IL-6 and COX-2 mRNAs in human  
558 breast cancer. *Int J Cancer* 118: 1915-1921.  
559  
560

## 561 **Figure Legend**

562 Figure 1: Design of the study

563

564 **Figure 2: Oxidized damaged proteins before (Basal Line) and after treatment (After Diet).**

565 **SDS-PAGE (4-20%) pattern of total proteins post-stained with ProteinGOLDTM (A), or**

566 carbonylated proteins pre-labeled with C5Hz (B). Semiquantification of carbonylated proteins  
567 were performed by densitometric analysis, expressed as relative values and shown as  
568 mean±S.D (n=5) and analyzed using Student's t-test; \* P=0.06 (C).

569

## 570 **Tables**

571 Table 1: Anthropometric parameters, semen characteristics, seminal antioxidant markers,  
572 metabolic and hormonal profiles and pregnancy outcome at baseline and after dietary advices.

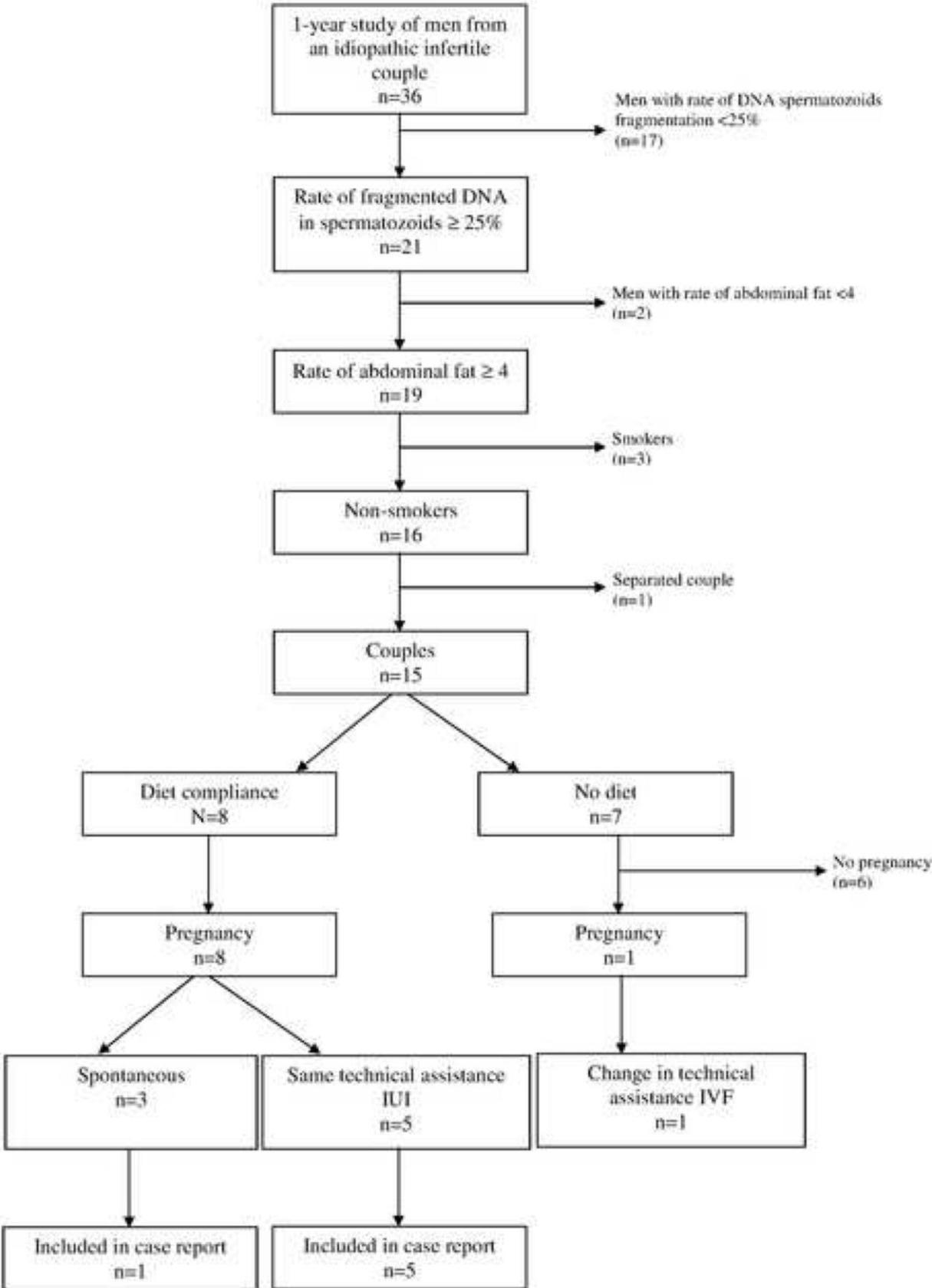
573

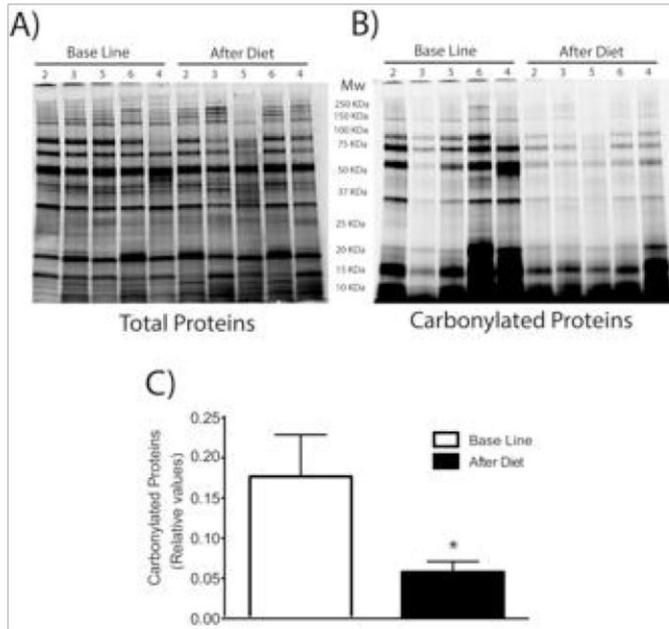
574 Table 2: Delivery and neonatal characteristics

575

576

Figure 1  
[Click here to download high resolution image](#)





580  
581  
582  
583  
584  
585  
586  
587

Figure 2: Oxidized damaged proteins before (Basal Line) and after treatment (After Diet). SDS-PAGE (4-20%) pattern of total proteins post-stained with ProteinGOLD™ (A), or carbonylated proteins pre-labeled with C5Hz (B). Semiquantification of carbonylated proteins were performed by densitometric analysis, expressed as relative values and shown as mean±S.D (n=5) and analyzed using Student's t-test; \* P=0.06 (C)

	Patient 1		Patient 2		Patient 3		Patient 4		Patient 5		Patient 6		Wilcoxon test
	baseline	after diet	baseline	after diet	baseline	after diet	signification (alpha s)						
<b>Anthropometry</b>													
age (years)	30		29		33		28		27		44		
height (m)	1,86		1,82		1,89		1,73		1,88		1,89		
weight (kg)	87,5	86,2	93,7	87,7	160,6	146,7	79,5	78,4	96,2	94,7	111,6	109	0,0139*
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25,3	24,9	28,3	26,5	44,9	41,1	26,6	26,2	27,2	26,8	31,2	30,7	0,0139*
waist circumference (cm)	103	90	90	89	142	121	83	80	96	94	125	114	0,0139*
intra-abdominal fat	6	3	4	3	26	13	6	3	7	5	13	9	0,0139*
<b>Sperm analysis</b>													
total sperm count (M)	28,4	16,9	76,2	31,9	35,6	87	74	199,6	29	176,6	21,9	32	0,1244
progressive sperm motility (%)	40	40	30	30	8	10	40	25	25	45	8	35	0,1367
normal spermatozoa (%)	31	27	14	15	11	21	26	19	7	14	11	16	0,2068
sperm fragmentation (%)	31	9,5	66	26,3	25	1,7	43	24	47	18	35	25,4	0,0139*
<b>Seminal plasma analysis</b>													
superoxide dismutase protein 2 (pg/ml)	1191,5	2741,5	809	3621,5	1819	3311,5	4191,5	>4399	754	3499	2939	4484	0,0139*
<b>Biological parameters</b>													
fasting glucose (g/l)	0,9	0,83	0,82	1,01	0,94	0,92	0,88	0,87	0,95	0,97	0,97	0,83	0,3766
triglycerides (g/l)	0,82	0,7	0,89	0,59	1,87	1,39	1,02	0,7	1,21	1,1	3,07	2,19	0,0139*
total cholesterol (g/l)	2,01	1,72	2,2	1,64	1,75	1,62	2,01	1,69	1,86	1,64	3,17	2,63	0,0139*
HDL (g/l)	0,46	0,37	0,52	0,37	0,43	0,54	0,47	0,38	0,51	0,5	0,62	0,5	0,0865
LDL (g/l)	1,4	1,21	1,51	0,95	0,96	0,97	1,35	1,17	1,11	1,52	2,11	1,52	0,1244
HDL/LDL ratio	0,33	0,31	0,34	0,39	0,45	0,56	0,35	0,32	0,46	0,33	0,29	0,33	
FSH (UI/l)	4,6	3,2	4,6	4,5	3,6	3,2	2,1	2,3	4,5	4,1	2,6	2,3	0,0374*
LH (UI/l)	5,3	2,7	4,9	4,8	3,9	2,7	3	2,7	3,3	2,9	2,3	2,7	0,0865
oestradiol (pg/ml)	51,7	36	37,4	22	34,6	32,8	32,8	26	30,3	28	26,7	18,1	
testosterone (ng/ml)	2,31	5,2	1,81	5,52	1,83	2,78	5,07	5,82	2,07	3,8	1,53	2,06	
testo/oestra ratio	44,6	144,4	48,4	250,9	52,9	87,76	154,6	223,8	68,3	135,7	57,3	113,8	0,0139*
<b>Assisted reproductive treatment</b>	1 stim 1 IUI	1 IUI	1 stim 1 IUI	1 IUI	2 stim 1 IUI	1 IUI	1 stim 3 IUI	1 IUI	2 stim None	None	3 IUI	1 IUI	
<b>Outcome</b>	No pregnancy	Live birth	No pregnancy	Live birth	No pregnancy	Live birth							

Table 1. Anthropometric parameters, semen characteristics, seminal antioxidant markers, metabolic and hormonal profiles and pregnancy outcome at baseline and after dietary advice

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
amenorrhea weeks	39.5	40	40	37	38	41
baby weight (kg)	3230	3070	3580	2750	3300	3750
size (cm)	47	49	53	45	47	50
APGAR	10	10	10	10	10	10
sex	girl	girl	boy	girl	girl	girl

Table 2. Delivery and neonatal characteristics

## **Partie 2: DOHAD**

### **I. Poids de naissance et paramètres spermatiques**

#### *Introduction*

Bien que le concept de DOHAD soit maintenant largement accepté, il existe peu de données concernant la programmation à long terme de la fertilité. Chez l'homme, il est difficile d'évaluer rétrospectivement l'alimentation maternelle pendant la grossesse, le poids de naissance est donc souvent utilisé comme un indicateur indirect du développement *in utero*. L'objectif de cette étude était de mettre en rapport le poids de naissance des patients et les paramètres spermatiques à l'âge adulte.

#### *Matériel et méthodes*

Les paramètres du spermogramme de 53 hommes recrutés pour l'étude ALIFERT (biomedical research P071224) ont été analysés. Les hommes étaient partenaires de couples présentant une infertilité primaire idiopathique. Leurs poids de naissance ont été recueillis dans leur carnet de naissance (tous étaient nés à terme). Les paramètres anthropométriques ont été mesurés le jour de la visite d'inclusion (IMC, tour de taille) et l'obésité abdominale évaluée par impédancemétrie. Un bilan métabolique a été établi (Cholestérol total, cholestérol LDL, cholestérol HDL, triglycérides et glycémie). L'étude des paramètres spermatiques a été réalisée en suivant les recommandations de l'OMS 2010. L'analyse de la fragmentation de l'ADN spermatique a été faite par la méthode TUNEL (Terminal Uridine Nick End Labeling) et la lecture a été réalisée à l'aide d'un microscope à fluorescence par deux biologistes qui ont compté au moins 200 spermatozoïdes. Le coefficient de corrélation de Spearman a été calculé entre le poids de naissance et les paramètres anthropométriques, ainsi qu'entre le poids de naissance et les paramètres spermatiques.

#### *Résultats*

Le poids de naissance moyen était de 3431g avec des valeurs extrêmes allant de 2500 à 4900 g (médiane, (Q1-Q3): 3400, (3100-3650)). Nous avons observé une corrélation négative significative entre le poids de naissance et la numération totale spermatique ( $p=0.007$ ). Il n'y avait pas d'association avec les autres paramètres spermatiques conventionnels. Il existait également une corrélation positive entre le poids de naissance et le taux de fragmentation de

l'ADN spermatique ( $p=0,038$ ). Nous n'avons pas retrouvé d'association entre le poids de naissance et les paramètres anthropométriques ou le bilan métabolique.

### *Conclusion*

D'après les données disponibles dans la littérature, il semblerait qu'une sous-nutrition, comme une surnutrition maternelle puissent altérer le développement des fonctions de reproduction masculine. Dans cette étude, aucun patient ne présentait de très petit poids de naissance ( $<2500\text{g}$ ), on ne peut donc pas exclure une diminution de la numération spermatique chez les hommes nés avec un retard de croissance plus sévère, ce qui aboutirait à une courbe en « U » inversée.

Pour la première fois, nous avons observé un impact du poids de naissance sur l'intégrité de l'ADN spermatique qui est un élément essentiel pour la conception.

Des études épidémiologiques de plus grande envergure, mais également des études chez l'animal sont nécessaires pour évaluer l'impact de la nutrition maternelle sur la fertilité des descendants et comprendre les mécanismes.



**Are semen parameters related to birth weight?**

Journal:	<i>Journal of Developmental Origins of Health and Disease</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Brief Report
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	FAURE, Céline; Hôpital Jean Verdier, Biologie de la Reproduction DUPONT, Charlotte; Hôpital Jean Verdier, Biologie de la Reproduction LEVY, Rachel; Hôpital Jean Verdier, Biologie de la Reproduction
Model or Method:	Newborn/Children < Human, Adult < Human, Pregnancy < Human, Epigenetics < Molecular/Cellular, Epidemiology/Public Health
Topic:	Child growth and health < Developmental Stage, Reproduction < Outcome/System, Body composition < Outcome/System, Maternal pregnancy < Outcome/System
Abstract:	Birth weight, commonly used for nutritional conditions during fetal life, could be a predictor of prenatal programming of reproductive functions. We aimed to investigate the relationship between birth weight and semen parameters in idiopathic infertile men. Birth weight was significantly inversely associated with total sperm count ( $p=0.007$ ) and also, a significantly positive association between birth weight and sperm DNA fragmentation ( $p=0.038$ ) was found. These findings support the concept of in utero programming across the range of birth weight.

SCHOLARONE™  
Manuscripts

Faure et al.

Birth weight and semen parameters

**Are semen parameters related to birth weight?**

Céline Faure<sup>1,2</sup>, Author, PhD; Charlotte Dupont<sup>1,2,3</sup>, Coauthor, PharmD; Rachel Levy<sup>1,2</sup>,  
Coauthor, MD, PhD, on behalf of ALIFERT collaborative Group

**Affiliations:** <sup>1</sup> Service d'Histologie-Embryologie-Cytogénétique-CECOS, Hôpital Jean Verdier (AP-HP), Bondy, France ; <sup>2</sup> Unité de Recherche en Epidémiologie Nutritionnelle, INSERM U557; INRA; CNAM; Université Paris 13, CRNH IdF, Bobigny, France ; <sup>3</sup> INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, Jouy en Josas, France

**Address correspondence to:** Céline Faure, Service d'Histologie-Embryologie-Cytogénétique-CECOS, Hôpital Jean Verdier (AP-HP), Avenue du 14 Juillet, 93143 Bondy, France. Tel: 00 33 1 48 02 68 80 ; [c.faure@uren.smbh.univ-paris13.fr](mailto:c.faure@uren.smbh.univ-paris13.fr)

Faure et al.

Birth weight and semen parameters

**Abstract**

Birth weight, commonly used for nutritional conditions during fetal life, could be a predictor of prenatal programming of reproductive functions. We aimed to investigate the relationship between birth weight and semen parameters in idiopathic infertile men.

Birth weight was significantly inversely associated with total sperm count ( $p=0.007$ ) and also, a significantly positive association between birth weight and sperm DNA fragmentation ( $p=0.038$ ) was found. These findings support the concept of *in utero* programming across the range of birth weight.

**Key words:** Birth Weigh, Fertility, Total Sperm Count, Sperm Quality, DOHAD

Faure et al.

Birth weight and semen parameters

## Introduction

Fetal programming of metabolic diseases is now a well-established concept known as DOHAD (Developmental Origins of Health and Disease). Little is known about prenatal development and subsequent fertility in adulthood. Some experiments in animal models suggest a link between maternal nutrition during gestation and reproductive function in offspring <sup>1</sup>. In humans, it is difficult to retrospectively assess *in utero* nutrition, so birth weight is commonly used as a proxy for nutritional conditions during fetal life. François et al. previously reported that men born small for gestational age are more likely to present infertility <sup>2</sup>. Recently, Vanbillemont *et al.* demonstrated that birth weight is positively correlated with plasma testosterone concentrations <sup>3</sup>. Olsen *et al.* and Ramlau-Hansen *et al.* however, did not confirm an association between birth weight and reproductive function <sup>4,5</sup>.

This study aimed at investigating the relationship between birth weights and semen parameters in idiopathic infertile men.

## Method

Data from 53 men (age range 24-45 yr) recruited within the ALIFERT study (biomedical research P071224) were recorded. They were all partners of infertile couples with primary idiopathic infertility. Birth weights were collected from their childhood health records with all subjects being born at term. Anthropometric parameters (body mass index, waist circumference, abdominal obesity measured by impedencemetry) were recorded. Conventional semen parameters were assessed, according to WHO guidelines (2010). Sperm DNA fragmentation was measured using the TUNEL (Terminal Uridine Nick End Labeling) assay with a minimum of 200 spermatozoa blind counted by two trained biologists. Blood samples were obtained for metabolic assays (total, LDL and HDL cholesterol, triglycerides and glycaemia). Spearman's correlation

Faure et al.

Birth weight and semen parameters

coefficient was used for correlation analysis.

## Results

The average birth weights was 3431g, ranging from 2500g to 4900g (median, (Q1-Q3): 3400, (3100-3650)). Birth weight was inversely correlated with total sperm count ( $p=0.007$ ) but not with other conventional semen parameters (Figure 1). There was also a significant positive association between birth weight and sperm DNA fragmentation ( $p=0.038$ ) (Figure 2). No association between birth weight and anthropometric parameters or metabolic status could be found.

## Discussion

Maternal nutrition is known to impact fetal growth and birth weight. Few studies have highlighted a relation between maternal nutrition and reproductive function<sup>1</sup>. In this homogeneous population made up of male partners from infertile couples with primary unexplained infertility, significant associations between birth weight, adult total sperm count and sperm DNA integrity were observed. None of the patients included in this study had a small gestational age. Hence, we could not exclude a decrease of sperm numeration in patients with low birth weight (<2.500g) leading to an inverted U-shaped association between birth weight and sperm numeration.

Several animal studies suggest that maternal environment may impair Sertoli cell development contributing to a negative impact on subsequent fertility in adulthood<sup>1</sup>.

Epidemiological studies and the use of animal models are necessary to assess the impact of maternal nutrition on offspring fertility and to elucidate the underlying mechanisms.

While BW is a poor substitute for nutritional status during gestation, these results underline the

Faure et al.

Birth weight and semen parameters

importance of the *in utero* environment for male reproductive functions and birth weight should be considered in male fertility assessment and prognosis.

### Acknowledgements

The authors want to acknowledge and thank all the patients who participated in the study. Thanks and appreciation to Alifert Collaborative Group\* for patient selection in ALIFERT study, B Gautier for statistical analysis and C Camelin and L Edinburgh who were involved in the paper review.

\*Alifert Collaborative Group: *Isabelle Aknin*: Unité fonctionnelle de biologie de la reproduction, histologie – embryologie – cytogénétique, hôpital Nord, Saint-Étienne, France ; *Isabelle Cedrin Durnerin*: Service de Médecine de la Reproduction, Hôpital Jean Verdier, Assistance Publique—Hôpitaux de Paris, Université Paris XIII, Bondy, France ; *Pascale Chavatte-Palmer*: INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, Jouy en Josas, France ; *Sébastien Czernichow*: Service Nutrition, Hôpital Ambroise Paré, Boulogne-Billancourt, France ; *Charlotte Dupont* : Service d’Histologie-Embryologie-Cytogénétique-CECOS, Hôpital Jean Verdier, Assistance Publique, Bondy, France ; *Céline Faure*: Service d’Histologie-Embryologie-Cytogénétique-CECOS, Hôpital Jean Verdier, Assistance Publique, Bondy, France ; *Serge Herberg*: Unité de Recherche en Epidémiologie Nutritionnelle, INSERM U557; INRA; CNAM; Université Paris 13, CRNH IdF, 93017 Bobigny, France ; *Jean-Noël Hugues*: Service de Médecine de la Reproduction, Hôpital Jean Verdier, Assistance Publique—Hôpitaux de Paris, Université Paris XIII, Bondy, France ; *Rachel Lévy*: Service d’Histologie-Embryologie-Cytogénétique-CECOS, Hôpital Jean Verdier, Assistance Publique, Bondy, France ; *Nathalie Sermondade*: Service d’Histologie-Embryologie-Cytogénétique-CECOS, Hôpital Jean Verdier, Assistance Publique, Bondy, France ; *Christophe Sifer*: Service d’Histologie-Embryologie-Cytogénétique-CECOS, Hôpital Jean Verdier, Assistance Publique, Bondy, France ; *Jean Philippe Wolf* : Service d’Histologie-Embryologie-Biologie de la Reproduction, Hôpital Cochin, Assistance Publique, Université Paris Descartes, Paris, France.

### Financial Support

This study was supported by national biomedical research P071224 / AOM 08180 / N°EudraCT 2009-A00256-51 / clinical trials NCT01093378.

### Conflict of interest

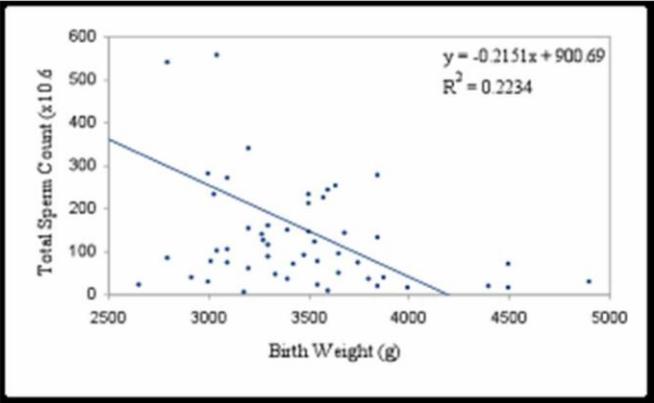
None.

Faure et al.

Birth weight and semen parameters

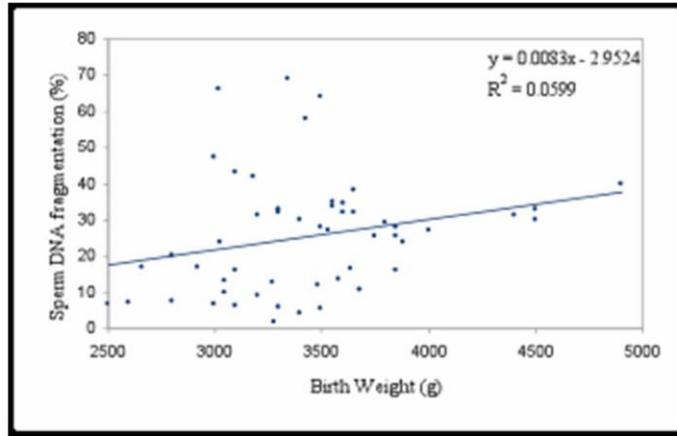
**References :**

1. Dupont C, Cordier AG, Junien C et al. Maternal environment and the reproductive function of the offspring. *Theriogenology*. 2012; 78, 1405-1414.
2. Francois I, de Zegher F, Spiessens C, D'Hooghe T, Vanderschueren D. Low birth weight and subsequent male subfertility. *Pediatr Res*. 1997; 42, 899-901.
3. Vanbillemont G, Lapauw B, Bogaert V et al. Birth weight in relation to sex steroid status and body composition in young healthy male siblings. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95, 1587-1594.
4. Olsen J, Bonde JP, Basso O et al. Birthweight and semen characteristics. *Int J Androl*. 2000; 23, 230-235.
5. Ramlau-Hansen CH, Hansen M, Jensen CR et al. Semen quality and reproductive hormones according to birthweight and body mass index in childhood and adult life: two decades of follow-up. *Fertil Steril*. 2010; 94, 610-618.



Total sperm count in subjects in relation to their birth weight  
115x71mm (72 x 72 DPI)

Peer Review



Sperm DNA fragmentation in subjects in relation to their birth weight  
119x77mm (72 x 72 DPI)

## **II. Impact d'une alimentation maternelle hypercholestérolémique sur les fonctions de reproduction masculine, étude chez le lapin**

### *Introduction*

L'étude des phénomènes de DOHAD nécessite l'utilisation de modèles animaux. Il n'existe pas de modèle animal idéal, le choix doit dépendre de la question posée. Le modèle de lapine hypercholestérolémique développé dans le laboratoire contribue à la compréhension des mécanismes impliqués dans la programmation fœtale. Les descendants mâles issus de ces expériences nous ont permis d'étudier l'impact d'une hypercholestérolémie maternelle sur les fonctions de reproduction masculine.

### *Intérêt du modèle lapin*

#### Métabolisme lipidique

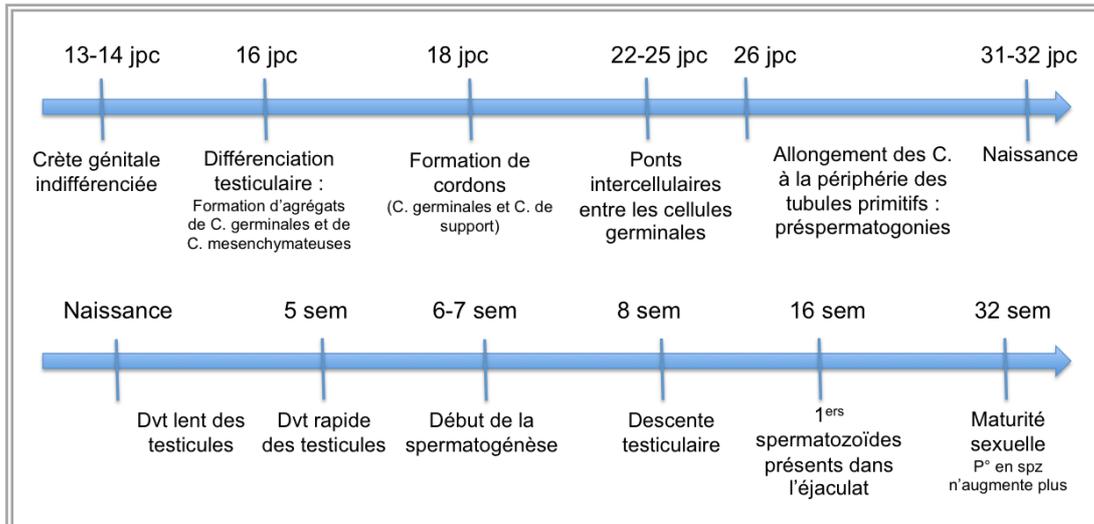
Le lapin appartient à l'ordre des lagomorphes et à la famille des Léporidés. Le lapin est un modèle qui a été employé pour l'étude des effets à long terme de l'athérosclérose et des régimes hyperlipidiques. En effet, son métabolisme lipidique est proche de celui de l'homme, notamment par la présence de LDL circulants (Palinski *et al.*, 2001). De plus, cet animal a longtemps été utilisé dans l'étude de la reproduction et du développement (Fischer *et al.*, 2012).

#### DOHAD

Le placenta est un élément clé pour le transport des nutriments et échanges materno-fœtaux. Or, celui des lapins est de type hémochorial, comme celui de l'homme, ce qui en fait un modèle de choix pour l'étude de la programmation fœtale. Le modèle de lapins soumis à une alimentation hyperlipidique, hypercholestérolémique (HH) avait déjà été développé dans notre laboratoire lorsque j'ai débuté ma thèse (Picone *et al.*, 2011). L'hypercholestérolémie maternelle induite par l'alimentation était associée à une altération de l'expression de certains gènes dans les blastocystes et à un retard de croissance intra-utérin des lapereaux, induisant un surpoids de ces derniers, à l'âge adulte (Picone *et al.*, 2011).

## Développement gonadique du lapin

Comme chez l'homme, le développement gonadique des lapins mâles débute pendant la vie intra-utérine. Les crêtes génitales indifférenciées qui vont servir de précurseurs au développement de l'appareil urogénital sont formées 13 à 14 jours post conception (jpc).



**Figure 12:** Développement gonadique du lapin mâle

(jpc : jours post conception ; C. : cellules ; dvt : développement ; P° : production)

La différenciation testiculaire débute 16 jpc avec la formation d'agrégats de cellules germinales et de cellules mésenchymateuses. Les cordons testiculaires commencent à se former 18 jpc et des ponts intercellulaires s'établissent entre les cellules germinales entre 22 et 25 jpc. Entre 26 jpc et la naissance (31-32 jpc), les cellules à la périphérie des tubules primitifs s'allongent et les pré-spermatogonies se forment. Après la naissance, les testicules se développent lentement jusqu'à la 5<sup>ème</sup> semaine puis leur développement s'accélère. La spermatogénèse démarre entre la 6<sup>ème</sup> et la 7<sup>ème</sup> semaine et les testicules descendent à la 8<sup>ème</sup> semaine. On peut trouver les premiers spermatozoïdes dans l'éjaculat dès la 16<sup>ème</sup> semaine mais la maturité sexuelle des lapins, c'est à dire la date à laquelle la production de spermatozoïdes n'augmente plus, est atteinte à la 32<sup>ème</sup> semaine (Gondos et Conner, 1973; Jost *et al.*, 1985). (**Figure 12**)

## *Matériel et méthodes*

### Lapins

Les animaux utilisés étaient des lapins néo-zélandais de souche INRA1077 élevés sur le site INRA de Jouy-en-Josas dans «l'Unité Commune d'Expérimentation Animale, (UE1298)». L'expérience a été entièrement approuvée par le comité local d'utilisation des animaux (CSU-UCEA) et par le comité local d'éthique (COMETHA, n°45). Le numéro de protocole est le 12/005.

L'euthanasie des lapins était réalisée par exsanguination après électronarcose.

### Protocole expérimental (Figure 13)

Des lapines âgées de 10 semaines recevaient une alimentation hypercholestérolémique et hyperlipidique. Ce régime enrichi de 0,2% de cholestérol et de 9% de lipides (soit un rapport  $\omega 6/\omega 3 = 6,86$ ) a pour objectif d'induire une hyperlipidémie, une hypercholestérolémie et de l'athérosclérose. Dans le même temps, un nombre équivalent de lapines du même âge ont reçu une alimentation témoin (**Tableau 8**).

A 18 semaines, ces femelles ont été accouplées avec un mâle témoin. Elles ont continué à recevoir le régime auquel elles étaient affiliées jusqu'à la fin de la lactation.

Après le sevrage (5 semaines), les descendants mâles ont été identifiés et dans chaque groupe, deux sous-groupes ont été formés : une partie des lapins a reçu le régime HH, l'autre partie a reçu le régime témoin.

### Poids et composition corporelle

Le TOBEC (Total Body Electrical conductivity) est un outil qui permet de prédire la composition corporelle. Le principe est basé sur la création d'un champ électromagnétique et sur l'enregistrement de la dissipation de ce champ dans la chambre de mesure. L'appareil est composé d'une chambre de détection formée d'un solénoïde parcouru par un courant électrique, il produit un champ magnétique oscillant de 10 MHz. Les lapins, placés dans la chambre, interagissent avec le champ magnétique. Il en résulte la dissipation d'une petite proportion du champ électromagnétique qui est mesurée. La variation est proportionnelle à la masse adipeuse du lapin. Les informations collectées permettent de calculer le poids des lipides, la composition en eau et l'énergie contenue dans le lapin.

Cette mesure a été réalisée chez les lapins mâles de 18 semaines, de façon concomitante à leur pesée. Les lapins ont ensuite été pesés à 34 semaines et au moment de l'abattage à 37 semaines.

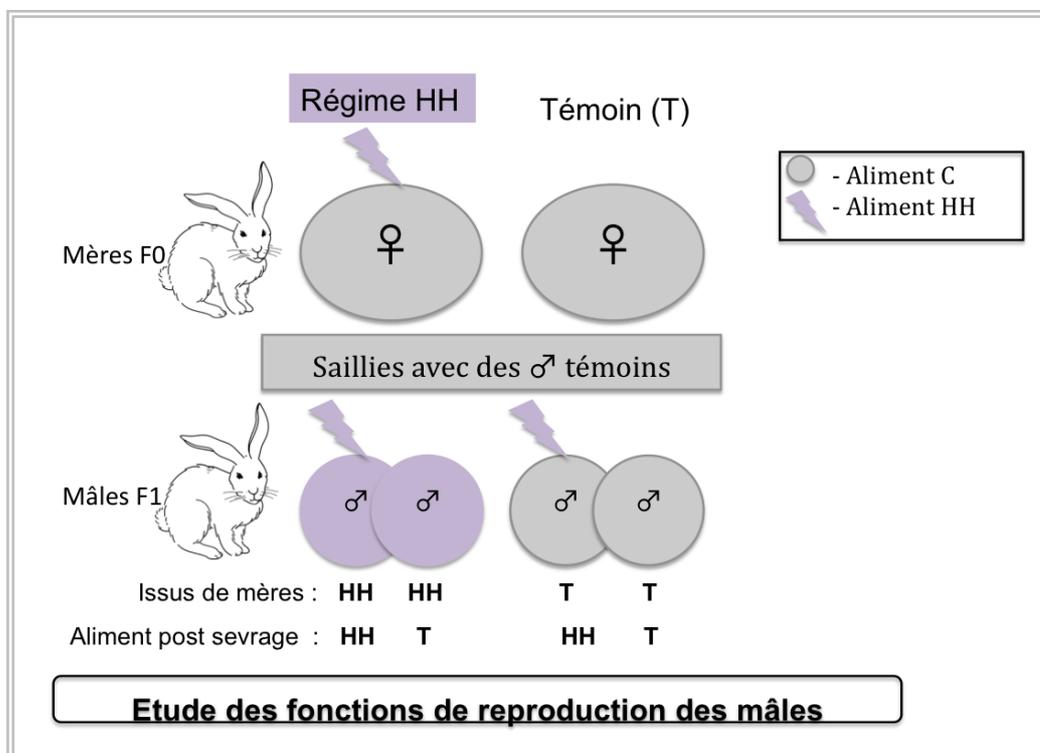


Figure 13 : Schéma du protocole expérimental

	C	HH		C	HH
<b>Ingrédients (g/1000 g)</b>			<b>Composition chimique</b>		
Blé	140.00	131.31	Energie digestible (MJ/kg)	11.53	9.94
Orge	160.00	150.07	Protéines brutes (%)	18.08	16.96
Son	110.00	103.18	Graisses (%)	2.03	8.05
Luzerne	140.00	131.31	Fibres brutes (%)	14.20	13.32
Tournesol	165.00	154.76	Amidon (%)	19.43	18.22
Farine de soja	96.00	89.11	Calcium (g/kKg)	8.02	7.52
Pulpe de betterave	124.00	116.31	Phosphate (g/kg)	6.67	6.26
Paille	35.00	32.83	Potassium (g/kg)	9.99	9.37
Phosphate dicalcique	10.00	9.38	Fibre détergent acide (%)	16.53	15.51
Sel	5.00	4.69	Fibre détergent neutre (%)	29.70	27.86
Concentrés minéraux vitaminés	15.00	14.07	Lignine (%)	3.57	3.35
Lysine	0.50	0.47	Méthionine (g/kg)	3.59	3.37
Méthionine	0.50	0.47	Méthionine + cystine (g/kg)	8.79	6.37
Huile de soja		60.03	Lysine (g/kg)	8.55	8.02
Cholesterol		2.01			

Tableau 8 : Ingrédients et composition chimique des aliments témoins et HH

### Mesure de la pression artérielle

La pression artérielle est mesurée au niveau de l'artère centrale de l'oreille des lapins. Elle a été mesurée chez les mâles de 34 semaines. Un cathéter est placé dans l'artère de l'oreille et une tubulure d'acquisition connectée au capteur de pression (BP sensor, Phymep, Paris, France) est fixée à ce cathéter. Le logiciel transforme les données captées sous forme de courbes qui permettent de déterminer les pressions maximum, minimum et moyennes (Powerlab system (ADInstruments, Oxfordshire, UK) couplé au logiciel : Chart 5, ADInstruments, Oxfordshire, UK).

### Recueil de sperme (24 semaines)

Un recueil de sperme a été réalisé chez certains lapins de 24 semaines à l'aide d'un vagin artificiel.

- La concentration spermatique a été évaluée à l'aide d'un hémocytomètre selon les recommandations de l'OMS 2010.

- La composition lipidique de la membrane spermatique a été évaluée sur ces spermatozoïdes. L'analyse a été réalisée dans l'équipe INSERM, U1107, NEURO-DOL, Clermont-Ferrand. Le cholestérol et les phospholipides membranaires ont été extraits en suivant la méthode de Folch (Folch *et al.*, 1957) adaptée pour les spermatozoïdes (Grizard *et al.*, 2000). L'extraction des lipides a été réalisée sur plaque de chromatographie sur couche mince haute performance (CCMHP). Les lipides ont ensuite été séparés selon leur polarité avec un système séquentiel. La quantification a été faite par densitométrie après coloration en comparant les échantillons avec des échantillons standard (Sigma Scan Pro, Sigma-Aldrich). Le rapport cholestérol/phosphatidyléthanolamine (Chol/PE) a été calculé.

### Autopsie (37 semaines)

Les lapins ont été euthanasiés à l'âge de 37 semaines. Un prélèvement sanguin a été réalisé pour les dosages métaboliques et hormonaux. Au moment de l'autopsie, le foie, les reins, la graisse péri rénale et le cœur ont été pesés.

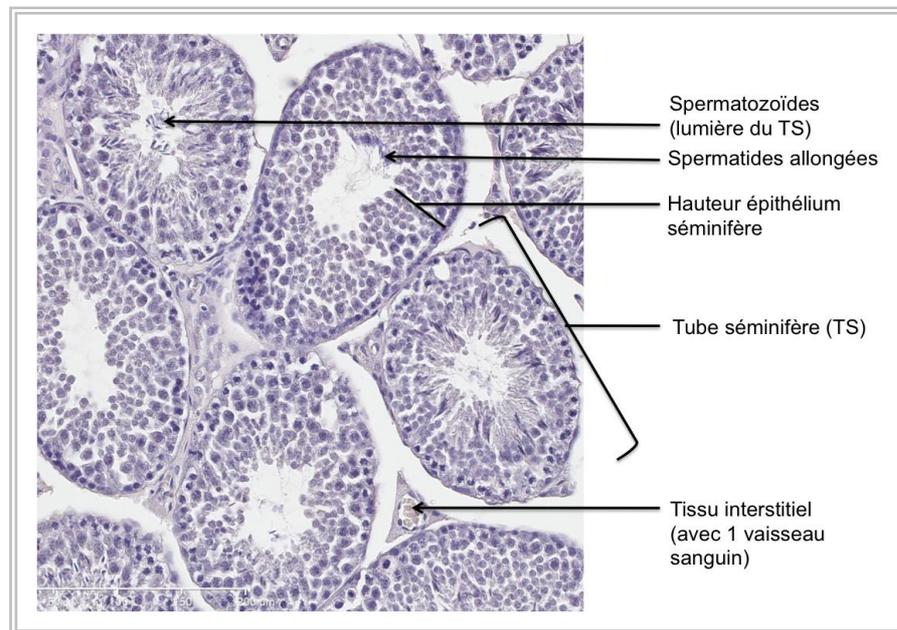
Les testicules et épидидymes les ont également été collectés et pesés (**Photo 1**).

- Un testicule a été fixé dans du formol 10% pendant 48 heures et conservé pour analyse histologique.

- Les spermatozoïdes ont été prélevés par scarification de la queue de l'épididyme. Des incisions ont été faites au niveau du tissu qui a été incubé 1 heure dans du PBS à température ambiante pour permettre aux spermatozoïdes d'en sortir. La fragmentation de l'ADN spermatique a été mesurée sur ces échantillons.



**Photo 1** : Testicule et épидидyme de lapin (37 semaines)



**Photo 2** : Histologie testiculaire d'un lapin. Coloration hématoxyline-éosine.

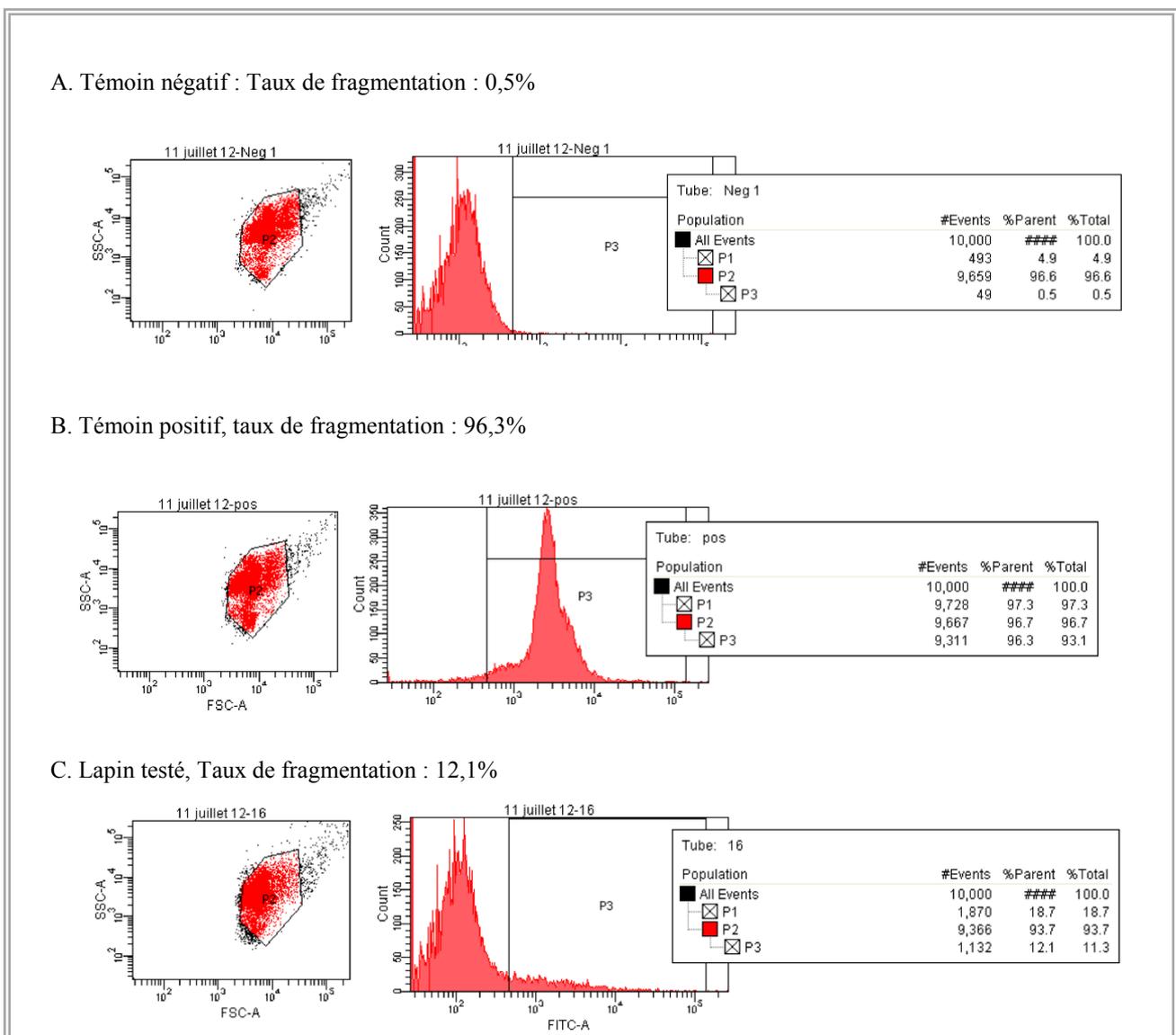
### Histologie

Les testicules fixés dans le formol ont été déshydratés par passage dans des bains successifs d'alcool de degré croissant, puis inclus en paraffine (Citadel1000®). Des sections de 6µm réalisées à l'aide d'un microtome (LEICA® RM2245) ont été déposées sur des lames et

colorées par hématoxyline-éosine. Les lames ont été scannées et converties en diapositives numériques haute résolution à l'aide du Nanozoomer (NanoZoomer Digital Pathology®, Hamamatsu, Japan).

La hauteur des tubes séminifères a été mesurée de la membrane basale jusqu'à la lumière en utilisant le programme IMAGEJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Les tubes séminifères bien sectionnés dans l'axe transversal étaient sélectionnés pour l'analyse. Dix mesures sur 3 coupes différentes étaient réalisées (**Photo 2**).

### Etude de la fragmentation de l'ADN spermatique



**Figure 14** : Exemples de graphes obtenus en cytométrie en flux après marquage des spermatozoïdes de lapins par la technique TUNEL. A : témoin négatif, B : Témoin positif, C : lapin testé.

Une analyse de la fragmentation de l'ADN spermatique a été réalisée par la technique TUNEL en utilisant le même protocole que celui décrit précédemment (Dupont *et al.*, 2013). La lecture a été réalisée en cytométrie en flux (FACScan flow cytometer (BD Bioscience) (**Figure 14**).

#### Bilan métabolique

La glycémie a été mesurée à l'aide d'un lecteur portable (Optium Xceed Medisesne, Abbott).

#### Bilan hormonal

La testostérone libre a été dosée selon la technique de radioimmunoassay (DIASource ImmunoAssays). Tous les échantillons ont été dosés simultanément pour éviter la variabilité inter essais.

#### *Analyses statistiques*

##### L'analyse des données a été réalisée en 2 temps :

- Dans un premier temps, l'effet de l'alimentation maternelle sur les fonctions de reproduction n'a été étudié que chez les mâles ayant reçu l'alimentation contrôle après le sevrage (Analyse 1). Ces résultats font l'objet d'un article soumis (article 6).
- Dans un deuxième temps nous avons analysé l'impact d'une alimentation HH post sevrage sur les fonctions de reproduction de lapins exposés *in utero* et au moment de l'allaitement à ce régime (Analyse 2). L'effectif des lapins ayant reçu l'alimentation HH étant faible et des données étant manquantes, nous ne présentons ici que des résultats préliminaires.

Des tests non paramétriques ont été utilisés.

Dans l'analyse 1, le test de Mann-Withney a été utilisé pour comparer les deux groupes.

Dans l'analyse 2, le test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour tester les différences entre les groupes. Le logiciel R a été utilisé. Une valeur de  $p < 0,05$  était considérée comme statistiquement significative.

## *Résultats*

### a. Analyse 1 : Comparaison des groupes T/T et HH/T

Sept lapins issus de 4 mères témoins (T/T) et 8 lapins issus de 4 mères HH (HH/T) ont pu être inclus dans cette analyse.

#### Poids, composition corporelle, bilan métabolique et cardiovasculaire

Le poids à 18 et 37 semaines, la composition lipidique (évaluée par TOBEC) et la masse de graisse péri rénale n'étaient significativement pas différents entre les 2 groupes. Les glycémies étaient identiques dans les deux groupes. La pression artérielle systolique et diastolique tendait à être augmentée ( $p=0,067$ ) et la pression artérielle moyenne était significativement augmentée ( $p=0,03$ ) chez les lapins nés de mère HH. La fréquence cardiaque n'était pas altérée par l'alimentation maternelle.

#### Poids des organes

Les lapins issus de mères HH présentaient des reins plus lourds que les lapins nés de mères témoins ( $p=0,02$ ). La différence restait significative lorsque le poids des reins étaient rapportés au poids total du lapin ( $p=0,037$ ). Concernant le poids du foie ou du cœur, aucune différence significative n'a été retrouvée entre les 2 groupes.

#### Fonctions de reproduction

Les lapins nés de mère soumises à l'alimentation HH présentaient des testicules de poids significativement inférieur à celui des lapins nés de mère soumise à l'alimentation contrôle ( $p=0,03$ ). Une diminution significative du poids des épидидymes a également été observée chez ces lapins ( $p=0,015$ ). Lorsque les poids des testicules et des épидидymes étaient rapportés au poids total du lapin, les différences restaient significatives ( $p=0,05$  et  $p=0,009$  respectivement).

Les concentrations sériques de testostérone, des lapins exposés *in utero* et pendant l'allaitement à l'hypercholestérolémie maternelle, étaient significativement inférieures à celles des lapins non exposés ( $p=0,05$ ).

Concernant la hauteur des tubes séminifères, la concentration spermatique, la fragmentation de l'ADN spermatique et la composition lipidique membranaire des spermatozoïdes (Chol/PE) aucune différence significative n'a été retrouvée entre les deux groupes. Le détail des résultats est présenté dans l'article 6.

#### b. Analyse 2 : Impact de l'alimentation post sevrage, comparaison de 4 groupes

L'étude de l'impact d'une alimentation HH chez des lapins mâles issus de mères soumises à cette alimentation n'a été faite que pour un faible nombre d'animaux (T/HH : n=5 ; HH/HH : n=3).

A l'âge de 34 semaines, le poids des lapins ne différait pas entre les 4 groupes. Néanmoins, les lapins HH/HH présentaient une glycémie significativement augmentée par rapport aux lapins T/T ( $p=0,05$ ) et HH/T ( $p=0,002$ ).

Chez ces lapins, la mesure du poids des testicules et des épидидymes n'a pas été réalisée. Aucune différence significative concernant la hauteur des tubes séminifères, la concentration spermatique et la composition lipidique membranaire des spermatozoïdes (Chol/PE) n'a été retrouvée entre les quatre groupes (**Tableau 9**).

#### *Conclusion*

Le lapin est un modèle pertinent pour l'étude de la programmation fœtale. Les lapins mâles, issus de mères présentant une hypercholestérolémie induite par l'alimentation, ont des testicules et de épидидymes plus légers que les mâles issues de mère témoins. Les cellules de Sertoli jouent un rôle important dans le développement testiculaire, leur développement pourrait être altéré *in utero* par l'alimentation HH, qui a été montré comme induisant, en plus de l'hypercholestérolémie, une hyperinsulinémie et une diminution des concentrations sériques de LH (Cordier *et al.*, 2013). La période de la lactation peut également avoir un impact sur le développement testiculaire qui se poursuit encore après la naissance. En effet, les mères continuent de recevoir le même régime ce qui peut entraîner une modification de la composition du lait comme cela a été observée chez les lapines obèses (Hue-Beauvais *et al.*, 2011). Les concentrations sériques de testostérone étaient diminuées chez les lapins exposés à l'alimentation HH maternelle. Ces résultats sont possiblement le signe d'une modification du développement de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique et/ou une augmentation de

l'activité aromatasase dans le tissu adipeux associée à une diminution de la synthèse d'androgène, comme observé chez l'homme obèse.

Nous n'avons pas observé de retentissement sur la production spermatique ou la qualité spermatique, mais les recueils de sperme n'ont été réalisés qu'une seule fois à l'âge de 24 semaines. Il pourrait être intéressant répéter ces analyses chez des lapins de plus de 32 semaines (maturité sexuelle).

Nous avons aussi observé une augmentation du poids des reins chez les lapins nés de mères soumises au régime HH. Cette altération du développement rénal pourrait être liée à l'augmentation de la pression artérielle moyenne observée chez ces lapins.

Nous avons regardé si l'administration d'une alimentation hyperlipidique après le sevrage, chez des lapins exposés *in utero* et pendant l'allaitement à une hypercholestérolémie, aggravait le phénotype. En effet, 5 semaines après la naissance, la croissance testiculaire des lapins s'accélère et pourrait être perturbée par l'environnement nutritionnel. Les effectifs étant relativement faibles, il est cependant difficile de conclure. Nous avons cependant observé que ces lapins présentaient une glycémie augmentée par rapport aux lapins témoins. Ces résultats signent peut être le début d'une insulino-résistance, connue comme source d'altérations des fonctions de reproduction. D'autres études sont nécessaires pour répondre clairement à cette question.

Alimentation maternelle/ Alimentation post sevrage	T/T	HH/T	T/HH	HH/HH	p
<b>Poids</b> (35 semaines) (g)	3812 (3555-4108)	3710 (3468-3963)	3626 (3500-3770)	3678 (3596-3823)	NS
<b>Paramètres spermatiques</b>					
Concentration spermatique (10 <sup>6</sup> /ml)	474 (379-726)	573 (548-878)	375 (295-668)	386 (288,5-638,5)	NS
Composition membranaire (Chol/PE)	1,91 (1,69-2,08)	2,31 (1,80-2,40)	2,19 (2,02-2,34)	2,51 (2,23-3,64)	NS
<b>Analyse histologique</b>					
Hauteur des tubes séminifères (µm)	54,7 (49,4-57,8)	56,1 (51,2-57,1)	55,4 (50,7-59,4)	53,2 (53,1-53,3)	NS
<b>Dosage sérique</b>					
Glycémie (g/l)	1,13 (1,07-1,14) <sup>a</sup>	1,06 (0,97-1,15) <sup>b</sup>	1,26 (1,13-1,30)	1,35 (1,34-1,40) <sup>ab</sup>	p<0,05*

**Tableau 9.** Phénotype des descendants mâles en fonction de l'alimentation maternelle et de l'alimentation post sevrage. Les résultats sont présentés sous forme de médiane (25ème–75ème percentile).  $P < 0.05$  est considéré comme statistiquement significatif.



**Impact of maternal hyperlipidic hypercholesterolemic diet on male reproductive organs and testosterone concentration in rabbits.**

Journal:	<i>Journal of Developmental Origins of Health and Disease</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Brief Report
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	DUPONT, Charlotte; Hôpital Jean Verdier, Biologie de la Reproduction Ralliard-Rousseau, Delphine; INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78352, Tarrade, Anne; INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78352, Faure, Céline; Hôpital Jean Verdier (AP-HP), Dahirel, Michèle; INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78352, Sion, Benoit; Clermont Université, Université d'Auvergne, Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur, BP 10448, Brugnon, Florence; CHU Clermont Ferrand, CHU Estaing, Assistance Médicale à la Procréation, CECOS, Place Aubrac, LEVY, Rachel; Hôpital Jean Verdier, Biologie de la Reproduction CHAVATTE-PALMER, Pascale; INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78352,
Model or Method:	Small animals < Animal
Topic:	Reproduction < Outcome/System, Endocrine disorder < Outcome/System
Abstract:	<p>The concept of Developmental Origins of Health and Disease (DOHAD) initially stemmed from the developmental programming of metabolic diseases. Reproductive functions and fertility in adulthood may also be programmed during fetal development.</p> <p>We studied the impact of dietary induced maternal hyperlipidemia and hypercholesterolemia (HH), administered at 10 weeks of age and throughout the gestation and lactation, on male reproductive functions of rabbit offspring.</p> <p>Male rabbits born to HH dams and fed a control diet had significantly lighter testes and epididymes compared to rabbits born to control dams at adulthood. No significant changes in sperm concentration, sperm DNA integrity and sperm membrane composition were observed.</p> <p>This study confirms the importance of maternal metabolic status for male reproductive organs development.</p>

1 **Impact of maternal hyperlipidic hypercholesterolemic diet on male reproductive organs**  
2 **and testosterone concentration in rabbits.**

3

4 C. Dupont<sup>1,2,3,4</sup>, D. Ralliard-Rousseau<sup>1,2</sup>, A. Tarrade<sup>1,2,5</sup>, C. Faure<sup>3,4</sup>, M. Dahirel<sup>1,2,5</sup>, B. Sion<sup>6,7</sup>,  
5 F. Brugnon<sup>7,8</sup>, R. Levy<sup>3,4</sup>, P. Chavatte-Palmer<sup>1,2,5</sup>

6 Brief report → JDOHAD

7

8 <sup>1</sup>INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78350 Jouy-en-Josas,  
9 France;

10 <sup>2</sup>ENVA, F-94700 Maisons Alfort, France;

11 <sup>3</sup>APHP, Hosp Jean-Verdier, F-93140, Bondy, France;

12 <sup>4</sup>Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Unité de Recherche en Epidémiologie  
13 Nutritionnelle (UREN), F-93000, Bobigny, France;

14 <sup>5</sup>PremUp, 4 av. de l'Observatoire, 75006 Paris, France;

15 <sup>6</sup>Clermont Université, Université d'Auvergne, Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la  
16 Douleur, BP 10448, Clermont-Ferrand F-63001 France ;

17 <sup>7</sup>INSERM, U1107, NEURO-DOL, Clermont-Ferrand F-63001 France

18 <sup>8</sup>CHU Clermont Ferrand, CHU Estaing, Assistance Médicale à la Procréation, CECOS, Place  
19 Aubrac, 63000 Clermont Ferrand, France

20 <sup>9</sup>Université d'Auvergne, Génétique Reproduction et Développement, UMR CNRS 6293-  
21 INSERMU1103, Place Henri Dunant, 63000 Clermont Ferrand France

22

23 Corresponding author: [pascale.chavatte@jouy.inra.fr](mailto:pascale.chavatte@jouy.inra.fr)

24

25

26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46

**Abstract**

The concept of Developmental Origins of Health and Disease (DOHAD) initially stemmed from the developmental programming of metabolic diseases. Reproductive functions and fertility in adulthood may also be programmed during fetal development.

We studied the impact of dietary induced maternal hyperlipidemia and hypercholesterolemia (HH), administered at 10 weeks of age and throughout the gestation and lactation, on male reproductive functions of rabbit offspring.

Male rabbits born to HH dams and fed a control diet had significantly lighter testes and epididymes compared to rabbits born to control dams at adulthood. No significant changes in sperm concentration, sperm DNA integrity and sperm membrane composition were observed.

This study confirms the importance of maternal metabolic status for male reproductive organs development.

**Key words** DOHAD, fetal programming, male reproductive function, rabbit, maternal hyperlipidemia and hypercholesterolemia, maternal diet

47

48 **Introduction**

49

50 The concept of Developmental Origins of Health and Disease (DOHAD) has expanded for  
51 two decades<sup>1</sup>. Many epidemiological studies and experiments in animal models have  
52 highlighted an increased risk of long-term metabolic and cardiovascular diseases in case of  
53 nutritional imbalance during pregnancy or gestation<sup>1</sup>. Reproductive functions and fertility in  
54 adulthood may also be programmed during fetal development<sup>2</sup>.

55 In humans, birth weight is commonly used as a proxy indicator for infant health depending  
56 upon the maternal nutritional environment during pregnancy. A few studies have highlighted  
57 a relationship between male birth weight and infertility<sup>3</sup> or hormonal status<sup>4</sup>. In sheep,  
58 maternal undernutrition during gestation has been linked to altered gonadal development<sup>5</sup>  
59 leading to a decrease in Sertoli cell number and a reduction of the diameter of the  
60 seminiferous tubules<sup>6</sup> in adulthood, but effects vary according to the timing of the nutritional  
61 stress<sup>7</sup>. Maternal overnutrition in sheep has also been associated with alterations in  
62 reproductive functions of male offspring such as a delay in the onset of puberty associated  
63 with lower plasma testosterone concentrations and reduced testicular volume<sup>8</sup>.

64 The rabbit is a relevant model to assess effect of developmental programming on reproductive  
65 functions<sup>9</sup>. In our laboratory, a model of rabbits with dietary-induced hyperlipidemia,  
66 hypercholesterolemia and atherosclerosis has been developed<sup>10, 11</sup>. It has been observed that  
67 feeding mothers with a hypercholesterolemic hyperlipidic (HH) diet leads to intrauterine  
68 growth retardation (IUGR)<sup>11</sup>. As in humans, the rabbit male gonadal development begins *in*  
69 *utero*. In rabbits, the gonads begin to differentiate on the 16th day after fertilization (term =  
70 31 days). Primitive seminiferous tubules are formed and contain Sertoli cells and germline  
71 before birth<sup>12, 13</sup>. The objective of the present study was to assess the impact of maternal

72 hyperlipidemia and hypercholesterolemia on male offspring reproductive functions at  
73 adulthood.

74

## 75 **Material and methods**

76

### 77 *Ethical statement*

78 The experiment was performed in accordance with the International Guiding Principles for  
79 Biomedical Research involving Animals as promulgated by the Society for the Study of  
80 Reproduction and in accordance with the European Convention on Animal experimentation.  
81 The whole experiment was approved by the local scientific committee for animal use (CSU  
82 UCEA) and received ethical approval from the local ethics committee (COMETHA, N°45 in  
83 the National Registry), under protocol number 12/005.

84

### 85 *Animals*

86 New Zealand rabbits (strain INRA 1077) were used. Females (N=8) were fed *ad libitum* with  
87 either a control or an experimental hypercholesterolemic (0.2%) hyperlipidic (7.7%) (HH)  
88 diet<sup>10, 11</sup> from 10 weeks of age, throughout pregnancy and until offspring's weaning, as  
89 described previously<sup>10, 11</sup>. Briefly, females were mated with control males at 18 weeks of age.  
90 Pups were weaned at 5 weeks of age and were fed a control diet thereafter. Eight male pups  
91 born from 4 different does fed the HH diet and 7 male pups born from 4 control does were  
92 used. Pups were not identified at birth so birthweight was not recorded.

93

### 94 *Weight and body composition*

95 Body composition was assessed at 18 weeks of age using a total body electrical conductivity  
96 technique (TOBEC). This method is valuable to predict energy and lipid body content<sup>14</sup> and

97 provides information about total body lipid reserves. All rabbits were weighed before  
98 euthanasia at 37 weeks of age.

99

#### 100 *Arterial blood pressure and heart rate*

101 Systolic, diastolic and mean blood pressures were measured from the ear artery at 37 weeks of  
102 age, a few days before euthanasia as described previously<sup>11</sup>. An ear artery catheter connected  
103 to a pressure transducer (BP sensor, Phymep, Paris, France) was inserted. Data were  
104 monitored using a Powerlab system (ADInstruments, Oxfordshire, UK) coupled to computer  
105 software (Chart 5, ADInstruments, Oxfordshire, UK).

106

#### 107 *Sperm and tissue collection*

108 At 24 weeks of age, semen samples were collected using an artificial vagina. Sperm  
109 concentration and sperm membrane composition were assessed.

110 At 37 weeks of age, all rabbits were fasted overnight and euthanized. Immediately after  
111 euthanasia, kidneys, liver, heart and perirenal adipose tissues were weighed. Testes and  
112 epididymes were collected and weighed. Testes were fixed in 10% buffered formalin for 48  
113 hours and stored in PBS until analysis. The caudal part of the epididymes was removed with  
114 sharp scissors and placed in 1ml of PBS to recover spermatozoa in the solution as described  
115 previously<sup>15</sup>. Collected spermatozoa were used for sperm DNA fragmentation analysis.

116

#### 117 *Sperm analysis*

118 Sperm concentration in ejaculates was determined with a haemocytometer counting chamber.  
119 Sperm membrane composition was evaluated. Sperm cholesterol and phospholipids were  
120 extracted by the method of Folch *et al.* adapted for spermatozoa as previously  
121 described<sup>16</sup>. Lipid extracts were applied on the HPTLC plate and separated by using

122 sequential development system: development to half final distance to resolve polar lipids  
123 followed by full development to resolve the non polar lipids. The quantification was  
124 performed after staining. Lipids were quantified against standards by densitometry (Sigma  
125 Scan Pro, Sigma-Aldrich).

126 Sperm DNA fragmentation was assessed in spermatozoa collected from the epididymes with  
127 the TUNEL (Terminal Uridine Nick End Labeling) technique using an *In Situ* Cell Death  
128 Detection Kit (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche Applied Science)<sup>17</sup>.  
129 Labelled spermatozoa were measured on a FACScan flow cytometer (BD Biosciences;  
130 Becton-Dickinson). Each analysis included 10,000 spermatozoa.

131

#### 132 *Blood analysis*

133 At euthanasia, a drop of blood was used to measure glycaemia using a glucose strip test  
134 (Optium Xceed Medisense, Abbott). Free testosterone concentrations were assayed in one  
135 single assay, to avoid inter-assay variability, using radioimmunoassay (DIAsource  
136 ImmunoAssays).

137

#### 138 *Histological analysis*

139 Testis histological analysis was performed for in 4 HH males and 5 control males (one testis  
140 per animal).

141 Testes fixed in formalin were dehydrated and embedded in paraffin. Six micrometers sections  
142 were stained with haematoxylin and eosin and morphological observations were carried out  
143 using Nanozoomer Digital Pathology software (Hamamatsu, Japan).

144 The seminiferous epithelium height was measured from the basal membrane to the luminal  
145 edge. Thirty measures in 3 different cross sections were carried for each testis using the public  
146 domain image-processing program IMAGEJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

147

148 **Statistical analyses**

149

150 Non parametric statistical analyses were used. The Mann and Whitney test was performed

151 using R software (The R Foundation for Statistical Computing, (<http://www.R-project.org>)).152 Data are expressed as the median, the first quartile and third quartile (Table 1).  $P \leq 0.05$  was

153 considered statistically significant.

154

155 **Results** (Table 1).

156

157 *Weight, body composition, metabolic status and cardiovascular evaluation*

158 Weight and body lipid composition (measured by TOBEC) were not significantly different

159 between the 2 groups at 18 weeks of age ( $p=1$  and  $p=0.35$  respectively) (Table 1).

160 At 37 weeks, body weight and perirenal adipose tissue weight were not significantly different

161 between the two groups (Table 1). Glycaemia was similar in both groups. Systolic and

162 diastolic blood pressure tended to be increased in rabbits born to HH dams ( $p = 0.067$ ) and163 mean arterial pressure was significantly increased ( $p = 0.03$ ). The heart rate was not affected

164 by the maternal diet (Table 1).

165

166 *Organ weights*167 Kidney weight was significantly heavier in HH compared to control males ( $p = 0.02$ ) (Table168 1). Considering the relative weight, the difference remained significant, ( $p = 0.037$ ). Absolute

169 and relative weights of liver and heart did not differ statistically between the 2 groups.

170

171 *Reproductive functions*

172 Rabbits born from HH dams had significantly lighter testes (6,78 (6,51-7,41) g vs 5,78 (5,54-  
173 6,35)g , p = 0,03) (Figure 1) and epididymes (1,84 (1,76-2,04) g vs 1,30 (1,24-1,68) g, p =  
174 0,015) compared to rabbits born from C dams. Considering the relative weight, the difference  
175 remained significant (p = 0,05 et p = 0,009 respectively). The seminiferous epithelium height  
176 was comparable between the 2 groups (Table 1). No significant differences in sperm  
177 concentration, sperm DNA integrity and sperm membrane composition were observed (Table  
178 1). Interestingly, plasma free testosterone concentrations were decreased in males born from  
179 HH dams (42,2 (30,9-42,9) g vs 4,10 (2,55-9,25) g, p=0.05) (Table 1) at 37 weeks of age.

180

## 181 Discussion

182

183 The present study indicates that maternal HH diet is associated with reduced testicular and  
184 epididymal weight in male offspring. Serum free testosterone concentrations were decreased  
185 in HH males, possibly as a sign of modifications of the hypothalamo-pituitary gonadal axis.  
186 No alteration of the seminiferous epithelium structure was observed.

187

188 Male gonadal development starts *in utero*, so nutritional stress during this period may  
189 challenge testicular and epididymal development. Since testes develop slowly from birth to 5  
190 weeks of age, the maternal diet before weaning (weaning at 5 weeks) i.e lactation period may  
191 also have impacted the pups' gonadal development, maybe through a change in the milk  
192 contents, as it was previously shown that obese rabbits had a disturbed mammary gland  
193 development during pregnancy<sup>18</sup>.

194 Sertoli cells play a central role in testis development and their number is correlated to  
195 testicular volume and sperm production. Sertoli cell proliferation requires testosterone<sup>19</sup> that  
196 may be challenged by maternal hyperlipidemia. The alteration of the maternal reproductive

197 hormonal status previously observed may affect the fetal testis development through  
198 alterations of the hypothalamic-pituitary axis. Indeed, a decrease in LH levels and  
199 hyperinsulinemia are observed in 18 week old does fed with the HH diet since puberty<sup>10, 11</sup>,  
200 but no observations are available on their offspring. Moreover, increased aromatase activity in  
201 the adipose tissue and reduced production of testosterone by the Leydig cells may contribute  
202 to the decrease in plasma testosterone, as described in obese men<sup>20</sup>.

203 Besides endocrine disruption, other mechanisms such as oxidative stress and epigenetic  
204 changes may be involved in fetal programming and also impair reproductive functions in  
205 offspring. Nutritional changes are known to affect oxidative balance<sup>21</sup>. ROS (reactive oxygen  
206 species) control many metabolic pathways by adapting intracellular signalling and ROS  
207 excess leads to DNA damages that can be transmitted to offspring. It was observed that  
208 obesity or high fat diet lead to sperm DNA damages in human<sup>17</sup> and in rodents<sup>22</sup>. However,  
209 no effect was observed on sperm quality or on sperm DNA fragmentation; this maybe due to  
210 the continuous process of spermatogenesis in the male and to the fact that offspring were not  
211 submitted themselves to the HH diet. Indeed, sperm DNA fragmentation occurs during  
212 spermatogenesis or during the transport of spermatozoa through the reproductive tract<sup>23</sup> This  
213 does not preclude, however, the possibility of epigenetic effects that may affect fertility.

214 Finally, consequences of maternal nutrition may not to be limited to offspring phenotypes but  
215 may also impact subsequent generations' health. A sex-specific paternal transmission of  
216 metabolic disorders and impaired reproductive functions has recently been demonstrated in  
217 obese mice over several generations<sup>24</sup>. Alteration of epigenetic marks in the sperm may  
218 contribute to the future embryo development and therefore play a critical role in the long-term  
219 health<sup>25</sup>.

220

221 **Conclusion**

222 Environmental exposures during fetal and neonatal development are known to affect long-  
223 term health. In this study, we confirm the importance of maternal nutrition for reproductive  
224 organs development and the possible impact on fertility in adulthood. Although gonadal  
225 weight was affected, in the present study of a limited number of animals, no effects were  
226 observed on sperm quality parameters. Further studies are needed to explore effects on  
227 fertility, the potential apposition of epigenetic marks and any transgenerational effect.

228

229 **Table 1.** Physiological and morphological observations in male offspring according maternal  
230 nutrition (C: offspring from control dams and HH: offspring from dams fed the HH diet).  
231 Median (25th–75th percentile).  $P < 0.05$  is considered statistically significant.

232

233 **Figure 1.** Effect of maternal HH diet on offspring testicular weight (g) at 37 weeks of age

234

235

### 236 Acknowledgement

237

238 The authors thank Y. Lalatonne for testosterone assays, M.C Aubrière and M. Guinot for  
239 technical assistance, B. Dondi for help with flow cytometry and the staff of INRA UCEA unit  
240 for the animal care.

241

### 242 Statement of interest

243

244 None

245

### 246 References

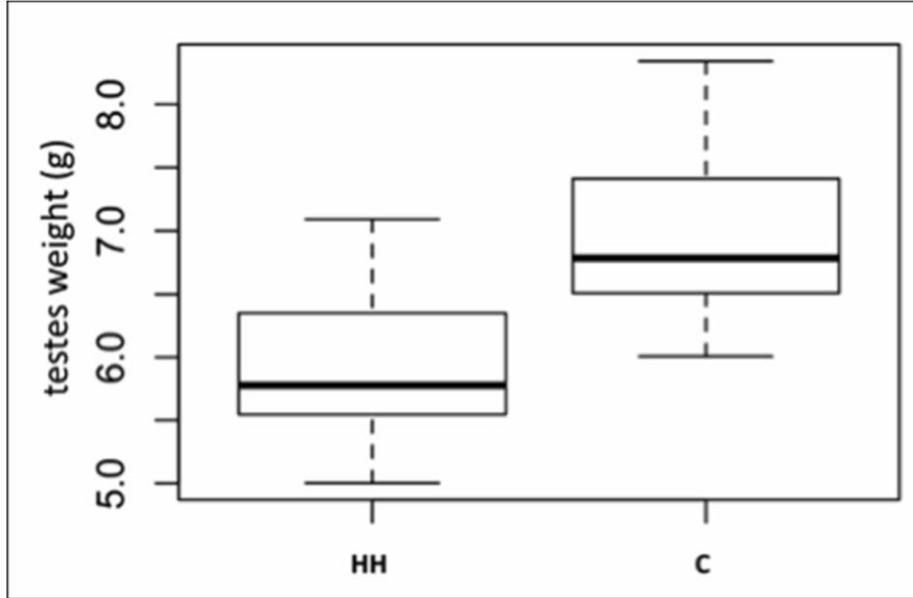
247

- 248 1. Hanson MA, Gluckman PD. Developmental origins of health and disease: new  
249 insights. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008; 102, 90-93.
- 250 2. Dupont C, Cordier AG, Junien C et al. Maternal environment and the reproductive  
251 function of the offspring. *Theriogenology.* 2012; 78, 1405-1414.
- 252

- 253  
254 3. Francois I, de Zegher F, Spiessens C, D'Hooghe T, Vanderschueren D. Low birth  
255 weight and subsequent male subfertility. *Pediatr Res.* 1997; 42, 899-901.  
256
- 257 4. Vanbillemont G, Lapauw B, Bogaert V et al. Birth weight in relation to sex steroid  
258 status and body composition in young healthy male siblings. *J Clin Endocrinol*  
259 *Metab.* 2010; 95, 1587-1594.  
260
- 261 5. Alejandro B, Perez R, Pedrana G et al. Low maternal nutrition during pregnancy  
262 reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. *Reprod Fertil Dev.* 2002;  
263 14, 333-337.  
264
- 265 6. Kotsampasi B, Balaskas C, Papadomichelakis G, Chadio SE. Reduced Sertoli cell  
266 number and altered pituitary responsiveness in male lambs undernourished in  
267 utero. *Anim Reprod Sci.* 2009; 114, 135-147.  
268
- 269 7. Rae MT, Kyle CE, Miller DW et al. The effects of undernutrition, in utero, on  
270 reproductive function in adult male and female sheep. *Anim Reprod Sci.* 2002; 72,  
271 63-71.  
272
- 273 8. Da Silva P, Aitken RP, Rhind SM, Racey PA, Wallace JM. Influence of placentally  
274 mediated fetal growth restriction on the onset of puberty in male and female  
275 lambs. *Reproduction.* 2001; 122, 375-383.  
276
- 277 9. Fischer B, Chavatte-Palmer P, Viebahn C, Navarrete Santos A, Duranthon V.  
278 Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction.* 2012; 144, 1-10.  
279
- 280 10. Cordier AG, Leveille P, Dupont C et al. Dietary lipid and cholesterol induce  
281 ovarian dysfunction and abnormal LH response to stimulation in rabbits. *PLoS*  
282 *One.* 2013; 8, e63101.  
283
- 284 11. Picone O, Laigre P, Fortun-Lamothe L et al. Hyperlipidic hypercholesterolemic  
285 diet in prepubertal rabbits affects gene expression in the embryo, restricts fetal  
286 growth and increases offspring susceptibility to obesity. *Theriogenology.* 2011;  
287 75, 287-299.  
288
- 289 12. Gondos B, Conner LA. Ultrastructure of developing germ cells in the fetal rabbit  
290 testis. *Am J Anat.* 1973; 136, 23-42.  
291
- 292 13. Jost A, Perlman S, Magre S. The initial stages of testicular differentiation in the  
293 rabbit fetus. *Arch Anat Microsc Morphol Exp.* 1985; 74, 69-75.  
294
- 295 14. Fortun-Lamothe L, Lamboley-Gaüzère B, Bannelier C. Prediction of body  
296 composition in rabbit females using total body electrical conductivity (TOBEC).  
297 *Livestock Production Science.* 2002; 78, 133-142.  
298
- 299 15. Kumar N, Sood S, Arora B, Singh M, Beena. Effect of duration of fluoride exposure  
300 on the reproductive system in male rabbits. *J Hum Reprod Sci.* 2010; 3, 148-152.  
301

- 302 16. Grizard G, Sion B, Bauchart D, Boucher D. Separation and quantification of  
303 cholesterol and major phospholipid classes in human semen by high-  
304 performance liquid chromatography and light-scattering detection. *J Chromatogr*  
305 *B Biomed Sci Appl.* 2000; 740, 101-107.  
306
- 307 17. Dupont C, Faure C, Sermondade N et al. Obesity leads to higher risk of sperm  
308 DNA damage in infertile patients. *Asian J Androl.* 2013; 15, 622-625.  
309
- 310 18. Hue-Beauvais C, Chavatte-Palmer P, Aujean E et al. An obesogenic diet started  
311 before puberty leads to abnormal mammary gland development during  
312 pregnancy in the rabbit. *Dev Dyn.* 2011; 240, 347-356.  
313
- 314 19. Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. Proliferation and functional  
315 maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in  
316 adulthood. *Reproduction.* 2003; 125, 769-784.  
317
- 318 20. Chavarro JE, Toth TL, Wright DL, Meeker JD, Hauser R. Body mass index in  
319 relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive  
320 hormone levels among men attending an infertility clinic. *Fertil Steril.* 2010; 93,  
321 2222-2231.  
322
- 323 21. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M et al. Increased oxidative stress in obesity  
324 and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004; 114, 1752-1761.  
325
- 326 22. Bakos HW, Mitchell M, Setchell BP, Lane M. The effect of paternal diet-induced  
327 obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *Int J Androl.* 2011;  
328 34, 402-410.  
329
- 330 23. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact  
331 on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril.* 2010; 93, 1027-1036.  
332
- 333 24. Fullston T, Ohlsson Teague EM, Palmer NO et al. Paternal obesity initiates  
334 metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to  
335 the F2 generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm  
336 microRNA content. *FASEB J.* 2013.  
337
- 338 25. Jenkins TG, Carrell DT. The paternal epigenome and embryogenesis: poisoning  
339 mechanisms for development. *Asian J Androl.* 2011; 13, 76-80.  
340  
341  
342

Maternal diet	C	HH	<i>p</i>
<b>Body composition</b>			
Body weight 37W (g)	4080 (3939-4144)	4175 (3747-4468)	0.9
Body weight 18 W (g)	3288 (3163-3400)	3272 (2917-3537)	1
Total body lipid reserves (%)	5.19 (5.14-5.47)	5.48 (5.20-6.00)	0.35
Perirenal adipose tissue weight (g)	141.7 (130.1-162.5)	133.3 (86.61-77.4)	0.87
Perirenal adipose tissue/body weight (%)	3.37 (3.20-3.90)	3.19 (2.30-3.83)	0.46
<b>Arterial blood pressure and heart rate</b>			
Systolic blood pressure (mmHg)	70.7 (67.6-75.5)	85.6 (77.4-87.7)	0.067
Mean blood pressure (mmHg)	59.3 (56.4-62.7)	69.8 (63.3-73.5)	0.038
Diastolic blood pressure (mmHg)	53.5 (50.8-56.3)	61.9 (57.0-66.4)	0.067
Heart rate (beats per minute)	191 (182-201)	194 (176-200)	0.76
<b>Organ weights</b>			
Sum of testes weight (g)	6.78 (6.51-7.41)	5.78 (5.54-6.35)	<b>0.035</b>
Testes/body weight (%)	0.170 (0.163-0.188)	0.163 (0.122-0.171)	<b>0.05</b>
Sum of epididymes weight (g)	1.84 (1.76-2.04)	1.30 (1.24-1.68)	<b>0.015</b>
Epididymes/body weight (%)	0.046 (0.043-0.050)	0.034 (0.029-0.040)	<b>0.009</b>
Sum of kidneys weight (g)	14.2 (13.8-15.1)	16.8 (15.6-17.9)	<b>0.02</b>
Kidneys/body weight (%)	0.36 (0.34-0.37)	0.41 (0.39-0.43)	<b>0.004</b>
Liver weight (g)	77.6 (71.1-81.9)	108.7 (68.6-118.3)	0.28
Liver/body weight (%)	1.95 (1.78-2.00)	2.36 (1.95-2.60)	0.09
Heart weight (g)	7.80 (7.54-8.30)	8.25 (8.09-9.69)	0.14
Heart/body weight (%)	0.20 (0.18-0.20)	0.21 (0.20-0.22)	0.07
<b>Semen parameters</b>			
Sperm concentration (10 <sup>6</sup> /ml)	474 (379-726)	573 (548-878)	0.56
Sperm DNA fragmentation (%)	4.45 (3.65-4.88)	2.50 (2.20-3.95)	0.50
Sperm membrane composition (Chol/PE)	1.91 (1.69-2.08)	2.31 (1.80-2.40)	0.52
<b>Histological analysis</b>			
Seminiferous epithelium height (µm)	54.7 (49.4-57.8)	56.1 (51.2-57.1)	1
<b>Serum assays</b>			
Glycaemia (g/l)	1.13 (1.07-1.14)	1.06 (0.97-1.15)	0.37
Free testosterone (pmol/L)	42.2 (30.9-42.9)	4.10 (2.55-9.25)	<b>0.05</b>



Effect of maternal HH diet on offspring testicular weight (g) at 37 weeks of age  
160x106mm (72 x 72 DPI)

## Discussion et perspectives

### I. Synthèse générale

#### A) Paramètres anthropométriques et fonctions de reproduction masculine

Les deux récentes méta-analyses ont permis de conclure que les hommes en surpoids ou obèses avaient un risque plus important de présenter une oligozoospermie ou une azoospermie (Sermondade *et al.*, 2012a; Sermondade *et al.*, 2013b). Concernant les autres paramètres spermatiques tels que la mobilité ou la morphologie, aucun consensus n'a été établi. Dans les deux études que nous avons réalisées (Dupont *et al.*, 2013) et (Article 2) nous avons retrouvé une corrélation négative entre l'IMC et la mobilité spermatique. Concernant l'intégrité de l'ADN spermatique, les études précédemment publiées n'avaient pas permis de conclure de façon certaine à l'impact du surpoids ou de l'obésité sur l'augmentation de la fragmentation de l'ADN spermatique (**Tableau 5**). Dans notre étude qui incluait 300 hommes infertiles, nous avons observé un impact de l'obésité sur l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes, avec une tendance du surpoids (Dupont *et al.*, 2013). Ces résultats amènent à penser, que lorsque les hommes sont en surpoids, sans être obèses, il pourrait y avoir une atteinte modérée de l'intégrité de l'ADN spermatique. Cette hypothèse est d'ailleurs en concordance avec les résultats observés dans la deuxième étude qui montraient qu'une augmentation de l'IMC masculin était associée à une augmentation de la fragmentation partielle de l'ADN spermatique (spermatozoïdes présentant un marquage de la tête compris entre 20 et 50% avec la méthode TUNEL) (Article 2). Nous avons fait l'hypothèse que cette fragmentation partielle pourrait être un signe précoce d'apoptose et qu'elle précéderait la fragmentation totale de l'ADN spermatique. Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces hypothèses.

Nous avons également regardé si la répartition de la masse grasse avait un impact sur les paramètres spermatiques. En effet, l'obésité abdominale est un indicateur fiable du risque de développer des comorbidités liées au surpoids et à l'obésité. Nous avons retrouvé que la mesure du tour de taille et l'évaluation de la graisse viscérale par impédancemétrie sont corrélées à certains paramètres spermatiques telle que la mobilité et la fragmentation partielle de l'ADN spermatique. L'obésité abdominale tendait également à être corrélée au nombre total de spermatozoïdes (Article 2). Néanmoins, nous n'avons pas montré que l'évaluation de

l'obésité abdominale est un meilleur indicateur que l'IMC pour appréhender le risque d'infertilité. Cependant, la mesure de la graisse viscérale pourrait être plus intéressante pour identifier les hommes qui ne sont pas obèses, selon les critères définis par l'IMC, mais qui présentent une obésité abdominale et pourraient donc être à risque d'infertilité.

Certains de nos patients recrutés dans l'étude ALIFERT ont bénéficié d'une prise en charge hygiéno-diététique personnalisée. Les hommes partenaires de couple infertile consultant pour une infertilité primaire idiopathique présentaient une obésité abdominale et une augmentation de la fragmentation de l'ADN spermatique. En suivant les conseils hygiéno-diététiques proposés par une nutritionniste, tous les patients ont perdu un peu de poids, mais il a surtout été observé une diminution significative de l'obésité abdominale. Une amélioration du bilan hormonal avec une diminution du rapport œstradiol/testostérone accompagnée d'une diminution de la fragmentation de l'ADN spermatique ont été rapportées. Tous les couples ont obtenu une grossesse et la naissance d'un enfant en bonne santé à la suite de cette prise en charge (Article 4). Pour s'assurer d'un réel lien de cause à effet, il faudrait confirmer ces résultats avec des effectifs plus grands. Néanmoins, ces premiers résultats nous montrent qu'une prise en charge adaptée permet d'améliorer le pronostic des patients en surpoids et nous encourageant à développer des structures pour les accueillir.

L'impact de l'IMC masculin sur l'aspect quantitatif et certains paramètres qualitatifs des spermatozoïdes est bien établi ; l'atteinte de leur capacité fécondante reste encore à démontrer. Dans une population ciblée de couples présentant une infertilité primaire idiopathique, nous n'avons pas retrouvé d'impact du surpoids ou de l'obésité sur la capacité des spermatozoïdes à se fixer à la zone pellucide (Sermondade *et al.*, 2013a). La fixation des spermatozoïdes à la zone pellucide est l'une des premières étapes de l'interaction gamétique qui s'achève par la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte et la fécondation. D'autres études évaluant les différentes étapes de l'interaction gamétique sont nécessaires pour rechercher si le surpoids ou l'obésité masculine peuvent négativement affecter ce processus.

## B) DOHAD

Il semble indispensable d'intervenir lorsque des facteurs de risque sont identifiés à l'âge adulte, mais la prévention pourrait se faire plus précocement, comme cela est suggéré par le

concept de DOHAD qui admet une programmation très précoce de la santé d'un individu à long terme mais également une programmation des fonctions de reproduction et de la fertilité.

Si la littérature concernant la programmation fœtale de maladies métaboliques à l'âge adulte est abondante, le thème de la programmation à long terme des fonctions de reproduction est plus confidentiel. Nous avons réalisé une revue de la littérature afin d'avoir une vue plus générale de ce qui a été publié (Dupont *et al.*, 2012).

Les études épidémiologiques sont peu nombreuses et sont essentiellement basées sur les conséquences à long terme d'un retard de croissance intra utérin. Une altération des gonades a été observée dès le stade fœtal ou au moment de la naissance, aussi bien chez les garçons que chez les filles. Au moment de la puberté, le bilan hormonal pourrait être altéré et être responsable d'hypofertilité à l'âge adulte. D'autres études s'intéressant au poids de la mère avant la conception ou au gain de poids pendant la grossesse ont aussi montré un impact de l'environnement nutritionnel maternel sur la programmation des fonctions de reproduction des descendants (Dupont *et al.*, 2012).

Le poids de naissance est souvent utilisé comme un indicateur indirect du développement *in utero*. Nous avons évalué la relation entre le poids de naissance et les paramètres spermatiques dans une population d'hommes partenaires de couples présentant une infertilité primaire idiopathique. Le poids de naissance était inversement corrélé au nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat. Nous avons également retrouvé une association positive entre le poids de naissance et la fragmentation de l'ADN spermatique (Article 5). Même si le poids de naissance n'est pas le meilleur reflet du développement embryonnaire et fœtal, ces données montrent bien que les événements qui ont lieu pendant la vie intra-utérine, quelle que soit leur origine, peuvent influencer les fonctions de reproduction à l'âge adulte. Pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ces phénomènes, l'utilisation de modèles animaux est nécessaire.

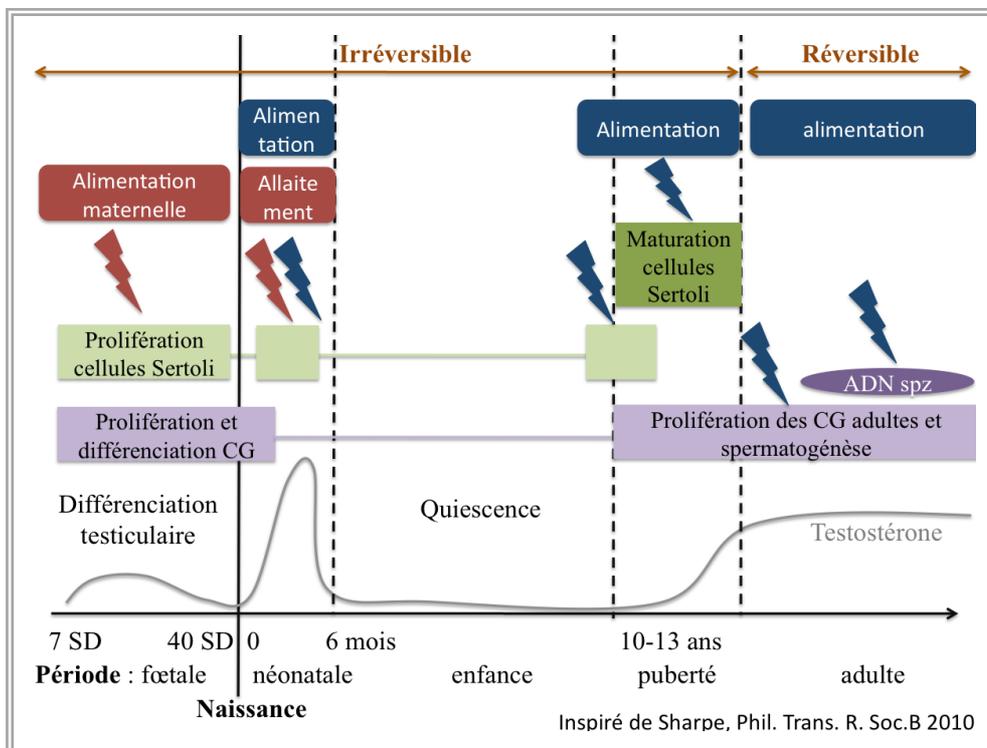
Quelques études chez l'animal ont été publiées. Malgré les biais liés aux différences caractérisant les animaux (placentation et chronologie de la mise en place de la gamétogénèse différentes) et à la diversité des protocoles expérimentaux (moment de l'exposition, stress alimentaire), il semble exister un réel impact de l'alimentation maternelle (sous nutrition, surnutrition, défaut ou excès de micronutriments) pendant la gestation sur le développement des gonades masculine et féminine pouvant avoir un retentissement à long terme sur les

fonctions de reproduction (Dupont *et al.*, 2012).

Dans l'étude que nous avons réalisée chez les lapins mâles issus de mères présentant une hypercholestérolémie induite par l'alimentation, nous avons observé un retentissement sur le poids des testicules et des épididymes. Les lapins présentaient de plus des concentrations sériques en testostérone libre plus basses (Article 6). Il pourrait être intéressant d'aller plus loin dans l'exploration des fonctions de reproduction en étudiant les hormones hypophysaires (LH et FSH) et en répétant les analyses de sperme chez des lapins plus âgés.

Chez le lapin, la période post sevrage étant une période importante pour le développement testiculaire, l'alimentation à ce moment là pourrait altérer la croissance et la structure des gonades. Nous avons de plus observé que les lapins exposés à l'hypercholestérolémie maternelle et soumis au régime HH présentaient une glycémie augmentée par rapport aux autres lapins. Ces résultats signent peut être le début d'une insulino-résistance, connue comme source d'altération des fonctions de reproduction.

### C) Conclusion



**Figure 15 :** Périodes au cours desquelles l'environnement nutritionnel est critique.

Au total, l'environnement nutritionnel peut avoir un impact sur les fonctions de reproduction masculine dès la période embryonnaire et tout au long de la vie.

Chez l'homme, on recense trois fenêtres critiques principales au cours desquelles les testicules subissent une croissance et une maturation importante : la période fœtale et la période néonatale (0 à 6 mois) au cours desquelles les cellules de Sertoli prolifèrent et la période prépubertaire et pubertaire au cours de laquelle les cellules de Sertoli finissent de proliférer et mûrissent. Les événements survenant au cours de ces périodes ont plus de risque d'être irréversibles car ils surviennent au moment du développement et de la maturation du système reproductif. Tant que le pool de spermatogonies reste intact, les événements environnementaux survenant après la puberté ont plus de chances d'être réversibles après correction des facteurs de risque.

La prévention doit donc passer par l'information et l'éducation des jeunes hommes, mais également des futures mères dès la période préconceptionnelle, avec un suivi jusqu'à l'allaitement et le début de l'alimentation de l'enfant (**Figure 15**).

## **II. Au delà de la programmation maternelle**

### A) Empreinte nutritionnelle paternelle

Un certain nombre de perturbations environnementales de la conception jusqu'à l'âge adulte peuvent donc modifier les fonctions de reproduction masculine. Nous avons vu que les gamètes peuvent être directement altérés par l'environnement nutritionnel et notamment l'intégrité du noyau. Ces anomalies sont donc susceptibles d'être transmises à la descendance.

#### 1- Données chez l'animal

La notion de transmission paternelle non génétique de pathologies à long terme a émergé très récemment. Les premières observations ont été faites à l'aide de modèles animaux.

Dans une première étude mettant en évidence une transmission paternelle, non génétique, de pathologies en lien avec le régime hyperlipidique, Ng et son équipe ont montré qu'une obésité paternelle acquise chez le rat entraînait une dysfonction des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans chez les descendantes femelles adultes. Ces femelles présentaient également une augmentation du poids corporel et de l'adiposité, une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline. L'épigénétique est un mécanisme pouvant expliquer les effets observés puisque

le gène dont l'expression était la plus modifiée était le gène *Ill3ra2*, avec une diminution de méthylation de ce gène (Ng *et al.*, 2010).

Les descendants de souris mâles soumis à un régime pauvre en protéines présentaient un profil d'expression altéré de nombreux gènes hépatiques impliqués dans le métabolisme lipidique et du cholestérol. Des changements de méthylation des cytosines ont notamment entraîné un changement d'expression d'un régulateur clé du métabolisme lipidique : PPAR $\gamma$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) (Carone *et al.*, 2010).

Toujours dans un modèle murin, Fullston *et al.* ont montré récemment que l'obésité paternelle induite par un régime hyperlipidique entraînait chez les descendants mâle et femelle une intolérance au glucose, une résistance à l'insuline et obésité à plus long terme (Fullston *et al.*, 2013) (**Tableau 10**).

Comme cela avait été observé avec l'étude de la programmation maternelle, c'est d'abord une altération du profil métabolique qui a été observée chez les descendants d'animaux mâles soumis à un stress alimentaire. La programmation paternelle peut cependant concerner d'autres systèmes et organes.

Ainsi, Fullston et son équipe ont démontré qu'une alimentation paternelle hyperlipidique entraînait une altération des fonctions de reproduction des descendants mâles et femelles (Fullston *et al.*, 2012). Chez les mâles F1, une diminution de la mobilité spermatique associée à une augmentation des EOR et de la fragmentation de l'ADN spermatique a été observée. Cette génération présentait donc un phénotype proche de la génération F0 soumise à l'alimentation hyperlipidique. Aucune modification du poids des testicules et des épидидymes n'a été observée. Les femelles F1 présentaient quant à elle une diminution des compétences méiotiques des ovocytes (maturation des vésicules germinatives en ovocytes matures) et une altération du potentiel de membrane mitochondrial ovocytaire (Fullston *et al.*, 2012).

Les pères F0 présentaient une altération du profil transcriptionnel au niveau testiculaire. Au niveau spermatique, une altération du contenu en micro-RNA et une diminution de la méthylation globale de l'ADN ont été retrouvées, pouvant expliquer une possible transmission de pathologies aux générations futures (Fullston *et al.*, 2013) (**Tableau 10**).

## 2- Données chez l'homme

L'impact de l'IMC des parents sur la méthylation des DMR d'IGF2 et H19 a été étudié chez 78 familles. Il a été observé que l'obésité paternelle est associée à une hypométhylation de

l'IGF2 (DMR) dans les leucocytes prélevés dans le sang de cordon chez les enfants (78 familles). Il n'y avait par contre pas d'impact sur la méthylation du DMR H19 (Soubry *et al.*, 2013). Le gène IGF2 est fortement impliqué dans la croissance et le développement *in utero*. L'obésité paternelle peut donc induire une altération de l'expression d'IGF2 qui aurait pour conséquence une altération de la croissance et du développement embryonnaire et fœtal entraînant à long terme un syndrome métabolique. Une augmentation de la concentration en IGF2 plasmatique chez le nouveau-né est d'ailleurs associée à une augmentation du poids de naissance (Hoyo *et al.*, 2012).

### 3- Mécanismes

Les mécanismes impliqués dans la transmission paternelle sont encore assez peu élucidés et l'origine de ce phénomène est probablement multifactorielle.

Il a été montré que le surpoids ou l'obésité masculine entraînait une augmentation des EOR dans le plasma séminal (Tunc *et al.*, 2011) et une altération de l'ADN spermatique (Dupont *et al.*, 2013). Ces anomalies de l'intégrité de l'ADN sont donc susceptibles d'être transmises à la génération suivante.

Tunc et son équipe avaient observé un lien entre le stress oxydatif, la fragmentation de l'ADN spermatique et la méthylation de l'ADN spermatique (Tunc et Tremellen, 2009). Le surpoids et l'obésité sont des facteurs de risque d'infertilité, or chez les hommes infertiles, une altération de la méthylation des centres d'empreintes d'IGF2 et H19 a été observé (Boissonnas *et al.*, 2010).

L'altération des marques épigénétiques dans les spermatozoïdes contribue aux compétences développementales du futur embryon (Jenkins et Carrell, 2011) et pourraient jouer un rôle critique dans la santé à long terme mais également dans la fertilité des descendants.

Chez les descendants d'animaux soumis à un stress alimentaire, la programmation paternelle peut s'exprimer dès les stades très précoces de développement. Chez la souris, en cas d'obésité paternelle induite par une alimentation hyperlipidique (HF), un retard de développement embryonnaire précoce, observé par « TimeLaps vidéo », une diminution du potentiel de membrane mitochondrial et une diminution de la masse cellulaire interne et du trophoctoderme des blastocystes ont été observés. Les blastocystes issus de ces mâles obèses présentaient également des altérations du métabolisme glucidique avec une augmentation de

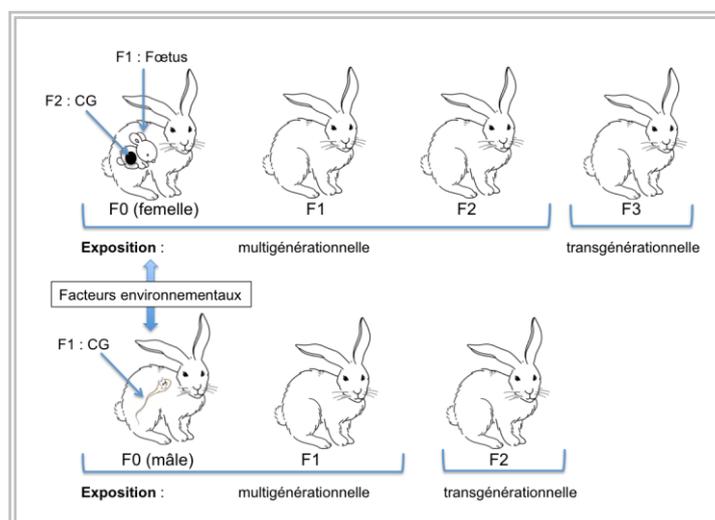
la glycolyse. Les taux d'implantation étaient plus faibles et les fœtus présentait un retard du développement associé à une insuffisance placentaire (Binder *et al.*, 2012a; Binder *et al.*, 2012b). Mitchell et son équipe avaient également montré chez la souris que l'obésité paternelle altérait le développement des embryons préimplantatoires ainsi que l'implantation (Mitchell *et al.*, 2011).

#### 4- Conclusion

L'environnement paternel au moment de la conception est également un élément important à considérer en ce qui concerne la programmation de la santé et de la fertilité d'un individu. La transmission pourrait aussi se faire sur plusieurs générations.

##### B) Effets multigénérationnels et transgénérationnels

Lors d'une grossesse ou d'une gestation, le fœtus (F1) et ses cellules germinales (F2) peuvent être exposés à l'environnement maternel (F0) qui peut se répercuter à long terme. On parle alors de transmission multigénérationnelle. En cas de transmission aux générations suivantes (F3 et plus), la transmission est dite transgénérationnelle car il n'y a aucun contact direct entre l'environnement et les cellules de l'individu. Si l'exposition est paternelle, la transmission multigénérationnelle est limitée à la génération F1 qui a été exposée par les gamètes paternels à l'environnement. Pour les générations suivantes (F2 et plus) on parle de transmission transgénérationnelle (Skinner, 2010). (**Figure 16**).



**Figure 16 :** Transmissions multigénérationnelles et transgénérationnelles, maternelles et paternelles (D'après (Skinner, 2010)). CG : cellules germinales.

## 1- Données épidémiologiques

Des études épidémiologiques indiquent que l'exposition des grands-pères paternels à la famine pouvait prédisposer les générations suivantes à l'obésité et aux maladies cardiovasculaires (Kaati *et al.*, 2002; Kaati *et al.*, 2007).

Les enfants des individus nés de mères (F0) soumises à la famine hollandaise sont maintenant adultes et leur santé a été évaluée. Il a été observé que les enfants (F2) de mères (F1) exposées à la famine *in utero* présentaient une diminution de la taille à la naissance avec une augmentation de l'indice pondéral, bien que le poids de naissance ne soit pas altéré. Ils ne présentaient pas plus de maladies métaboliques ou cardiovasculaires, mais étaient plus sujets à d'autres pathologies. Dans cette étude, il n'avait pas été retrouvé d'impact chez les descendants (F2) de pères (F1) exposés *in utero* à la famine (Painter *et al.*, 2008).

En revanche, dans une autre étude plus récente concernant des individus plus âgés, il a été observé que les enfants (F2) de pères (F1) exposés *in utero* à la famine avaient un poids plus élevé et avaient plus de risque d'être obèses. Il n'a pas été retrouvé d'impact sur les enfants dont les mères ont été exposées *in utero*. Pour l'instant, aucune altération n'a été observée chez les arrière-petits enfants (F3) de femmes exposées à la famine, mais ils sont encore très jeunes (Veenendaal *et al.*, 2013). Les données chez l'homme sont encore rares, mais quelques études ont été réalisées chez l'animal.

## 2- Données chez l'animal

Des modèles de rats soumis à une restriction protéique ont permis de montrer chez les descendants F1 et F2 une augmentation de la pression artérielle (Torrens *et al.*, 2008) ou une résistance à l'insuline (Pinheiro *et al.*, 2008). Dans ce modèles de rats soumis à une restriction protéique, une diminution du poids de naissance, une intolérance au glucose et une obésité ont été observées chez les animaux des générations F1 et F2 (Pinheiro *et al.*, 2008). De plus, une transmission d'altération du métabolisme et de l'obésité a été observée chez les descendants de souris sous nourries pendant la gestation ; cette transmission se faisait de façon sexe-spécifique. Une diminution du poids de naissance était observée chez les mâles et les femelles de la génération F1, puis uniquement chez les descendants F2 issus des males F1. En revanche, l'obésité progressait à travers la lignée maternelle F1. L'intolérance au glucose concernait les males et les femelles des générations F1 et F2 (Jimenez-Chillaron *et al.*, 2009).

A partir d'un mâle souris F0 dont l'obésité est induite par une alimentation hyperlipidique (Bakos *et al.*, 2011b), il a été observé une transmission paternelle sexe-spécifique sur plusieurs générations (F1 et F2) de pathologies métaboliques et d'altération des fonctions de reproduction (Fullston *et al.*, 2013). Seuls les mâles F0 étaient soumis au régime hyperlipidique ; les souris des génération F1 et F2 recevaient l'aliment contrôle. Une altération de la qualité des gamètes a été retrouvée à la fois chez les mâles et les femelles des générations F1 et F2. L'obésité et l'intolérance au glucose concernaient les deux sexes de la génération F1, mais uniquement les mâles F2 de la lignée maternelle F1. L'insulino-résistance était retrouvée chez tous les animaux, sauf les mâles F2 issus de la lignée mâle F1. Le détail de tous les phénotypes est reporté dans le **tableau 10** (Fullston *et al.*, 2013).

### 3) Conclusion

Les données résumées ci-dessus indiquent une transmission multigénérationnelle et transgénérationnelle de pathologies liées à l'alimentation.

Avec le développement du concept de programmation multigénérationnelle et transgénérationnelle, la notion de dimorphisme sexuel s'est élargie. La susceptibilité à une programmation défavorable peut entraîner des altérations différentes entre les mâles et les femelles. On observe un dimorphisme sexuel selon le sexe du parent transmetteur, le sexe de l'individu et la génération (Gabory *et al.*, 2009; Junien *et al.*, 2012).

Régime	Phénotypes	sexe			
F0 (HFD)	Obésité Adiposité Intolérance au glucose Insulino-résistance Augmentation de la leptine Augmentation du cholestérol Gamètes	Mâle			
		oui oui non non oui oui			
		↑EOR, ↑frag ADN, altération expression miRNA, hypométhylation, ↓FT			
F1 (C)	Obésité Adiposité Intolérance au glucose Insulino-résistance Augmentation de la leptine Augmentation des triglycérides Altération du poids des gonades Gamètes	Mâle		Femelle	
		oui non oui oui, à partir de 26 S oui non		oui oui oui, à partir de 8 S oui, à partir de 16 S oui non	
		↓Mobilité, ↑EOR, ↑frag ADN		↓compétence méiotique, altération PMM	
F2 (C)	Obésité Adiposité Intolérance au glucose Insulino-résistance Augmentation de la leptine Altération du poids des gonades Gamètes Hormones	Mâle	Femelle	Mâle	Femelle
		non non non non non non	non oui non oui	oui oui oui oui non oui	non non non oui non
		↓Mobilité, ↑EOR, ↓frag ADN	↑Stress ox, altération PMM	↓Mobilité, ↑EOR ↓testostérone	compétence méiotique N, ↓EOR

**Tableau 10 :** Conséquences sur 2 générations de souris d'une obésité masculine induite par l'alimentation (Synthèse des articles (Fullston *et al.*, 2012; Fullston *et al.*, 2013)). EOR : espèce oxygénée réactives ; frag ADN : fragmentation de l'ADN spermatique ; FT : spermatozoïdes de formes typiques ; S : semaines ; PMM : potentiel de membrane mitochondrial ovocytaire

### III. Perspectives

Cette thèse s'inscrit dans un large projet débuté par l'étude de l'impact de l'IMC sur la concentration spermatique (Sermondade *et al.*, 2012a; Sermondade *et al.*, 2013b). De nombreux travaux sont toujours en cours.

#### A) Comprendre les mécanismes

L'inflammation et le stress oxydant sont des pistes prometteuses pour évaluer les principaux mécanismes impliqués dans l'étiologie de l'infertilité liée au surpoids et à l'obésité.

Dans le cadre de l'étude ALIFERT, de nombreuses analyses sont encore en cours :

- Les concentrations des marqueurs l'inflammation (IL-6, IL-8, eotaxin, MCP1, MIP1a, MIP1b et RANTES) vont être comparées chez les hommes fertiles et les hommes infertiles et interprétées en fonction de l'ensemble du bilan métabolique.

- La mise au point de dosages de 4 marqueurs du stress oxydatif vient d'être réalisée dans le plasma séminal. L'activité enzymatique des enzymes antioxydantes SOD et GPx et la concentration de SOD2 peuvent être dosées. La concentration en glutathion, antioxydant non enzymatique, est également réalisable. Il existe cependant une susceptibilité individuelle face au stress oxydant qui est déterminée par les polymorphismes génétiques (Forsberg *et al.*, 2001). Quelques variants génétiques, essentiellement sous la forme de SNPs (single nucleotide polymorphisms) ont été observés. Ces polymorphismes influenceraient la capacité des individus à lutter contre les attaques des EOR et prédisposeraient les individus à développer des pathologies liées au stress oxydatif. L'association des polymorphismes génétiques des enzymes antioxydantes impliquées dans le système de défense (MnSOD, CAT, GPx1, MPO, NOS3) et le risque d'infertilité sont en cours d'évaluation afin de déterminer l'existence de profils protecteurs ou de profils à risque.

- L'épigénétique étant un des mécanismes clés de la programmation maternelle et paternelle, l'étude de la méthylation de l'ADN spermatique sera faite chez les hommes infertiles qui sont recrutés dans l'étude métasperme. L'objectif de cette étude est d'observer les relations entre les paramètres spermatiques et le syndrome métabolique chez 500 hommes partenaires de couples infertiles (PHRC national 2010). Les analyses comprendront l'étude de la

méthylation de l'ADN codant pour deux gènes à empreinte (SNRPN pour l'empreinte paternelle et locus IGF2/H19 pour l'empreinte maternelle) et l'expression génique des protamines.

- L'étude de la programmation maternelle sur plusieurs générations est en cours à l'INRA. Elle est réalisée sur le modèle de lapines soumises à l'alimentation hypercholestérolémique et hyperlipidique. L'étude de l'impact de l'hypercholestérolémie maternelle sur les gonades des générations au delà de F1 reste à réaliser.

## B) Traitements ?

### *Traitement pharmacologique de l'infertilité liée à l'obésité ?*

L'inflammation et le stress oxydant étant impliqués dans l'étiologie de l'infertilité liée à l'obésité, la pertinence d'un traitement anti-inflammatoire et/ou un traitement antioxydant est à considérer.

L'utilisation d'anti-inflammatoire non stéroïdien a été montré efficace chez des hommes présentant une leucospermie sans infection génito-urinaire sous jacente (Hamada *et al.*, 2012). Néanmoins il ne semble pas que ce traitement ait été testé pour diminuer l'état inflammatoire chronique des hommes obèses et donc améliorer leur fertilité.

L'efficacité d'une supplémentation en antioxydants a été observée dans certaines situations, essentiellement lorsque les hommes présentaient une augmentation du stress oxydant au niveau spermatique. Néanmoins, dans certaines études, aucune amélioration n'a été observée, des effets délétères peuvent même apparaître en cas de traitement prolongé avec des doses élevées (Faure *et al.*, 2011). Les antioxydants faisant partie de notre alimentation de façon naturelle, il est préférable de les consommer par cette voie.

L'insulinorésistance est également un des phénomènes impliqués dans l'étiologie de l'infertilité. Chez les femmes, l'insulinorésistance et l'hyperinsulinémie ont un rôle important dans la pathogénie du syndrome des ovaires polykystiques (SOPK). Quarante pourcent des femmes souffrant d'un SOPK sont obèses et un traitement par metformine, qui est un antidiabétique oral (biguanide), permet une diminution des concentrations sériques d'insuline et une amélioration des symptômes liés au syndrome. Malgré quelques controverses, chez ces

patientes le traitement par metformine est régulièrement utilisé pour améliorer les chances de grossesse (Tang *et al.*, 2012). Chez les hommes, la metformine est moins utilisée dans le domaine de la fertilité. Une étude avait cependant montré qu'un traitement de 6 mois par Metformine chez des hommes présentant un syndrome métabolique améliorait la sensibilité à l'insuline. Le bilan hormonal (LH, Testostérone totale et libre, oestradiol) et les paramètres spermatiques (concentration, mobilité et morphologie) étaient également améliorés (Morgante *et al.*, 2011). Le nombre de patients inclus dans cette étude était faible (n=45) et il existe pour l'instant trop peu de preuves pour pouvoir proposer ce traitement à tous les patients souffrant d'un syndrome métabolique, d'autant plus que les effets toxiques de la metformine sur les testicules n'ont pas été écartés (Adaramoye *et al.*, 2012).

### *Prévention d'une programmation fœtale délétère par un traitement ?*

Maintenant, il est possible d'identifier les risques de l'obésité et du syndrome métabolique maternelles sur le développement des enfants, mais existe-t-il des traitements permettant de limiter les complications ? En plus des modifications épigénétiques, le stress oxydant et l'altération du bilan hormonal sont les principaux mécanismes impliqués dans le phénomène de DOHaD. Dans une revue de la littérature, il a été recensé les effets d'interventions diététiques pendant la période fœtale ou néonatale, et notamment la supplémentation en micronutriments anti-oxydants. Des études épidémiologiques et des données chez l'animal ont montré, dans certaines situations, l'intérêt d'une supplémentation sur la santé des descendants à long terme. Néanmoins, dans certains cas, des effets néfastes ont été observés (Ma et Hardy, 2012). Il est donc nécessaire de rester prudent quant à l'utilisation de ces composés et préférer chez les femmes enceintes une consommation d'aliments contenant naturellement les micronutriments.

Concernant le bilan hormonal, la metformine améliore le profil hormonal et surtout la résistance à l'insuline et l'hyperinsulinémie qui sont connus pour augmenter le risque de macrosomie et altérer le développement hypothalamique des descendants. Serait-il justifié d'instaurer ce traitement chez les femmes enceintes souffrant d'obésité sachant que la metformine passe la barrière placentaire ? La metformine n'est pas contre-indiquée pendant la grossesse et il n'a d'ailleurs pas été retrouvé d'effets néfastes ou tératogènes chez les nouveau-nés (Ro *et al.*, 2012). Néanmoins, une augmentation de l'adiposité périphérique chez les enfants de 2 ans exposés *in utero* (Rowan *et al.*, 2011) et une possible augmentation de la glycémie à jeun associée à une augmentation de la pression artérielle chez les enfants de 8 ans

exposés *in utero* ont été observées (Ro *et al.*, 2012). Concernant la fertilité, une augmentation de la SHBG a été mise en évidence chez les nouveau-nés exposés à la metformine (Carlsen et Vanky, 2010). Une étude récente a de plus montré *in vitro* que la metformine diminue la sécrétion de testostérone et l'expression de facteurs impliqués dans la synthèse de stéroïdes dans des cultures de cellules testiculaires de rats et d'hommes. *In vivo*, chez le rat, l'administration de metformine pendant la gestation entraîne une diminution de la taille des testicules des fœtus et des nouveau-nés. Les cellules germinales n'étaient pas affectées par le traitement, mais le nombre de cellules de Sertoli était réduit et une altération des cellules de Leydig associée à une diminution des concentrations en testostérone a été observée (Tartarin *et al.*, 2012). Cette étude encourage donc à utiliser la metformine pendant la grossesse avec prudence en attendant des études épidémiologiques de grande envergure. La période de grossesse est d'ailleurs une période critique pour ce qui est de la mise en place de traitements.

**En absence d'études prospectives randomisées, la prise en charge hygiéno-diététique, suivie d'une chirurgie de l'obésité si elle est indiquée, reste à privilégier pour améliorer la fertilité et assurer une programmation fœtale favorable.**

### C) Application clinique

Le gouvernement, de plus en plus concerné par la progression de l'obésité, a demandé un état des lieux de la situation en France. Dans ce contexte, un plan d'action a été proposé afin d'enrayer la progression de l'obésité et de faire face à ses conséquences médicales et sociales. ([http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Plan\\_Obesite\\_-\\_interactif.pdf](http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Plan_Obesite_-_interactif.pdf)).

Le plan national obésité (PNO) comporte quatre axes prioritaires :

- Améliorer l'offre de soin et promouvoir le dépistage chez l'enfant et l'adulte ;
- Mobiliser les partenaires de la prévention, agir sur l'environnement et promouvoir l'activité physique ;
- Prendre en compte les situations de vulnérabilité et lutter contre la discrimination ;
- Investir dans la recherche.

Les résultats de cette thèse sont des arguments pour développer une prise en charge personnalisée pour les couples qui viennent consulter pour un désir d'enfant. Notre travail s'intègre dans le PNO. Cette prise en charge devrait débuter avant la conception, concerner les

deux membres du couple et continuer tout au long de la grossesse pour les femmes, l'objectif étant d'améliorer la fertilité des couples, mais surtout la santé de leurs enfants. Même si le thème principal de cette thèse est l'alimentation, d'autres facteurs environnementaux sont susceptibles d'agir sur la fertilité des couples et la santé des descendants, il faut en tenir compte dans la prise en charge.

*Le projet de recherche PEPCI (Parcours Environnement PériConceptionnel en Infertilité) qui vient d'être soumis s'inscrit dans cette thématique. C'est une étude clinique randomisée qui visera à évaluer l'efficacité d'un parcours thérapeutique prenant en compte l'environnement périconceptionnel, dans la prise en charge du couple infertile.*

Au cours de leur première consultation dans le centre d'AMP, les couples seront invités à participer au projet. S'ils acceptent, ils seront randomisés dans deux groupes.

Les couples du groupe contrôle recevront une prise en charge standard et se verront remettre des plaquettes d'information contenant des conseils hygiéno-diététiques.

Les 2 membres des couples du groupe expérimental PEPCI vont chacun bénéficier d'une évaluation standardisée puis en fonction des résultats se verront proposer une prise en charge et un suivi personnalisé pendant 3 mois, sur les thèmes de la nutrition, des addictions (tabac, alcool, cannabis) de l'exercice physique et de la dépression, en même temps que leur prise en charge pour infertilité.

Les couples des deux groupes seront revus en consultation 3 mois après l'inclusion afin d'évaluer l'efficacité de l'intervention et planifier la suite de la prise en charge. Les couples seront suivis jusqu'à un an. Les informations sur les parcours d'AMP et les grossesses obtenues seront recensées. Si une grossesse démarre pendant la période de l'étude (1 an), les couples seront suivis jusqu'à l'accouchement afin d'obtenir les informations sur la naissance et données néonatales.

L'objectif est d'inclure 1400 couples (700 dans chaque bras), dans 5 centres. L'originalité de cette approche est qu'elle est globale, multidisciplinaire et localisée sur un seul site pour les patients. Dans le cadre de ce projet, 4 binômes comprenant un médecin et un personnel paramédical seront formés pour permettre une prise en charge optimale des couples :

- Addictologue /infirmière de liaison ;
- Endocrinologie / Diététicien ;
- Psychiatre / psychologie ;

- Médecin du sport / coach sportif.

Ce programme permettra d'évaluer l'efficacité des interventions visant à limiter les facteurs de risques des couples sur leur fertilité et sur le développement *in utero* de l'enfant, qui pourrait déterminer à long terme sa santé mais également sa fertilité.

## Conclusion

L'impact négatif de l'obésité sur la fertilité masculine a été décrit dès le 10<sup>ème</sup> siècle par Avicenne, un scientifique Perse et docteur en médecine, dans son encyclopédie médicale : « The canon of Medicine ». En pratique, l'obésité masculine est rarement prise en compte dans l'évaluation et la prise en charge de l'infertilité du couple. Si depuis quelques années, il y a de plus en plus d'études sur ce sujet, peu de programmes interventionnels ont été développés. La réversibilité probable des effets délétères de l'obésité sur la fertilité nous encourage à intégrer cette notion dans la prise en charge des couples.

Bien que le concept de DOHAD soit relativement récent, en 1895, Adolphe Pinard obstétricien de formation et pionnier de la puériculture, disait : « La puériculture est le soin aux enfants commençant 15 jours avant la conception ». Comme en témoigne les nombreux articles publiés depuis une vingtaine d'années, cette thématique est de plus en plus reprise et devrait permettre de d'aboutir à des pratiques visant à prévenir et limiter les effets néfastes d'une programmation fœtale.

Au total, il faut identifier, comprendre, prévenir, traiter...

## Références

Abu-Amero, S. N., Ali, Z., Bennett, P., Vaughan, J. I. and Moore, G. E. Expression of the insulin-like growth factors and their receptors in term placentas: a comparison between normal and IUGR births. *Mol Reprod Dev* 1998; **49**: 229-235.

Adaramoye, O., Akanni, O., Adesanoye, O., Labo-Popoola, O. and Olaremi, O. Evaluation of toxic effects of metformin hydrochloride and glibenclamide on some organs of male rats. *Niger J Physiol Sci* 2012; **27**: 137-144.

Agarwal, A. and Said, T. M. Sperm chromatin assessment. *Textbook of ART, 2nd Edition*, (Editors: D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, and Z. Shoham), Taylor & Francis Group, plc, London, UK, Chapter 7 2004: 93-106.

Aggerholm, A. S., Thulstrup, A. M., Toft, G., Ramlau-Hansen, C. H. and Bonde, J. P. Is overweight a risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone profile? *Fertil Steril* 2008; **90**: 619-626.

Aitken, R. J. and De Iuliis, G. N. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online* 2007; **14**: 727-733.

Aitken, R. J., De Iuliis, G. N. and McLachlan, R. I. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl* 2009; **32**: 46-56.

Akpınar, E., Bashan, I., Bozdemir, N. and Saatci, E. Which is the best anthropometric technique to identify obesity: body mass index, waist circumference or waist-hip ratio? *Coll Antropol* 2007; **31**: 387-393.

Alberti, K. G., Zimmet, P. and Shaw, J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet* 2005; **366**: 1059-1062.

Anifandis, G., Dafopoulos, K., Messini, C. I., Polyzos, N. and Messinis, I. E. The BMI of men and not sperm parameters impact on embryo quality and the IVF outcome. *Andrology* 2013; **1**: 85-89.

Apostolidou, S., Abu-Amero, S., O'Donoghue, K., Frost, J., Olafsdottir, O., Chavele, K. M., *et al.* Elevated placental expression of the imprinted PHLDA2 gene is associated with low birth weight. *J Mol Med (Berl)* 2007; **85**: 379-387.

Ashwell, M., Gunn, P. and Gibson, S. Waist-to-height ratio is a better screening tool than waist circumference and BMI for adult cardiometabolic risk factors: systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 2012; **13**: 275-286.

Attig, L., Gabory, A. and Junien, C. Nutritional developmental epigenomics: immediate and long-lasting effects. *Proc Nutr Soc* 2010; **69**: 221-231.

Auger, J. Assessing human sperm morphology: top models, underdogs or biometrics? *Asian J Androl* 2010; **12**: 36-46.

Auger, J., Eustache, F., Andersen, A. G., Irvine, D. S., Jorgensen, N., Skakkebaek, N. E., *et al.* Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Hum Reprod* 2001; **16**: 2710-2717.

Auger, J., Kunstmann, J. M., Czyglik, F. and Jouannet, P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med* 1995; **332**: 281-285.

Austin, C. R. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* 1952; **170**: 326.

Bachmann, N. and Bergmann, C. Epigenetics and imprinting. *Arch Pediatr* 2012; **19**: 1145-1147.

Bakos, H. W., Henshaw, R. C., Mitchell, M. and Lane, M. Paternal body mass index is associated with decreased blastocyst development and reduced live birth rates following assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2011a; **95**: 1700-1704.

Bakos, H. W., Mitchell, M., Setchell, B. P. and Lane, M. The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *Int J Androl* 2011b; **34**: 402-410.

Balen, A. H. and Anderson, R. A. Impact of obesity on female reproductive health: British Fertility Society, Policy and Practice Guidelines. *Hum Fertil (Camb)* 2007; **10**: 195-206.

Banks, S., King, S. A., Irvine, D. S. and Saunders, P. T. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction* 2005; **129**: 505-514.

Barker, D. J., Eriksson, J. G., Forsen, T. and Osmond, C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol* 2002; **31**: 1235-1239.

Barouki, R., Gluckman, P. D., Grandjean, P., Hanson, M. and Heindel, J. J. Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. *Environ Health* 2012; **11**: 42.

Barraud-Lange, V., Chalas Boissonnas, C., Serres, C., Auer, J., Schmitt, A., Lefevre, B., *et al.* Membrane transfer from oocyte to sperm occurs in two CD9-independent ways that do not supply the fertilising ability of Cd9-deleted oocytes. *Reproduction* 2012; **144**: 53-66.

Basdevant, A. and Ciangura, C. [New insights into obesity]. *Bull Acad Natl Med* 2009; **193**: 1259-1268; discussion 1268-1259.

Bellisari, A., Roche, A. F. and Siervogel, R. M. Reliability of B-mode ultrasonic measurements of subcutaneous adipose tissue and intra-abdominal depth: comparisons with skinfold thicknesses. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1993; **17**: 475-480.

Bergman, Y. and Cedar, H. DNA methylation dynamics in health and disease. *Nat Struct Mol Biol* 2013; **20**: 274-281.

- Bhat, G. K., Sea, T. L., Olatinwo, M. O., Simorangkir, D., Ford, G. D., Ford, B. D., *et al.* Influence of a leptin deficiency on testicular morphology, germ cell apoptosis, and expression levels of apoptosis-related genes in the mouse. *J Androl* 2006; **27**: 302-310.
- Binder, N. K., Hannan, N. J. and Gardner, D. K. Paternal diet-induced obesity retards early mouse embryo development, mitochondrial activity and pregnancy health. *PLoS One* 2012a; **7**: e52304.
- Binder, N. K., Mitchell, M. and Gardner, D. K. Parental diet-induced obesity leads to retarded early mouse embryo development and altered carbohydrate utilisation by the blastocyst. *Reprod Fertil Dev* 2012b; **24**: 804-812.
- Blank, D. M., Clark, R. V., Heymsfield, S. B., Rudman, D. R. and Blank, M. S. Endogenous opioids and hypogonadism in human obesity. *Brain Res Bull* 1994; **34**: 571-574.
- Blondel, B., Supernant, K., Du Mazaubrun, C. and Breart, G. [Trends in perinatal health in metropolitan France between 1995 and 2003: results from the National Perinatal Surveys]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2006; **35**: 373-387.
- Boissonnas, C. C., Abdalaoui, H. E., Haelewyn, V., Fauque, P., Dupont, J. M., Gut, I., *et al.* Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men. *Eur J Hum Genet* 2010; **18**: 73-80.
- Bouret, S. G. Role of early hormonal and nutritional experiences in shaping feeding behavior and hypothalamic development. *J Nutr* 2010; **140**: 653-657.
- Boyes, A. D. and Latner, J. D. Weight stigma in existing romantic relationships. *J Sex Marital Ther* 2009; **35**: 282-293.
- Brahem, S., Mehdi, M., Elghezal, H. and Saad, A. Detection of DNA fragmentation and meiotic segregation in human with isolated teratozoospermia. *J Assist Reprod Genet* 2011; **28**: 41-48.
- Bray, G. A. Obesity and reproduction. *Hum Reprod* 1997; **12 Suppl 1**: 26-32.
- Briana, D. D. and Malamitsi-Puchner, A. The role of adipocytokines in fetal growth. *Ann N Y Acad Sci* 2010; **1205**: 82-87.
- Brzakowski, M., Lourdel, E., Cabry, R., Olieric, M. F., Claeys, C., Devaux, A., *et al.* [Epidemiology of the infertile couple]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2009; **38 Spec No 1-2**: F3-7.
- Bujan, L., Walschaerts, M., Moinard, N., Hennebicq, S., Saias, J., Brugnon, F., *et al.* Impact of chemotherapy and radiotherapy for testicular germ cell tumors on spermatogenesis and sperm DNA: a multicenter prospective study from the CECOS network. *Fertil Steril* 2013; **100**: 673-680 e672.

Burris, H. H., Braun, J. M., Byun, H. M., Tarantini, L., Mercado, A., Wright, R. J., *et al.* Association between birth weight and DNA methylation of IGF2, glucocorticoid receptor and repetitive elements LINE-1 and Alu. *Epigenomics* 2013; **5**: 271-281.

Calle, E. E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K. and Thun, M. J. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003; **348**: 1625-1638.

Camino, J. E., Nogueiras, R., Gaytan, F., Pineda, R., Gonzalez, C. R., Barreiro, M. L., *et al.* Novel expression and direct effects of adiponectin in the rat testis. *Endocrinology* 2008; **149**: 3390-3402.

Cantone, I. and Fisher, A. G. Epigenetic programming and reprogramming during development. *Nat Struct Mol Biol* 2013; **20**: 282-289.

Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N. and Skakkebaek, N. E. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 1992; **305**: 609-613.

Carlsen, S. M. and Vanky, E. Metformin influence on hormone levels at birth, in PCOS mothers and their newborns. *Hum Reprod* 2010; **25**: 786-790.

Carone, B. R., Fauquier, L., Habib, N., Shea, J. M., Hart, C. E., Li, R., *et al.* Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell* 2010; **143**: 1084-1096.

Carrell, D. T., Liu, L., Peterson, C. M., Jones, K. P., Hatasaka, H. H., Erickson, L., *et al.* Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl* 2003; **49**: 49-55.

Castetbon, K., Vernay, M., Malon, A., Salanave, B., Deschamps, V., Roudier, C., *et al.* Dietary intake, physical activity and nutritional status in adults: the French nutrition and health survey (ENNS, 2006-2007). *Br J Nutr* 2009; **102**: 733-743.

Ceriello, A. and Motz, E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; **24**: 816-823.

Chavarro, J. E., Toth, T. L., Wright, D. L., Meeker, J. D. and Hauser, R. Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. *Fertil Steril* 2010; **93**: 2222-2231.

Chu, S. Y., Callaghan, W. M., Kim, S. Y., Schmid, C. H., Lau, J., England, L. J., *et al.* Maternal obesity and risk of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2007; **30**: 2070-2076.

Chughtai, B., Lee, R. K., Te, A. E. and Kaplan, S. A. Metabolic syndrome and sexual dysfunction. *Curr Opin Urol* 2011; **21**: 514-518.

Cianfarani, S., Germani, D. and Branca, F. Low birthweight and adult insulin resistance: the "catch-up growth" hypothesis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999; **81**: F71-73.

Cicognani, A., Alessandrini, R., Pasini, A., Pirazzoli, P., Cassio, A., Barbieri, E., *et al.* Low birth weight for gestational age and subsequent male gonadal function. *J Pediatr* 2002; **141**: 376-379.

Colaci, D. S., Afeiche, M., Gaskins, A. J., Wright, D. L., Toth, T. L., Tanrikut, C., *et al.* Men's body mass index in relation to embryo quality and clinical outcomes in couples undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2012; **98**: 1193-1199 e1191.

Collins, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 2004; **26**: 249-261.

Cooper, T. G., Noonan, E., von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H. W., Behre, H. M., *et al.* World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 2010; **16**: 231-245.

Cordier, A. G., Leveille, P., Dupont, C., Tarrade, A., Picone, O., Larcher, T., *et al.* Dietary lipid and cholesterol induce ovarian dysfunction and abnormal LH response to stimulation in rabbits. *PLoS One* 2013; **8**: e63101.

Corona, G., Rastrelli, G., Monami, M., Saad, F., Luconi, M., Lucchese, M., *et al.* Body weight loss reverts obesity-associated hypogonadotropic hypogonadism: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol* 2013; **168**: 829-843.

Cummings, D. E., Weigle, D. S., Frayo, R. S., Breen, P. A., Ma, M. K., Dellinger, E. P., *et al.* Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 2002; **346**: 1623-1630.

Czernichow, S., Kengne, A. P., Stamatakis, E., Hamer, M. and Batty, G. D. Body mass index, waist circumference and waist-hip ratio: which is the better discriminator of cardiovascular disease mortality risk?: evidence from an individual-participant meta-analysis of 82 864 participants from nine cohort studies. *Obes Rev* 2011; **12**: 680-687.

Da Silva, P., Aitken, R. P., Rhind, S. M., Racey, P. A. and Wallace, J. M. Influence of placentally mediated fetal growth restriction on the onset of puberty in male and female lambs. *Reproduction* 2001; **122**: 375-383.

Da Silva, P., Aitken, R. P., Rhind, S. M., Racey, P. A. and Wallace, J. M. Impact of maternal nutrition during pregnancy on pituitary gonadotrophin gene expression and ovarian development in growth-restricted and normally grown late gestation sheep fetuses. *Reproduction* 2002; **123**: 769-777.

Das, M., Al-Hathal, N., San-Gabriel, M., Phillips, S., Kadoch, I. J., Bissonnette, F., *et al.* High prevalence of isolated sperm DNA damage in infertile men with advanced paternal age. *J Assist Reprod Genet* 2013; **30**: 843-848.

Das, U. N. Is obesity an inflammatory condition? *Nutrition* 2001; **17**: 953-966.

de Bruin, J. P., Dorland, M., Bruinse, H. W., Spliet, W., Nikkels, P. G. and Te Velde, E. R. Fetal growth retardation as a cause of impaired ovarian development. *Early Hum Dev* 1998; **51**: 39-46.

de Kretser, D. M. Male infertility. *Lancet* 1997; **349**: 787-790.

De Lorenzo, A., Del Gobbo, V., Premrov, M. G., Bigioni, M., Galvano, F. and Di Renzo, L. Normal-weight obese syndrome: early inflammation? *Am J Clin Nutr* 2007; **85**: 40-45.

Despres, J. P. and Lemieux, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 2006; **444**: 881-887.

di Frega, A. S., Dale, B., Di Matteo, L. and Wilding, M. Secondary male factor infertility after Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity: case report. *Hum Reprod* 2005; **20**: 997-998.

Di Renzo, L., Galvano, F., Orlandi, C., Bianchi, A., Di Giacomo, C., La Fauci, L., *et al.* Oxidative stress in normal-weight obese syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 2010; **18**: 2125-2130.

Diaz-Arjonilla, M., Schwarcz, M., Swerdloff, R. S. and Wang, C. Obesity, low testosterone levels and erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 2009; **21**: 89-98.

Diouf, I., Charles, M. A., Ducimetiere, P., Basdevant, A., Eschwege, E. and Heude, B. Evolution of obesity prevalence in France: an age-period-cohort analysis. *Epidemiology* 2010; **21**: 360-365.

Dixon, J. B. The effect of obesity on health outcomes. *Mol Cell Endocrinol* 2010; **316**: 104-108.

Djiane, J. and Attig, L. Role of leptin during perinatal metabolic programming and obesity. *J Physiol Pharmacol* 2008; **59 Suppl 1**: 55-63.

Donato, J., Jr., Cravo, R. M., Frazao, R. and Elias, C. F. Hypothalamic sites of leptin action linking metabolism and reproduction. *Neuroendocrinology* 2011; **93**: 9-18.

Dorner, G. and Plagemann, A. Perinatal hyperinsulinism as possible predisposing factor for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life. *Horm Metab Res* 1994; **26**: 213-221.

Druce, M. R., Wren, A. M., Park, A. J., Milton, J. E., Patterson, M., Frost, G., *et al.* Ghrelin increases food intake in obese as well as lean subjects. *Int J Obes (Lond)* 2005; **29**: 1130-1136.

Duits, F. H., van Wely, M., van der Veen, F. and Gianotten, J. Healthy overweight male partners of subfertile couples should not worry about their semen quality. *Fertil Steril* 2010; **94**: 1356-1359.

Dupont, C., Cordier, A. G., Junien, C., Mandon-Pepin, B., Levy, R. and Chavatte-Palmer, P. Maternal environment and the reproductive function of the offspring. *Theriogenology* 2012; **78**: 1405-1414.

Dupont, C., Faure, C., Sermondade, N., Boubaya, M., Eustache, F., Clement, P., *et al.* Obesity leads to higher risk of sperm DNA damage in infertile patients. *Asian J Androl* 2013; **15**: 622-625.

Esposito, K., Giugliano, F., Di Palo, C., Giugliano, G., Marfella, R., D'Andrea, F., *et al.* Effect of lifestyle changes on erectile dysfunction in obese men: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004; **291**: 2978-2984.

Esquela-Kerscher, A. and Slack, F. J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; **6**: 259-269.

Evenson, D. and Jost, L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Sci* 2000; **22**: 169-189.

Evenson, D. and Wixon, R. Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reprod Biomed Online* 2006; **12**: 466-472.

Evenson, D. P. and Wixon, R. Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; **207**: 532-537.

Fariello, R. M., Pariz, J. R., Spaine, D. M., Cedenho, A. P., Bertolla, R. P. and Fraietta, R. Association between obesity and alteration of sperm DNA integrity and mitochondrial activity. *BJU Int* 2012; **110**: 863-867.

Farooqi, I. S., Jebb, S. A., Langmack, G., Lawrence, E., Cheetham, C. H., Prentice, A. M., *et al.* Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* 1999; **341**: 879-884.

Faure, C., Dupont, C., Sermondade, N. and Lévy, R. Antioxydants et infertilité masculine. *Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie* 2011; **13**: 275-283.

Fejes, I., Koloszar, S., Szollosi, J., Zavaczki, Z. and Pal, A. Is semen quality affected by male body fat distribution? *Andrologia* 2005; **37**: 155-159.

Fernandez, J. L., Cajigal, D., Lopez-Fernandez, C. and Gosalvez, J. Assessing sperm DNA fragmentation with the sperm chromatin dispersion test. *Methods Mol Biol* 2011; **682**: 291-301.

Feve, B., Bastard, J. P. and Vidal, H. [Relationship between obesity, inflammation and insulin resistance: new concepts]. *C R Biol* 2006; **329**: 587-597; discussion 653-585.

Finucane, M. M., Stevens, G. A., Cowan, M. J., Danaei, G., Lin, J. K., Paciorek, C. J., *et al.* National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis

of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet* 2011; **377**: 557-567.

Fischer, B., Chavatte-Palmer, P., Viebahn, C., Navarrete Santos, A. and Duranthon, V. Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction* 2012; **144**: 1-10.

Fleming, T. P., Kwong, W. Y., Porter, R., Ursell, E., Fesenko, I., Wilkins, A., *et al.* The embryo and its future. *Biol Reprod* 2004; **71**: 1046-1054.

Fleming, T. P., Velazquez, M. A., Eckert, J. J., Lucas, E. S. and Watkins, A. J. Nutrition of females during the peri-conceptional period and effects on foetal programming and health of offspring. *Anim Reprod Sci* 2012; **130**: 193-197.

Florman, H. M., Jungnickel, M. K. and Sutton, K. A. Regulating the acrosome reaction. *Int J Dev Biol* 2008; **52**: 503-510.

Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; **226**: 497-509.

Forsberg, L., de Faire, U. and Morgenstern, R. Oxidative stress, human genetic variation, and disease. *Arch Biochem Biophys* 2001; **389**: 84-93.

Franco Mdo, C., Dantas, A. P., Akamine, E. H., Kawamoto, E. M., Fortes, Z. B., Scavone, C., *et al.* Enhanced oxidative stress as a potential mechanism underlying the programming of hypertension in utero. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; **40**: 501-509.

Francois, I., de Zegher, F., Spiessens, C., D'Hooghe, T. and Vanderschueren, D. Low birth weight and subsequent male subfertility. *Pediatr Res* 1997; **42**: 899-901.

Frydman, N., Prisant, N., Hesters, L., Frydman, R., Tachdjian, G., Cohen-Bacrie, P., *et al.* Adequate ovarian follicular status does not prevent the decrease in pregnancy rates associated with high sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 2008; **89**: 92-97.

Fullston, T., Ohlsson Teague, E. M., Palmer, N. O., Deblasio, M. J., Mitchell, M., Corbett, M., *et al.* Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F2 generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content. *FASEB J* 2013.

Fullston, T., Palmer, N. O., Owens, J. A., Mitchell, M., Bakos, H. W. and Lane, M. Diet-induced paternal obesity in the absence of diabetes diminishes the reproductive health of two subsequent generations of mice. *Hum Reprod* 2012; **27**: 1391-1400.

Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004; **114**: 1752-1761.

Gabory, A., Attig, L. and Junien, C. Sexual dimorphism in environmental epigenetic programming. *Mol Cell Endocrinol* 2009; **304**: 8-18.

- Gautier, A., Bonnet, F., Dubois, S., Massart, C., Grosheny, C., Bachelot, A., *et al.* Associations between visceral adipose tissue, inflammation and sex steroid concentrations in men. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2013; **78**: 373-378.
- Gil-Campos, M., Canete, R. R. and Gil, A. Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. *Clin Nutr* 2004; **23**: 963-974.
- Gluckman, P. D. and Hanson, M. A. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science* 2004; **305**: 1733-1736.
- Gluckman, P. D., Hanson, M. A., Bateson, P., Beedle, A. S., Law, C. M., Bhutta, Z. A., *et al.* Towards a new developmental synthesis: adaptive developmental plasticity and human disease. *Lancet* 2009; **373**: 1654-1657.
- Gluckman, P. D., Hanson, M. A. and Mitchell, M. D. Developmental origins of health and disease: reducing the burden of chronic disease in the next generation. *Genome Med* 2010; **2**: 14.
- Gnacinska, M., Malgorzewicz, S., Stojek, M., Lysiak-Szydłowska, W. and Sworczak, K. Role of adipokines in complications related to obesity: a review. *Adv Med Sci* 2009; **54**: 150-157.
- Gondos, B. and Conner, L. A. Ultrastructure of developing germ cells in the fetal rabbit testis. *Am J Anat* 1973; **136**: 23-42.
- Goodpaster, B. H., Krishnaswami, S., Harris, T. B., Katsiaras, A., Kritchevsky, S. B., Simonsick, E. M., *et al.* Obesity, regional body fat distribution, and the metabolic syndrome in older men and women. *Arch Intern Med* 2005; **165**: 777-783.
- Gorczyca, W., Gong, J. and Darzynkiewicz, Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 1993; **53**: 1945-1951.
- Grizard, G., Sion, B., Bauchart, D. and Boucher, D. Separation and quantification of cholesterol and major phospholipid classes in human semen by high-performance liquid chromatography and light-scattering detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000; **740**: 101-107.
- Gupta, P., Narang, M., Banerjee, B. D. and Basu, S. Oxidative stress in term small for gestational age neonates born to undernourished mothers: a case control study. *BMC Pediatr* 2004; **4**: 14.
- Hackett, J. A. and Surani, M. A. DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2013; **368**: 20110328.
- Hagiuda, J., Ishikawa, H., Furuuchi, T., Hanawa, Y. and Marumo, K. Relationship between dyslipidaemia and semen quality and serum sex hormone levels: an infertility study of 167 Japanese patients. *Andrologia* 2012.

Hakonsen, L. B., Thulstrup, A. M., Aggerholm, A. S., Olsen, J., Bonde, J. P., Andersen, C. Y., *et al.* Does weight loss improve semen quality and reproductive hormones? Results from a cohort of severely obese men. *Reprod Health* **8**: 24.

Hakonsen, L. B., Thulstrup, A. M., Aggerholm, A. S., Olsen, J., Bonde, J. P., Andersen, C. Y., *et al.* Does weight loss improve semen quality and reproductive hormones? Results from a cohort of severely obese men. *Reprod Health* 2011; **8**: 24.

Hales, C. N. and Barker, D. J. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 2001; **60**: 5-20.

Hamada, A. J., Montgomery, B. and Agarwal, A. Male infertility: a critical review of pharmacologic management. *Expert Opin Pharmacother* 2012; **13**: 2511-2531.

Hammiche, F., Laven, J. S., Boxmeer, J. C., Dohle, G. R., Steegers, E. A. and Steegers-Theunissen, R. P. Sperm quality decline among men below 60 years of age undergoing IVF or ICSI treatment. *J Androl* 2011; **32**: 70-76.

Hammiche, F., Laven, J. S., Twigt, J. M., Boellaard, W. P., Steegers, E. A. and Steegers-Theunissen, R. P. Body mass index and central adiposity are associated with sperm quality in men of subfertile couples. *Hum Reprod* 2012; **27**: 2365-2372.

Hammoud, A. O., Wilde, N., Gibson, M., Parks, A., Carrell, D. T. and Meikle, A. W. Male obesity and alteration in sperm parameters. *Fertil Steril* 2008; **90**: 2222-2225.

Handel, M. L., Watts, C. K., deFazio, A., Day, R. O. and Sutherland, R. L. Inhibition of AP-1 binding and transcription by gold and selenium involving conserved cysteine residues in Jun and Fos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 4497-4501.

Hannan, J. L., Maio, M. T., Komolova, M. and Adams, M. A. Beneficial impact of exercise and obesity interventions on erectile function and its risk factors. *J Sex Med* 2009; **6 Suppl 3**: 254-261.

HAS. Surpoids et obésité de l'adulte : prise en charge médicale de premier recours. *Recommandation de bonne pratique* 2011.

Hautanen, A. Synthesis and regulation of sex hormone-binding globulin in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; **24 Suppl 2**: S64-70.

Hedger, M. P. Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis. *J Androl* 2011; **32**: 625-640.

Heijmans, B. T., Tobi, E. W., Stein, A. D., Putter, H., Blauw, G. J., Susser, E. S., *et al.* Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 17046-17049.

Heslehurst, N., Rankin, J., Wilkinson, J. R. and Summerbell, C. D. A nationally representative study of maternal obesity in England, UK: trends in incidence and

demographic inequalities in 619 323 births, 1989-2007. *Int J Obes (Lond)* 2010; **34**: 420-428.

Hill, A. M., LaForgia, J., Coates, A. M., Buckley, J. D. and Howe, P. R. Estimating abdominal adipose tissue with DXA and anthropometry. *Obesity (Silver Spring)* 2007; **15**: 504-510.

Hinney, A., Vogel, C. I. and Hebebrand, J. From monogenic to polygenic obesity: recent advances. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2010; **19**: 297-310.

Hoffer, L. J., Beitins, I. Z., Kyung, N. H. and Bistran, B. R. Effects of severe dietary restriction on male reproductive hormones. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; **62**: 288-292.

Hofny, E. R., Ali, M. E., Abdel-Hafez, H. Z., Kamal Eel, D., Mohamed, E. E., Abd El-Azeem, H. G., *et al.* Semen parameters and hormonal profile in obese fertile and infertile males. *Fertil Steril* 2010; **94**: 581-584.

Hoyo, C., Fortner, K., Murtha, A. P., Schildkraut, J. M., Soubry, A., Demark-Wahnefried, W., *et al.* Association of cord blood methylation fractions at imprinted insulin-like growth factor 2 (IGF2), plasma IGF2, and birth weight. *Cancer Causes Control* 2012; **23**: 635-645.

Hue-Beauvais, C., Chavatte-Palmer, P., Aujean, E., Dahirel, M., Laigre, P., Pechoux, C., *et al.* An obesogenic diet started before puberty leads to abnormal mammary gland development during pregnancy in the rabbit. *Dev Dyn* 2011; **240**: 347-356.

Hult, M., Tornhammar, P., Ueda, P., Chima, C., Bonamy, A. K., Ozumba, B., *et al.* Hypertension, diabetes and overweight: looming legacies of the Biafran famine. *PLoS One* 2010; **5**: e13582.

Huszar, G., Ozkavukcu, S., Jakab, A., Celik-Ozenci, C., Sati, G. L. and Cayli, S. Hyaluronic acid binding ability of human sperm reflects cellular maturity and fertilizing potential: selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006; **18**: 260-267.

Ibanez, L. and de Zegher, F. Puberty and prenatal growth. *Mol Cell Endocrinol* 2006; **254-255**: 22-25.

Igosheva, N., Abramov, A. Y., Poston, L., Eckert, J. J., Fleming, T. P., Duchon, M. R., *et al.* Maternal diet-induced obesity alters mitochondrial activity and redox status in mouse oocytes and zygotes. *PLoS One* 2010; **5**: e10074.

Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A. and Okabe, M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 2005; **434**: 234-238.

INSERM and ABM. Les troubles de la fertilité. Etat des connaissances et pistes pour la recherche. *Rapport* 2012.

Isidori, A. M., Caprio, M., Strollo, F., Moretti, C., Frajese, G., Isidori, A., *et al.* Leptin and androgens in male obesity: evidence for leptin contribution to reduced androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; **84**: 3673-3680.

Jammes, H., Junien, C. and Chavatte-Palmer, P. Epigenetic control of development and expression of quantitative traits. *Reprod Fertil Dev* 2011; **23**: 64-74.

Jegou, B. and Pineau, C. Current aspects of autocrine and paracrine regulation of spermatogenesis. *Adv Exp Med Biol* 1995; **377**: 67-86.

Jenkins, T. G. and Carrell, D. T. The paternal epigenome and embryogenesis: poisoning mechanisms for development. *Asian J Androl* 2011; **13**: 76-80.

Jensen, T. K., Andersson, A. M., Jorgensen, N., Andersen, A. G., Carlsen, E., Petersen, J. H., *et al.* Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil Steril* 2004; **82**: 863-870.

Jimenez-Chillaron, J. C., Isganaitis, E., Charalambous, M., Gesta, S., Pentinat-Pelegrin, T., Faucette, R. R., *et al.* Intergenerational transmission of glucose intolerance and obesity by in utero undernutrition in mice. *Diabetes* 2009; **58**: 460-468.

Jost, A., Perlman, S. and Magre, S. The initial stages of testicular differentiation in the rabbit fetus. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 1985; **74**: 69-75.

Junien, C., Gabory, A. and Attig, L. [Sexual dimorphism in the XXI(st) century]. *Med Sci (Paris)* 2012; **28**: 185-192.

Kaati, G., Bygren, L. O. and Edvinsson, S. Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *Eur J Hum Genet* 2002; **10**: 682-688.

Kaati, G., Bygren, L. O., Pembrey, M. and Sjostrom, M. Transgenerational response to nutrition, early life circumstances and longevity. *Eur J Hum Genet* 2007; **15**: 784-790.

Karakosta, P., Georgiou, V., Fthenou, E., Papadopoulou, E., Roumeliotaki, T., Margioris, A., *et al.* Maternal weight status, cord blood leptin and fetal growth: a prospective mother-child cohort study (rhea study). *Paediatr Perinat Epidemiol* 2013; **27**: 461-471.

Karelis, A. D., St-Pierre, D. H., Conus, F., Rabasa-Lhoret, R. and Poehlman, E. T. Metabolic and body composition factors in subgroups of obesity: what do we know? *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**: 2569-2575.

Kaser, S., Kaser, A., Sandhofer, A., Ebenbichler, C. F., Tilg, H. and Patsch, J. R. Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **309**: 286-290.

Kasturi, S. S., Tannir, J. and Brannigan, R. E. The metabolic syndrome and male infertility. *J Androl* 2008; **29**: 251-259.

Kaukua, J., Pekkarinen, T., Sane, T. and Mustajoki, P. Sex hormones and sexual function in obese men losing weight. *Obes Res* 2003; **11**: 689-694.

- Keim, S. A., Branum, A. M., Klebanoff, M. A. and Zemel, B. S. Maternal body mass index and daughters' age at menarche. *Epidemiology* 2009; **20**: 677-681.
- Keltz, J., Zapantis, A., Jindal, S. K., Lieman, H. J., Santoro, N. and Polotsky, A. J. Overweight men: clinical pregnancy after ART is decreased in IVF but not in ICSI cycles. *J Assist Reprod Genet* 2010; **27**: 539-544.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H. and Kangawa, K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; **402**: 656-660.
- Kort, H. I., Massey, J. B., Elsner, C. W., Mitchell-Leef, D., Shapiro, D. B., Witt, M. A., *et al.* Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl* 2006; **27**: 450-452.
- Kotsampasi, B., Balaskas, C., Papadomichelakis, G. and Chadio, S. E. Reduced Sertoli cell number and altered pituitary responsiveness in male lambs undernourished in utero. *Anim Reprod Sci* 2009; **114**: 135-147.
- Koukoura, O., Sifakis, S., Soufla, G., Zaravinos, A., Apostolidou, S., Jones, A., *et al.* Loss of imprinting and aberrant methylation of IGF2 in placentas from pregnancies complicated with fetal growth restriction. *Int J Mol Med* 2011; **28**: 481-487.
- Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007; **128**: 693-705.
- Kraemer, W. J., Volek, J. S., Clark, K. L., Gordon, S. E., Puhl, S. M., Koziris, L. P., *et al.* Influence of exercise training on physiological and performance changes with weight loss in men. *Med Sci Sports Exerc* 1999; **31**: 1320-1329.
- Kwong, W. Y., Miller, D. J., Ursell, E., Wild, A. E., Wilkins, A. P., Osmond, C., *et al.* Imprinted gene expression in the rat embryo-fetal axis is altered in response to periconceptual maternal low protein diet. *Reproduction* 2006; **132**: 265-277.
- Kwong, W. Y., Wild, A. E., Roberts, P., Willis, A. C. and Fleming, T. P. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development* 2000; **127**: 4195-4202.
- Kyle, U. G., Bosaeus, I., De Lorenzo, A. D., Deurenberg, P., Elia, M., Gomez, J. M., *et al.* Bioelectrical impedance analysis--part I: review of principles and methods. *Clin Nutr* 2004; **23**: 1226-1243.
- La Vignera, S., Condorelli, R. A., Vicari, E. and Calogero, A. E. Negative effect of increased body weight on sperm conventional and nonconventional flow cytometric sperm parameters. *J Androl* 2012; **33**: 53-58.
- Lager, S. and Powell, T. L. Regulation of nutrient transport across the placenta. *J Pregnancy* 2012; **2012**: 179827.

- Lampiao, F. and du Plessis, S. S. Insulin and leptin enhance human sperm motility, acrosome reaction and nitric oxide production. *Asian J Androl* 2008; **10**: 799-807.
- Landry, D., Cloutier, F. and Martin, L. J. Implications of leptin in neuroendocrine regulation of male reproduction. *Reprod Biol* 2013; **13**: 1-14.
- Lanzafame, F. M., La Vignera, S., Vicari, E. and Calogero, A. E. Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility. *Reprod Biomed Online* 2009; **19**: 638-659.
- Lazaros, L., Hatzi, E., Markoula, S., Takenaka, A., Sofikitis, N., Zikopoulos, K., *et al.* Dramatic reduction in sperm parameters following bariatric surgery: report of two cases. *Andrologia* 2012; **44**: 428-432.
- Lee, J. H., Reed, D. R. and Price, R. A. Familial risk ratios for extreme obesity: implications for mapping human obesity genes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997; **21**: 935-940.
- Leese, H. J., Hugentobler, S. A., Gray, S. M., Morris, D. G., Sturmey, R. G., Whitear, S. L., *et al.* Female reproductive tract fluids: composition, mechanism of formation and potential role in the developmental origins of health and disease. *Reprod Fertil Dev* 2008; **20**: 1-8.
- Leisegang, K., Udodong, A., Bouic, P. J. and Henkel, R. R. Effect of the metabolic syndrome on male reproductive function: a case-controlled pilot study. *Andrologia* 2012.
- Li, H. W., Chiu, P. C., Cheung, M. P., Yeung, W. S. and O, W. S. Effect of leptin on motility, capacitation and acrosome reaction of human spermatozoa. *Int J Androl* 2009a; **32**: 687-694.
- Li, Y., Lin, H., Ma, M., Li, L., Cai, M., Zhou, N., *et al.* Semen quality of 1346 healthy men, results from the Chongqing area of southwest China. *Hum Reprod* 2009b; **24**: 459-469.
- Liu, D. Y., Garrett, C. and Baker, H. W. Clinical application of sperm-oocyte interaction tests in in vitro fertilization--embryo transfer and intracytoplasmic sperm injection programs. *Fertil Steril* 2004; **82**: 1251-1263.
- Lumey, L. H. Compensatory placental growth after restricted maternal nutrition in early pregnancy. *Placenta* 1998; **19**: 105-111.
- Lumey, L. H. and Stein, A. D. Offspring birth weights after maternal intrauterine undernutrition: a comparison within sibships. *Am J Epidemiol* 1997; **146**: 810-819.
- Luo, Z. C., Fraser, W. D., Julien, P., Deal, C. L., Audibert, F., Smith, G. N., *et al.* Tracing the origins of "fetal origins" of adult diseases: programming by oxidative stress? *Med Hypotheses* 2006; **66**: 38-44.
- Lussana, F., Painter, R. C., Ocke, M. C., Buller, H. R., Bossuyt, P. M. and Roseboom, T. J. Prenatal exposure to the Dutch famine is associated with a preference for fatty foods and a more atherogenic lipid profile. *Am J Clin Nutr* 2008; **88**: 1648-1652.

Ma, N. and Hardy, D. B. The fetal origins of the metabolic syndrome: can we intervene? *J Pregnancy* 2012; **2012**: 482690.

MacDonald, A. A., Herbison, G. P., Showell, M. and Farquhar, C. M. The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2010; **16**: 293-311.

Mantzoros, C. S., Flier, J. S. and Rogol, A. D. A longitudinal assessment of hormonal and physical alterations during normal puberty in boys. V. Rising leptin levels may signal the onset of puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 1066-1070.

Marcon, L. and Boissonneault, G. Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod* 2004; **70**: 910-918.

Martin-Gronert, M. S. and Ozanne, S. E. Mechanisms underlying the developmental origins of disease. *Rev Endocr Metab Disord* 2012; **13**: 85-92.

Martini, A. C., Tissera, A., Estofan, D., Molina, R. I., Mangeaud, A., de Cuneo, M. F., *et al.* Overweight and seminal quality: a study of 794 patients. *Fertil Steril* 2010; **94**: 1739-1743.

Masuoka, H. C. and Chalasani, N. Nonalcoholic fatty liver disease: an emerging threat to obese and diabetic individuals. *Ann N Y Acad Sci* 2013; **1281**: 106-122.

McKay, J. A. and Mathers, J. C. Diet induced epigenetic changes and their implications for health. *Acta Physiol (Oxf)* 2011; **202**: 103-118.

Melissas, J., Malliaraki, N., Papadakis, J. A., Taflampas, P., Kampa, M. and Castanas, E. Plasma antioxidant capacity in morbidly obese patients before and after weight loss. *Obes Surg* 2006; **16**: 314-320.

Mieusset, R. and Bujan, L. Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. *Int J Androl* 1995; **18**: 169-184.

Mitchell, M., Bakos, H. W. and Lane, M. Paternal diet-induced obesity impairs embryo development and implantation in the mouse. *Fertil Steril* 2011; **95**: 1349-1353.

Monteiro, R. and Azevedo, I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators Inflamm* 2010; **2010**.

Montorsi, P., Ravagnani, P. M., Galli, S., Rotatori, F., Veglia, F., Briganti, A., *et al.* Association between erectile dysfunction and coronary artery disease. Role of coronary clinical presentation and extent of coronary vessels involvement: the COBRA trial. *Eur Heart J* 2006; **27**: 2632-2639.

Mora, M., Aranda, G. B., de Hollanda, A., Flores, L., Puig-Domingo, M. and Vidal, J. Weight loss is a major contributor to improved sexual function after bariatric surgery. *Surg Endosc* 2013; **27**: 3197-3204.

Morgante, G., Tosti, C., Orvieto, R., Musacchio, M. C., Piomboni, P. and De Leo, V. Metformin improves semen characteristics of oligo-terato-asthenozoospermic men with metabolic syndrome. *Fertil Steril* 2011; **95**: 2150-2152.

Muratori, M., Marchiani, S., Tamburrino, L., Tocci, V., Failli, P., Forti, G., *et al.* Nuclear staining identifies two populations of human sperm with different DNA fragmentation extent and relationship with semen parameters. *Hum Reprod* 2008; **23**: 1035-1043.

Nakao, Y. M., Miyawaki, T., Yasuno, S., Nakao, K., Tanaka, S., Ida, M., *et al.* Intra-abdominal fat area is a predictor for new onset of individual components of metabolic syndrome: METabolic syndROME and abdominal Obesity (MERLOT study). *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2012; **88**: 454-461.

Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K., *et al.* A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; **409**: 194-198.

National Institute for clinical excellence. Obesity : guidance on the prevention, identification, assessment and management of overweight and obesity in adults and children *NICE clinical guideline 43* 2006.

National Taskforce on Obesity. Obesity - the policy challenges. *The report of the National Taskforce on Obesity* 2005.

Neff, K. J. and le Roux, C. W. Bariatric surgery: a best practice article. *J Clin Pathol* 2013; **66**: 90-98.

Ng, S. F., Lin, R. C., Laybutt, D. R., Barres, R., Owens, J. A. and Morris, M. J. Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* 2010; **467**: 963-966.

Nguyen, R. H., Wilcox, A. J., Skjaerven, R. and Baird, D. D. Men's body mass index and infertility. *Hum Reprod* 2007; **22**: 2488-2493.

Niskanen, L., Laaksonen, D. E., Punnonen, K., Mustajoki, P., Kaukua, J. and Rissanen, A. Changes in sex hormone-binding globulin and testosterone during weight loss and weight maintenance in abdominally obese men with the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab* 2004; **6**: 208-215.

Nogueiras, R., Barreiro, M. L., Caminos, J. E., Gaytan, F., Suominen, J. S., Navarro, V. M., *et al.* Novel expression of resistin in rat testis: functional role and regulation by nutritional status and hormonal factors. *J Cell Sci* 2004; **117**: 3247-3257.

Nohr, E. A., Vaeth, M., Rasmussen, S., Ramlau-Hansen, C. H. and Olsen, J. Waiting time to pregnancy according to maternal birthweight and prepregnancy BMI. *Hum Reprod* 2009; **24**: 226-232.

Novakovic, B., Yuen, R. K., Gordon, L., Penaherrera, M. S., Sharkey, A., Moffett, A., *et al.* Evidence for widespread changes in promoter methylation profile in human placenta in

response to increasing gestational age and environmental/stochastic factors. *BMC Genomics* 2011; **12**: 529.

O'Bryan, M. K. and Hedger, M. P. Inflammatory networks in the control of spermatogenesis : chronic inflammation in an immunologically privileged tissue? *Adv Exp Med Biol* 2008; **636**: 92-114.

O'Rourke, R. W. Inflammation in obesity-related diseases. *Surgery* 2009; **145**: 255-259.

O'Shaughnessy, P. J. and Fowler, P. A. Endocrinology of the mammalian fetal testis. *Reproduction* 2011; **141**: 37-46.

ObEpi. Enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité. *Une enquête INSERM / KANTAR HEALTH / ROCHE* 2012.

Ohlsson, C., Lorentzon, M., Norjavaara, E. and Kindblom, J. M. Age at adiposity rebound is associated with fat mass in young adult males-the GOOD study. *PLoS One* 2012; **7**: e49404.

Okamoto, I., Otte, A. P., Allis, C. D., Reinberg, D. and Heard, E. Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science* 2004; **303**: 644-649.

Oken, E., Taveras, E. M., Kleinman, K. P., Rich-Edwards, J. W. and Gillman, M. W. Gestational weight gain and child adiposity at age 3 years. *Am J Obstet Gynecol* 2007; **196**: 322 e321-328.

Padron, R. S., Mas, J., Zamora, R., Riverol, F., Licea, M., Mallea, L., *et al.* Lipids and testicular function. *Int Urol Nephrol* 1989; **21**: 515-519.

Painter, R. C., Osmond, C., Gluckman, P., Hanson, M., Phillips, D. I. and Roseboom, T. J. Transgenerational effects of prenatal exposure to the Dutch famine on neonatal adiposity and health in later life. *BJOG* 2008; **115**: 1243-1249.

Painter, R. C., Roseboom, T. J. and Bleker, O. P. Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview. *Reprod Toxicol* 2005; **20**: 345-352.

Palinski, W., D'Armiento, F. P., Witztum, J. L., de Nigris, F., Casanada, F., Condorelli, M., *et al.* Maternal hypercholesterolemia and treatment during pregnancy influence the long-term progression of atherosclerosis in offspring of rabbits. *Circ Res* 2001; **89**: 991-996.

Palmer, N. O., Bakos, H. W., Owens, J. A., Setchell, B. P. and Lane, M. Diet and exercise in an obese mouse fed a high-fat diet improve metabolic health and reverse perturbed sperm function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; **302**: E768-780.

Patel, L., Buckels, A. C., Kinghorn, I. J., Murdock, P. R., Holbrook, J. D., Plumpton, C., *et al.* Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **300**: 472-476.

Patrat, C., Serres, C. and Jouannet, P. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol Cell* 2000; **92**: 255-266.

Pellitero, S., Olaizola, I., Alastrue, A., Martinez, E., Granada, M. L., Balibrea, J. M., *et al.* Hypogonadotropic hypogonadism in morbidly obese males is reversed after bariatric surgery. *Obes Surg* 2012; **22**: 1835-1842.

Petersen, G. L., Schmidt, L., Pinborg, A. and Kamper-Jorgensen, M. The influence of female and male body mass index on live births after assisted reproductive technology treatment: a nationwide register-based cohort study. *Fertil Steril* 2013; **99**: 1654-1662.

Philipps, L. H., Santhakumaran, S., Gale, C., Prior, E., Logan, K. M., Hyde, M. J., *et al.* The diabetic pregnancy and offspring BMI in childhood: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia* 2011; **54**: 1957-1966.

Phillips, D. M. The presence of acetyl groups of histones. *Biochem J* 1963; **87**: 258-263.

Picone, O., Laigre, P., Fortun-Lamothe, L., Archilla, C., Peynot, N., Ponter, A. A., *et al.* Hyperlipidic hypercholesterolemic diet in prepubertal rabbits affects gene expression in the embryo, restricts fetal growth and increases offspring susceptibility to obesity. *Theriogenology* 2011; **75**: 287-299.

Pinheiro, A. R., Salvucci, I. D., Aguila, M. B. and Mandarim-de-Lacerda, C. A. Protein restriction during gestation and/or lactation causes adverse transgenerational effects on biometry and glucose metabolism in F1 and F2 progenies of rats. *Clin Sci (Lond)* 2008; **114**: 381-392.

Pitteloud, N., Hardin, M., Dwyer, A. A., Valassi, E., Yialamas, M., Elahi, D., *et al.* Increasing insulin resistance is associated with a decrease in Leydig cell testosterone secretion in men. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; **90**: 2636-2641.

Plagemann, A., Harder, T., Schellong, K., Schulz, S. and Stupin, J. H. Early postnatal life as a critical time window for determination of long-term metabolic health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2012; **26**: 641-653.

Poston, L. Maternal obesity, gestational weight gain and diet as determinants of offspring long term health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2012; **26**: 627-639.

Psilopanagioti, A., Papadaki, H., Kranioti, E. F., Alexandrides, T. K. and Varakis, J. N. Expression of adiponectin and adiponectin receptors in human pituitary gland and brain. *Neuroendocrinology* 2009; **89**: 38-47.

Rae, M. T., Kyle, C. E., Miller, D. W., Hammond, A. J., Brooks, A. N. and Rhind, S. M. The effects of undernutrition, in utero, on reproductive function in adult male and female sheep. *Anim Reprod Sci* 2002; **72**: 63-71.

Rae, M. T., Palassio, S., Kyle, C. E., Brooks, A. N., Lea, R. G., Miller, D. W., *et al.* Effect of maternal undernutrition during pregnancy on early ovarian development and subsequent follicular development in sheep fetuses. *Reproduction* 2001; **122**: 915-922.

Ramasamy, R., Bryson, C., Reifsnnyder, J. E., Neri, Q., Palermo, G. D. and Schlegel, P. N. Overweight men with nonobstructive azoospermia have worse pregnancy outcomes after microdissection testicular sperm extraction. *Fertil Steril* 2013; **99**: 372-376.

Ramirez-Torres, M. A., Carrera, A. and Zambrana, M. [High incidence of hyperestrogenemia and dyslipidemia in a group of infertile men]. *Ginecol Obstet Mex* 2000; **68**: 224-229.

Ramlau-Hansen, C. H., Nohr, E. A., Thulstrup, A. M., Bonde, J. P., Storgaard, L. and Olsen, J. Is maternal obesity related to semen quality in the male offspring? A pilot study. *Hum Reprod* 2007a; **22**: 2758-2762.

Ramlau-Hansen, C. H., Thulstrup, A. M., Nohr, E. A., Bonde, J. P., Sorensen, T. I. and Olsen, J. Subfecundity in overweight and obese couples. *Hum Reprod* 2007b; **22**: 1634-1637.

Rankinen, T., Zuberi, A., Chagnon, Y. C., Weisnagel, S. J., Argyropoulos, G., Walts, B., *et al.* The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)* 2006; **14**: 529-644.

Ray-Gallet, D., Gerard, A., Polo, S. and Almouzni, G. [Variations on the topic of the "histone code"]. *Med Sci (Paris)* 2005; **21**: 384-389.

Reis, L. O., Zani, E. L., Saad, R. D., Chaim, E. A., de Oliveira, L. C. and Fregonesi, A. Bariatric surgery does not interfere with sperm quality--a preliminary long-term study. *Reprod Sci* 2012; **19**: 1057-1062.

Relwani, R., Berger, D., Santoro, N., Hickmon, C., Nihsen, M., Zapantis, A., *et al.* Semen parameters are unrelated to BMI but vary with SSRI use and prior urological surgery. *Reprod Sci* 2011; **18**: 391-397.

Remacle, C., Dumortier, O., Bol, V., Goosse, K., Romanus, P., Theys, N., *et al.* Intrauterine programming of the endocrine pancreas. *Diabetes Obes Metab* 2007; **9 Suppl 2**: 196-209.

Reverchon, M., Maillard, V., Froment, P., Rame, C. and Dupont, J. [Adiponectin and resistin: a role in the reproductive functions?]. *Med Sci (Paris)* 2013; **29**: 417-424.

Reynolds, R. M., Allan, K. M., Raja, E. A., Bhattacharya, S., McNeill, G., Hannaford, P. C., *et al.* Maternal obesity during pregnancy and premature mortality from cardiovascular event in adult offspring: follow-up of 1 323 275 person years. *BMJ* 2013; **347**: f4539.

Rich-Edwards, J. W., Goldman, M. B., Willett, W. C., Hunter, D. J., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., *et al.* Adolescent body mass index and infertility caused by ovulatory disorder. *Am J Obstet Gynecol* 1994; **171**: 171-177.

Ro, T. B., Ludvigsen, H. V., Carlsen, S. M. and Vanky, E. Growth, body composition and metabolic profile of 8-year-old children exposed to metformin in utero. *Scand J Clin Lab Invest* 2012; **72**: 570-575.

Robeva, R., Tomova, A., Kirilov, G. and Kumanov, P. Anti-Mullerian hormone and inhibin B levels reflect altered Sertoli cell function in men with metabolic syndrome. *Andrologia* 2012; **44 Suppl 1**: 329-334.

Robker, R. L., Akison, L. K., Bennett, B. D., Thrupp, P. N., Chura, L. R., Russell, D. L., *et al.* Obese women exhibit differences in ovarian metabolites, hormones, and gene expression compared with moderate-weight women. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; **94**: 1533-1540.

Rolland, M., Le Moal, J., Wagner, V., Royere, D. and De Mouzon, J. Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26,609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. *Hum Reprod* 2013; **28**: 462-470.

Rolland-Cachera, M. F. and Peneau, S. Growth trajectories associated with adult obesity. *World Rev Nutr Diet* 2013; **106**: 127-134.

Rooney, K. and Ozanne, S. E. Maternal over-nutrition and offspring obesity predisposition: targets for preventative interventions. *Int J Obes (Lond)* 2011; **35**: 883-890.

Roseboom, T., de Rooij, S. and Painter, R. The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. *Early Hum Dev* 2006; **82**: 485-491.

Rowan, J. A., Rush, E. C., Obolonkin, V., Battin, M., Wouldes, T. and Hague, W. M. Metformin in gestational diabetes: the offspring follow-up (MiG TOFU): body composition at 2 years of age. *Diabetes Care* 2011; **34**: 2279-2284.

Rubinstein, E., Ziyat, A., Wolf, J. P., Le Naour, F. and Boucheix, C. The molecular players of sperm-egg fusion in mammals. *Semin Cell Dev Biol* 2006; **17**: 254-263.

Rudich, A., Kanety, H. and Bashan, N. Adipose stress-sensing kinases: linking obesity to malfunction. *Trends Endocrinol Metab* 2007; **18**: 291-299.

Rybar, R., Kopecka, V., Prinosilova, P., Markova, P. and Rubes, J. Male obesity and age in relationship to semen parameters and sperm chromatin integrity. *Andrologia* 2011; **43**: 286-291.

Sabin, M. A., Werther, G. A. and Kiess, W. Genetics of obesity and overgrowth syndromes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011; **25**: 207-220.

Saez Lancellotti, T. E., Boarelli, P. V., Monclus, M. A., Cabrillana, M. E., Clementi, M. A., Espinola, L. S., *et al.* Hypercholesterolemia impaired sperm functionality in rabbits. *PLoS One* 2010; **5**: e13457.

Sailer, B. L., Sarkar, L. J., Bjordahl, J. A., Jost, L. K. and Evenson, D. P. Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *J Androl* 1997; **18**: 294-301.

Sakkas, D. and Alvarez, J. G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010; **93**: 1027-1036.

Sakkas, D., Seli, E., Bizzaro, D., Tarozzi, N. and Manicardi, G. C. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 2003; **7**: 428-432.

Sallmen, M., Sandler, D. P., Hoppin, J. A., Blair, A. and Baird, D. D. Reduced fertility among overweight and obese men. *Epidemiology* 2006; **17**: 520-523.

Sandovici, I., Hoelle, K., Angiolini, E. and Constancia, M. Placental adaptations to the maternal-fetal environment: implications for fetal growth and developmental programming. *Reprod Biomed Online* 2012; **25**: 68-89.

Schneider, E., Pliushch, G., El Hajj, N., Galetzka, D., Puhl, A., Schorsch, M., *et al.* Spatial, temporal and interindividual epigenetic variation of functionally important DNA methylation patterns. *Nucleic Acids Res* 2010; **38**: 3880-3890.

Schug, T. T., Barouki, R., Gluckman, P. D., Grandjean, P., Hanson, M. and Heindel, J. J. PPTOX III: environmental stressors in the developmental origins of disease--evidence and mechanisms. *Toxicol Sci* 2013; **131**: 343-350.

Seidell, J. C., Bakker, C. J. and van der Kooy, K. Imaging techniques for measuring adipose-tissue distribution--a comparison between computed tomography and 1.5-T magnetic resonance. *Am J Clin Nutr* 1990; **51**: 953-957.

Sekhavat, L. and Moein, M. R. The effect of male body mass index on sperm parameters. *Aging Male* 2010; **13**: 155-158.

Seli, E., Gardner, D. K., Schoolcraft, W. B., Moffatt, O. and Sakkas, D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004; **82**: 378-383.

Sepaniak, S., Forges, T., Gerard, H., Foliguet, B., Bene, M. C. and Monnier-Barbarino, P. The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation. *Toxicology* 2006; **223**: 54-60.

Sermondade, N., Dupont, C., Faure, C., Boubaya, M., Cedrin-Durnerin, I., Chavatte-Palmer, P., *et al.* Body mass index is not associated with sperm-zona pellucida binding ability in subfertile males. *Asian J Androl* 2013a; **15**: 626-629.

Sermondade, N., Faure, C., Fezeu, L., Levy, R. and Czernichow, S. Obesity and increased risk for oligozoospermia and azoospermia. *Arch Intern Med* 2012a; **172**: 440-442.

Sermondade, N., Faure, C., Fezeu, L., Shayeb, A. G., Bonde, J. P., Jensen, T. K., *et al.* BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2013b; **19**: 221-231.

Sermondade, N., Massin, N., Boitrelle, F., Pfeffer, J., Eustache, F., Sifer, C., *et al.* Sperm parameters and male fertility after bariatric surgery: three case series. *Reprod Biomed Online* 2012b; **24**: 206-210.

Shamsi, M. B., Kumar, R. and Dada, R. Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian J Med Res* 2008; **127**: 115-123.

Sharpe, R. M. Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010; **365**: 1697-1712.

Sharpe, R. M., McKinnell, C., Kivlin, C. and Fisher, J. S. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 2003; **125**: 769-784.

Shayeb, A. G., Harrild, K., Mathers, E. and Bhattacharya, S. An exploration of the association between male body mass index and semen quality. *Reprod Biomed Online* 2011; **23**: 717-723.

Shuster, A., Patlas, M., Pinthus, J. H. and Mourtzakis, M. The clinical importance of visceral adiposity: a critical review of methods for visceral adipose tissue analysis. *Br J Radiol* 2012; **85**: 1-10.

Sifer, C., Sasportes, T., Barraud, V., Poncelet, C., Rudant, J., Porcher, R., *et al.* World Health Organization grade 'a' motility and zona-binding test accurately predict IVF outcome for mild male factor and unexplained infertilities. *Hum Reprod* 2005; **20**: 2769-2775.

Signorelli, J., Diaz, E. S. and Morales, P. Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation. *Cell Tissue Res* 2012; **349**: 765-782.

Silva, P. F. and Gadella, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 2006; **65**: 958-978.

Singer, G. and Granger, D. N. Inflammatory responses underlying the microvascular dysfunction associated with obesity and insulin resistance. *Microcirculation* 2007; **14**: 375-387.

Singhal, A. and Lanigan, J. Breastfeeding, early growth and later obesity. *Obes Rev* 2007; **8 Suppl 1**: 51-54.

Skinner, M. K. Fathers' nutritional legacy. *Nature* 2010; **467**: 922-923.

Slama, R., Ducot, B., Keiding, N., Blondel, B. and Bouyer, J. La fertilité des couples en France. *BEH* 2012a: 87-91.

Slama, R., Hansen, O. K., Ducot, B., Bohet, A., Sorensen, D., Giorgis Allemand, L., *et al.* Estimation of the frequency of involuntary infertility on a nation-wide basis. *Hum Reprod* 2012b; **27**: 1489-1498.

Smith, F. M., Garfield, A. S. and Ward, A. Regulation of growth and metabolism by imprinted genes. *Cytogenet Genome Res* 2006; **113**: 279-291.

Smith, Z. D. and Meissner, A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet* 2013; **14**: 204-220.

Soubry, A., Schildkraut, J. M., Murtha, A., Wang, F., Huang, Z., Bernal, A., *et al.* Paternal obesity is associated with IGF2 hypomethylation in newborns: results from a Newborn Epigenetics Study (NEST) cohort. *BMC Med* 2013; **11**: 29.

Speliotes, E. K., Willer, C. J., Berndt, S. I., Monda, K. L., Thorleifsson, G., Jackson, A. U., *et al.* Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet* 2010; **42**: 937-948.

Spingart, C., Frapsauce, C., Veau, S., Barthelemy, C., Royere, D. and Guerif, F. Semen variation in a population of fertile donors: evaluation in a French centre over a 34-year period. *Int J Androl* 2012; **35**: 467-474.

Steegers-Theunissen, R. P., Twigt, J., Pestinger, V. and Sinclair, K. D. The periconceptional period, reproduction and long-term health of offspring: the importance of one-carbon metabolism. *Hum Reprod Update* 2013.

Swan, S. H. and Elkin, E. P. Declining semen quality: can the past inform the present? *Bioessays* 1999; **21**: 614-621.

Tang, T., Lord, J. M., Norman, R. J., Yasmin, E. and Balen, A. H. Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; **5**: CD003053.

Tartarin, P., Moison, D., Guibert, E., Dupont, J., Habert, R., Rouiller-Fabre, V., *et al.* Metformin exposure affects human and mouse fetal testicular cells. *Hum Reprod* 2012; **27**: 3304-3314.

Teerds, K. J., de Rooij, D. G. and Keijer, J. Functional relationship between obesity and male reproduction: from humans to animal models. *Hum Reprod Update* 2011; **17**: 667-683.

Tena-Sempere, M. Roles of ghrelin and leptin in the control of reproductive function. *Neuroendocrinology* 2007; **86**: 229-241.

Tena-Sempere, M., Pinilla, L., Gonzalez, L. C., Dieguez, C., Casanueva, F. F. and Aguilar, E. Leptin inhibits testosterone secretion from adult rat testis in vitro. *J Endocrinol* 1999; **161**: 211-218.

Thonneau, P., Marchand, S., Tallec, A., Ferial, M. L., Ducot, B., Lansac, J., *et al.* Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod* 1991; **6**: 811-816.

Tobi, E. W., Lumey, L. H., Talens, R. P., Kremer, D., Putter, H., Stein, A. D., *et al.* DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Hum Mol Genet* 2009; **18**: 4046-4053.

Torrens, C., Poston, L. and Hanson, M. A. Transmission of raised blood pressure and endothelial dysfunction to the F2 generation induced by maternal protein restriction in the F0, in the absence of dietary challenge in the F1 generation. *Br J Nutr* 2008; **100**: 760-766.

Tremellen, K. Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 2008; **14**: 243-258.

Tunc, O., Bakos, H. W. and Tremellen, K. Impact of body mass index on seminal oxidative stress. *Andrologia* 2011; **43**: 121-128.

Tunc, O. and Tremellen, K. Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. *J Assist Reprod Genet* 2009; **26**: 537-544.

Uysal, F. K., Onal, E. E., Aral, Y. Z., Adam, B., Dilmen, U. and Ardicolu, Y. Breast milk leptin: its relationship to maternal and infant adiposity. *Clin Nutr* 2002; **21**: 157-160.

Uzun, H., Zengin, K., Taskin, M., Aydin, S., Simsek, G. and Dariyerli, N. Changes in leptin, plasminogen activator factor and oxidative stress in morbidly obese patients following open and laparoscopic Swedish adjustable gastric banding. *Obes Surg* 2004; **14**: 659-665.

Vanbillemont, G., Lapauw, B., Bogaert, V., De Naeyer, H., De Bacquer, D., Ruige, J., *et al.* Birth weight in relation to sex steroid status and body composition in young healthy male siblings. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; **95**: 1587-1594.

Vazquez-Vela, M. E., Torres, N. and Tovar, A. R. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res* 2008; **39**: 715-728.

Veenendaal, M. V., Painter, R. C., de Rooij, S. R., Bossuyt, P. M., van der Post, J. A., Gluckman, P. D., *et al.* Transgenerational effects of prenatal exposure to the 1944-45 Dutch famine. *BJOG* 2013; **120**: 548-553.

Vehaskari, V. M. Prenatal programming of kidney disease. *Curr Opin Pediatr* 2010; **22**: 176-182.

Vincent, H. K., Innes, K. E. and Vincent, K. R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes Metab* 2007; **9**: 813-839.

Waddington, C. H. The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol* 2012; **41**: 10-13.

Wang, P. X., Wang, J. J., Lei, Y. X., Xiao, L. and Luo, Z. C. Impact of fetal and infant exposure to the Chinese Great Famine on the risk of hypertension in adulthood. *PLoS One* 2012; **7**: e49720.

- Wang, X., Li, H., De Leo, D., Guo, W., Koshkin, V., Fantus, I. G., *et al.* Gene and protein kinase expression profiling of reactive oxygen species-associated lipotoxicity in the pancreatic beta-cell line MIN6. *Diabetes* 2004; **53**: 129-140.
- Watkins, A. J., Wilkins, A., Cunningham, C., Perry, V. H., Seet, M. J., Osmond, C., *et al.* Low protein diet fed exclusively during mouse oocyte maturation leads to behavioural and cardiovascular abnormalities in offspring. *J Physiol* 2008; **586**: 2231-2244.
- Wegner, C. C., Clifford, A. L., Jilbert, P. M., Henry, M. A. and Gentry, W. L. Abnormally high body mass index and tobacco use are associated with poor sperm quality as revealed by reduced sperm binding to hyaluronan-coated slides. *Fertil Steril* 2010; **93**: 332-334.
- Whitaker, R. C., Wright, J. A., Pepe, M. S., Seidel, K. D. and Dietz, W. H. Predicting obesity in young adulthood from childhood and parental obesity. *N Engl J Med* 1997; **337**: 869-873.
- WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic *World Health Organization, Geneva, Switzerland* 2000.
- WHO. World Health Organization Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction, 5th edn. *Cambridge University Press, Cambridge, UK*. 2010.
- Winters, A. J., Colston, C., MacDonald, P. C. and Porter, J. C. Fetal plasma prolactin levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1975; **41**: 626-629.
- Wyrobek, A. J., Eskenazi, B., Young, S., Arnheim, N., Tiemann-Boege, I., Jabs, E. W., *et al.* Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**: 9601-9606.
- Xiang, N., Zhao, R., Song, G. and Zhong, W. Selenite reactivates silenced genes by modifying DNA methylation and histones in prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 2008; **29**: 2175-2181.
- Zain, M. M. and Norman, R. J. Impact of obesity on female fertility and fertility treatment. *Womens Health (Lond Engl)* 2008; **4**: 183-194.
- Zaneveld, L. J., De Jonge, C. J., Anderson, R. A. and Mack, S. R. Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum Reprod* 1991; **6**: 1265-1274.
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., *et al.* The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Hum Reprod* 2009; **24**: 2683-2687.
- Zentner, G. E. and Henikoff, S. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat Struct Mol Biol* 2013; **20**: 259-266.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. and Friedman, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; **372**: 425-432.

Zorn, B., Osredkar, J., Meden-Vrtovec, H. and Majdic, G. Leptin levels in infertile male patients are correlated with inhibin B, testosterone and SHBG but not with sperm characteristics. *Int J Androl* 2007; **30**: 439-444.

## **Annexes**

# Physiologie de la fonction testiculaire

**Charlotte Dupont, Laila El Khattabi, Nathalie Sermondade, Rachel Lévy**

## Embryologie de l'appareil testiculaire

**L**E DÉVELOPPEMENT de l'appareil génital masculin se fait en 3 étapes à partir du mésoblaste intermédiaire. Le sexe génétique 46, XY est établi lors de la fécondation. Au cours du stade indifférencié, des structures primitives identiques se développent dans les embryons mâles et femelles. Puis, le génotype sexuel est responsable du contrôle du développement gonadique (sexe gonadique) : les gonades bipotentielles se différencient alors en testicules. La troisième étape est le développement et la différenciation des organes génitaux internes et externes (sexe phénotypique) qui, dans le cas des embryons mâles, se fait en présence d'hormones testiculaires (1).

### **La gonade indifférenciée**

Dans toutes les espèces, on observe une séparation spatiotemporelle de la différenciation des cellules germinales primordiales (CGP) et des gonades, et une nécessité pour les CGP de migrer jusqu'aux ébauches gonadiques.

Les cellules germinales primordiales naissent de l'épiblaste (22-24 jours, gastrulation) : épiblaste proximal, proche de l'ectoderme extra-embryonnaire (2).

Elles se multiplient par mitoses et se regroupent dans un premier temps dans une région extra embryonnaire, située à la base de l'allantoïde, dans la paroi postérieure de la vésicule vitelline ; à partir de ce stade de développement, leur potentiel est restreint à la lignée germinale.

Deux modes de migration, l'un passif, l'autre actif, vont permettre aux CGP de rejoindre les crêtes génitales. La formation de l'endoderme de la paroi de l'intestin postérieur à partir de l'endoderme viscéral conduit, de façon passive, à l'intégration des CGP dans ce tissu. Elles vont ensuite activement migrer pour quitter l'intestin, traverser le mésentère dorsal et rejoindre les ébauches gonadiques. Celles-ci se forment de chaque côté de la ligne médiane, entre le mésonéphros et le mésentère dorsal, du fait de la prolifération de l'épithélium cœlomique et d'une condensation du mésenchyme sous-jacent. Il semble que les deux modes de migration se fassent simultanément. En effet, les CGP possèdent une morphologie de cellules migratrices (présence de pseudopodes) (3). Les premières cellules « pionnières » guideraient les CGP suivantes vers leur destination grâce aux contacts qu'elles conservent entre elles via leurs pseudopodes. Au cours de leur migration, les CGP continuent à se multiplier par mitoses. Après leur entrée dans les crêtes génitales, les CGP sont dénommées gonocytes.

Les crêtes urogénitales, dès la quatrième semaine de développement, servent de précurseurs au développement de l'appareil uro-génital. Elles proviennent de la prolifération de mésenchyme et sont recouvertes par un épithélium cœlomique. Plusieurs gènes sont nécessaires à la formation initiale de la gonade, mais également requis pour l'expression ultérieure du gène *SRY* : *WT1* (*Wilms' tumor gene 1*) et *SF1* (*steroidogenic factor 1*) (4).

Au cours de la sixième semaine, les cellules issues de l'épithélium cœlomique forment des agrégats de cellules somatiques de soutien qui entourent complètement les cellules germinales : si ces **cellules de soutien** n'entourent pas les cellules germinales, celles-ci dégénèrent.

Au cours de la même semaine les conduits müllériens (paramésonephrotiques) se forment latéralement aux conduits mésonéphrotiques de Wolff.

### **Différentiation gonadique**

Au cours de la 7<sup>ème</sup> semaine de développement, la gonade indifférenciée se différencie en testicule dans les embryons XY. Cette différenciation se fait sous l'influence du gène *SRY* (*sex-determining region on the*

*Y chromosome*) porté par le chromosome Y. *SRY*, associé à *SFI*, active l'expression de *SOX 9* (*SRY-related HMG-box gene 9*) : ensemble, ils induisent la différenciation des cellules de Sertoli. Lorsque ce facteur *SRY* s'exprime dans les cellules somatiques de soutien de la gonade indifférenciée, à un certain seuil, et à un moment approprié, ces cellules s'engagent dans la lignée pré sertolienne et le développement masculin débute.

Les cellules de Sertoli sont les premières cellules différenciées à apparaître dans la gonade. Elles coordonnent le développement testiculaire (5). Les cellules de Sertoli produisent l'AMH (hormone anti-müllérienne) et l'inhibine B. Le développement génital masculin commence donc avec la différenciation des cellules somatiques de soutien en cellules de Sertoli sous l'influence de la protéine *SRY*. Les cellules de Sertoli se multiplient activement jusqu'à la puberté et ne seront ensuite jamais renouvelées au cours de la vie de l'individu.

Les cellules de Sertoli s'organisent avec les cellules interstitielles de la gonade pour former **les cordons testiculaires** qui renferment en leur centre les cellules germinales. Les cordons testiculaires sont entourés par une membrane basale et des cellules myoïdes périvitubulaires. A la puberté, les cordons testiculaires se canalisent et se différencient en tubules séminifères.

Des signaux émanant des cellules de Sertoli recrutent des cellules mésenchymateuses dans la crête gonadique qui se différencient en cellules de Leydig. Ainsi, entre les cordons testiculaires, se trouve le **tissu interstitiel**, composé essentiellement des cellules de Leydig qui sécrètent les androgènes et l'INSL3 (Insulin-Like factor 3).

Les cellules de Sertoli forment également le *rete testis* qui met les tubules séminifères en connexion avec un nombre limité de tubules mésonéphrotiques, et se canalise à la puberté.

Le canal de Wolff se différencie ultérieurement en **épididyme, canal déférent et vésicule séminale**.

#### **Développement des gamètes mâles**

Une interaction entre cellules de Sertoli et cellules germinales primordiales se produit dès l'arrivée des CGP (appelées alors gonocytes) dans la gonade indifférenciée avec inhibition des mitoses et de l'entrée en méiose. Au 3<sup>e</sup> mois postnatal, les gonocytes se différencient en spermatogonies de type A. Les phases ultérieures de la gamétogenèse mâle débiteront à la puberté.

### **Rôles des hormones testiculaires**

Lorsque les cellules pré sertoliennes débutent leur différenciation morphologique en réponse à SRY, elles commencent à sécréter une hormone glycoprotéique appelée **hormone anti müllérienne ou AMH**, membre de la famille TGF $\beta$ . Son expression est déclenchée par SOX9 et potentialisée par SF1 et WT1 (6). Elle débute à la 8<sup>e</sup> semaine et provoque une régression rapide des canaux de Müller par apoptose entre la 8<sup>e</sup> et 10<sup>e</sup> semaine (action des Mmp2 (Matrix metalloproteinase type 2)).

Au cours de la 9<sup>e</sup> ou 10<sup>e</sup> semaine, les cellules de Leydig se différencient à partir des cellules mésenchymateuses mésonéphrotiques recrutées par les cellules pré sertoliennes et produisent la testostérone, à partir du cholestérol, grâce à l'action coordonnée d'un certain nombre d'enzymes stéroïdogéniques (1). Le nombre de cellules de Leydig et le taux de testostérone atteignent un pic entre 14 et 18 semaines. Après la 16<sup>e</sup> semaine, le nombre de cellules de Leydig commence à diminuer. La testostérone assure la survie des conduits mésonéphrotiques et la différenciation des canaux de Wolff en épididyme, canaux déférents et vésicules séminales. En l'absence de testostérone, les canaux de Wolff dégénèrent. Deux populations distinctes de cellules de Leydig sont respectivement responsables de la biosynthèse d'androgènes au cours de la vie fœtale et de la vie post natale. Les cellules de Leydig fœtales régressent et dégénèrent à la fin de la vie fœtale et au début de la vie post natale. A la puberté, une nouvelle population de cellules de Leydig adultes se différencie : les androgènes produits jouent un rôle majeur dans la masculinisation de l'encéphale responsable du comportement sexuel masculin ainsi que dans le déclenchement de la spermatogenèse.

INSL3, également produit par les cellules de Leydig, se lie au récepteur RXFP3 (Relaxin/insulin-like family peptide receptor 3) situé sur le gubernaculum testis et participe à la migration testiculaire.

### **Migration testiculaire**

La migration testiculaire est un processus en deux étapes distinctes et successives impliquant une régulation anatomique et hormonale (7).

Initialement, les testicules sont localisés dans la cavité abdominale au 10<sup>e</sup> niveau thoracique. La première phase, intra-abdominale, se déroule ainsi entre la 8<sup>ème</sup> et la 15<sup>ème</sup> semaine de développement. Les portions extra inguinales du gubernaculum testis se raccourcissent et attirent les

testicules vers le bas jusqu'au voisinage de l'anneau inguinal profond. Ce processus est contrôlé notamment par INSL3 et dont l'effet est potentialisé par l'AMH. Du 3<sup>e</sup> au 7<sup>e</sup> mois, les testicules restent au voisinage de l'anneau inguinal.

La seconde phase, inguino-scrotale, a lieu entre la 25<sup>ème</sup> et 35<sup>ème</sup> semaine. En réponse à un nouveau raccourcissement et une nouvelle migration du gubernaculum, les testicules entourés par le processus vaginal, pénètrent dans les canaux inguinaux, et descendent vers le scrotum. Cette étape est sous le contrôle des androgènes et du nerf génito-fémoral, avec une participation du muscle crémaster.

## Développement post-natal

Pendant la période néonatale (2 à 4 mois) se produit une phase d'activation de l'axe gonadotrope, accompagnée d'une augmentation du nombre de cellules de Sertoli et d'une augmentation importante du volume testiculaire. Suit une période de quiescence apparente au cours de laquelle le volume testiculaire évolue peu. Pendant l'enfance, peu de cellules germinales sont présentes dans le testicule. Ce sont essentiellement des cellules de Sertoli immatures et des spermatogonies qui constituent les cordons séminifères. Les cellules de Leydig sont inactives, ou absentes des espaces intertubulaires.

Pendant la période pré-pubertaire, les cellules de Sertoli prolifèrent et subissent une maturation sous l'influence d'hormones. L'activation des neurones à GnRH entraîne la sécrétion de FSH (Follicle Stimulating Hormone) et LH (Luteinizing Hormone), qui agiront sur le développement du testicule. La prolifération des cellules de Sertoli induit l'allongement des tubules séminifères. Au début de la puberté, la barrière hémato-testiculaire se forme et la lumière des tubes séminifères apparaît. Ce phénomène coïncide avec l'expansion de la population de cellules germinales (8), associée à une vague d'apoptose qui touche les spermatogonies et les spermatocytes I. Cette vague d'apoptose est indispensable pour le déclenchement et la poursuite de la spermatogenèse (9).

Le testicule va donc subir divers changements pendant l'enfance et l'adolescence, périodes critiques dont dépendra la fertilité à long terme.

## Histologie de l'appareil testiculaire

Les testicules sont situés à l'extérieur de l'abdomen, dans les bourses. Ils sont fixés au scrotum par le *gubernaculum testis* au niveau de leur pôle inférieur. Ils ont une double fonction : **endocrine** - sécrétion d'hormones sexuelles et **exocrine** - production de gamètes mâles matures ou spermatozoïdes.

### Architecture testiculaire

#### *Les enveloppes*

Le testicule est entouré de différentes enveloppes. Le scrotum, enveloppe la plus externe, est constitué d'une peau pigmentée riche en follicule pileux et en glandes sébacées et sudoripares qui recouvre le muscle lisse de Dartos. Cet ensemble entoure la gaine spermatique, composée par le fascia spermatique externe qui provient du muscle grand oblique, du muscle crémaster qui provient du muscle petit oblique et transverse, et du fascia spermatique interne qui provient du fascia transverse. Puis se situe la tunique vaginale, séreuse formée à partir de replis du péritoine. Cette tunique recouvre l'albuginée, tissu conjonctif très vascularisé. Au pôle antéro-supérieur du testicule, en regard de l'épididyme, l'albuginée s'épaissit et s'enfonce en profondeur pour former les corps de Highmore.

#### *Le parenchyme testiculaire et voies spermatiques intra et extra testiculaires*

Chaque testicule est composé de nombreux lobules (200 à 300) qui sont séparés par des cloisons conjonctives (les *septa testis*). A l'intérieur des lobules, plusieurs tubes séminifères (3 à 5), dans lesquels sont produits les spermatozoïdes, sont organisés sous forme de pelotes et rejoignent le *rete testis*. Le *rete testis*, réseau formé par les corps de Highmore recouverts d'un épithélium, se poursuit par les cônes efférents, qui se jetteront ensuite dans la tête de l'épididyme.

### La vascularisation

La surface de l'albuginée est parcourue par des vaisseaux sanguins, branches testiculaires de l'artère spermatique issues de l'aorte abdominale, qui cheminent dans le cordon. Depuis la périphérie, les artères se ramifient en rameaux interlobulaires courts et longs qui se dirigent vers le

corps de Highmore sans y pénétrer. L'épididyme est vascularisé par l'artère spermatique et l'artère déférentielle qui est issue de l'artère iliaque et qui vascularise aussi le canal déférent. Le cordon spermatique, les enveloppes et le muscle crémaster sont vascularisés par l'artère funiculaire ou crémasterique issue de l'artère épigastrique.

Le drainage veineux des bourses se fait grâce à un réseau profond composé de deux groupes veineux. Le plexus antérieur ou plexus pampiniforme draine le testicule et la tête de l'épididyme. Le plexus postérieur ou plexus crémasterien draine le corps et la queue de l'épididyme. Il existe également un réseau superficiel qui permet une vascularisation indépendante du scrotum.

### **Le tissu interstitiel = glande endocrine du testicule**

Le tissu interstitiel remplit les espaces entre les tubes séminifères. C'est une glande endocrine très vascularisée, de nombreux vaisseaux sanguins sont visibles sur les coupes histologiques. On retrouve aussi des vaisseaux lymphatiques et des nerfs. Les cellules de Leydig composent ce tissu. Ce sont de grosses cellules polyédriques (15 à 20 µm de diamètre) avec un noyau central et un nucléole bien marqué. Deux générations de cellules de Leydig ont été mises en évidence : les cellules de Leydig fœtales et les cellules adultes. Les cellules de Leydig adultes ne dérivent pas des cellules fœtales, mais plutôt de cellules souches périvitubulaires (10). Leur fonction principale est la synthèse de testostérone à partir du cholestérol. Le régulateur le plus important de la fonction des cellules de Leydig est la LH qui agit via un récepteur à 7 domaines transmembranaire couplé à une protéine G. L'AMP cyclique est le principal second messager de la transduction du signal. La synthèse de la testostérone est aussi modulée, mais de façon moins importante, par d'autres hormones ou facteurs, parmi lesquels la prolactine, l'insuline, le cortisol, les hormones thyroïdiennes...

Les cellules de Leydig produisent également l'INSL3 qui contrôle chez l'adulte la survie des cellules germinale (11).

#### A) Les tubes séminifères

Les tubes séminifères ont une longueur d'environ 80 cm à 1 m et un diamètre compris entre 150 et 300 µm. Ils assurent la fonction exocrine du testicule, c'est à dire la production de gamètes matures : les spermatozoïdes.

L'épithélium séminifère est un épithélium haut, pluristratifié, constitué de cellules somatiques, les cellules de Sertoli, et de cellules germinales disposées entre les cellules de Sertoli sur toute la hauteur de l'épithélium pluristratifié.

L'épithélium est délimité par une gaine périvitulaire ou membrane propre d'une épaisseur de 5µm. Elle est constituée d'une lame basale, de plusieurs couches de cellules myoïdes périvitulaire (aspect de cellules musculaires lisses), de fibres de collagènes et de fibroblastes.

#### **Description des cellules de Sertoli (12)**

Les cellules de Sertoli sont des cellules pyramidales reposant sur la lame basale, disposées sur toute la hauteur de l'épithélium et allant jusqu'à la lumière du tube séminifère. Le noyau situé en position basal est clair, de forme triangulaire avec un gros nucléole bien visible et une chromatine fine. Les cellules de Sertoli s'accrochent entre elles par des jonctions serrées situées au niveau basal et elles interagissent avec les cellules germinales. Au pôle apical de la cellule, des vésicules de phagocytose sont présentes et jouent un rôle dans la spermiogenèse. Les cellules de Sertoli n'ont pas de centriole et n'entrent donc pas en mitose.

#### **Fonctions des cellules de Sertoli (12)**

La position des cellules de Sertoli dans le tube séminifère leur confère un rôle fondamental dans le contrôle de la spermatogenèse. Leur nombre est corrélé au nombre de cellules germinales pouvant donner des spermatozoïdes. Les fonctions des cellules de Sertoli sont nombreuses et sont directement en relation avec le développement des cellules germinales et leur migration (13).

– Les cellules de Sertoli ont un rôle mécanique en servant **de soutien** et permettant la **cohésion** des cellules germinales. Elles établissent des jonctions communicantes avec les cellules germinales voisines et les autres cellules de Sertoli.

– Elles créent une barrière imperméable, la **barrière hémato-testiculaire** qui sépare le compartiment basal du compartiment adluminal. La barrière hémato-testiculaire est indispensable pour le bon déroulement de la méiose et de la spermatogenèse ; elle apporte également une protection immunitaire en créant une barrière immunologique. Cette partie sera développée plus longuement dans le paragraphe « barrière hémato-testiculaire ».

- Les cellules de Sertoli sont directement impliquées dans la **progression des cellules germinales vers la lumière du tube séminifère**. Le cytosquelette composé de microtubules, de microfilaments d'actine et de filament intermédiaire de vimentine, joue un rôle important dans le transport des cellules germinales. De plus, la synthèse de protéase et d'inhibiteur de protéases par les cellules de Sertoli permet le mouvement des spermatocytes au stade préleptotène, du compartiment basal vers le compartiment adluminal (14). La barrière hémato-testiculaire s'ouvre puis se referme pendant la méiose pour permettre la migration des spermatocytes. L'urokinase et les activateurs du plasminogène dégradent les complexes de jonctions et permettent aussi le déplacement des cellules germinales.

- Les cellules de Sertoli sont indispensables lors de la **spermiogenèse** au cours de laquelle les spermatides se différencient en spermatozoïdes. Après la libération des spermatozoïdes dans la lumière du tube séminifère, les cellules de Sertoli éliminent les corps résiduels et les cellules germinales anormales, grâce à leur fonction de **phagocytose**. La procathepsine L intervient dans la libération des spermatozoïdes, alors que la collagénase de type IV ainsi que d'autres métalloprotéases interviennent dans le remodelage tissulaire pendant la spermiogenèse (14, 15).

- L'épithélium séminifère n'étant pas vascularisé, la **nutrition des cellules germinales** se fait grâce aux cellules de Sertoli. Elles apportent des nutriments venant du tissu interstitiel et synthétisent du lactate et du pyruvate, nécessaires aux cellules germinales qui ne peuvent pas métaboliser le glucose. La cellule de Sertoli apporte également les protéines de transport telles que l'ABP (*androgen binding protein*) qui a pour fonction de transporter les androgènes, la transferrine et la céruloplasmine qui permettent l'apport de fer et de cuivre aux cellules germinales (14, 15).

- Les cellules de Sertoli synthétisent et sécrètent des **facteurs contrôlant la prolifération, la différenciation et le métabolisme des cellules germinales**. Cette fonction sera décrite de façon plus approfondie dans le paragraphe « régulation paracrine de la spermatogénèse ».

#### **Barrière hémato-testiculaire**

La barrière hémato-testiculaire est constituée par l'endothélium vasculaire de l'espace interstitiel, par les cellules péricubulaires de la gaine péricubulaire et enfin par les cellules de Sertoli elles-mêmes. Les jonctions serrées entre les cellules de Sertoli, les spermatogonies et les

spermatocytes de type I au stade leptotène dans le compartiment basal, ainsi que les jonctions adhérentes au niveau adluminal interviennent dans la structure de la barrière hémato-testiculaire. Cette barrière régule le transport des molécules : elle permet le passage sélectif d'eau, d'électrolytes, de nutriments, d'acides aminés et d'hormones de l'espace interstitiel vers le compartiment adluminal.

La barrière hémato-testiculaire est indispensable pour le déroulement de la méiose et de la spermatogenèse. Elle constitue un système dynamique et de contrôle qui s'ouvre et se referme pour laisser les spermatocytes au stade leptotène migrer vers le compartiment adluminal où ils achèvent leur méiose. Cette barrière permet de séparer les cellules germinales entrées en méiose de la circulation systémique, leur procurant ainsi une protection immunitaire (16).

## Spermatogenèse

### Déroulement de la spermatogenèse

La spermatogenèse est un phénomène continu à partir de la puberté. C'est le processus de multiplication et de différenciation cellulaire qui, à partir des cellules germinales souches, aboutit à la formation des spermatozoïdes. Ce processus se fait sous le contrôle des cellules de Sertoli, de façon centripète, c'est à dire du compartiment basal vers la lumière du tube séminifère. Il comprend trois phases : la prolifération des spermatogonies (mitoses), la méiose et la spermiogenèse. La durée de la spermatogenèse est constante pour une espèce donnée : elle est de 74 jours chez l'homme.

#### *Spermatogonies (17)*

Les spermatogonies, cellules les plus immatures, constituent le pool de réserve et sont situées dans le compartiment basal. Ce sont de petites cellules arrondies ou ovalaires, de 10 à 15  $\mu\text{m}$  de diamètre. Il en existe 3 sortes selon l'aspect de leur noyau : les cellules Ad (dark) ont une chromatine fine et sombre, les cellules Ap (pale) ont une chromatine claire et les cellules B ont une chromatine en mottes avec un nucléole bien visible. Les spermatogonies A se multiplient de façon continue par mitoses somatiques. Certaines se différencient et donnent les spermatogonies B.

L'homéostasie du pool de spermatogonie se fait grâce à l'équilibre entre la prolifération des cellules et leur mort cellulaire programmée (apoptose). La FSH et la testostérone agissent sur l'homéostasie des spermatogonies en contrôlant les mécanismes de survie et d'apoptose (18). Des facteurs paracrines régulent également l'équilibre du pool de cellules germinales. En effet, le LIF (Leukemia inhibitory factor) et le SF (Steel factor) assurent la survie des cellules germinales alors que le système Fas/Fas-L régule l'apoptose de ces cellules (19). La transduction du signal apoptotique met en jeu deux voies principales : celle de la famille des TNF (Tumor necrosis factor) et la voie mitochondriale via les protéines de la famille Bcl-2. Dans ces deux voies, des caspases vont être recrutées et intervenir dans les processus d'apoptose (19).

Près de 75% des spermatogonies A seraient ainsi éliminées par apoptose, mais ce processus concerne aussi 20% des cellules germinales qui seraient entrées en méiose (Spermatocytes I et II et spermatides) (9). L'apoptose, qui est indispensable au moment de la puberté, l'est également au moment de la mise en route de la spermatogenèse et au cours de ces différentes étapes. Tout déséquilibre entre les mécanismes de survie et d'apoptose peut entraîner une production anormale de spermatozoïdes associée à un risque d'infertilité.

#### ***Les spermatocytes I et II, les spermatides***

Les spermatogonies Ap vont entrer en division par groupes tous les 16 jours et se diviser en spermatogonies B qui se diviseront à leur tour et donneront les spermatocytes de type I. Les spermatocytes de type I, cellules arrondies volumineuses, entament la première division de méiose après la phase S de répllication de l'ADN, qui est une étape longue (23 jours), et donnent les spermatocytes de type II.

Les spermatocytes de type II sont des cellules rondes, plus petites, elles vont subir la deuxième division de méiose qui est une étape beaucoup plus rapide (1 jour). Les spermatocytes de type II sont donc rarement visibles sur les coupes histologiques du fait de leur durée de vie courte, ils donnent les spermatides. Les spermatides sont les cellules les plus petites (6 à 7  $\mu\text{m}$ ), elles sont très nombreuses. On peut observer 3 stades : le stade de spermatides jeunes ou rondes, le stade de spermatides intermédiaires ou en cours d'élongation et le stade de spermatides matures ou allongées.

### **Spermiogenèse**

Au cours de la spermiogenèse, les spermatides vont subir des remaniements cellulaires qui aboutiront à la formation du spermatozoïde. L'acrosome va être formé à partir de la fusion de vésicules contenant des enzymes provenant de l'appareil de Golgi. Cette coiffe recouvrira les deux tiers antérieurs du noyau. Des remaniements nucléaires vont avoir lieu, le noyau va s'allonger et se condenser grâce au remplacement des histones par les protamines. Le flagelle se développe dès le début de la spermiogenèse à partir du centriole distal qui forme l'axonème. Le cytoplasme va se réorganiser et va partiellement être éliminé sous forme de corps résiduels qui seront phagocytés par les cellules de Sertoli. Les mitochondries vont se disposer autour de la partie initiale du flagelle, jusqu'à la zone d'étranglement : l'annulus. Cette partie constituera la gaine mitochondriale au niveau de la pièce intermédiaire du spermatozoïde.

### **Le spermatozoïde**

Les spermatozoïdes ainsi formés sont libérés dans la lumière du tube séminifère. Ils rejoignent ensuite les tubes droits, le *rete testis* puis l'épididyme où ils continuent à maturer et sont stockés dans la queue de l'épididyme jusqu'à leur émission. Le spermatozoïde est une cellule mobile. La tête du spermatozoïde a une longueur de 5  $\mu\text{m}$  et une largeur de 3  $\mu\text{m}$ . Elle est composée du noyau haploïde qui fournit à l'embryon la moitié du matériel génétique, d'un cytoplasme peu abondant et de l'acrosome. La pièce intermédiaire lui fait suite (5 à 7  $\mu\text{m}$ ), au niveau de laquelle sont localisées les mitochondries, puis la pièce principale du flagelle (45  $\mu\text{m}$ ) qui confère au spermatozoïde sa mobilité et enfin la pièce terminale (1  $\mu\text{m}$ ). L'axonème parcourt toute la longueur du flagelle : il est composé d'un doublet de microtubules centraux entouré de neuf doublets périphériques qui partent de la tête du spermatozoïde mais qui s'arrêtent avant la pièce terminale. La gaine mitochondriale de forme hélicoïdale entoure la pièce intermédiaire. Au niveau de la pièce principale, la gaine fibreuse entoure les fibres denses (20).

### **Régulation de la spermatogenèse**

Le fonctionnement testiculaire est sous la dépendance d'hormones qui agissent de façon endocrine et/ou paracrine (14).

### **Régulation endocrine**

L'hypothalamus, situé dans la région du diencephale, sécrète de façon pulsatile la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) qui stimule la synthèse des chaînes alpha et bêta de la LH (Luteinizing Hormone) et de la FSH (Follicle Stimulating Hormone) par l'hypophyse. Les hormones hypophysaires interviennent dans la production d'hormones stéroïdes et de spermatozoïdes par le testicule.

Des récepteurs à la LH sont présents sur les cellules de Leydig. La LH va stimuler la synthèse et la sécrétion de testostérone par ces cellules. La testostérone est nécessaire à la spermatogénèse, mais elle va également servir de rétrocontrôle négatif au niveau hypothalamo-hypophysaire. La FSH, via des récepteurs présents sur les cellules de Sertoli, va stimuler la synthèse d'inhibine B qui exerce un rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus et l'hypophyse et qui stimule la spermatogénèse.

La cellule de Sertoli possède des récepteurs pour la FSH et la testostérone, les principaux régulateurs hormonaux de la spermatogénèse. La FSH exerce son activité via un récepteur à la FSH (FSHR) couplé à une protéine G, situé sur la membrane des cellules de Sertoli. De nombreuses voies de signalisation sont activées (18). La testostérone exerce son action en se liant à des récepteurs aux androgènes localisés dans les cellules de Sertoli. Certaines voies de signalisation sont communes entre la FSH et la testostérone. La FSH régulerait préférentiellement le développement des spermatogonies alors que la testostérone régulerait la phase tardive de spermiogénèse. La FSH et la testostérone agiraient de façon concomitante pour contrôler le développement des spermatoocytes (18).

### **Régulation paracrine**

En plus de l'action des hormones hypophysaires, la spermatogénèse est contrôlée par des facteurs autocrines et paracrines qui exercent leur action via un réseau de communications intercellulaires.

Puisque les cellules germinales ne possèdent pas de récepteur aux hormones, la régulation de la spermatogénèse nécessite des jonctions communicantes (connexines) entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales. Les cellules de Sertoli vont produire de nombreux facteurs (cytokines et facteurs de croissance) qui vont intervenir dans la multiplication et la différenciation des cellules germinales. Parmi les mieux décrits, l'IL-1 (Interleukine 1) et l'IL-6 (Interleukine 6) jouent un rôle

dans la réplication de l'ADN des cellules germinales. L'IL-1 est activé par la phagocytose des corps résiduels et stimule la synthèse d'ADN dans les spermatogonies et dans les spermatocytes. IL-6 qui est induit par IL-1 inhibe, au contraire, la synthèse d'ADN (21). L'IGF-1 (Insulin Growth factor 1) et l'activine entraînent la prolifération des spermatogonies alors que l'inhibine inhibe cette prolifération. Des récepteurs à TGF $\beta$  (transforming growth factor) sont présents sur les cellules germinales, et la production de TGF $\beta$  par les cellules de Sertoli entraîne la division et la différenciation des cellules germinales (15). Les facteurs de croissance, EGF (Epidermal growth factor) et TGF $\alpha$  (transforming growth factor) stimulent la phase méiotique de la spermatogenèse (22).

Les cellules de Sertoli sécrètent des facteurs qui agissent aussi sur les cellules de Leydig. L'inhibine et l'IGF-1 stimulent la synthèse de testostérone alors que l'activine et le TGF $\beta$  l'inhibe.

Les cellules germinales produisent également des facteurs qui diffèrent selon leur stade de développement et qui modulent les fonctions des cellules de Sertoli.

Enfin, les cellules péritubulaires interagissent aussi avec les cellules de Sertoli, notamment par l'intermédiaire de PModS qui induit la sécrétion d'ABP (Androgen Binding Protein) et de transferrine (15, 23).

## La méiose et sa régulation

Les cellules germinales se distinguent des cellules somatiques par leur haploïdie. Le passage de l'état diploïde à l'état haploïde est assuré par la division méiotique qui est initiée à la puberté chez le mâle. Son but est à la fois la transmission et le brassage de l'information génétique. Par conséquent, les différentes étapes constituant la méiose sont hautement contrôlées par des mécanismes moléculaires qui lui sont spécifiques. Les anomalies de la méiose, notamment les non-disjonctions, sont une cause d'infertilité.

### Déroulement de la méiose

Elle est composée de deux divisions cellulaires successives précédées d'une unique phase de réplication de l'ADN :

– la méiose I, ou méiose réductionnelle, car elle divise par deux le nombre de chromosomes,

– et la méiose II, dite également méiose équationnelle, du fait de la conservation du nombre de chromosomes.

La méiose I représente plus de 90% du temps nécessaire à la méiose.

### **Méiose I**

Elle est initiée dans le spermatocyte I et dure 23 jours aboutissant à la ségrégation des chromosomes homologues. La disposition des chromosomes homologues de part et d'autre de la plaque équatoriale étant aléatoire,  $2^{23}$  associations entre chromosomes non homologues sont possibles.

Elle se compose, comme pour une mitose, de quatre phases : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. Néanmoins, des événements uniques les différencient. Premièrement, la prophase I est une étape très longue (15 jours) caractérisée par 5 stades (leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse) lors desquels les chromosomes homologues vont s'apparier, sous forme de bivalents ou tétravalents voire plus lorsqu'il y a des translocations équilibrées, et créer des zones de liaison étroite ou synapsis. Ces liaisons sont médiées par des complexes synaptonémaux et permettent des échanges de matériel génétique, ou crossing-over, donnant naissance à de nouvelles combinaisons génétiques à l'origine de la diversité phénotypique. Deuxièmement, l'activité transcriptionnelle se poursuit lors de la méiose, sauf pour les chromosomes sexuels, qui sont eux inactivés et assemblés sous forme d'une vésicule sexuelle. Enfin, le fuseau de division méiotique est unipolaire, contrairement au fuseau de division mitotique qui est bipolaire, et ce sont les chromosomes homologues qui sont séparés par l'action de la protéine REC8. Tout au long de la méiose I, les chromatides sœurs restent étroitement liées grâce à la mise en place de protéines dites cohésines (SCC : sister chromatid cohesion et SMC : structural maintenance of chromosomes) à la fois au niveau du centromère et des bras de chaque chromosome.

### **Les crossing-over**

Ils sont essentiels à la ségrégation des chromosomes homologues. Ils assurent leur liaison pendant la fin de la prophase lorsque les cohésines se dissocient. Leur absence peut être responsable d'une aneuploïdie. Ils sont initiés par des cassures double-brins (DSB pour double strand breaks) qui sont génétiquement programmées mais dont les mécanismes restent pour le moment mal connus. Chez les mammifères, ce mécanisme impliquerait un complexe multiprotéique formé par les protéines SPO11, RAD50,

MRE11 et bien d'autres qui restent à identifier (24, 25). S'en suit, une résection exonucléolytique en 5'. Le brin 3' va alors s'intercaler entre les deux brins du chromosome homologue formant ainsi la boucle de recombinaison (D-loop). Enfin, des mécanismes de réparation de l'ADN finalisent l'interaction et aboutissent à la formation des chromosomes recombinés.

Il est de plus en plus évident que les points de recombinaison ne sont pas aléatoires. En effet, il existe des points chauds de recombinaison où des marqueurs épigénétiques, à savoir la conformation chromatinienne et les modifications post-traductionnelles des histones, sont reconnaissables par les protéines intervenant dans le DSB (26, 27).

### **Méiose II**

Le spermatocyte II entre rapidement en deuxième division méiotique sans passer par une phase de réplication de l'ADN. Les chromosomes se décondensent *a minima* dans le but de former une chromatine. Les étapes suivantes sont les mêmes que celles d'une mitose à la différence près qu'elles impliquent 23 chromosomes. Elles durent 24 heures environ et aboutissent à la séparation des chromatides sœurs et à la naissance de deux spermatides.

### **Régulation de la méiose**

Les mécanismes de régulation de la méiose ne sont pas encore complètement élucidés. Le premier point de régulation est la décision même de l'entrée en méiose. Des études récentes soutiennent que son initiation ferait intervenir l'acide rétinoïque qui stimule l'expression de *STRA8*. Les cellules germinales de souris déficientes en *STRA8* ne sont pas capables d'exprimer les modifications signant l'entrée en prophase méiotique (28, 29).

Par ailleurs, à l'image du cycle mitotique contrôlé par des cascades de phosphorylations/déphosphorylations, la méiose est également contrôlée par des mécanismes moléculaires équivalents. Ces systèmes de contrôle veillent au bon déroulement de la méiose et assurent l'élimination des cellules porteuses d'anomalies. Leur mise en place se ferait au stade pachytène de la prophase I chez les mammifères (30). En effet, les cellules présentant des défauts de recombinaison sont bloquées au stade pachytène et éliminées par apoptose. En outre, des protéines telles que les kinases ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) et ATR (Ataxia-Telangiectasia and

RAD3-related) pourraient jouer un rôle dans la surveillance du bon déroulement de la méiose de façon similaire à leur rôle dans la mitose (31). Ainsi, les patients souffrant d'ataxie-télangiectasie, pathologie liée à un déficit de la protéine ATM, présentent, entre autres, une infertilité.

### **Anomalies de la méiose et infertilité**

Les conséquences liées à des anomalies de la méiose sont l'arrêt de maturation germinale conduisant soit à une azoospermie sécrétoire, ou à la production de spermatozoïdes porteurs de mutations ou d'aneuploïdies. Néanmoins, peu d'études ont observé un lien de cause à effet entre les erreurs méiotiques et l'infertilité. Récemment, des études pangénomiques menées dans des populations d'hommes présentant une azoospermie ont identifié des mutations (32) ou des polymorphismes alléliques (33) associés à un arrêt méiotique. En outre, une augmentation significative du pourcentage de bivalents sans chiasma a été mise en évidence chez les patients présentant une azoospermie sécrétoire par rapport aux contrôles fertiles (34), et ce pour les chromosomes 9, 21, X et Y. Enfin, les non-disjonctions, qu'elles surviennent en méiose I ou II, génèrent des gamètes aneuploïdes qui peuvent être féconds mais conduisant à des grossesses qui se terminent par des fausses-couches spontanées.

En conclusion, la méiose est un processus complexe dont les mécanismes moléculaires ne sont pas totalement clarifiés. Les défis des études à venir sont la mise en lumière des relations entre les différents acteurs et le rôle de l'épigénétique dans la régulation de la méiose.

### **Références**

1. Rey RA, Grinspon RP. Normal male sexual differentiation and aetiology of disorders of sex development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011 Apr;25(2):221-38.
2. Kolasa A, Misiakiewicz K, Marchlewicz M, Wiszniewska B. The generation of spermatogonial stem cells and spermatogonia in mammals. *Reprod Biol.* 2012 Mar;12(1):5-23.
3. Freeman B. The active migration of germ cells in the embryos of mice and men is a myth. *Reproduction.* 2003 May;125(5):635-43.

4. Pannetier M, Pailhoux E. [Sex differentiation: state of the art and future prospects]. *Med Sci (Paris)*. 2011 Oct;27(10):859-65.
5. Combes AN, Wilhelm D, Davidson T, Dejana E, Harley V, Sinclair A, et al. Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Dev Biol*. 2009 Feb 1;326(1):112-20.
6. Rey R. Regulation of spermatogenesis. *Endocr Dev*. 2003;5:38-55.
7. Lie G, Hutson JM. The role of cremaster muscle in testicular descent in humans and animal models. *Pediatr Surg Int*. 2011 Dec;27(12):1255-65.
8. Sifer C, Sellami A, Poncelet C, Kulski P, Martin-Pont B, Bottero J, et al. A prospective randomized study to assess the benefit of partial zona pellucida digestion before frozen-thawed embryo transfers. *Hum Reprod*. 2006 Sep;21(9):2384-9.
9. Levy R, Seifer-Aknin I. Place de l'apoptose au cours de la spermatogenèse et dans le sperme éjaculé : relations avec la fécondation. *Annales de Biologie Clinique*. 2001;59(5):531-45.
10. Huirne JA, Hugues JN, Pirard C, Fischl F, Sage JC, Pouly JL, et al. Cetrorelix in an oral contraceptive-pretreated stimulation cycle compared with buserelin in IVF/ICSI patients treated with r-hFSH: a randomized, multicentre, phase IIIb study. *Hum Reprod*. 2006 Jun;21(6):1408-15.
11. Kawamura K, Kumagai J, Sudo S, Chun SY, Pisarska M, Morita H, et al. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 May 11;101(19):7323-8.
12. Ravel C, Jaillard S. [The Sertoli cell]. *Morphologie*. 2011 Dec;95(311):151-8.
13. Mruk DD, Cheng CY. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev*. 2004 Oct;25(5):747-806.
14. Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Giannakis D, Pardalidis N. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008 Apr;109(3-5):323-30.
15. Jegou B, Pineau C. Current aspects of autocrine and paracrine regulation of spermatogenesis. *Adv Exp Med Biol*. 1995;377:67-86.
16. Jouannet P, Ducot B, Feneux D, Spira A. Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics. *Int J Androl*. 1988 Oct;11(5):379-94.
17. De Rooij DG, Griswold MD. Questions about Spermatogonia Posed and Answered Since 2000. *J Androl*. 2012 Aug 9.
18. Ruwanpura SM, McLachlan RI, Meachem SJ. Hormonal regulation of male germ cell development. *J Endocrinol*. 2010 May;205(2):117-31.
19. Dadoune J-P. Processus fondamentaux liés à l'évolution des cellules germinales mâles : nouvelle approche des anomalies de la spermatogenèse. *médecine thérapeutique-médecine de la reproduction*. 2006;8(2):85-98.
20. Johnson L, Thompson DL, Jr., Varner DD. Role of Sertoli cell number and func-

- tion on regulation of spermatogenesis. *Anim Reprod Sci.* 2008 Apr;105(1-2):23-51.
21. Dugast I, Jegou B. [Cytokines and Sertoli cell and germ cell interactions]. *Contracept Fertil Sex.* 1994 Oct;22(10):631-4.
  22. David G, Bisson J, Czyglik F, Jouannet P, Gernigon C. Anomalies morphologiques du spermatozoïde humain. 1) Propositions pour un système de classification. *J Gynecol Obs Biol Reprod.* 1975;4:736.
  23. Verhoeven G, Hoeben E, De Gendt K. Peritubular cell-Sertoli cell interactions: factors involved in PmodS activity. *Andrologia.* 2000 Jan;32(1):42-5.
  24. Romanienko PJ, Camerini-Otero RD. The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol Cell.* 2000 Nov;6(5):975-87.
  25. Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, d'Angelo D, et al. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reprod Biomed Online.* 2008 Jun;16(6):835-41.
  26. Fukuda T, Kugou K, Sasanuma H, Shibata T, Ohta K. Targeted induction of meiotic double-strand breaks reveals chromosomal domain-dependent regulation of Spo11 and interactions among potential sites of meiotic recombination. *Nucleic Acids Res.* 2008 Feb;36(3):984-97.
  27. Balaban B, Yakin K, Alatas C, Oktem O, Isiklar A, Urman B. Clinical outcome of intracytoplasmic injection of spermatozoa morphologically selected under high magnification: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online.* 2011 Feb 15.
  28. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovsky A, Yagoda A, Lederman H, et al. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril.* 2003 Dec;80(6):1413-9.
  29. Lin Y, Gill ME, Koubova J, Page DC. Germ cell-intrinsic and -extrinsic factors govern meiotic initiation in mouse embryos. *Science.* 2008 Dec 12;322(5908):1685-7.
  30. Li XC, Schimenti JC. Mouse pachytene checkpoint 2 (trip13) is required for completing meiotic recombination but not synapsis. *PLoS Genet.* 2007 Aug;3(8):e130.
  31. Barlow C, Liyanage M, Moens PB, Tarsounas M, Nagashima K, Brown K, et al. Atm deficiency results in severe meiotic disruption as early as leptotema of prophase I. *Development.* 1998 Oct;125(20):4007-17.
  32. Miyamoto T, Hasuike S, Yogev L, Maduro MR, Ishikawa M, Westphal H, et al. Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. *Lancet.* 2003 Nov 22;362(9397):1714-9.
  33. Sato H, Miyamoto T, Yogev L, Namiki M, Koh E, Hayashi H, et al. Polymorphic alleles of the human MEI1 gene are associated with human azoospermia by meiotic arrest. *J Hum Genet.* 2006;51(6):533-40.
  34. Sun F, Mikhaail-Philips M, Oliver-Bonet M, Ko E, Rademaker A, Turek P, et al. The relationship between meiotic recombination in human spermatocytes and aneuploidy in sperm. *Hum Reprod.* 2008 Aug;23(8):1691-7.

## Chapitre 3

# Histologie de l'appareil génital masculin

C. Dupont, B. Martin-Pont, R. Lévy

## 1. Les testicules

Les testicules, organes pairs, sont localisés dans les bourses et fixés au scrotum par le *gubernaculum testis* au niveau de leur pôle inférieur. Leur pôle supérieur est en continuité avec le cordon spermatique dans lequel cheminent les vaisseaux et les nerfs. Ils présentent à la fois une fonction endocrine par la sécrétion d'hormones sexuelles et une fonction exocrine avec la production de spermatozoïdes.

### 1.1. Architecture testiculaire

#### 1.1.1. Les enveloppes du testicule

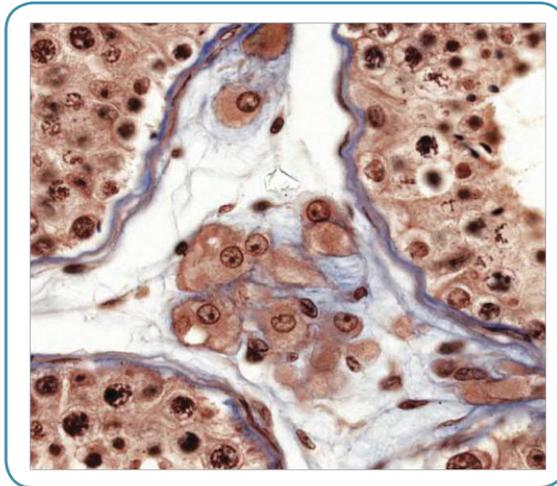
Le testicule est protégé par différentes enveloppes. Le scrotum, l'enveloppe la plus externe, est constitué d'une peau riche en follicules pileux et en glandes sébacées et sudoripares qui recouvre le muscle lisse de Dartos. La tunique vaginale, séreuse, recouvre l'albuginée, tissu conjonctif très vascularisé. Au pôle antéro-supérieur du testicule, en regard de l'épididyme, l'albuginée s'épaissit et s'enfonce en profondeur pour former les corps de Highmore.

#### 1.1.2. Le parenchyme testiculaire et les voies spermatiques intra et extra-testiculaires

Chaque testicule est composé de nombreux lobules (200 à 300) qui sont séparés par des cloisons conjonctives (les *septa testis*). À l'intérieur de chaque lobule se trouvent plusieurs tubes séminifères (3 à 5), peletonnés, très longs (80 cm à 1 m), d'un diamètre compris entre 150 et 300  $\mu\text{m}$ . Le tissu interstitiel comble les espaces entre les tubes séminifères (Figure 1). Les tubes séminifères rejoignent

le *rete testis* (réseau testiculaire) qui se prolonge par les cônes efférents à partir desquels des canaux confluent vers la tête de l'épididyme.

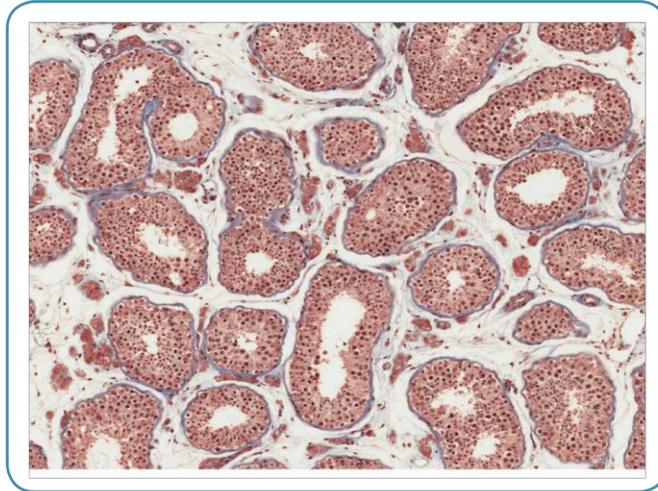
Une vascularisation sanguine distribuée à la surface de l'albuginée provenant de l'artère testiculaire se ramifie dans les cloisons interlobulaires.



**Figure 1** – Parenchyme testiculaire : tubes séminifères (TS) et tissu interstitiel (TI).  
(Coloration : trichrome de Masson).

## 1.2. Le tissu interstitiel ou glande endocrine du testicule (Figure 2)

Le tissu interstitiel comble les espaces entre les tubes séminifères, on y observe de nombreux vaisseaux sanguins ainsi que des vaisseaux lymphatiques et des nerfs. Il est constitué de cellules de Leydig, grosses cellules polyédriques (15 à 20  $\mu\text{m}$  de diamètre) comportant un noyau central et un nucléole bien marqué. En microscopie électronique, on peut observer un réticulum endoplasmique lisse développé, ainsi que de nombreuses mitochondries à crêtes tubulaires. De nombreuses inclusions lipidiques, reflet de la synthèse de testostérone par les cellules, et des inclusions protidiques (cristalloïdes de Reinke) sont présentes. Leur fonction principale est la synthèse de testostérone à partir du cholestérol régulée par la *Luteinizing Hormone* (LH). Les cellules de Leydig produisent également l'*Insulin-like factor 3* (INSL3) qui contrôle, chez l'adulte, la survie des cellules germinales.



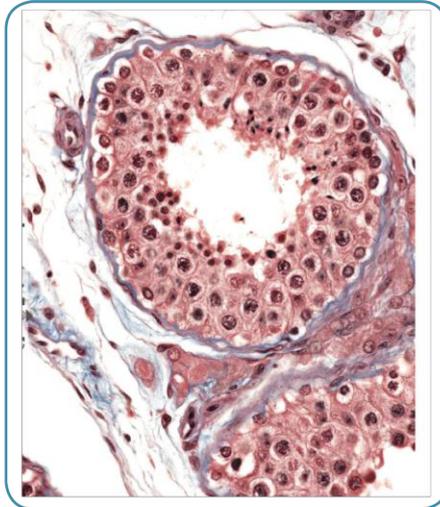
**Figure 2 – Tissu interstitiel.**

Présence de cellules de Leydig (CL) entre les tubes séminifères (TS). (Coloration : trichrome de Masson).

### 1.3. Les tubes séminifères

Les tubes séminifères assurent la fonction exocrine du testicule, c'est à dire la production de gamètes matures : les spermatozoïdes.

L'épithélium séminifère est délimité par une gaine péritubulaire d'une épaisseur de  $5\mu\text{m}$ , constituée d'une lame basale, de plusieurs couches de cellules myoïdes péritubulaires, de fibres de collagènes et de fibroblastes. Il s'agit d'un épithélium haut, pluristratifié, constitué à la fois de cellules somatiques, les cellules de Sertoli, et de cellules germinales disposées entre elles sur toute la hauteur de l'épithélium.



**Figure 3** – Épithélium séminifère.

L'épithélium séminifère est délimité par une gaine péritubulaire entourant un épithélium haut, pluristratifié, constitué de cellules de Sertoli et de cellules germinales disposées sur toute la hauteur de l'épithélium. (Coloration : trichrome de Masson).

### 1.3.1. Les cellules de Sertoli

#### ► Histologie (Figure 4)

Les cellules de Sertoli ont un aspect pyramidal et s'étendent depuis la lame basale jusqu'à la lumière du tube séminifère. Leur noyau situé en position basale, de forme triangulaire et d'aspect clair, présente un gros nucléole bien visible et une chromatine fine. En microscopie optique, le cytoplasme est peu visible du fait de la disposition des cellules germinales.

En microscopie électronique, le cytoplasme des cellules de Sertoli apparaît très riche en organites (appareil de Golgi, réticulum endoplasmique lisse, réticulum endoplasmique granuleux). Les jonctions serrées proches de la lumière (compartiment *adluminal*) assurent la cohésion des cellules. Au pôle apical, de nombreuses vésicules de phagocytose participent à la spermiogénèse.

#### ► Fonctions

La position des cellules de Sertoli dans le tube séminifère leur confère un rôle fondamental pour le contrôle de la spermatogénèse. Leur nombre est corrélé au

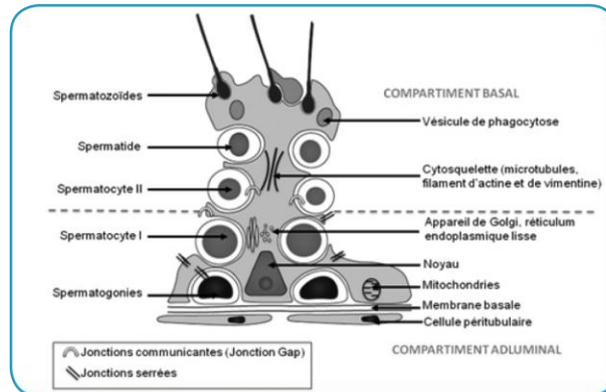


Figure 4 – La cellule de Sertoli et les cellules germinales.

nombre de cellules germinales susceptibles de former des spermatozoïdes. Les nombreuses fonctions des cellules de Sertoli permettent le développement des cellules germinales jusqu'au stade de spermatozoïdes et leur progression depuis la lame basale vers la lumière du tube séminifère.

Les cellules de Sertoli assurent le **soutien** et la **cohésion** des cellules germinales. Elles établissent des jonctions communicantes avec les cellules germinales voisines et les autres cellules de Sertoli au niveau du compartiment basal.

Elles établissent une barrière imperméable, la **barrière hémato-testiculaire** séparant le compartiment basal du compartiment *adluminal*. Elle est composée de l'endothélium vasculaire, des cellules péritubulaires et des cellules de Sertoli elles mêmes. Cette barrière régule le **transport des molécules** : elle permet le passage sélectif d'eau, d'électrolytes, de nutriments, d'acides aminés et d'hormones de l'espace interstitiel vers le compartiment *adluminal*. Elle est indispensable au déroulement de la spermatogénèse.

La barrière hémato-testiculaire isole les cellules germinales entrées en méiose de la circulation systémique, leur procurant ainsi une **protection immunitaire**.

Les cellules de Sertoli sont également impliquées dans la **progression des cellules germinales vers la lumière du tube séminifère**. Le cytosquelette (microtubules, microfilaments d'actine et filaments intermédiaires de vimentine) joue un rôle important dans la migration des cellules germinales. De plus, les protéases et les inhibiteurs de protéase, synthétisés par les cellules de Sertoli, contrôlent le déplacement des spermatozoïtes du compartiment basal vers le compartiment *adluminal*. La barrière hémato-testiculaire constitue un système dynamique qui s'ouvre et se referme pour permettre aux spermatozoïtes de migrer vers le

compartiment *adluminal* où ils achèveront leur méiose. L'urokinase ainsi que les activateurs du plasminogène dégradent les complexes de jonctions.

Les cellules de Sertoli sont indispensables au déroulement de la **spermiogénèse** (différenciation des spermatides en spermatozoïdes). Les cellules de Sertoli éliminent les corps résiduels et les cellules germinales anormales par **phagocytose**. La procathepsine L intervient dans la libération des spermatozoïdes. La collagénase de type IV et d'autres métalloprotéases permettent le remodelage tissulaire pendant la spermiogénèse.

L'épithélium séminifère n'étant pas vascularisé, la **nutrition des cellules germinales** se fait par l'intermédiaire des cellules de Sertoli. Celles-ci transportent des nutriments venant du tissu interstitiel et synthétisent du lactate et du pyruvate, nécessaires aux cellules germinales qui ne métabolisent pas le glucose. La cellule de Sertoli sécrète des protéines de transport comme l'*androgen binding protein* (ABP) qui assure le transport des androgènes, la transferrine et la ceruloplasmine permettant l'apport de fer et de cuivre aux cellules germinales.

Les cellules de Sertoli synthétisent et sécrètent également de nombreux **facteurs paracrines contrôlant la prolifération, la différenciation et le métabolisme des cellules germinales**.

### 1.3.2. La spermatogénèse

La spermatogénèse est un phénomène continu à partir de la puberté. Les cellules germinales souches se multiplient et se différencient aboutissant à la formation des spermatozoïdes. La spermatogénèse évolue du compartiment basal vers la lumière du tube séminifère (évolution centripète) sous le contrôle des cellules de Sertoli. On distingue trois phases : une phase de prolifération des spermatogonies (mitoses), les phases méiotiques permettant le brassage génétique et la spermiogénèse. La durée totale de la spermatogénèse est constante pour une espèce donnée : elle est de 74 jours chez l'homme.

#### ► Les mitoses spermatogoniales

**Les spermatogonies**, situées dans le compartiment basal, constituent le pool de réserve. Il s'agit de petites cellules arrondies ou ovalaires, de 10 à 15 µm de diamètre. Elles présentent trois aspects en fonction de leur noyau : les cellules Ad (dark) ont une chromatine fine et sombre, les cellules Ap (pale) ont une chromatine claire, les cellules B ont un noyau présentant des mottes chromatiniennes avec un nucléole bien visible. L'homéostasie du pool de spermatogonies résulte de l'équilibre entre la prolifération cellulaire par mitoses (renouvellement cellulaire) et la mort cellulaire programmée (apoptose). Certaines spermatogonies Ap

se différencient en donnant les spermatogonies B qui se divisent à leur tour et donnent des spermatocytes de type I.

#### ► La méiose

**Les spermatocytes de type I**, volumineuses cellules arrondies, débutent leur méiose. Ce stade de première division dure 23 jours et aboutit aux spermatocytes de type II.

**Les spermatocytes de type II** sont des cellules rondes, plus petites qui entrent en deuxième division de méiose, étape très rapide (1 jour). Elles aboutissent aux spermatides.

#### ► La spermiogénèse

**Les spermatides**, cellules les plus petites (6 à 7  $\mu\text{m}$ ), sont très nombreuses. On observe des spermatides jeunes et rondes, des spermatides intermédiaires en cours d'élongation et des spermatides matures allongées.

Au cours de la spermiogénèse, les spermatides subissent un certain nombre de remaniements cellulaires pour aboutir aux spermatozoïdes. La formation de l'acrosome résulte de la fusion des vésicules golgiennes contenant des enzymes. L'acrosome recouvre les deux tiers antérieurs du noyau. Des remaniements nucléaires ont lieu, le noyau se condense et s'allonge avec le remplacement progressif des histones par les protamines. Le flagelle se développe à partir du centriole distal, formant la structure de l'axonème. Le cytoplasme se redistribue et les corps résiduels sont phagocytés par les cellules de Sertoli. Les mitochondries se disposent en spirale autour de la partie initiale du flagelle, jusqu'à la zone d'étranglement (l'*annulus*) constituant la pièce intermédiaire du spermatozoïde.

### 1.3.3. Le spermatozoïde (Figure 5)

Les spermatozoïdes sont libérés dans la lumière du tube séminifère (spermiation). Ils rejoignent les tubes droits, le *rete testis* puis l'épididyme où leur maturation se poursuit. Ils sont stockés principalement dans la queue de l'épididyme jusqu'à leur émission (éjaculation).

**Le spermatozoïde**, cellule mobile, présente trois parties. La tête, d'une longueur d'environ 4,1  $\mu\text{m}$  et d'une largeur de 2,8  $\mu\text{m}$  (OMS, 2010\*) est composée d'un noyau haploïde qui fournit à l'embryon la moitié du matériel génétique, d'un cytoplasme réduit et de l'acrosome. Lui fait suite la pièce intermédiaire d'une longueur équivalente à celle de la tête, au niveau de laquelle sont localisées les mitochondries, et la pièce principale du flagelle (45  $\mu\text{m}$ ), qui apporte au spermatozoïde sa mobilité, puis la pièce terminale. L'axonème, qui parcourt

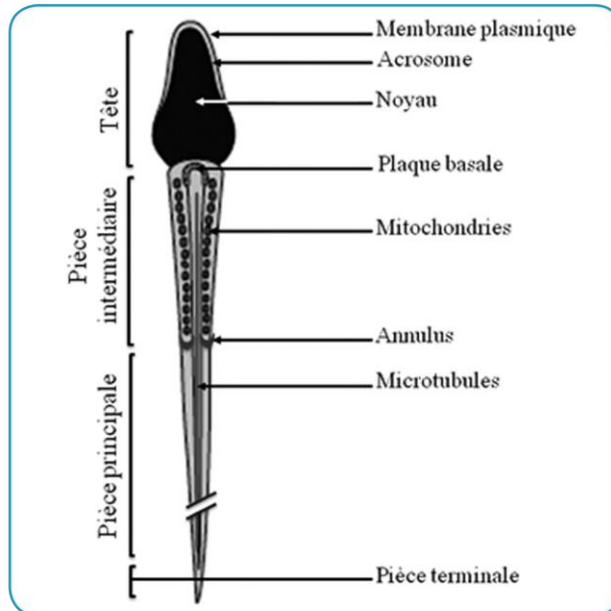


Figure 5 – Spermatozoïde observé en microscopie électronique

la longueur du flagelle, s'arrête avant la pièce terminale, composé d'un doublet central de microtubules entouré de neuf doublets périphériques. La gaine mitochondriale disposée de façon hélicoïdale entoure la pièce intermédiaire. Au niveau de la pièce principale, une gaine fibreuse entoure les fibres denses.

### 1.3.4. Régulation de la spermatogénèse

Le fonctionnement testiculaire est sous la dépendance d'hormones qui agissent de façon endocrine et paracrine (Figure 6).

L'hypothalamus sécrétant la GnRH (Gonadotrophine Releasing Hormone) de façon pulsatile stimule la synthèse de LH (Luteinizing Hormone) et de FSH (Follicle Stimulating Hormone) par l'hypophyse. La LH stimule la synthèse et la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig en se liant à un récepteur présent sur ces cellules. La FSH, via des récepteurs présents sur les cellules de Sertoli, stimule la synthèse d'inhibine B, qui exerce un rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus et l'hypophyse et stimule la spermatogénèse.

La spermatogénèse est également contrôlée par de nombreux facteurs auto-crine et paracrine qui exercent leur action via le réseau de communications

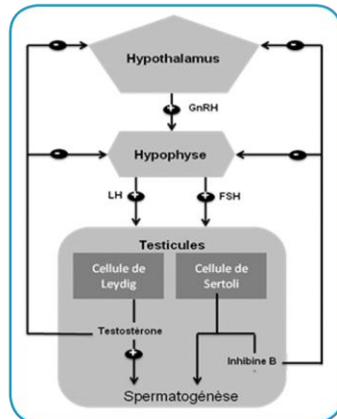


Figure 6 – Régulation endocrine du testicule

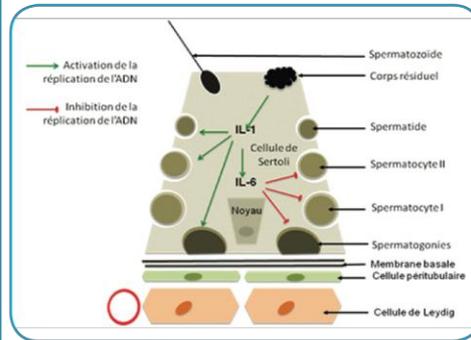


Figure 7 – Régulation paracrine de la spermatogénèse

intercellulaires. Les cellules germinales ne possédant pas de récepteurs hormonaux, la régulation de la spermatogénèse utilise les jonctions communicantes entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales. Les cellules de Sertoli produisent de nombreux facteurs (cytokines et facteurs de croissance) qui interviennent dans la multiplication et la différenciation des cellules germinales. Parmi les mieux décrits, les interleukines (IL-1 et IL-6) jouent un rôle dans la réplication de l'ADN des cellules germinales. L'IL-1 est activé par la phagocytose des corps résiduels et stimule la synthèse d'ADN dans les spermatogonies et dans les spermatozytes. L'IL-6 qui est induit par l'IL-1 inhibe, au contraire, la synthèse d'ADN (Figure 7).

## 2. Les voies excrétrices

### 2.1. Les voies intra-testiculaire : tubes droits et *rete testis*

Les tubes droits sont de courts segments de 25 µm de diamètre faisant suite aux tubes séminifères. Leur paroi est constituée d'une seule assise de cellules cubiques (cellules de Sertoli transformées). Ces tubes droits servent de jonction entre les tubes séminifères et le *rete testis*.

Le *rete testis* formé par les corps de Highmore est un réseau de canaux tapissé par un épithélium pavimenteux simple qui repose sur une lame basale.

## 2.2. Les cônes efférents

Les cônes efférents composés de canaux efférents, font suite au *rete testis* et traversent l'albuginée. Ils sont constitués par un épithélium haut pseudo-stratifié de hauteur inégale. Les canaux efférents sont entourés d'une couche de fibres musculaires lisses qui modulent la taille de la lumière. Trois types cellulaires composent l'épithélium.

Les **cellules ciliées** sont des cellules prismatiques avec un gros noyau en position basale. De nombreux organites (réticulum endoplasmique, mitochondries) sont observables en microscopie électronique. Ces cellules permettent le brassage du liquide séminal.

Les **cellules glandulaires ou sécrétrices** sont également des cellules prismatiques avec un noyau en position basale et riches en organites. Des vésicules sécrétrices sont présentes à l'apex des cellules.

Les **cellules basales**, facilement repérables, sont de petites cellules aplaties situées au niveau basal. Elles permettent le renouvellement des deux autres types cellulaires.

Les spermatozoïdes après passage dans les cônes efférents rejoignent ensuite l'épididyme. Les canaux efférents jouent également un rôle dans la résorption du liquide séminal et la sécrétion des protéines.

## 2.3. L'épididyme ou canal épидидymaire

L'épididyme est un tube de 7-8 m de long composé de 3 segments histologiquement différents : la tête, le corps et la queue. La tête, très pelotonnée, forme un renflement en position antéro-supérieure du testicule. Le corps et la queue de l'épididyme plus déroulés rejoignent le pôle postéro-inférieur.

Le canal épидидymaire est constitué d'un épithélium prismatique pseudo-stratifié composé de deux types cellulaires : des **cellules glandulaires prismatiques à stéréocils** qui présentent de nombreuses vésicules de pinocytose et d'endocytose, des lysosomes et des corps multi-vésiculaires, et des **cellules basales** qui assurent le renouvellement cellulaire. L'épithélium diminue de hauteur de la tête vers la queue. Il est entouré par un tissu conjonctif richement vascularisé et par une couche de cellules musculaires lisses qui s'épaissit de la tête vers la queue.

Les spermatozoïdes acquièrent progressivement leur pouvoir fécondant au cours de leur trajet dans l'épididyme, au contact du fluide épидидymaire. Ils sont stockés dans la queue.



**Figure 8** – L'épididyme est constitué d'un épithélium prismatic pseudo-stratifié composé de cellules glandulaires prismatic à stéréocils et de cellules basales. (Coloration : trichrome de Masson).

Au niveau de la tête de l'épididyme, 90 % du fluide testiculaire est réabsorbé. Les cellules de la tête et du corps synthétisent entre autre l' $\alpha$ -glucosidase. La carnitine et l'acétylcarnitine sont très concentrées dans le corps de l'épididyme. Les cellules de la queue de l'épididyme synthétisent des lipides. Toutes ces fonctions sont régulées par la sécrétion d'androgènes.

## 2.4. Le canal déférent

Le canal déférent fait suite à la queue de l'épididyme. Sa longueur est de 40 à 45 cm pour un diamètre de 2 mm.

La lumière est étroite et festonnée. Elle est bordée par un épithélium prismatic pseudostratifié de composition proche de celle de la queue de l'épididyme. Le chorion est constitué de tissu conjonctif lâche, riche en élastine. La couche musculuse est très développée et composée de 3 tuniques : une couche longitudinale interne, une couche circulaire moyenne et une couche longitudinale externe qui est entourée par l'adventice.

Le canal déférent termine son trajet au niveau de l'abouchement des vésicules séminales par une portion renflée : l'ampoule déférentielle. Il se continue ensuite par le canal éjaculateur puis par l'urètre prostatique.

## 2.5. L'urètre

L'urètre masculin est constitué de 3 segments :

- l'urètre prostatique (3 cm) ;
- l'urètre membraneux qui traverse le périnée (1 cm) ;
- et l'urètre spongieux qui traverse le pénis.

La muqueuse irrégulière présente un épithélium de type urinaire près de la vessie qui devient cubique stratifié et pavimenteux pluristratifié, non kératinisé à proximité du méat urinaire. De petites glandes intra ou extra-épithéliales sont situées dans le chorion (glandes de Littre). La musculature est composée de 2 couches : une longitudinale interne et une circulaire externe.

## 3. Les glandes annexes

### 3.1. Les vésicules séminales

Les deux vésicules séminales se jettent avec le canal déférent dans le canal éjaculateur après l'ampoule déférentielle.

Ce sont deux grandes glandes lobulées constituées de tubes pelotonnés séparés par cloisons conjonctives. Les tubes sont tapissés par un épithélium contourné, unistratifié composé de 2 types cellulaires : les **cellules principales glandulaires**



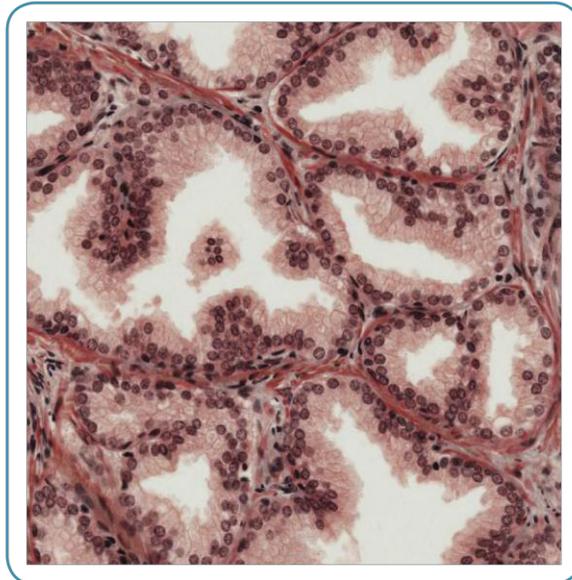
**Figure 9** – Les vésicules séminales sont tapissées par un épithélium contourné, unistratifié composé de cellules principales glandulaires et de cellules basales. (Coloration : Trichrome de Masson).

et les **cellules basales**. La muqueuse présente de nombreux replis et délimite des cavités de taille variable. Autour de la muqueuse, s'établissent les tuniques musculaires et l'adventice.

Les vésicules séminales élaborent la majeure partie du volume plasma séminal de pH alcalin. Elles sécrètent de l'eau, des électrolytes et des sucres, notamment le fructose qui est un marqueur de l'activité des vésicules séminales. Elles produisent des protéines ayant des propriétés antibactériennes (lactoferrine et lysosyme), des immunosuppresseurs, des facteurs de dé-capacitation et des facteurs de coagulation. Des prostaglandines favorisant les contractions utérines et activant la migration des spermatozoïdes, ainsi que de la vitamine C entrent dans la composition du plasma séminal.

### 3.2. La prostate

La prostate est une glande exocrine unique de 20 g entourée d'une capsule conjonctive fibro-élastique, riche en cellules musculaires lisses. Elle est constituée par une cinquantaine de glandes tubulo-alvéolaires ramifiées dont les canaux excréteurs s'abouchent dans l'urètre prostatique. Trois groupes de



**Figure 10** – La prostate présente un épithélium prismatic simple constitué de cellules basales et de cellules excrétrices (apex clair). (Coloration : trichrome de Masson).

glandes concentriques s'organisent autour de l'urètre prostatique : les glandes péri-urétrales internes, les glandes péri-urétrales externes et les glandes principales.

L'épithélium prismatique simple est constitué de **cellules basales** et de **cellules excrétrices**. Les cellules excrétrices présentent un apex clair du à leur activité phosphatase acide, marqueur de la fonction prostatique. La prostate sécrète un liquide épais et blanc dont le pH est légèrement acide. Cette sécrétion prostatique contient de la spermine et de la spermidine, de l'acide citrique, de l'albumine, des enzymes protéolytiques telles que la fibrinolysine, des phosphatases acides, des facteurs de liquéfaction du sperme et des ions (zinc, magnésium, calcium).

Des calcifications (sympexions de Robin) sont observables : leur nombre augmente avec l'âge.

### 3.3. Les glandes bulbo-urétrales ou glandes de Cowper

Ce sont de petites glandes tubulo-alvéolaires d'aspect lobulé qui s'abouchent dans l'urètre membraneux et sécrètent un mucus permettant de la lubrification de l'urètre avant l'éjaculation. Elles permettent la protection des spermatozoïdes contre l'acidité de l'urine.

## 4. Le sperme

Le sperme est le produit de l'éjaculat. Il est composé des sécrétions testiculaires, des spermatozoïdes et du liquide séminal (majorité du volume).

Le liquide séminal est composé des sécrétions des vésicules séminales (50 à 60 %, pH basique), des sécrétions prostatiques (15 à 30 %, pH acide), du fluide épидidymaire (5 à 10 %) et des sécrétions des glandes de Cowper (très faible volume).

D'après les normes établies par l'OMS en 2010<sup>1</sup>, le volume normal est supérieur à 1,5 ml, le pH doit être supérieur ou égal à 7,2 et la concentration en spermatozoïdes doit être supérieure à  $15 \cdot 10^6/\text{ml}$ .

<sup>1</sup> World Health Organization, WHO, *Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. 5<sup>th</sup> ed., Geneva, 2010.

# Dietary Lipid and Cholesterol Induce Ovarian Dysfunction and Abnormal LH Response to Stimulation in Rabbits

Anne-Gaël Cordier<sup>1,2,3</sup>, Pauline Léveillé<sup>1,3,4,5</sup>, Charlotte Dupont<sup>1,3,4</sup>, Anne Tarrade<sup>1,5</sup>, Olivier Picone<sup>1</sup>, Thibaut Larcher<sup>6</sup>, Michèle Dahirel<sup>1,5</sup>, Elodie Pומרerol<sup>1</sup>, Béatrice Mandon-Pepin<sup>1</sup>, Rachel Lévy<sup>3,4</sup>, Pascale Chavatte-Palmer<sup>1,5\*</sup>

**1** INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, Jouy-en-Josas, France, **2** APHP, Hosp Antoine Béchère, Service de Gynécologie-Obstétrique et Médecine de la Reproduction, Clamart, France, **3** Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Unité de Recherche en Epidémiologie Nutritionnelle (UREN), Bobigny, France, **4** APHP, Hôpital Jean-Verdier, Bondy, France, **5** PremUp foundation, Paris, France, **6** INRA, UMR 703 APEX, Oniris, Nantes, France

## Abstract

**Background/Aim:** Excess of fat intake is dramatically increasing in women of childbearing age and results in numerous health complications, including reproductive disorders. Using rabbit does as a biomedical model, the aim of this study was to evaluate onset of puberty, endocrine responses to stimulation and ovarian follicular maturation in females fed a high fat high cholesterol diet (HH diet) from 10 weeks of age (i.e., 2 weeks before normal onset of puberty) or a control diet (C diet).

**Methodology/Principal Findings:** Three experiments were performed, each including 8 treated (HH group) and 8 control (C group) does. In experiment 1, the endocrine response to Gonadotropin releasing hormone (GnRH) was evaluated at 13, 18 and 22 weeks of age. In experiment 2, the follicular population was counted in ovaries of adult females (18 weeks of age). In experiment 3, the LH response to mating and steroid profiles throughout gestation were evaluated at 18 weeks of age. Fetal growth was monitored by ultrasound and offspring birth weight was recorded. Data showed a significantly higher Luteinizing hormone (LH) response after induction of ovulation at 13 weeks of age in the HH group. There was no difference at 18 weeks, but at 22 weeks, the LH response to GnRH was significantly reduced in the HH group. The number of atretic follicles was significantly increased and the number of antral follicles significantly reduced in HH does vs. controls. During gestation, the HH diet induced intra-uterine growth retardation (IUGR).

**Conclusion:** The HH diet administered from before puberty onwards affected onset of puberty, follicular growth, hormonal responses to breeding and GnRH stimulation in relation to age and lead to fetal IUGR.

**Citation:** Cordier A-G, Léveillé P, Dupont C, Tarrade A, Picone O, et al. (2013) Dietary Lipid and Cholesterol Induce Ovarian Dysfunction and Abnormal LH Response to Stimulation in Rabbits. PLoS ONE 8(5): e63101. doi:10.1371/journal.pone.0063101

**Editor:** Stephen Franks, Imperial College London, United Kingdom

**Received:** December 6, 2012; **Accepted:** March 28, 2013; **Published:** May 14, 2013

**Copyright:** © 2013 Cordier et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** No current external funding sources was obtained for this study. The work was entirely financed through internal INRA funding. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** Pascale Chavatte-Palmer is currently acting as academic editor for PLOS ONE. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

\* E-mail: pascale.chavatte@jouy.inra.fr

† These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Adult lifestyle - generally diet and sedentary habits - as well as environmental chemicals are known factors impacting the fertility of men and women. According to the recent national observational study "Obésité-Epidémiologie" (ObEpi), the prevalence of overweight (defined by a Body Mass Index (BMI) >25 kg/m<sup>2</sup>) and obesity (BMI >30 kg/m<sup>2</sup>) among French women is 25% and 15% respectively [1]. The weight of women in childbearing age is dramatically increasing by about 0.5 to 0.7 kg/year. Moreover, in Europe, lipid intake represents more than 32% of food intake with a high proportion of saturated fat [2]. The Normal Weight Obese syndrome, which affects up to 37% of apparently healthy patients, is characterized by a BMI <25 together with a high fat mass (>30%), leading to high inflammatory cytokines and a high level

of oxidative stress [3,4]. Oxidative stress is well known to be detrimental in many tissues, including the female reproductive tract [5]. Compromised oocyte quality, altered pubertal development and hormonal and ovulatory dysfunction have been described.

Early onset of puberty has also been described in animals fed a high fat diet or in models of obese animals. Feng Li et al. [6] showed a dramatic acceleration of the LH pulse frequency concomitant with an early onset of puberty in rat fed a high fat diet. Even the short term (7 days) administration of a fat enriched diet can significantly modify endocrine responses, inducing higher plasma LH concentrations in rats [7]. In pigs, Iberian gilts, which are naturally obese due to leptin resistance subsequent to a mutation in the leptin receptor, have an earlier onset of puberty compared to other breeds [8]. In primates, precocious menarche

was reported in rhesus monkeys fed a high calorie diet, in association with high nocturnal plasma LH concentrations [9].

In adults, numerous studies have demonstrated a reduced LH surge in adult obese women. Overweight and obese women were found to have a longer follicular phase and reduced plasma LH concentrations [10,11,12]. In a study where 22 fertile, overweight or obese women were compared with 10 fertile, normal-weight women, the overweight group had lower plasma LH concentrations compared with normal weight women and LH concentrations were negatively correlated to BMI and waist circumference [13]. An additional study including 18 premenopausal, eumenorrheic (nonpolycystic syndrome) morbidly obese women and 12 eumenorrheic, normal-weight subjects found a dramatic reduction of both the amplitude and the mean LH concentration in the morbid obesity group [14]. In women, it has been suggested that the pituitary response to endogenous GnRH is attenuated by obesity. Recent work in Assisted Reproductive Technologies (ART) has shown that obese patient require higher doses of gonadotropins and prolonged ovarian stimulation compared to normal weight individuals [15,16,17]. Other studies, however, have failed to demonstrate a difference in the ovarian response to stimulation in obese women [18,19,20].

Effects of high fat diets were also observed on the ovarian function. In rats, the administration of a cafeteria diet was shown to negatively affect female reproduction by reducing the number of oocytes (median number (interquartile range) of oocytes in cafeteria diet fed females [1(0/6)] vs. chow-fed rats [10(8/12)]) and preantral follicles in the ovary [21]. In obese hyperinsulinemic (fa/fa) adult rats, the ovaries from the obese rat contained more corpora lutea, antral, pre antral and atretic follicles compared to controls, with a positive association between follicular atresia and the expression of the pro apoptotic factor of transcription FOXO1 [22]. Similarly, the number of follicles present in the ovary of obese, ob/ob mice, is reduced and granulosa cell apoptosis and follicular atresia are increased [23].

In the same model, excessive lipid storage was shown to induce ovarian function disorders with advanced follicular atresia, apoptosis and defective steroidogenesis [24]. In contrast to what has been found in rodents, fat supplementation in lactating cows did not appear to affect follicular growth, although luteal progesterone was reduced in supplemented cows [25]. In the obese Iberian pig model, the ovarian follicular population, plasma estradiol concentrations and ovulation rates were not different compared to lean pigs [26].

High fat diets appear to induce different effects on reproduction according to the model, the age, the exposure and/or the fat content in the diet. The objective of this work was to explore the effects of a high fat, high cholesterol diet administered from the prepubertal period on the onset of reproductive function, endocrine status and follicular growth, using a previously established rabbit model [27]. The rabbit was chosen as a model because of its decisive advantages over the rat or mouse models for the proposed longitudinal studies [28]. Indeed, it is a preferred model for diet-induced lipid metabolic disorders and insulin resistance [29] and its size allows for repetitive blood sampling and transabdominal ultrasound during pregnancy.

## Materials and Methods

### Ethical Statement

The experiment was performed in accordance with the International Guiding Principles for Biomedical Research involving Animals as promulgated by the Society for the Study of Reproduction and in accordance with the European Convention

on Animal experimentation. The animal studies were approved by the local animal care and use committee (CSU UCEA) and received ethical approval from the local ethics committee (COMETHEA), under protocol number 12/029. Researchers involved in the work with the animals possessed an animal experimentation license (level 1 or 2) delivered by the French veterinary authorities.

### Animals and Diet

Forty-eight female New Zealand rabbits (INRA 1077 or PS 19 line) were housed individually with free access to water, under a 8 hours light/16 hours dark photoperiod unless stated below. At 10 weeks of age, they were allocated to one of two groups and fed *ad libitum* with either a hyperlipidic hypercholesterolemic diet (HH group) (n = 24) or a control diet (C group) (n = 24) containing respectively 7.71% or 1.83% fat and 0.2% or 0% cholesterol as previously described [27].

The fat supplementation consisted of soybean oil, i.e. mainly polyunsaturated fatty acids (N6/N3 = 6.86). The euthanasia of the animals was performed by exsanguination after electronarcosis at the local experimental slaughterhouse, according to the protocol approved by the local ethics committee and the veterinary services.

### Experimental Protocol

The study was organized in 3 consecutive experiments as summarized in Figure 1.

**Experiment 1 (n = 16).** The first experiment was conducted in does from 10 to 27 weeks of age to evaluate the influence of the HH diet on the onset of puberty and ovulation disorders according to age. Experiments were repeated in the same animals at 13, 18 and 22 weeks of age.

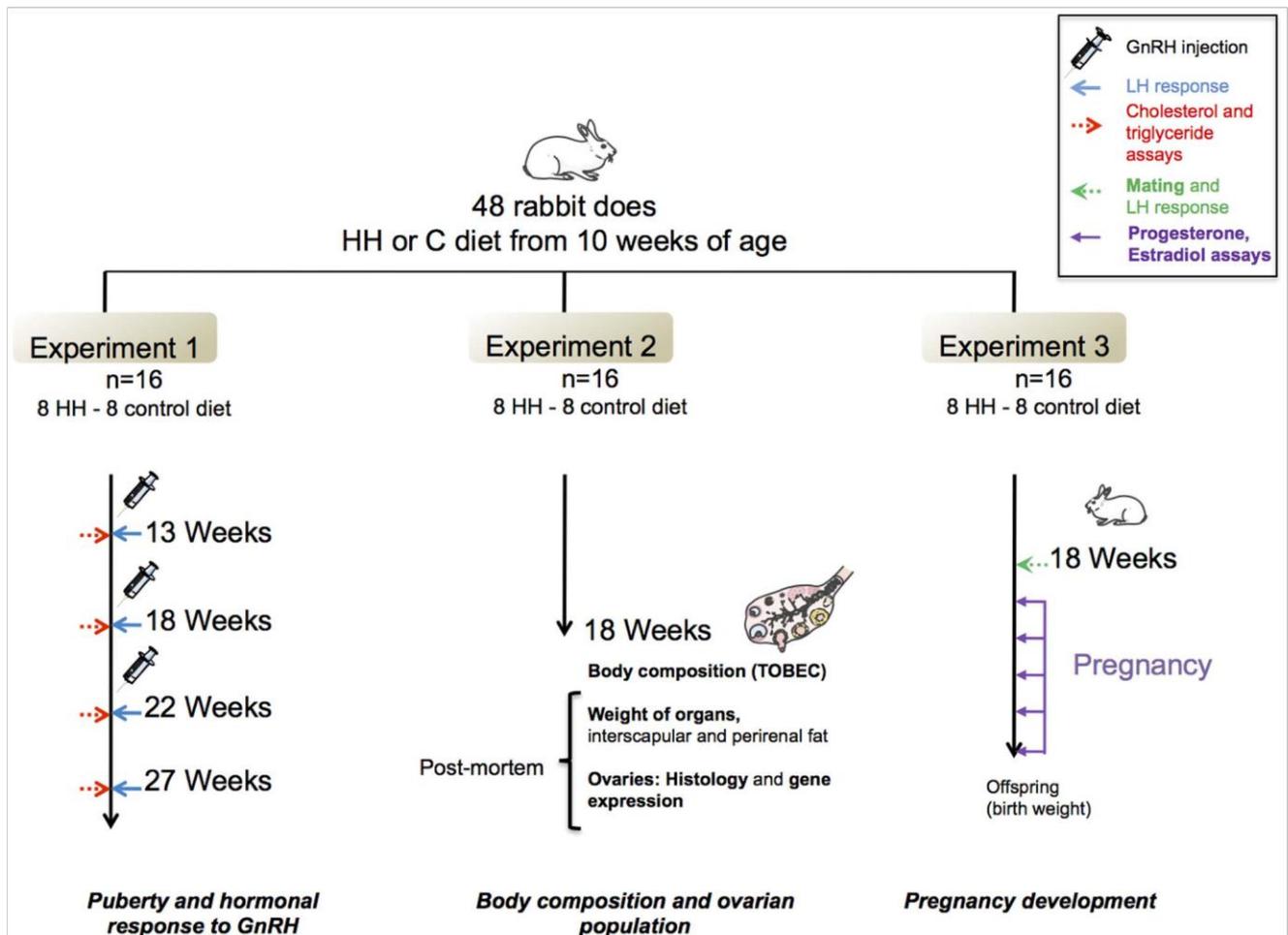
Females were fasted overnight, weighed and blood was collected from the auricular vein into EDTA coated vacutainers for biochemical dosages (total cholesterol and triglycerides, progesterone, leptin and estradiol).

The rabbit being an induced ovulator, puberty can only be assessed by inducing ovulation, either by mating or by chemical stimulation. Here, the onset of puberty was evaluated by injecting 40 µg of a GnRH analogue (Receptal®) IM after 1 week of synchronization with light (16 hours of light/8 hours of dark). Blood was collected for LH assay at 0, 30, 60, 90, 120 and 180 minutes after injection. Blood samples were obtained through a catheter previously placed in the peripheral ear vein into EDTA coated vacutainers which were placed on ice until processing. Samples were centrifuged within an hour of collection and supernatants stored in several aliquots at -20°C until analysis.

**Experiment 2 (n = 16).** In the second experiment, ovaries were collected from 18 week old females after slaughter in order to assess follicular populations in the ovaries and ovarian function.

One week before slaughter, 16 does were synchronised by 16 hours of light and 8 hours of dark by day. At 18 weeks of age, the body composition was analysed by Total Body Electrical Conductivity (TOBEC) [30]. After euthanasia, the liver, kidney, ovaries, interscapular and perirenal fat were weighted. All ovaries were flash frozen in liquid nitrogen and then conserved at -80°C for molecular analysis (1 ovary per animal) or fixed in 10% formalin and processed for histological analysis (1 ovary per animal).

For histological analysis, ovaries were embedded in paraffin wax. Four transversal 6 µm sections, each spaced from 100 µm minimum from the others, were stained per ovary using a routine hematoxylin-eosin-saffron (HES). The microscopic observation was performed blindly in two steps: 16 randomly selected fields per ovary were observed with ×10 magnification (4 fields per section,



**Figure 1. Schematic representation of the experimental protocol.** Three experiments were performed, each including 8 treated (HH group) and 8 controls does (C group). Experiment 1: Influence of HH diet on puberty and hormonal response. Experiment 2: Influence of HH diet on the ovarian follicular population. Experiment 3: Influence of HH diet on endocrine function during gestation, with fetal growth monitored by ultrasound and recording of offspring birth weight. doi:10.1371/journal.pone.0063101.g001

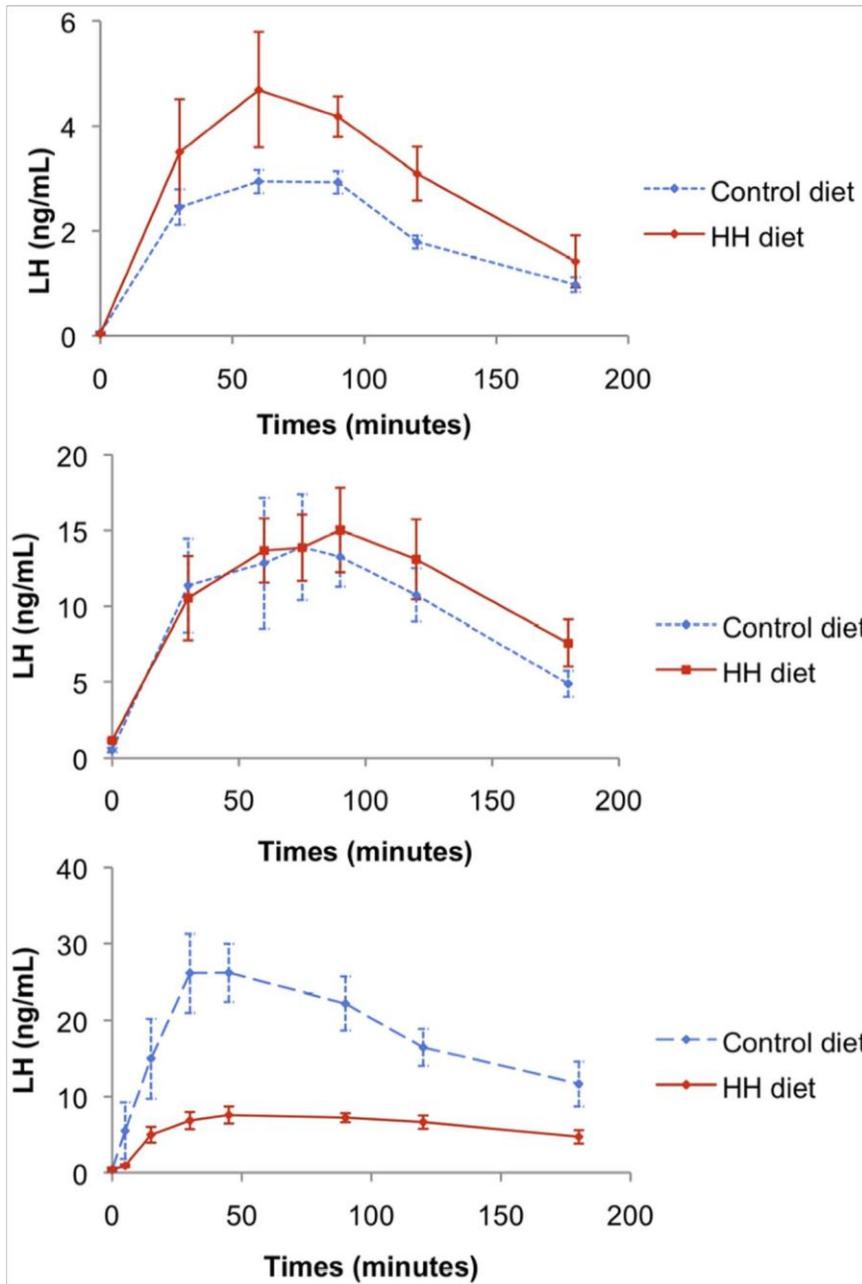
4 sections per ovary) and 4 randomly selected fields at  $\times 5$  magnification per ovary (2 fields per section, 2 sections per ovary) using a light microscope combined with a digital camera (DXM 1200, Nikon, Champigny, France). The intermediate magnification ( $\times 10$ ) was chosen in order to count all smaller follicles (primordial, primary, secondary) and low magnification ( $\times 5$ ) to count larger ones (tertiary, hemorrhagic, luteum corpus). Bodenstein histological criteria were used for follicle classification [31]. Atretic follicles as assessed by the irregular shape of the pellucid membrane, were also numbered. Repeatability was tested by reproducing measurements 3 times on the same sample by the same experimenter.

The expression of 9 genes involved in ovarian development was studied by RT-qPCR. Total rabbit RNAs were extracted from each sample using Trizol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) using the RNeasy Mini kit (QIAGEN SA, Courtaboeuf, France), following the manufacturer's instructions. RT was performed on each sample using 5  $\mu$ g Dnase-treated RNA incubated with random hexanucleotide primers with Superscript II (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), according to the manufacturer's instructions.

Real-time PCR analysis of the different genes was performed using the ABIPrism 7700 HT apparatus (Applied Biosystems).

Briefly, PCR was performed in triplicate with the Absolute blue QPCR SYBR Green ROX mix (Abgene, Les Ulis, France), using 50 ng of cDNA from the RT. Specific primers were used (data supplied as Data S1). Control experiments were performed to ensure that the primers could not amplify any genomic products. Cycle conditions were as follows: one cycle at 50°C for 2 min, followed by 1 cycle at 95°C for 10 min, followed by 45 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. All expression data were normalized using the mean expression level for each sample of three different genes (H2AFX, CPR2 and YWHAZ). Results were analyzed using Qbase Software (Ghent University, Ghent, Belgium). Each condition (control or HH diet) represents the mean of 5 different animals.

**Experiment 3 (n = 16).** The aim of the third experiment was to measure the effects of the HH diet on hormonal response just after mating and during gestation. At 18 weeks of age and after synchronization with light as described in Experiment 2, 8 control and 8 HH rabbit does were mated with 3 different males. The LH response was analysed in samples collected from the peripheral ear vein, through a previously placed catheter, into EDTA coated vacutainers, 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360 minutes after mating. Blood samples were collected from the peripheral ear vein



**Figure 2. Mean ( $\pm$ SEM) LH response after induction of ovulation at 13 (A), 18 (B) and 22 weeks (C) of age (ng/ml).**  
 doi:10.1371/journal.pone.0063101.g002

for estradiol (E2) and progesterone (P4) assays 3, 6, 13, 20 and 27 days after mating.

Pregnancy was followed by ultrasound scanning at 13, 21 and 27 days of gestation as described previously [27,32], using a Voluson V8 (General Electrics Healthcare). Does were allowed to deliver naturally and offspring were numbered and weighed at birth.

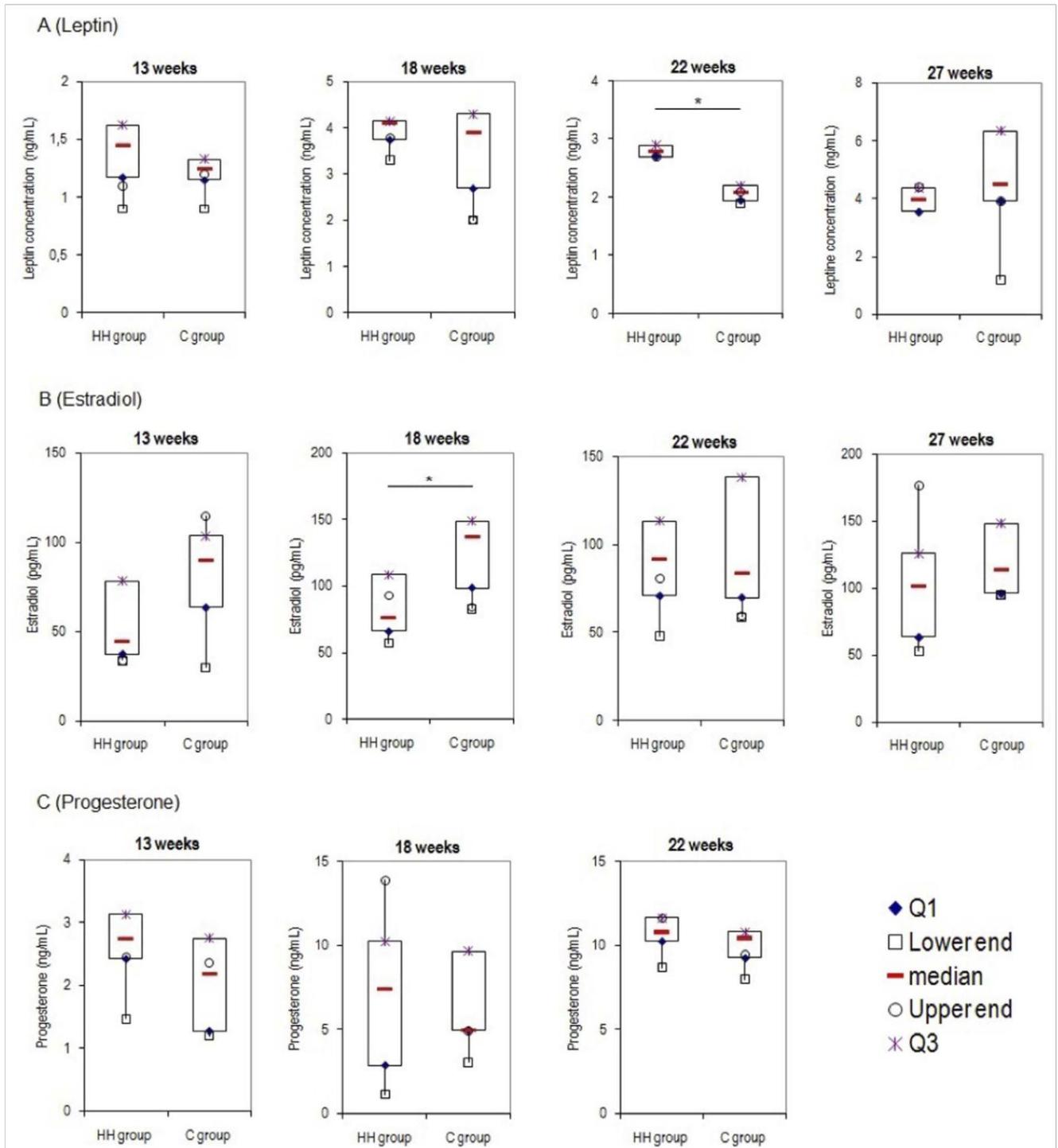
Total cholesterol and triglycerides were analysed using a colorimetric enzymatic technique (OSR 6116-6187-61118 (OLYMPUS, Hamburg, Germany)).

Hormones were assayed in one single assay to avoid inter-assay variability. LH was measured both after stimulation (experiment 1) or mating (experiment 3) with a multispecies ELISA, with an intra-assay variation of 2.5% for values above 1 ng/ml (LH-DETECT<sup>®</sup>,

Repro-Pharm, France). Leptin was measured in duplicate with a multi-species leptin RIA Kit (LINCO Research, Missouri, USA) (25  $\mu$ L) with an intra-assay variation below 5% [33]. Estradiol was measured in duplicate by using the I<sup>125</sup> E2 Diasorin RIA Kit with an intra-assay of 8% (Sorin diagnostic, Antony, France). Progesterone was measured in duplicate (25 and 40  $\mu$ L) by direct RIA method (without extraction) using an in-house antibody. Intra-assay variation was 25%.

**Statistical Analyses**

Non parametric statistical analyses were used. For LH response, areas under the curves (AUCs) were calculated for each animal and data analysed using the Mann and Whitney test. The others variables were analysed by a comparison of means using the



**Figure 3. Mean ( $\pm$ SEM) serum leptin, estradiol and progesterone concentrations according to age in HH and Control does.** Each box plot represents the distribution of values in each group at 13, 18, 22 and 27 weeks of age for leptin and estradiol (A and B) and at 13, 18 and 22 weeks of age for progesterone (C). Median values are indicated by the red line within the box. The upper point (in purple) and the lower point (in blue) represent the first and the third quartile respectively. The highest and the lowest values are representing by circle and square respectively. \*indicates  $P < 0.05$ . doi:10.1371/journal.pone.0063101.g003

Wilcoxon test (PROC NPAR1WAY, SAS version 9.1; SAS Institute, Cary, NC). For progesterone and estradiol values, rabbits were also classified according to the peak value time and a Fisher's test was used to analyse repartition. All results are expressed as means  $\pm$  Standard Error of the Mean (SEM) (figures

as curves) or as median (quartile1; quartile3) (box plot figures). Significance was defined as  $P \leq 0.05$ .

**Table 1.** Mean number follicles (intermediate magnification).

Type of follicle	HH diet	Control diet	P
Primordial	289.00±29.64	340.20±37.05	0.14
Type I	30.60±3.51	29.70±3.91	0.43
Small type II	16.70±2.48	14.70±3.24	0.31
Large type II	12.00±2.42	13.50±2.18	0.32
Antral	9.50±1.85	12.20±1.49	0.13
Atretic	51.40±4.83	39.10±5.02	0.05
Hemorrhagic	3.60±0.65	6.20±0.96	0.02
Corpus luteum	0.00±0.00	0.12±0.13	0.16
Corpus albicans	0.60±0.26	0.25±0.16	0.12

Follicles are classified in 9 categories. The counting was realized using one ovary per rabbit and per group (intermediate magnification).  
doi:10.1371/journal.pone.0063101.t001

## Results

### Experiment 1

**Weight and metabolic blood test results.** The HH diet did not induce obesity, as no significant difference in body weight was observed at 13, 18, 22 and 27 weeks (data supplied as Data S2).

Plasma cholesterol concentrations were significantly higher in HH does compared to controls, at all times. However, no significant difference was found between HH and Controls for plasma triglyceride concentrations (data supplied as Data S3 and S4).

**Hormonal response after induction of ovulation.** The LH response to GnRH stimulation according to age is shown in Figure 2. At 13 weeks, the peak LH concentrations in response to GnRH was significantly higher in HH does ( $P<0.02$ ). At 18 weeks, no difference was found between the two groups ( $P=0.428$ ). At 22 weeks, the LH response was significantly reduced in HH does ( $P<0.0001$ ).

Leptin serum concentrations were significantly higher in HH does compared to controls at 22 weeks of age (2.8 ng/ml (2.7;2.9) vs. 2.1 ng/ml (2.0;2.2), respectively)  $P<0.05$ ) but not before (Figure 3 (A)). Estradiol concentrations were significantly reduced in HH does at 18 weeks of age (76.0 pg/mL (66.0;108.5) vs. 137.0 pg/mL (98.5;149.0) respectively,  $P<0.05$ ) (Figure 3 (B)). No difference was found between groups for progesterone concentrations at any time (Figure 3 (C)).

### Experiment 2

**Body composition by TOBEC.** At 18 weeks of age, HH does had a significantly higher body lipid content compared with controls (6.11±0.19% vs. 5.67±0.14%, respectively,  $P=0.04$ , other data supplied as Data S5).

Despite a large difference in the means for adipose tissue weight (mean perirenal+interscapular tissue: 101.84 g ±15.41 vs. 82.95 g ±16.90 in HH and Controls, respectively,  $P=0.20$ ), there was no significant difference in adipose tissue weight. There was no significant difference in organ weight either (liver, kidney and ovaries), data supplied as Data S5).

**Histological results.** The aim of this analysis was to evaluate follicular populations in the ovary. Using intermediate ×10 magnification, a significantly higher number of atretic follicles was observed in the HH group compared to controls (51.40±4.83 vs. 39.10±5.02, respectively,  $P=0.05$ ) (Table 1, Figure 4). Using the ×5 magnification, a significantly reduced number of antral

follicles was observed in the HH group compared to controls (7.38±1.00 vs. 17.88±2.28, respectively,  $P<0.001$ ) (Table 2, Figure 4).

**Gene expression in the ovary.** The expression of 9 genes involved in ovarian development was studied by RT-qPCR. These transcripts fell within functional categories which included: (i) steroidogenesis (HSD3B2), (ii) germ cell differentiation (VASA), (iii) apoptosis (Caspase), (iv) folliculogenesis (FOXL2, FST, GDF9, BMP15), and (v) receptors (ESR1, ESR2). Of these quantified transcripts, none showed any significant difference in expression between the 2 groups (data supplied as Data S6).

### Experiment 3

**Endocrine response after mating.** After mating at 18 weeks of age, all the control does but only 4 out of 7 HH does had a normal LH response. The three other animals had either no LH increase at all ( $N=2$ ) or a delayed response ( $N=1$ ) (Figure 5 (A)) but the difference was not significant between the two groups.

During gestation, there was no significant difference between the groups for plasma estradiol and progesterone concentrations, although the hormonal peaks appeared to be delayed in HH does (Figure 5 (B and C)).

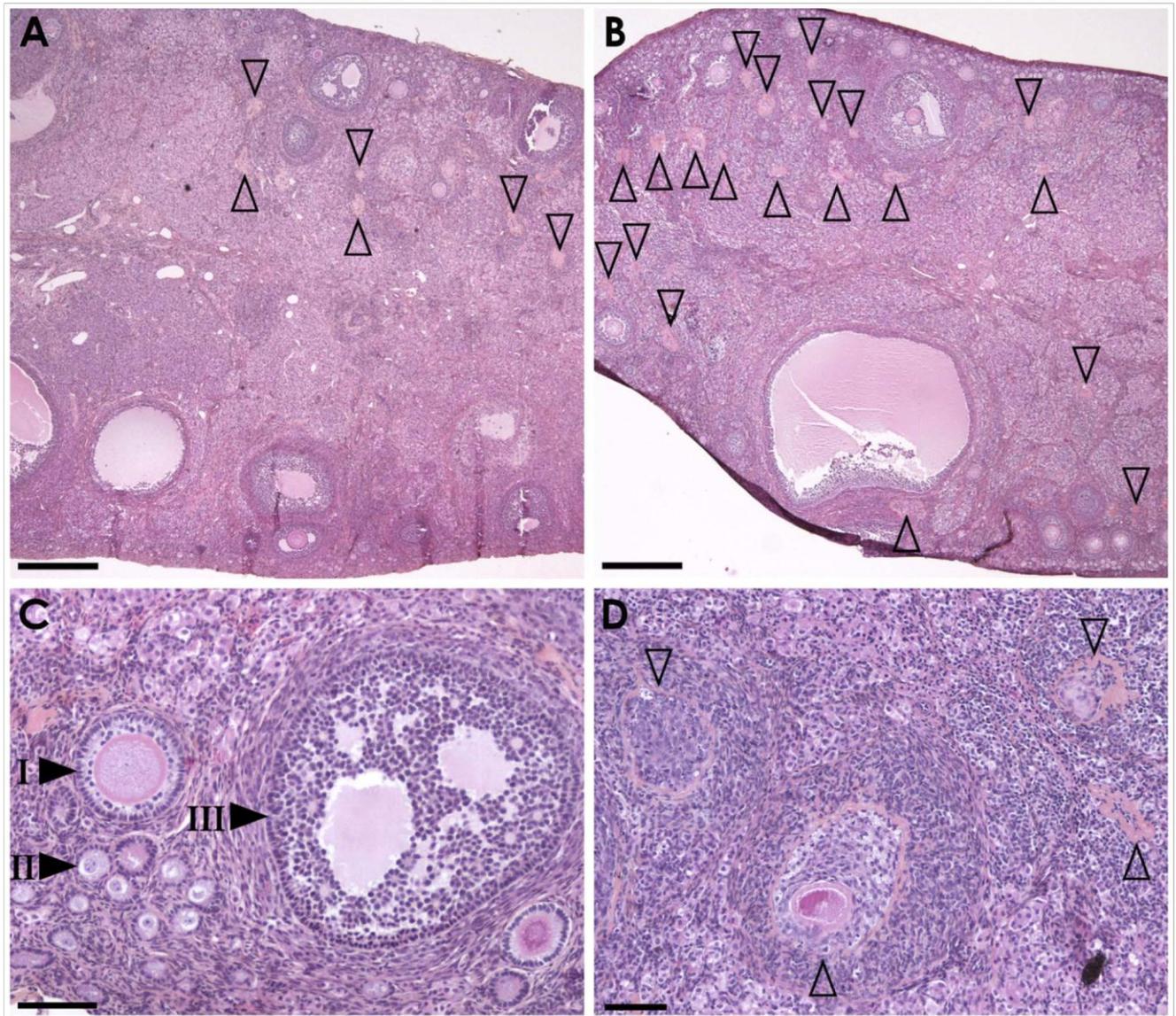
**Fetal growth and offspring characteristics.** All control females became pregnant whereas the two females that had no LH response did not become pregnant. The median litter size was 6 pups in the Control group and 7 pups in the HH group, with no statistical difference between groups.

On ultrasound examination, biparietal diameter, abdominal circumference and body surface area were significantly smaller in HH diet fetuses at 27 days of gestation ( $P=0.012$ ,  $P=0.001$ ;  $P=0.005$  respectively) (data supplied as Data S7). At birth, HH pups were significantly lighter in the HH group compared to control group (37.3±1.89 g vs. 47.77±1.63 g, respectively,  $P<0.0001$ ).

## Discussion

This study evaluated the effect of a diet supplemented in soybean oil and cholesterol, administered from before the age of puberty (13 weeks) on reproductive hormones, ovarian maturation and ovulation disorders, using a previously used rabbit model. In summary, although the rabbit does were not overweight, the HH diet administered from before puberty onwards affected onset of puberty, follicular growth and hormonal responses to breeding and GnRH stimulation. Although the number of antral follicles was decreased and that of atretic follicles increased in HH does, the ovarian expression of genes involved in folliculogenesis was not modified. Fertility and prolificity did not appear to be affected, although 2 does did not get pregnant as a result of a lack of LH response to mating (LH response and ovulation are induced by mating in rabbits). In contrast, fetal growth was affected with intra-uterine growth retardation observed in offspring, as previously observed [27].

The enhanced LH response at 13 weeks in the HH group indicates an early puberty onset compared to controls. An early onset of puberty [9] and of high LH pulse frequency [34,35] has also been demonstrated in obese rats. In this model, a fat-related signal has been shown to facilitate the activation of hypothalamic GnRH release and advance the onset of puberty [6,36]. In rhesus monkeys, administration of a high-calorie diet results in the acceleration of growth accompanied with precocious menarche [6]. In humans, the onset of puberty is influenced mainly by genetics, lifestyle, environment, nutrition and body fat [37,38,39]. In adults, body size parameters, such as weight or BMI, are



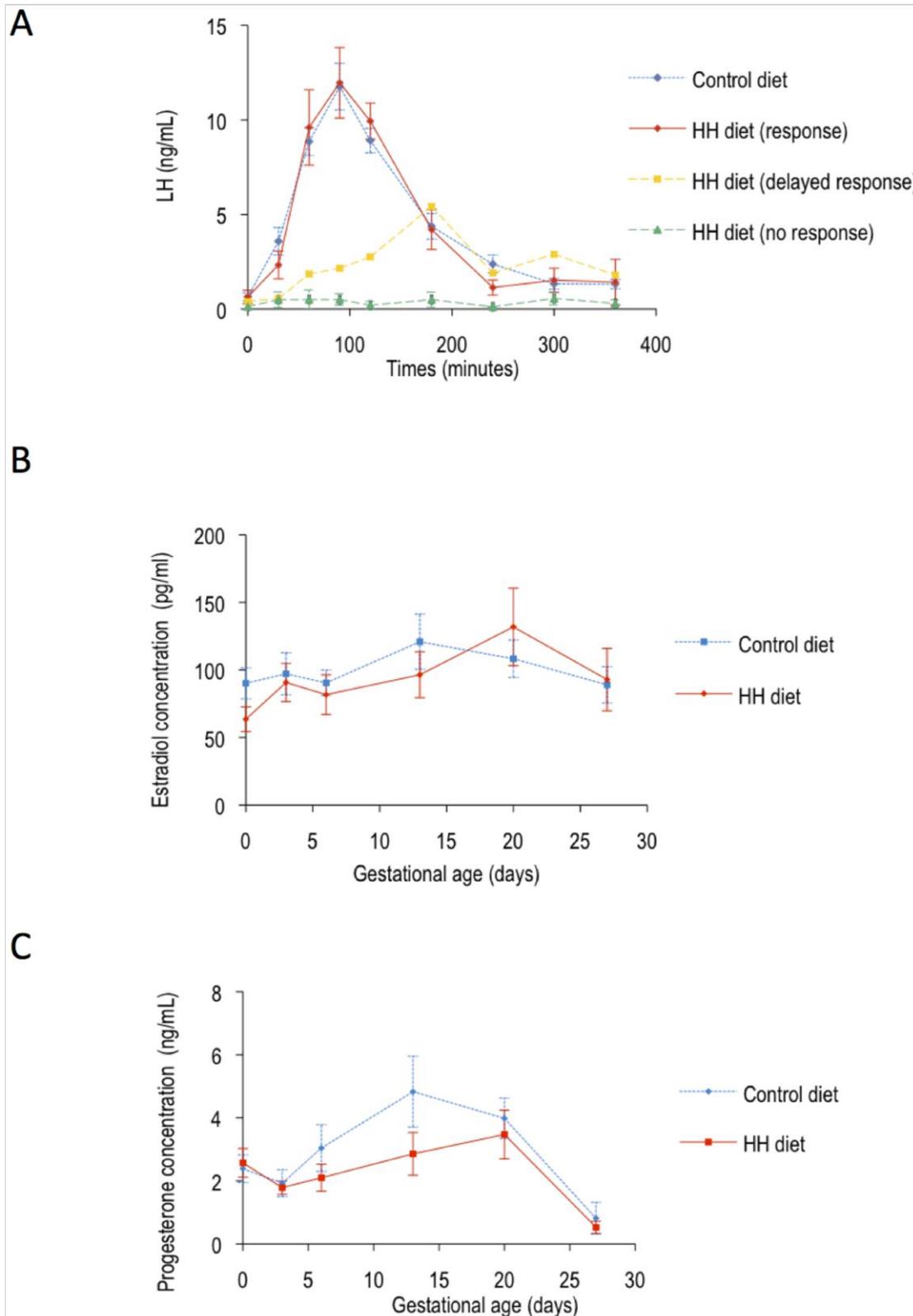
**Figure 4. Ovarian histology.** Hematoxylin-eosin-saffron staining ovary sections of rabbits fed a control diet (left panel) or HH diet (right panel) at low (A,B) or high (C,D) magnification. Compared to the control sample (A), numerous atretic follicle remnants (open arrowheads) are scattered in the ovary parenchyma of the high fat diet-fed animal (B). With higher magnification, primary (I), secondary (II) and tertiary follicles (III) are observed in the control samples (C) whereas numerous fields in high fat diet-fed animal samples are devoid of maturing follicles and are only composed of atretic follicle remnants at different stage of involution (D). Scale bars = 500  $\mu$ m (A, B) and 100  $\mu$ m (C, D).  
doi:10.1371/journal.pone.0063101.g004

**Table 2. Mean number follicles according to size (low magnification).**

Type of follicle	HH diet	Control diet	P
Type II	15.50 $\pm$ 2.27	12.13 $\pm$ 2.01	0.14
Antral	7.38 $\pm$ 1.00	17.88 $\pm$ 2.28	<0.001
Atretic	44.38 $\pm$ 8.27	31.13 $\pm$ 4.89	0.09
Hemorrhagic	3.13 $\pm$ 0.61	2.13 $\pm$ 0.69	0.14
Corpus luteum	0.00 $\pm$ 0.00	0.25 $\pm$ 0.16	0.07

Follicles are classified into 5 categories. The counting was realized using one ovary per rabbit and per group (low magnification).  
doi:10.1371/journal.pone.0063101.t002

strongly correlated with an earlier onset of puberty [37]. In the prepubertal age (5–9 years), increased subcutaneous fat and BMI are associated with increased likelihood of early (<11 years) menarche [38]. Interestingly, the studies evaluating whether nutritional habits (total, unsaturated or saturated fatty acids) could influence age of menarche are still controversial. Some studies reported that higher intake of total fat or PUFA intake in childhood were associated with earlier age at menarche [39,40,41,42] while others found that a balance towards saturated fat or MUFA decreased the risk of early menarche [41,43]. In any case, early menarche constitutes a robust marker of obesity and mortality risk in adult life [44,45]. In humans, an earlier age of menarche has been associated with an earlier age at menopause [46,47]. In experiment 3, at 18 weeks of age, although there was no significant difference in the LH response to GnRH, 2 out of 8



**Figure 5. Hormonal response (LH response, estradiol and progesterone) after mating.** (A) Mean  $\pm$ SEM serum LH concentrations (ng/mL) according to time after mating and response to mating: C animals that all responded (N=7). HH animals that had a LH response (N=5). - HH animal that had a delayed response (N=1). - HH animals that did not respond (N=2). (B) Mean  $\pm$ SEM serum estradiol concentrations (pg/mL) in HH and C does at 0, 3, 6, 13, 20 and 27 days of gestation (term: 31 days). (C) Mean  $\pm$ SEM serum progesterone concentration (ng/mL) in HH and C does at 0, 3, 6, 13, 20 and 27 days of gestation (term: 31 days).  
doi:10.1371/journal.pone.0063101.g005

HH does did not respond to mating and 1/8 had a delayed response. In experiment 1, in slightly older animals, at 22 weeks of age, the HH diet induced a significant decrease of the LH response in all females after induction of ovulation. In rats, a reduced LH surge before estrous and a reduction in plasma estradiol leading to anovulation were reported in females fed a high fat diet (45% calories from fat) [48]. In humans, a significant reduction of both amplitude and/or mean LH has been reported in obese compared to normal weight women [10,11,12,14] and a recent study on 154 normal weight and 25 obese weight women showed that adiposity may delay the timing and the concentration of hormonal peaks (progesterone and LH) during the menstrual cycle [13]. In mice, neonatally undernourished is associated with delayed puberty and an impairment of the peripubertal GnRH/LH system to respond to ovariectomy [49].

Moreover, in the present study, circulating estradiol concentrations were significantly reduced in the HH group at 18 weeks, in agreement with data obtained in one obese rat model [48]. The anti apoptotic role of estradiol [50] could possibly explain the significant increase observed in the number of atretic follicles. A significant increase in plasma leptin concentrations was only observed at 22 weeks of age. Unfortunately, these females were not put down nor their body composition analysed with TOBEC at that time, so it can only be assumed that this increase in leptin is related to higher percentage of fat in these animals. It is also difficult to try and relate this increased plasma leptin to direct effects on the ovary and more work is needed to elucidate this question. During gestation both progesterone and estradiol peaks tended to be delayed in HH does, and HH fetuses were growth retarded. In women, a positive correlation has been established between plasma progesterone concentrations and weight gain during pregnancy. In obese pubertal use, intra-uterine growth retardation has also been associated with a reduced placental secretion of progesterone [51]. No association was found, however, between gestational weight gain, maternal dietary fatty acid intake and estradiol concentrations [52].

Histological analysis of the ovaries of HH does at 18 weeks of age showed a higher number of atretic follicles and remnants of atretic follicles, indicating a possible increase in apoptotic mechanisms during folliculogenesis. Unfortunately, direct numbering of atretic follicle using specific - Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL) on sections of these ovaries, did not display significant results (data not shown) as this assay is focused on on-going atresia and do not reveal ended previous processes evidenced in HES staining by the presence of fibrotic foci with central hyper eosinophilic remnants of the zona pellucida. Moreover no difference was found in the expression of genes involved in the ovarian development. In parallel, histological analysis also showed a significantly reduced number of antral follicles in the HH group. Previous studies showed that the administration of a polyunsaturated fatty acids (PUFA) diet to cows during the periconceptional period reduces the number of small and middle size ovarian follicles, without affecting oocyte quality or *in vitro* cleavage [53]. In contrast, in a sheep model, short term overnutrition increased the number of large size ovarian follicles [54]. In agreement with the present study, rat models of obesity have impaired ovarian follicular growth with increased apoptosis [21,55], but no difference in morphology nor in the number of antral follicles [21]. In the rabbit, the ovarian cortex is thin and is characterized by a small number of primordial and small developing follicles with a higher number of mature follicles [56,57]. In terms of reproduction, rabbit females are characterized by the fact that mating induces ovulation. Follicular growth is a continuous process with waves of maturation that guarantee

mature oocytes nearly anytime. During post-natal growth, secondary, tertiary and antral follicles appear between 4 and 12 weeks of age. Basal growth until antral formation is independent of gonadotrophin secretion whereas terminal follicular development depends on FSH. Therefore, the beginning of the study (10 weeks of age) occurred during a key period when hormonal dependence was starting, between tertiary and antral follicles and it is not known whether this was an important determinant in the observed results.

Systemic alterations associated with woman obesity (hyperinsulinemia, dyslipidemia, and symptoms of chronic inflammation) extend directly into the ovarian follicular microenvironment. Overweight and obese women were shown to exhibit elevated intrafollicular insulin, triglyceride and androgens which were associated with poor reproductive outcome [58], although there was no direct relationship between serum and follicular concentrations of free fatty acids [59]. Recently, a higher concentration of inflammatory factors was also observed in the follicular fluid of infertile obese women [60]. In the present study, the increased plasma cholesterol concentrations may have induced increased oxidative stress in the ovary, leading to increased follicular atresia. Whether direct effects of the maternal diet on the oocyte and/or effects on the oviductal and uterine environment induced fetal IUGR also remains to be determined, although the very early deregulation of gene expression in the embryo with the present model suggests that the oocyte quality may be affected by the HH diet [27].

In conclusion, this paper highlights, using an animal model, the possible adverse effects of unbalanced diets on the reproductive function and possible fertility of women. Although the diet used here is rich in poly-unsaturated fatty acids whereas the diet in humans consist mainly of saturated fats, this model remains relevant for hypercholesterolemia and also gives insight in general effects of high lipid diets. Given the dramatically increasing prevalence of obesity among women of reproductive age, it is essential that women be counseled on the reproductive risks of obesity and dangerous dietary behaviors and the proven benefits of lifestyle modification. This intervention must occur in the pre-conception period.

## Supporting Information

### Data S1 Sequences of qPCR primers.

(DOC)

**Data S2 Weight according to age.** Mean  $\pm$ SEM weight (kg) at 10, 13, 17, 23 and 27 weeks in the 2 groups (8 rabbits per groups).

(TIFF)

**Data S3 Serum cholesterol concentrations according to age.** Mean  $\pm$ SEM serum cholesterol concentration (mmol/L) in the 2 groups according to age (13, 18, 22 and 27 weeks). \*\*\* $P < 0.001$ .

(TIFF)

**Data S4 Serum triglycerides concentrations according to age.** Mean  $\pm$ SEM serum triglyceride concentration (mmol/L) in the 2 groups according to age (13, 18, 22 and 27 weeks).

(TIFF)

**Data S5 Body composition, organ weight and fat mass in rabbits at 18 weeks of age according to group.**

(DOC)

**Data S6 Gene expression in the 2 groups.** Relative expression of genes involved in folliculogenesis in the 2 groups.

(TIFF)

**Data S7 Biometric measurements made by ultrasound examination in fetuses from the 2 groups at 27 days of gestation.**

(DOC)

**Acknowledgments**

The authors thank Stephen Besseau, Chantal Julia, and Mehdi Menai for their help for statistical analysis.

**References**

- Charles MA, Basdevant A, Eschwège E (2009) Enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité. *Obepi* 2009.
- Armitage JA, Taylor PD, Poston L (2005) Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. *J Physiol (Lond)* 565: 3–8.
- De Lorenzo A, Del Gobbo V, Premrov M, Bigioni M, Galvano F, et al. (2007) Normal-weight obese syndrome: early inflammation? *Am J Clin Nutr* 85: 40–45.
- Di Renzo L, Galvano F, Orlandi C, Bianchi A, Di Giacomo C, et al. (2010) Oxidative stress in normal-weight obese syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 18: 2125–2130.
- Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S (2012) The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 10: 49.
- Feng Li X, Lin YS, Kinsey-Jones JS, O'Byrne KT (2012) High-Fat Diet Increases LH Pulse Frequency and Kisspeptin-Neurokinin B Expression in Puberty-Advanced Female Rats. *Endocrinology* 153: 4422–4431.
- Soulis G, Kitraki E, Gerozissis K (2005) Early Neuroendocrine Alterations in Female Rats Following a Diet Moderately Enriched in Fat. *Cellular and Molecular Neurobiology* 25: 869–880.
- Gonzalez-Anover P, Encinas T, Torres-Rovira L, Sanz E, Pallares P, et al. (2011) Patterns of Corpora Lutea Growth and Progesterone Secretion in Sows with Thrifty Genotype and Leptin Resistance due to Leptin Receptor Gene Polymorphisms (Iberian Pig). *Reproduction in Domestic Animals* 46: 1011–1016.
- Terasawa E, Kurian JR, Keen KL, Shiel NA, Colman RJ, et al. (2012) Body weight impact on puberty: effects of high-calorie diet on puberty onset in female rhesus monkeys. *Endocrinology* 153: 1696–1705.
- Sherman BM, Korenman SG (1974) Measurement of serum LH, FSH, estradiol and progesterone in disorders of the human menstrual cycle: the inadequate luteal phase. *J Clin Endocrinol Metab* 39: 145–149.
- Grenman S, Ronnema T, Irjala K, Kaihola HL, Gronroos M (1986) Sex steroid, gonadotropin, cortisol, and prolactin levels in healthy, massively obese women: correlation with abdominal fat cell size and effect of weight reduction. *J Clin Endocrinol Metab* 63: 1257–1261.
- Santoro N, Lasley B, McConnell D, Allsworth J, Crawford S, et al. (2004) Body size and ethnicity are associated with menstrual cycle alterations in women in the early menopausal transition: The Study of Women's Health across the Nation (SWAN) Daily Hormone Study. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2622–2631.
- Yeung EH, Zhang C, Albert PS, Mumford SL, Ye A, et al. (2012) Adiposity and sex hormones across the menstrual cycle: the BioCycle Study. *Int J Obes (Lond)*.
- Jain A, Polotsky AJ, Rochester D, Berga SL, Loucks T, et al. (2007) Pulsatile luteinizing hormone amplitude and progesterone metabolite excretion are reduced in obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 2468–2473.
- Maheshwari A, Stofberg L, Bhattacharya S (2007) Effect of overweight and obesity on assisted reproductive technology—a systematic review. *Hum Reprod Update* 13: 433–444.
- Balen AH, Platteau P, Andersen AN, Devroey P, Sorensen P, et al. (2006) The influence of body weight on response to ovulation induction with gonadotropins in 335 women with World Health Organization group II anovulatory infertility. *BJOG* 113: 1195–1202.
- Bellver J, Busso C, Pellicer A, Remohi J, Simon C (2006) Obesity and assisted reproductive technology outcomes. *Reprod Biomed Online* 12: 562–568.
- Dechaud H, Anahory T, Reyftmann L, Loup V, Hamamah S, et al. (2006) Obesity does not adversely affect results in patients who are undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 127: 88–93.
- Martinuzzi K, Ryan S, Luna M, Copperman AB (2008) Elevated body mass index (BMI) does not adversely affect in vitro fertilization outcome in young women. *J Assist Reprod Genet* 25: 169–175.
- Lashen H, Ledger W, Bernal AL, Barlow D (1999) Extremes of body mass do not adversely affect the outcome of superovulation and in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 14: 712–715.
- Sagae SC, Menezes EF, Bonfleur ML, Vanzela EC, Zacharias P, et al. (2012) Early onset of obesity induces reproductive deficits in female rats. *Physiol Behav* 105: 1104–1111.
- Kajihara T, Uchino S, Suzuki M, Itakura A, Brosens JJ, et al. (2009) Increased ovarian follicle atresia in obese Zucker rats is associated with enhanced expression of the forkhead transcription factor FOXO1. *Med Mol Morphol* 42: 216–221.
- Hamm ML, Bhat GK, Thompson WE, Mann DR (2004) Folliculogenesis is impaired and granulosa cell apoptosis is increased in leptin-deficient mice. *Biol Reprod* 71: 66–72.
- Serke H, Nowicki M, Kosacka J, Schroder T, Kloting N, et al. (2012) Leptin-deficient (ob/ob) mouse ovaries show fatty degeneration, enhanced apoptosis and decreased expression of steroidogenic acute regulatory enzyme. *Int J Obes (Lond)* 36: 1047–1053.
- Hutchinson IA, Hennessy AA, Waters SM, Dewhurst RJ, Evans AC, et al. (2012) Effect of supplementation with different fat sources on the mechanisms involved in reproductive performance in lactating dairy cattle. *Theriogenology* 78: 12–27.
- Gonzalez-Anover P, Encinas T, Torres-Rovira L, Sanz E, Pallares P, et al. (2011) Patterns of corpora lutea growth and progesterone secretion in sows with thrifty genotype and leptin resistance due to leptin receptor gene polymorphisms (Iberian pig). *Reprod Domest Anim* 46: 1011–1016.
- Picone O, Laigre P, Fortun-Lamothe L, Archilla C, Peynot N, et al. (2011) Hyperlipidic hypercholesterolemic diet in prepubertal rabbits affects gene expression in the embryo, restricts fetal growth and increases offspring susceptibility to obesity. *Theriogenology* 75: 287–299.
- Fischer B, Chavatte-Palmer P, Viebahn C, Navarete-Santos A, Duranthon V (2012) Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction: in press*.
- Zheng H, Zhang C, Yang W, Wang Y, Lin Y, et al. (2009) Fat and Cholesterol Diet Induced Lipid Metabolic Disorders and Insulin Resistance in Rabbit. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 117: 400–405.
- Fortun-Lamothe L, Lamboley-Gauzere B, Bannelier C (2002) Prediction of body composition in rabbit females using total body electrical conductivity (TOBEC). *Livestock Production Science* 78: 133–142.
- Bodensteiner KJ, Sawyer HR, Moeller CL, Kane CM, Pau KYF, et al. (2004) Chronic exposure to dibromoacetic acid, a water disinfection byproduct, diminishes primordial follicle populations in the rabbit. *Toxicological Sciences* 80: 83–91.
- Chavatte-Palmer P, Laigre P, Simonoff E, Chesne P, Challah-Jacques M, et al. (2008) In utero characterisation of fetal growth by ultrasound scanning in the rabbit. *Theriogenology* 69: 859–869.
- Rommers JM, Boiti C, Brecchia G, Meijerhof R, Noordhuizen J, et al. (2004) Metabolic adaptation and hormonal regulation in young rabbit does during long-term caloric restriction and subsequent compensatory growth. *Animal Science* 79: 255–264.
- Ahima RS, Dushay J, Flier SN, Prabakaran D, Flier JS (1997) Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest* 99: 391–395.
- Dearth RK, Hiney JK, Dees WL (2000) Leptin acts centrally to induce the prepubertal secretion of luteinizing hormone in the female rat. *Peptides* 21: 387–392.
- Akamine EH, Marcal AC, Camporez JP, Hoshida MS, Caperuto LC, et al. (2010) Obesity induced by high-fat diet promotes insulin resistance in the ovary. *Journal of Endocrinology* 206: 65–74.
- Pierce MB, Leon DA (2005) Age at menarche and adult BMI in the Aberdeen children of the 1950s cohort study. *Am J Clin Nutr* 82: 733–739.
- Freedman DS, Khan LK, Serdula MK, Dietz WH, Srinivasan SR, et al. (2002) Relation of age at menarche to race, time period, and anthropometric dimensions: the Bogalusa Heart Study. *Pediatrics* 110: e43.
- Rogers IS, Northstone K, Dunger DB, Cooper AR, Ness AR, et al. (2010) Diet throughout childhood and age at menarche in a contemporary cohort of British girls. *Public Health Nutr* 13: 2052–2063.
- Berkey CS, Gardner JD, Frazier AL, Colditz GA (2000) Relation of childhood diet and body size to menarche and adolescent growth in girls. *Am J Epidemiol* 152: 446–452.
- Maclure M, Travis L, Willett W, MacMahon B (1991) A prospective cohort study of nutrient intake and age at menarche. *Am J Clin Nutr* 54: 649–656.
- Merzenich H, Boeing H, Wahrendorf J (1993) Dietary fat and sports activity as determinants for age at menarche. *Am J Epidemiol* 138: 217–224.
- Moisan J, Meyer F, Gingras S (1990) A nested case-control study of the correlates of early menarche. *Am J Epidemiol* 132: 953–961.
- Lakshman R, Forouhi N, Luben R, Bingham S, Khaw K, et al. (2008) Association between age at menarche and risk of diabetes in adults: results from the EPIC-Norfolk cohort study. *Diabetologia* 51: 781–786.

**Author Contributions**

Conceived and designed the experiments: PCP AGC CD. Performed the experiments: AGC CD AT OP MD EP. Analyzed the data: PCP PL BMP RL AGC. Contributed reagents/materials/analysis tools: BMP TL. Wrote the paper: AGC PL PCP.

45. Lakshman R, Forouhi NG, Sharp SJ, Luben R, Bingham SA, et al. (2009) Early age at menarche associated with cardiovascular disease and mortality. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 4953–4960.
46. Ozdemir O, Col M (2004) The age at menopause and associated factors at the health center area in Ankara, Turkey. *Maturitas* 49: 211–219.
47. Cramer DW, Xu H, Harlow BL (1995) Does “incessant” ovulation increase risk for early menopause? *Am J Obstet Gynecol* 172: 568–573.
48. Balasubramanian P, Jagannathan L, Mahaley RE, Subramanian M, Gilbreath ET, et al. (2012) High fat diet affects reproductive functions in female diet-induced obese and dietary resistant rats. *J Neuroendocrinol* 24: 748–755.
49. Caron E, Ciofi P, Prevot V, Bouret SG (2012) Alteration in neonatal nutrition causes perturbations in hypothalamic neural circuits controlling reproductive function. *J Neurosci* 32: 11486–11494.
50. Lund SA, Murdoch J, Van Kirk EA, Murdoch WJ (1999) Mitogenic and antioxidant mechanisms of estradiol action in preovulatory ovine follicles: relevance to luteal function. *Biol Reprod* 61: 388–392.
51. Lea RG, Wooding P, Stewart I, Hannah LT, Morton S, et al. (2007) The expression of ovine placental lactogen, StAR and progesterone-associated steroidogenic enzymes in placentae of overnourished growing adolescent ewes. *Reproduction* 133: 785–796.
52. Lof M, Hilakivi-Clarke L, Sandin SS, de Assis S, Yu W, et al. (2009) Dietary fat intake and gestational weight gain in relation to estradiol and progesterone plasma levels during pregnancy: a longitudinal study in Swedish women. *BMC Womens Health* 9: 10.
53. Zachut M, Dekel I, Lehrer H, Arieli A, Arav A, et al. (2010) Effects of dietary fats differing in n-6:n-3 ratio fed to high-yielding dairy cows on fatty acid composition of ovarian compartments, follicular status, and oocyte quality. *J Dairy Sci* 93: 529–545.
54. Ying S, Wang Z, Wang C, Nie H, He D, et al. (2011) Effect of different levels of short-term feed intake on folliculogenesis and follicular fluid and plasma concentrations of lactate dehydrogenase, glucose, and hormones in Hu sheep during the luteal phase. *Reproduction* 142: 699–710.
55. Jungheim ES, Schoeller EL, Marquard KL, Loudon ED, Schaffer JE, et al. (2010) Diet-Induced Obesity Model: Abnormal Oocytes and Persistent Growth Abnormalities in the Offspring. *Endocrinology* 151: 4039–4046.
56. Kranzfelder D, Korr H, Mestwerdt W, Maurer-Schultze B (1984) Follicle growth in the ovary of the rabbit after ovulation-inducing application of human chorionic gonadotropin. *Cell Tissue Res* 238: 611–620.
57. Arias-Alvarez M, García-García RM, Rebollar PG, Revuelta L, Millán P, et al. (2009) Influence of metabolic status on oocyte quality and follicular characteristics at different postpartum periods in primiparous rabbit does. *Theriogenology* 72: 612–623.
58. Robker RL, Akison LK, Bennett BD, Thrupp PN, Chura LR, et al. (2009) Obese Women Exhibit Differences in Ovarian Metabolites, Hormones, and Gene Expression Compared with Moderate-Weight Women. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 1533–1540.
59. Jungheim ES, Macones GA, Odem RR, Patterson BW, Lanzendorf SE, et al. (2011) Associations between free fatty acids, cumulus oocyte complex morphology and ovarian function during in vitro fertilization. *Fertil Steril* 95: 1970–1974.
60. La Vignera S, Condorelli R, Bellanca S, La Rosa B, Mousavi A, et al. (2011) Obesity is associated with a higher level of pro-inflammatory cytokines in follicular fluid of women undergoing medically assisted procreation (PMA) programs. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 15: 267–273.

## RESUME

Le surpoids et l'obésité, dont la prévalence augmente régulièrement depuis quelques décennies, ont un impact négatif sur les fonctions de reproduction masculine. De plus, le concept de DOHAD suggère que l'environnement très précoce pourrait programmer à long terme la fertilité d'un individu.

L'objectif de cette thèse est d'évaluer, d'une part, la relation entre l'obésité et les paramètres spermatiques, d'autre part, l'influence de l'environnement maternel et du développement néonatal sur les fonctions de reproduction masculine.

Dans une étude incluant 300 hommes infertiles, nous avons observé un impact négatif de l'obésité sur l'intégrité de l'ADN spermatique. L'obésité abdominale, évaluée par impédancemétrie et mesure du tour de taille, semble également impacter sur la qualité spermatique. Nous n'avons cependant pas observé d'influence du surpoids ou de l'obésité sur la capacité des spermatozoïdes à se fixer à la zone pellucide.

Nous rapportons aussi l'histoire de 6 patients infertiles présentant une obésité abdominale et une augmentation de la fragmentation de l'ADN spermatique. Après quelques mois de prise en charge hygiéno-diététique, une diminution ciblée de l'obésité abdominale et une amélioration de l'intégrité de l'ADN spermatique et du bilan hormonal ont été observées. Les 6 couples ont par la suite obtenu une grossesse et la naissance d'un enfant en bonne santé.

Concernant l'impact de la croissance *in utero* sur les paramètres spermatiques masculins, nous avons observé une corrélation négative entre le poids de naissance et le nombre total de spermatozoïdes, ainsi qu'une corrélation positive entre le poids de naissance et la fragmentation de l'ADN spermatique.

Une étude chez le lapin nous a permis d'observer un impact négatif de l'hyperlipidémie-hypercholestérolémie maternelle sur le poids des testicules et des épидидymes des lapins adultes et sur les concentrations en testostérone, montrant ainsi l'importance de l'alimentation maternelle dans le développement des fonctions de reproduction masculine.

Ces résultats confirment l'importance de la corpulence des hommes dans la prise en charge de l'infertilité. Les effets néfastes de l'obésité, simplement définie par l'IMC, ou de l'obésité abdominale, définie par une augmentation du tour de taille, pourraient être réversibles avec une prise en charge adaptée. L'alimentation de la mère pendant la grossesse semble également être un facteur important pour la programmation de la fertilité à long terme. Ce travail s'inclut dans un large projet, qui prend en compte l'origine multifactorielle de l'infertilité et nécessite une prise en charge multidisciplinaire très précoce du couple.

---

**TITLE :** Impact of male body composition and maternal nutrition on male reproductive functions

---

## ABSTRACT

Infertility is a public health issue affecting almost 15% of couples in developed countries, in 50 % of cases, a male factor is involved. The worldwide epidemic of obesity seems to have a negative impact on male fertility. Moreover, the concept of DOHAD suggests that the very early environment may program long-term fertility.

The objective of this thesis is to evaluate both, the relationship between obesity and sperm parameters, and the influence of maternal and neonatal environment on male reproductive functions.

In a study including 300 infertile men, we observed a negative impact of obesity on sperm DNA integrity. Abdominal obesity, measured by bioelectrical impedance and waist circumference, seems also impact sperm quality. However, body mass index was not associated with sperm-zona pellucida binding ability in subfertile males. We also report the cases of six infertile patients with abdominal obesity and high sperm DNA fragmentation rates. After a few months following a dietary program, a reduction of abdominal obesity and improvements of sperm DNA integrity and hormonal balance were observed. All female partners subsequently achieved pregnancy and delivered a healthy child.

Considering fetal growth, we observed a negative correlation between birth weight and total sperm count and a positive correlation between birth weight and sperm DNA fragmentation.

Furthermore, in rabbits, we observed a negative impact of maternal diet induced hyperlipidemia, hypercholesterolemia, on the testes and epididymes weights and on testosterone concentrations in adults. These data highlighted the importance of maternal nutrition in the development of male reproductive functions.

These results confirm the importance of male body composition in the management of infertility. The adverse effects of obesity or abdominal obesity may be reversible with appropriate health care. The maternal diet during pregnancy also appears to be an important parameter in the programming of offsprings' long-term fertility. This work is a part of a larger project, which consider the multifactorial etiology of infertility and requires a multidisciplinary approach.

---

**DISCIPLINE :** Biologie

**MOTS-CLES :** Infertilité masculine, Obésité, Obésité abdominale, DOHAD, Programmation fœtale

---

Unité de Recherche en Epidémiologie Nutritionnelle, U557 Inserm / U1125 Inra / Cnam / Université Paris 13, 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny, France