

Université du Québec  
Institut National de la Recherche Scientifique  
Centre INRS-Institut Armand-Frappier

**EFFETS DES CHIMIOTHÉRAPIES PÉDIATRIQUES  
SUR L'INTÉGRITÉ DE L'ADN DES CELLULES GERMINALES MÂLES**

Par

BEAUD Hermance

Thèse présentée pour l'obtention du grade  
de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)  
en biologie

**Jury d'évaluation**

Président du jury et examineur interne	Daniel G Cyr INRS – Institut Armand Frappier
Examinatrice externe	Andrée Gauthier-Fisher Programme CReATe
Examineur externe	Guylain Boissonneault Université de Sherbrooke
Directrice de recherche	Géraldine Delbès INRS – Institut Armand Frappier





## RESUME

Les hommes survivants de cancers pédiatriques sont plus susceptibles que leurs frères sans historique de cancer d'être infertiles. Avant la puberté, les cellules germinales sont principalement des spermatogonies, dont des spermatogonies souches (SSC). Le potentiel génotoxique des agents de chimiothérapie sur les SSC reste incertain, et les mécanismes de réparation de l'ADN dans les SSC sont peu décrits. De plus, il n'est toujours pas clair si les spermatozoïdes produits plusieurs années après la rémission d'un cancer pédiatrique sont endommagés. Notre étude transversale chez des hommes survivants de leucémie ou lymphome pédiatriques suggère qu'indépendamment de l'âge au diagnostic les survivants de cancers pédiatriques présentent un risque plus élevé d'infertilité en raison d'un compte spermatique faible ou nul, mais que lorsque des spermatozoïdes sont produits les risques d'anomalies de l'ADN et de la chromatine apparaissent similaires à ceux observés dans la population générale. Toutefois, l'exposition à la doxorubicine pourrait avoir des conséquences à long terme sur l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes de survivants de cancers pédiatriques. Sur une lignée de spermatogonies de rat aux propriétés de SSC (GC-6spg), nous avons démontré la cytotoxicité dose-dépendante de la doxorubicine *via* l'induction de cassures de l'ADN. De plus, nous avons mesuré l'expression constitutive de 75 gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, dont l'expression de 16 gènes est affectée par la doxorubicine ( $>1.5$  d'amplification ;  $P < 0.05$ ). Après arrêt du traitement, les cassures de l'ADN induites dans les GC-6spg retrouvent des niveaux similaires aux témoins. Ces résultats supportent l'idée que les spermatogonies indifférenciées peuvent répondre aux dommages à l'ADN induits par des composés de chimiothérapies et peuvent échapper à l'accumulation de cassure de l'ADN. Pour déterminer si un mécanisme similaire de défense est activé *in vivo* dans le testicule prépubère, nous avons développé un modèle d'exposition des SSC à la doxorubicine chez des rats transgéniques exprimant spécifiquement la GFP dans les cellules germinales. Après 24h de traitement, l'expression de gènes de réparation de l'ADN ne varie pas dans les cellules germinales isolées par cytométrie en flux, en comparaison des cellules germinales témoins, suggérant qu'une défaillance des mécanismes de réparation de l'ADN pourrait être la cause de la toxicité de la doxorubicine. Ensemble, les travaux de cette thèse soulignent l'importance de mieux comprendre les effets des agents de chimiothérapies sur les SSC pour mieux informer les patients et ouvrir de nouvelles pistes de recherche dans la prévention de ces effets secondaires.

Mots clés : cancer pédiatrique, chimiothérapie, doxorubicine, fertilité masculine, spermatozoïdes, spermatogonie souche, réparation de l'ADN.

## ABSTRACT

Men survivors of pediatric cancers are more likely than their brothers without cancer history to be infertile. Before puberty, germ cells are mainly spermatogonia, including spermatogonia stem cells (SSC). The genotoxic potential of chemotherapy agents on SSC remains uncertain, and the mechanisms of DNA repair in SSC are poorly described. In addition, it is still unclear whether spermatozoa produced several years after the remission of pediatric cancer are damaged. Our cross-sectional study in men survivors of pediatric leukemia or lymphoma suggests that, regardless of the age of diagnosis, pediatric cancer survivors have a higher risk of infertility due to low or no sperm count, but when spermatozoa are produced, the risks of DNA and chromatin abnormalities appear similar to those observed in the general population. However, exposure to doxorubicin may have long-term consequences on the DNA integrity of spermatozoa from pediatric cancer survivors. In a rat spermatogonia cell line with SSC (GC-6spg), we demonstrated the dose-dependent cytotoxicity of doxorubicin by the induction of DNA breaks. In addition, we measured the constitutive expression of 75 genes involved in DNA repair, whose expression of 16 genes is affected by doxorubicin ( $> 1.5$  amplification,  $P < 0.05$ ). After treatment arrest, DNA breaks induced in GC-6spg returned to levels similar to controls. These results support the idea that undifferentiated spermatogonia can respond to DNA damage induced by chemotherapy compounds, and can escape from DNA breaks accumulation. To determine if a similar defence mechanism is activated *in vivo* in the prepubertal testis, we have developed a model of exposure of SSC to doxorubicin in transgenic rats specifically expressing GFP in germ cells. After 24 hours of treatment, the expression of DNA repair genes in germ cells isolated by flow cytometry was not different to control germ cells, suggesting that a failure of DNA repair mechanisms could induce the toxicity of the doxorubicin. Together, the work of this thesis highlight the importance to better understand the effects of chemotherapeutic agents on SSC, to better inform patients and open up new research avenues in the prevention of these side effects.

Key words: Pediatric cancer, chemotherapy, doxorubicin, male fertility, spermatozoa, spermatogonia stem cell, DNA repair.

## REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier sincèrement ma directrice de recherche Géraldine Delbès pour m'avoir fait confiance et m'avoir accueillie dans son jeune laboratoire pour réaliser ce projet enrichissant. Merci pour sa supervision et sa patience. Tu as toujours pris le temps d'être présente pour tes étudiants. Merci également pour toutes les connaissances communiquées au fil de ces années de doctorat, ainsi que le sens de la rigueur et du défi afin de toujours se surpasser.

Je remercie les membres de mon jury, Andrée Gauthier-Fisher, Guylain Boissonneault et Daniel Cyr, pour avoir accepté de relire et commenter ce mémoire de thèse. Merci à Guylain et à Daniel d'avoir suivi mes travaux de recherche au cours de mon doctorat.

Un énorme merci Guylaine Lassonde, la première à m'avoir rejoint dans le laboratoire. Tes conseils techniques ont été précieux. Mais avant tout, merci pour nos discussions sur la culture québécoise et française, nos chants sur du Léonard Cohen, et nos fou-rires qui feront toujours partis des meilleurs souvenirs durant mon doctorat. Merci à Amélie qui m'accompagne depuis deux ans dans le laboratoire. Ton énergie et ta gentillesse ont été d'un grand support. D'abord ma stagiaire, puis ma collègue de bureau et de laboratoire, et finalement mon amie. Merci également à tous les autres membres du laboratoire Fabien, Arlette, Bintou, et tous les stagiaires avec qui j'ai partagé cette belle aventure.

Un immense merci à Cécile pour sa gentillesse, son sourire et son amitié, ainsi que pour son soutien dans les moments difficiles. Usain Bolt nous accompagnera partout ! Un grand merci à Elham et Laetitia pour leurs conseils, leurs soutien, et surtout pour leur amitié qui dépasse les murs de l'institut.

Je tiens à remercier les étudiants des autres laboratoires de l'institut Armand-Frappier ; Marc, Andrée-Anne, Mélanie, Arvin, Asma, Hélène et bien d'autres qui ont pris le temps de m'épauler alors que j'étais encore la seule étudiante dans le laboratoire. Merci à la nouvelle génération, Daphnée (Bou'cœur !), Aude, Guillaume, Laurie, Mathilde, Mustapha, Vincent et les autres avec qui j'ai partagé de bons moments. Merci aux autres membres du comité d'organisation du Congrès Armand-Frappier et particulièrement Sophie et Fabrice. Cette expérience passionnante pendant mon doctorat m'aura également permis de vous rencontrer. Merci pour votre joie de vivre. Et merci à Josette qui m'a permis de démarrer chacune de mes journées avec un beau sourire.

Je tiens particulièrement à remercier Laure. Tu m'as accueillie sur ce sol inconnu alors que nous-même ne nous connaissions pas. Ton accueil à bras ouvert m'a de suite permis de me sentir dans ma famille. Merci pour ta bonté, ta candeur, et ta générosité. Merci pour ton soutien et ton amitié lors de nos nombreuses séances d'écriture de mémoire.

Enfin, je tiens à remercier mes parents, ma sœur, mes grands-parents, les autres membres de ma famille et mes amis qui m'ont soutenu dans mes études. Malgré la difficulté de la distance, vous avez su comprendre et m'appuyer dans cette belle aventure.

Pour finir, un immense merci à Yan qui a su me soutenir, me supporter, m'écouter et m'apaiser ces dernières années. Sans toi, l'aventure ne serait pas aussi belle !

## TABLE DES MATIERES

Résumé.....	iv
Abstract.....	v
Remerciements.....	vi
Table des matières.....	viii
Liste des figures.....	xi
Liste des tableaux.....	xiii
Liste des sigles et abréviations.....	xiv
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>PARTIE I : ÉTAT DES CONNAISSANCES.....</b>	<b>3</b>
1 - LES LEUCEMIES ET LYMPHOMES PEDIATRIQUES, ET LES CHIMIOTHERAPIES ASSOCIEES.....	3
1.1 - Leucémies et lymphomes.....	3
1.1.1 - les leucémies.....	4
1.1.2 - les lymphomes.....	5
1.1.3 - différences et analogie de ces pathologies :.....	6
1.2 - Les chimiothérapies en oncologie pédiatrique.....	6
1.2.1 - la vincristine.....	8
1.2.2 - la doxorubicine.....	9
1.3 - La qualité de vie des survivants après rémission du cancer.....	11
2 - LA FERTILITÉ MASCULINE.....	11
2.1 – Le testicule prépubère.....	11
2.2 – La puberté.....	14
2.3 – Le testicule adulte.....	15
2.4 - Les spermatogonies souches (SSC).....	17
2.4.1 - les marqueurs des SSC.....	19
2.4.2 - les modèles d'études.....	20
2.5 - Les spermatozoïdes.....	23
2.6 - diagnostic de fertilité.....	25
2.6.1 - le spermogramme.....	25
2.6.2 - le SCSA et le test de COMET.....	26
3 - LES EFFETS SECONDAIRES DES CHIMIOTHÉRAPIES SUR LA FERTILITÉ MASCULINE.....	29
3.1 - Évidences épidémiologiques issues de cancers chez l'adulte.....	29
3.1.1 - l'influence de la maladie.....	29
3.1.2 - les agents alkylants.....	30
3.1.3 - les agents non alkylants.....	31
3.1.4 - atteinte de l'intégrité génomique des cellules germinales.....	32
3.2 - Études épidémiologiques dans le cas de cancers pédiatriques.....	34
3.2.1 - influence de la maladie.....	34
3.2.2 - les agents alkylants.....	35
3.2.3 - atteinte de l'intégrité génomique des cellules germinales.....	36
3.2.4 - Sensibilité du testicule pré-pubère.....	36
3.3 - Données expérimentales.....	37
3.3.1 - modèles <i>in vivo</i> .....	37
3.3.2 - modèles <i>in vitro</i> .....	41
3.4 - Préservation de la fertilité après un cancer.....	42
3.4.1 - cryopréservation de sperme.....	42
3.4.2 - biopsie testiculaire.....	43
3.4.3 - co-traitement avec des anti-oxydants.....	45

3.4.4 - autres protocole de préservation .....	46
4 - LA RÉPARATION DE L'ADN.....	47
4.1 - Les principales voies de réparation dans les cellules germinales .....	48
4.2 - Réparation de l'ADN dans les SSC.....	54
5 – PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS .....	57
<b>PARTIE II : RÉSULTATS .....</b>	<b>59</b>
CHAPITRE 1 : SPERM DNA INTEGRITY IN ADULT SURVIVORS OF PAEDIATRIC LEUKEMIA AND LYMPHOMA PATIENTS .....	59
1.1 - Abstract : .....	62
1.2 - Introduction : .....	62
1.3 - Materials & Methods : .....	64
1.4 - Results: .....	67
1.5 - Discussion: .....	75
1.6 - Acknowledgements:.....	79
1.7 - Funding informations:.....	79
1.8 - References: .....	79
CHAPITRE 2 : DOXORUBICIN AND VINCRISTINE AFFECT UNDIFFERENTIATED RAT SPERMATOGONIA .....	85
2.1 - Abstract : .....	87
2.2 - Introduction : .....	87
2.3 – Materials and Methods : .....	89
2.4 - Results : .....	93
2.5 - Discussion : .....	102
2.6 - Acknowledgements : .....	106
2.7 - Supplementary figures : .....	107
2.8 - References : .....	110
CHAPITRE 3 : DNA REPAIR RESPONSE IN PREPUBERTAL RAT SPERMATOGONIA AFTER <i>IN VIVO</i> EXPOSURE TO DOXORUBICIN .....	117
3.1 - Abstract.....	118
3.2 - Introduction .....	119
3.3 - Materials and Methods.....	122
3.4 - Results.....	126
3.5 - Discussion.....	133
3.6 - Conclusion.....	137
3.7 - Aknowledgements .....	137
<b>PARTIE III : DISCUSSION .....</b>	<b>138</b>
1. EFFET À LONG TERME DE L'HISTORIQUE DE CANCER PÉDIATRIQUE SUR LA FERTILITÉ .....	138
1.1 - Impact de l'âge au diagnostic du cancer sur les paramètres de fertilité à l'âge adulte .....	139
1.1.1 - la prévalence d'azoo- ou oligozoospermie selon l'âge au diagnostic.....	140
1.1.2 - l'intégrité du génome des spermatozoïdes selon l'âge au diagnostic.....	141
1.2 Effets des traitements sur l'intégrité du génome des cellules germinales .....	142
1.2.1 - agents alkylants et effets quantitatifs sur la spermatogenèse .....	143
1.2.2 - antibiotiques anti-cancéreux et effets sur la qualité des spermatozoïdes.....	144
1.2.3 - la doxorubicine et l'intégrité du génome des SSC .....	145
2. LES MÉCANISMES DE RÉPARATION DE L'ADN DANS LES SSC.....	146
2.1. Activation de gène de réparation de l'ADN dans les GC-6spg .....	148
2.2. Absence d'activation de gène candidat à la réparation de l'ADN dans les cellules germinales <i>in vivo</i> .....	153
3. PRÉDICTION DES EFFETS SECONDAIRES DES CHIMIOTHÉRAPIES SUR LA FERTILITÉ.....	159

4. PRÉVENTION DES EFFETS SECONDAIRES DES CHIMIOTHÉRAPIES SUR LA FERTILITÉ.....	160
4.1 Prévention de la réaction inflammatoire contre les spermatozoïdes .....	161
4.2 Prévention de la diminution de la concentration en testostérone.....	162
5. CONTRIBUTION À L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES.....	165
<b>PARTIE IV : RÉFÉRENCES .....</b>	<b>167</b>
<b>PARTIE V : Annexe I .....</b>	<b>189</b>

# LISTE DES FIGURES

## PARTIE I : ETAT DES CONNAISSANCES

Figure 1 : Distribution à l'internationale des nouveaux cas de certains cancers pédiatriques selon le groupe d'âge, de 2001 à 2010.....	3
Figure 2 : Origine cellulaire des principales formes de leucémies et leur proportion par rapport à l'ensemble des cancers diagnostiqués chez les enfants de 0 à 14 ans .....	5
Figure 3 : Structure moléculaire de la vincristine.....	9
Figure 4 : Les diverses actions moléculaires de la doxorubicine.....	10
Figure 5 : Partie postérieure et coupe transversale d'un embryon de souris schématisant la migration des cellules germinales primordiales dans les crêtes génitales.....	13
Figure 6 : Hétérogénéité de la population spermatogoniale chez le rat en période périnatale.....	13
Figure 8 : Épithélium des tubes séminifères à l'âge adulte.....	16
Figure 9 : Schéma de la multiplication des spermatogonies et du renouvellement des SSC selon les théories du groupe de Yoshida .....	18
Figure 10 : Compaction de l'ADN des spermatozoïdes chez l'homme par remplacement des histones par les protamines.....	24
Figure 11 : L'appareil reproducteur mâle ; le cheminement des spermatozoïdes de la lumière des tubes séminifères à l'urètre .....	25
Figure 12 : Principe des deux paramètres (DFI et HDS) mesurés par SCSA .....	27
Figure 13: Schéma original des principales étapes du test de COMET en haut débit (HT-COMET).....	28
Figure 14 : Stratégie expérimentale de sauvegarde de la fertilité avant les traitements anti-cancéreux chez les garçons prépubères .....	43
Figure 15 : Voies de réparation de l'ADN associées aux principales anomalies pouvant être retrouvées dans l'ADN .....	48
Figure 16 : Mécanisme de réparation de dommages à l'ADN par les voies DR ( <i>Direct reversal</i> ), BER ( <i>Base excision repair</i> ), et NER ( <i>Nucleotide excision repair</i> ).....	50
Figure 17 : Voies de réparation des cassures bicaténaïres par les voies NHEJ (Non homologous end joining), HR (Homologous recombinaison), et la voie NHEJ alternative .....	52
Figure 18 : Liste non exhaustive de l'expression des gènes et des protéines acteurs de la réparation de l'ADN aux différents stades de maturation de la spermatogenèse .....	53

## PARTIE II : RÉSULTATS

### CHAPITRE 1 : SPERM DNA INTEGRITY IN ADULT SURVIVORS OF PAEDIATRIC LEUKEMIA AND LYMPHOMA

Figure 1: Circulating hormone levels in adult controls and CCS .....	71
Figure 2: Semen parameters in adult controls and CCS.....	72
Figure 3: Sperm chromatin structure and DNA integrity in adult controls and CCS .....	73

## **CHAPITRE 2 : DOXORUBICIN AND VINCRISTINE AFFECT UNDIFFERENTIATED RAT SPERMATOGONIA**

Figure 1. Cytotoxicity of vincristine, doxorubicin, and their mixture on GC-6spg viability .....	96
Figure 2. Impact of vincristine, doxorubicin, and their mixture on apoptosis and cell death .....	97
Figure 3. Impact of vincristine, doxorubicin and their mixture on DNA breaks in GC-6spg .....	98
Figure 4. Survival, proliferation, and DNA breaks in GC-6spg after 24h exposure to 0.1µM doxorubicin and after a recovery period.....	99
Figure 5. Impact of DXO alone or in mixture with vincristine on gene expression after 24h of exposure to 0.1µM .....	101
Figure 6. Protein quantification of CDKN1a and XRCC1 in GC-6spg cells after 24h or 48h of treatment with doxorubicin alone or the mixture 1:1 .....	102
Figure S1. Impact of 0.01µM and 0.1µM doxorubicin on the expression level of selected DNA repair genes .....	107

## **CHAPITRE 3 : DNA REPAIR RESPONSE IN PREPUBERTAL RAT SPERMATOGONIA AFTER IN VIVO EXPOSURE TO DOXORUBICIN**

Figure 1: Percentage of GFP- and CD9-double positive cells in 6 PND rat testis .....	128
Figure 2: Weight gain and relative testis weight after DXO injection in 6 PND rat.....	129
Figure 3: Antioxidant activity in the serum after DXO injection in 6 PND rat.....	129
Figure 4: Circulating testosterone level after DXO injection in 6 PND rat .....	130
Figure 5: Germ cells numeration after DXO injection in 6 PND rat.....	131
Figure 6: Seminiferous cells apoptosis after DXO injection in 6 PND rat.....	132
Figure 7: DNA repair genes expression after DXO injection in 6 PND rat .....	133

## **PARTIE III : DISCUSSION**

Figure 19 : Représentation schématique des mécanismes cellulaires généraux mis en place suite à la détection de cassures de l'ADN et conséquences possibles dans le cas des cellules germinales ....	144
Figure 20 : Voies de réparation de l'ADN pouvant être activées après exposition à la doxorubicine et correspondance avec les gènes activés dans les GC-6spg .....	151
Figure 21 : Voies de signalisation de cassure double brins de l'ADN.....	152
Figure 22: Structure moléculaire de la cortisone et de la prednisone, et de leurs métabolites respectifs, le cortisol, et la prednisolone.....	164
Figure 23 : Représentation schématique d'un lien hypothétique entre l'administration de prednisone et la protection de la réserve de SSC.....	164

# LISTE DES TABLEAUX

## **PARTIE I : ETAT DES CONNAISSANCES**

Tableau 1 : Exemple d'agents de chimiothérapie utilisés en oncologie pédiatrique et leur posologie.....	8
Tableau 2 : Liste non exhaustive des marqueurs des spermatogonies souches.....	20
Tableau 3 : Valeur de référence de l'OMS pour les paramètres du compte spermatique .....	26
Tableau 4: Principales classes de chimiothérapie et effets de chaque agent sur la spermatogenèse chez l'homme .....	31
Tableau 5 : Effets d'un traitement prépubère à la doxorubicine sur les cellules germinales et sur la fertilité des rats .....	40
Tableau 6 : Acteur de la réparation de l'ADN mis en évidence dans les spermatogonies.....	55

## **PARTIE II : RÉSULTATS**

### **CHAPITRE 1 : SPERM DNA INTEGRITY IN ADULT SURVIVORS OF PAEDIATRIC LEUKEMIA AND LYMPHOMA**

Table 1: Personal and medical characteristics of participants.....	70
Table 2: Diagnosis and sperm concentration in relation to cancer treatment .....	74
Table 3: Correlations between sperm parameters and cancer treatment characteristics .....	75

### **CHAPITRE 2 : DOXORUBICIN AND VINCRIStINE AFFECT UNDIFFERENTIATED RAT SPERMATOGONIA**

Table 1. Determination of the Lowest Observed Adverse Effect Level (LOAEL) of doxorubicin, vincristine, and their mixture 1:1 on GC-6spg .....	97
Table 2. Expression levels of DNA repair genes in GC-6spg .....	100
Table S1: Complete gene list from the DNA damage signaling PCR array .....	108

### **CHAPITRE 3 : DNA REPAIR RESPONSE IN PREPUBERTAL RAT SPERMATOGONIA AFTER IN VIVO EXPOSURE TO DOXORUBICIN**

Table 1: Cell viability and purity after flow cytometry cell sorting 24h after the treatment of 6 PND rat133	
--	--

## **PARTIE III : DISCUSSION**

Tableau 7 : Comparaison du modèle <i>in vitro</i> des GC-6spg avec le modèle <i>in vivo</i> d'exposition à la doxorubicine de rat de 6 jours. ....	155
--	-----

## LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

γH2AX	Histone H2AX phosphorylée
ABVD	Doxorubicine, bléomycine, vinblastine, dacarbazine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALL	Leucémie lymphoblastique aiguë ( <i>Acute Lymphoblastic Leukemia</i> )
BEP	Bléomycine, étoposide, cisplatine
BER	<i>Base excision repair</i>
BCNU	Carmustine, agent alkylant
BHT	Barrière hémato-testiculaire
CASA	<i>Computer Assisted Sperm Analysis</i>
CED	Dose cumulée d'agent alkylant ( <i>cumulative equivalent dose</i> )
CHOP	Cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prednisone
COMET	<i>Single cell gel electrophoresis assay</i>
DFI	Indice de fragmentation de l'ADN ( <i>DNA fragmentation index</i> )
DR	<i>Direct Reversal</i>
DSBR	<i>Double Strand Break Repair</i>
DXO	Doxorubicine
FACS	Cytométrie de flux ( <i>Fluorescence activated cell sorting</i> )
FANC	Fanconi anemia complementation group
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i>
FSH	<i>Follicle-Stimulating Hormone</i>
HDS	Haut marquage fluorescent de l'ADN ( <i>High DNA Stainability</i> )
HL	Lymphome de Hodgkin ( <i>Hodgkin's Lymphoma</i> )
HR	<i>Homologous recombinaison</i>
HT-COMET	Technique de COMET à haut débit ( <i>high throughput COMET</i> )
LH	<i>Luteinizing hormone</i>
MACS	Tri cellulaire immuno-magnétique
MGMT	<i>O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase</i>
MMR	<i>Mismatch repair</i>
MOPP	Moutarde azotée, vincristine, procarbazine, prednisone
MOPP-ABV	MOPP, doxorubicin, bleomycin, vinblastine
NER	<i>Nucleotide excision repair</i>
NHEJ	Ligation d'extrémité chromosomique ( <i>Non-homologous end-joining</i> )
NHL	Lymphome non Hodgkinien ( <i>Non Hodgkin's Lymphoma</i> )
OMS	Organisation mondiale de la santé
PMA	Procréation médicalement assistée
PGC	Cellules germinales progénitrices ( <i>primordial germ cells</i> )
SCSA	<i>Sperm chromatin structure assay</i>
SRY	<i>Sex determining Region of Y chromosom</i>
SSC	Cellules souches spermatogoniales ( <i>spermatogonial stem cells</i> )
Tail DNA	Fluorescence dans la queue de la comète
Tail length	Longueur de la queue de la comète
TLS	<i>Translesion synthesis</i>
TS	<i>Template switch</i>
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
VCR	Vincristine

## INTRODUCTION

Avec l'augmentation du taux de survie après un cancer pédiatrique, l'amélioration de la qualité de vie après rémission devient un enjeu de santé important. Les hommes survivants de cancers pédiatriques peuvent être confrontés à des problèmes de fertilité à l'âge adulte. Ces risques d'infertilités sont peu communiqués aux patients, mais font pourtant partie des effets secondaires connus des chimiothérapies. En effet, une récente étude épidémiologique sur une large cohorte a mis en évidence que les hommes survivants de cancers pédiatriques ont presque deux fois plus de risque d'être diagnostiqué pour une infertilité que leurs frères sans historique de cancer.

Les composés de chimiothérapies, ciblant toutes les cellules en division, peuvent atteindre les spermatogonies souches (SSC) en prolifération dans le testicule prépubère. D'une part, une déplétion des SSC peut induire une azoo- ou oligozoospermie (réduction totale ou partielle du compte spermatique). D'autre part, l'induction de cassures permanentes dans l'ADN des SSC pourrait en théorie affecter la maturation des cellules germinales différenciées et affecter l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes à l'âge adulte, aboutissant à des troubles de la fertilité. Cette idée est renforcée par le fait que, dans le cas de cancer chez l'adulte, des altérations de la chromatine peuvent être mesurées dans les spermatozoïdes deux ans après l'arrêt du traitement. Il a également été montré chez le rat adulte, que les chimiothérapies altèrent les voies de réparation de l'ADN des cellules germinales différenciées. Toutefois, les connaissances sont limitées, d'une part, sur l'impact des chimiothérapies administrées avant la puberté sur l'intégrité des SSC, et d'autre part, sur l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes des hommes survivants de cancers pédiatriques.

Pour ce projet de doctorat, nous soutenons l'hypothèse que les composés de chimiothérapie causent des dommages permanents à l'ADN des SSC dans le testicule immature. Une fois à l'âge adulte, des altérations de la chromatine du spermatozoïde peuvent être mesurées. Nos objectifs ont été 1) de déterminer l'impact d'un cancer pédiatrique et de son traitement sur la qualité de la chromatine des spermatozoïdes chez l'homme, 2) de définir dans un modèle *in vitro* de SSC, les effets cytotoxiques, génotoxiques et, sur l'expression de gènes de réparation de l'ADN, d'une exposition aux chimiothérapies couramment utilisée en oncologie pédiatrique, et 3) d'établir un modèle de SSC de rat prépubère exposées *in vivo* à la DXO pour étudier les gènes de réparation de l'ADN mis en évidence *in vitro*. L'analyse de l'intégrité des spermatozoïdes de survivants de cancers pédiatriques en différenciant ceux diagnostiqués avant ou après la puberté permettra de mieux définir la sensibilité du testicule immature à l'historique de cancer. De plus,

la caractérisation de l'action directe de molécules utilisées en oncologie sur les SSC permettra de mieux comprendre les risques d'infertilité après un traitement de chimiothérapies.

La première partie de cette thèse présente l'état des connaissances sur les effets des chimiothérapies pédiatriques sur l'intégrité de l'ADN des cellules germinales mâles. A cette fin, la première section présente les cancers pédiatriques les plus diagnostiqués (leucémies et lymphomes), et les chimiothérapies associées. La deuxième section présente les connaissances sur la fertilité masculine. La troisième section décrit les effets secondaires connus des chimiothérapies sur la fertilité masculine. Enfin, la quatrième section aborde les systèmes de réparation de l'ADN dans les cellules germinales et particulièrement dans les SSC.

La deuxième partie de cette thèse présente, sous forme d'article scientifique, les résultats obtenus au cours de cette thèse. Les trois chapitres qui en découlent suivent les objectifs de la thèse. De ce fait, le premier chapitre présente une étude transversale chez l'homme mesurant l'impact de l'historique de leucémies ou de lymphomes pédiatriques sur l'intégrité de l'ADN et de la chromatine des spermatozoïdes en fonction de l'âge au diagnostic. Le deuxième chapitre est l'étude de l'impact d'un traitement *in vitro* à la doxorubicine et à la vincristine, seuls ou en combinaison, sur l'intégrité de l'ADN de spermatogonies avec des caractéristiques souches, et l'activation de l'expression de gènes de réparation de l'ADN. Le troisième chapitre décrit l'effet d'un traitement *in vivo* à la doxorubicine sur les spermatogonies de rat néonataux et la mesure de l'expression de gènes de réparation de l'ADN.

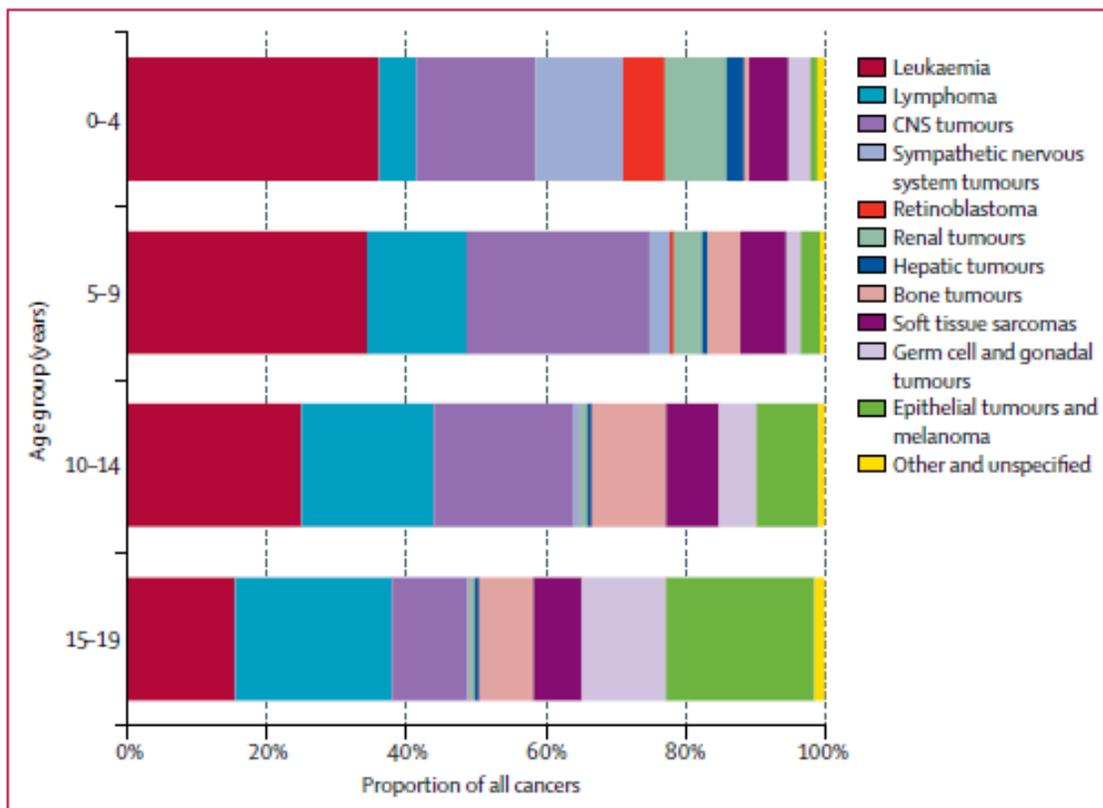
Finalement, la troisième partie est une discussion générale sur l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce doctorat mis en perspective par rapport à la littérature actuelle.

## PARTIE I : ÉTAT DES CONNAISSANCES

### 1 - LES LEUCEMIES ET LYMPHOMES PEDIATRIQUES, ET LES CHIMIOETHERAPIES ASSOCIEES

#### 1.1 - Leucémies et lymphomes

La leucémie est le type de cancer le plus diagnostiqué dans le monde chez les enfants de 0 à 14 ans (figure 1) (Steliarova-Foucher *et al.* 2017). Tandis qu'elle représente environ le tiers des cancers chez les 0 à 4 ans, elle ne représente plus que 15,4% des cancers chez les adolescents de 15 à 19 ans. Inversement, le lymphome est le troisième type de cancer le plus diagnostiqué dans le monde chez les enfants de 0 à 14 ans, mais représente la première cause de cancer chez les 15 à 19 ans (22,5%). Ainsi, la leucémie et le lymphome représentent de façon combinée environ 40% des types de cancers pédiatriques (figure 1).



**Figure 1 : Distribution à l'internationale des nouveaux cas de certains cancers pédiatriques selon le groupe d'âge, de 2001 à 2010**

(Steliarova-Foucher *et al.* 2017). La leucémie est le cancer le plus diagnostiqué chez les 0 à 14 ans, tandis que le lymphome est le plus diagnostiqué chez les 15 à 19 ans.

La leucémie et le lymphome trouvent leur origine dans la prolifération anarchique de différents types de globules blancs. L'ensemble des cellules du sang est formé lors de l'hématopoïèse. La cellule souche hématopoïétique, localisée dans la moelle osseuse, se divise pour former deux types de cellules progénitrices ; les cellules souches myéloïdes et les cellules souches lymphoïdes (Bozzone 2009). Ces deux lignées donnent naissance aux différents types de globules blancs.

### **1.1.1 - les leucémies**

Les différentes formes de leucémies sont principalement classées en fonction du stade de différenciation des globules blancs à l'origine de la pathologie et, par corrélation, en fonction de la rapidité d'évolution de la maladie (Morère *et al.* 2011). Une prolifération anarchique de globules blancs différenciés tels que les granulocytes, les lymphocytes T, les lymphocytes B, ou les cellules *natural killer*, produisent une forme chronique du cancer. En revanche, une prolifération anarchique des cellules indifférenciées myéloïde ou lymphoïde, engendre une forme aiguë (Figure 2). Tandis que les formes chroniques se développent en quelques mois ou années, les formes aiguës se déclarent et se développent très rapidement en quelques semaines (Bozzone 2009). La leucémie lymphoblastique aiguë (ALL ; *Acute Lymphoblastic Leukemia*) est la forme la plus représentée des leucémies pédiatriques (26,8%)(figure 2)(Kaatsch 2010).

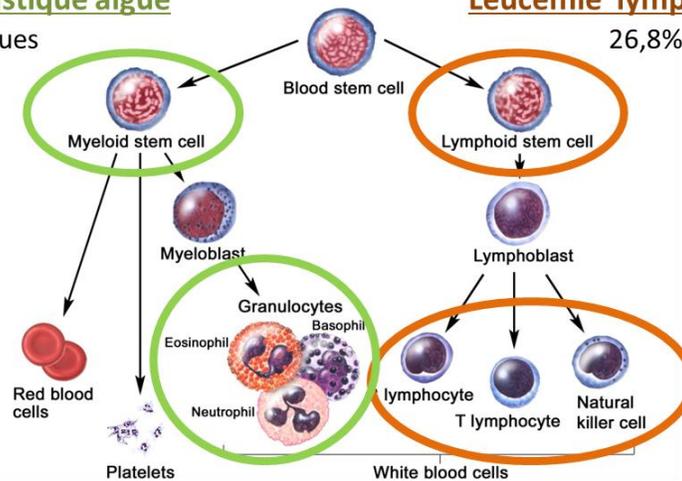
Les cellules leucémiques ont une fonction réduite de défense immunitaire. Leur prolifération excessive entraîne au fil de la pathologie une surcharge de la moelle osseuse et peut nuire à la production des cellules sanguines saines (Bozzone 2009). Le manque de globules blancs sains augmente le risque d'infection grave, voire mortelle. Certains facteurs d'origine environnementale (radiations ionisantes, produits chimiques, infections) ou génétique augmentent le risque d'apparition de cancer (Buffler *et al.* 2005). Cependant, l'origine des différentes leucémies reste majoritairement inconnue. Sans que l'on ne connaisse les mécanismes, les enfants prépubères, particulièrement les garçons, et les Caucasiens plutôt que les noirs africains, seraient les plus touchés par la maladie (Ward *et al.* 2014). En Amérique et en Europe, l'incidence de ce cancer ne cesse d'augmenter (Steliarova-Foucher *et al.* 2017), mais grâce à des dépistages précoces et à l'amélioration des traitements, les chances de survie d'une ALL au-delà de cinq ans sont d'environ 90% (Ward *et al.* 2014) (Comité consultatif de la Société canadienne du cancer 2017).

### Leucémie myéloblastique aiguë

4,7% cancer pédiatriques

### Leucémie lymphoblastique aiguë

26,8% cancer pédiatriques



### Leucémie myéloblastique chronique

0,4% cancer pédiatrique (rare)

### Leucémie lymphoblastique chronique

Uniquement chez l'adulte

**Figure 2 : Origine cellulaire des principales formes de leucémies et leur proportion par rapport à l'ensemble des cancers diagnostiqués chez les enfants de 0 à 14 ans**

Adapté avec autorisation de ©2007 Terese Winslow, U.S. Govt. has certain rights (Winslow 2008), et d'après (Kaatsch 2010). La leucémie lymphoblastique aiguë est la forme de leucémie la plus diagnostiquée chez les enfants.

#### 1.1.2 - les lymphomes

Le système lymphatique est composé d'organes (tel que le thymus, les amygdales, et la rate), de ganglions dispersés dans l'ensemble du corps, et de vaisseaux contenant le liquide lymphatique. Le réseau des vaisseaux lymphatiques est étroitement lié au système sanguin permettant des échanges entre les deux compartiments. Les infections de type bactériennes ou virales peuvent être éliminées du sang par les ganglions et transférées dans la lymphe pour être éliminées par les cellules immunitaires. La lymphe, considérée comme le filtrat du sang, contient en effet des globules blancs, dont les lymphocytes (Martini *et al.* 2012)

Un dysfonctionnement des lymphocytes B ou T peut déclencher une prolifération anormale de ces cellules et induire la formation d'une tumeur (Liu & Shipp 2017). Le diagnostic d'un lymphome de Hodgkin (HL ; *Hodgkin's Lymphoma*) est établi lors de la présence de cellules de Reed-Sternberg, cellules issues de lymphocytes B (Ott 2017). Dans le cas contraire, le diagnostic sera majoritairement un lymphome non Hodgkinien (NHL ; *Non Hodgkin's Lymphoma*). Il existe une trentaine de type de NHL. Le diagnostic, effectué par des pathologistes spécialisés, s'établit selon une classification complexe définie par

l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Ott 2017). Les tumeurs se développent principalement dans les ganglions. Cependant, le système lymphatique dessert l'ensemble du corps. Les sites de tumeurs sont multiples, et selon l'agressivité, la tumeur peut se propager très rapidement par les vaisseaux lymphatiques et même atteindre les os.

### **1.1.3 - différences et analogie de ces pathologies :**

Les leucémies lymphoblastiques et les lymphomes prennent naissance dans la lignée des lymphocytes. Tandis que la leucémie se développe dans la moelle osseuse, le lymphome se développe dans le système lymphatique (Bozzone 2009, Ott 2017). Cependant dans les formes d'ALL et dans certaines formes de NHL, les cellules malignes peuvent faire un passage sanguin. On parle alors de forme leucémique pour les lymphomes. La limite entre leucémie et lymphome est alors ambiguë. En effet, dans la classification des NHL de l'OMS, on retrouve l'ALL et une leucémie-lymphome à cellules T adultes (Ott 2017). De plus, lors d'un lymphome de Burkitt, les cellules malignes peuvent coloniser la moelle osseuse.

## **1.2 - Les chimiothérapies en oncologie pédiatrique**

Les chimiothérapies ont été découvertes dans les années 1940 avec l'utilisation militaire du gaz moutarde durant la seconde guerre mondiale. Les combinaisons de chimiothérapies sont utilisées en clinique contre les leucémies et les lymphomes depuis les années 1960, puis une dizaine d'années plus tard utilisées contre diverses tumeurs solides (Chabner & Roberts Jr 2005). En soixante ans, ce traitement révolutionnaire pour son époque, s'est diversifié dans le type d'agent thérapeutique utilisé, et s'est amélioré dans son efficacité en affinant les associations d'agent et leurs doses (Kaushansky *et al.* 2016). Notamment au Canada, on peut apprécier chez les 15 à 99 ans une nette amélioration du taux de survie à cinq ans en 2006-2008 par rapport à 1992-1994, représentant une augmentation de 15% du taux de survie à cinq ans pour les leucémies et de 16% pour les lymphomes non hodgkinien (Comité consultatif de la Société canadienne du cancer 2017). Chez les enfants de 0 à 14 ans, le taux de survie à cinq ans entre 2004 et 2008 atteint 88% pour la leucémie et les lymphomes non hodgkinien. (Comité consultatif de la Société canadienne du cancer 2017). Ensemble, les cancers pédiatriques ont un taux moyen de survie après 5 ans de rémission de 83%, avec un maximum de 98% pour les lymphomes hodgkinien chez les enfants de 0 à 14 ans (Comité consultatif de la Société canadienne du cancer 2017).

En absence de tumeur solide, la chimiothérapie est le traitement principal dans le traitement de la leucémie (Kaushansky *et al.* 2016). Le traitement comporte trois phases, cumulant une à trois années de traitement (Poplack 1989, Bertolone *et al.* 2011). La phase d'induction permet la rémission complète dans 98% des cas. La phase de consolidation prolonge la durée du traitement de plusieurs mois pour empêcher la rechute par des cellules leucémiques résiduelles et résistantes. Une phase d'entretien se poursuit entre un et trois ans avec des traitements de faible intensité, permettant à l'enfant le retour au domicile et à l'école (Poplack 1989, Bertolone *et al.* 2011, Kaushansky *et al.* 2016). En cas de rechute, une greffe de moelle osseuse peut être envisagée.

Dans le cas du lymphome, le traitement est composé d'une phase d'une durée totale inférieure à un an (Poplack 1989, Bertolone *et al.* 2011, Kaushansky *et al.* 2016). Les premières combinaisons de chimiothérapie mise en place en thérapeutique ont été le MOPP (mustargen, vincristine, procarbazine, prednisone), suivi de l'ABVD (doxorubicine, bléomycin, vinblastine, dacarbazine) qui induit moins d'effets secondaires toxiques (Viviani *et al.* 1985). La radiothérapie peut être utilisée en complément du traitement de chimiothérapie (Poplack 1989, Bertolone *et al.* 2011, Kaushansky *et al.* 2016). Des traitements de chimiothérapie alternatifs peuvent également être utilisés lorsque l'agressivité ou l'avancement du cancer est associé à un mauvais pronostic vital (Poplack 1989, Bertolone *et al.* 2011). Par exemple, la combinaison d'agents de chimiothérapie COPP (cyclophosphamide, vincristine, procarbazine, prednisone) peut être utilisée en alternance avec la combinaison ABVD (traitement COPP-ABVD) (Poplack 1989, Bertolone *et al.* 2011).

Principalement, les agents de chimiothérapies ont pour but de déstabiliser la machinerie de division cellulaire afin d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses. En fonction du type de cancer, de son agressivité, et de son avancement, les oncologues adoptent la combinaison de chimiothérapies à administrer pour chaque patient (Bertolone *et al.* 2011). La dose thérapeutique de chaque agent est ajustée en fonction du poids et/ou de l'âge de l'enfant (tableau 1). L'utilisation d'une combinaison d'agents de chimiothérapies permet de cibler les cellules cancéreuses par différents mécanismes d'action. Les agents sont répartis en différentes classes en fonction de leur mode d'action ou de leur structure moléculaire. Certains agents pourront donc être retrouvés dans plusieurs classes, par exemple la doxorubicine est un inhibiteur de topoisomérase et une anthracycline, et l'étoposide est aussi un inhibiteur de topoisomérase, mais également un alcaloïde (Baud & Garnier 2017). Les principales classes décrites sont : 1- les agents alkylants, agissant sur la réplication de l'ADN, 2- les alcaloïdes et 3- les inhibiteurs de topoisomérases, agissant sur les mécanismes de la mitose, et 4- les antimétabolites,

agissant sur le métabolisme cellulaire (Baud & Garnier 2017). L'emploi d'une combinaison d'agents de chimiothérapie permet de diminuer les doses administrées de chaque agent. Ainsi, les effets secondaires des traitements seraient réduits sur les cellules saines du corps, tout en conservant une bonne efficacité d'action sur les cellules cancéreuses (Lipshultz *et al.* 1991, Aghaee *et al.* 2013).

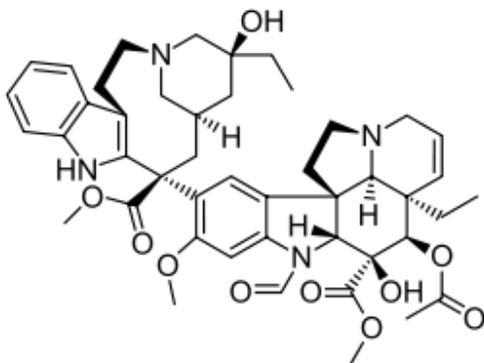
Mes travaux de thèse visent à déterminer l'impact sur les cellules germinales mâles, des traitements de chimiothérapies utilisés contre la leucémie lymphoblastique aiguë et les lymphomes. Particulièrement, mes travaux s'intéressent à deux molécules couramment utilisées contre ces pathologies ; la vincristine (VCR), et la doxorubicine (DXO) (tableau 1).

**Tableau 1 : Exemple d'agents de chimiothérapie utilisés en oncologie pédiatrique et leur posologie.**  
D'après (Kaushansky *et al.* 2016)

Agent de chimiothérapie	Dose thérapeutique	Voie d'administration	Fréquence d'administration
<b>Cyclophosphamide</b>	650-1250 mg/m <sup>2</sup>	Intraveineuse	Jour 1 sur un cycle de 21
<b>Vincristine</b>	1,4 mg/m <sup>2</sup>	Intraveineuse	Jour 1 sur un cycle de 21
<b>Doxorubicine</b>	25-50 mg/m <sup>2</sup>	Intraveineuse	Jour 1 sur un cycle de 21
<b>Prednisone</b>	40 mg/m <sup>2</sup>	Orale	Jour 1 à 14 sur un cycle de 28
	100 mg/m <sup>2</sup>		Jour 1 à 5 sur un cycle de 21

### 1.2.1 - la vincristine

La vincristine appartient à la famille des alcaloïdes naturels, extrait de la pervenche de Madagascar (figure 3) (*Catharanthus roseus*). Utilisé contre de nombreux cancers, cet agent anti-cancéreux est particulièrement utilisé pendant la phase d'induction et de consolidation des traitements contre la leucémie. Cependant, il n'est pas rare de l'utiliser durant la phase d'entretien avec la prednisone (Bertolone *et al.* 2011). La vincristine agit comme poison du fuseau mitotique. Elle inhibe la dynamique de polymérisation des microtubules du fuseau en liant les sous-unités alpha et bêta de la tubuline libre ou directement sur les microtubules (Jordan & Wilson 2004). Les cellules en prolifération restent bloquées en phase de mitose avec des chromosomes condensés. Son action antimitotique entraîne la mort cellulaire par apoptose (Jordan & Wilson 2004). L'effet secondaire de la vincristine le plus notoire est un effet neurotoxique. En revanche, une résistance au traitement avec la vincristine peut être observée en cas de surexpression des transporteurs membranaires de type ABC (Jordan & Wilson 2004).



**Figure 3 : Structure moléculaire de la vincristine**  
(Moncrief & Lipscomb 1965), image : Wikipedia

### 1.2.2 - la doxorubicine

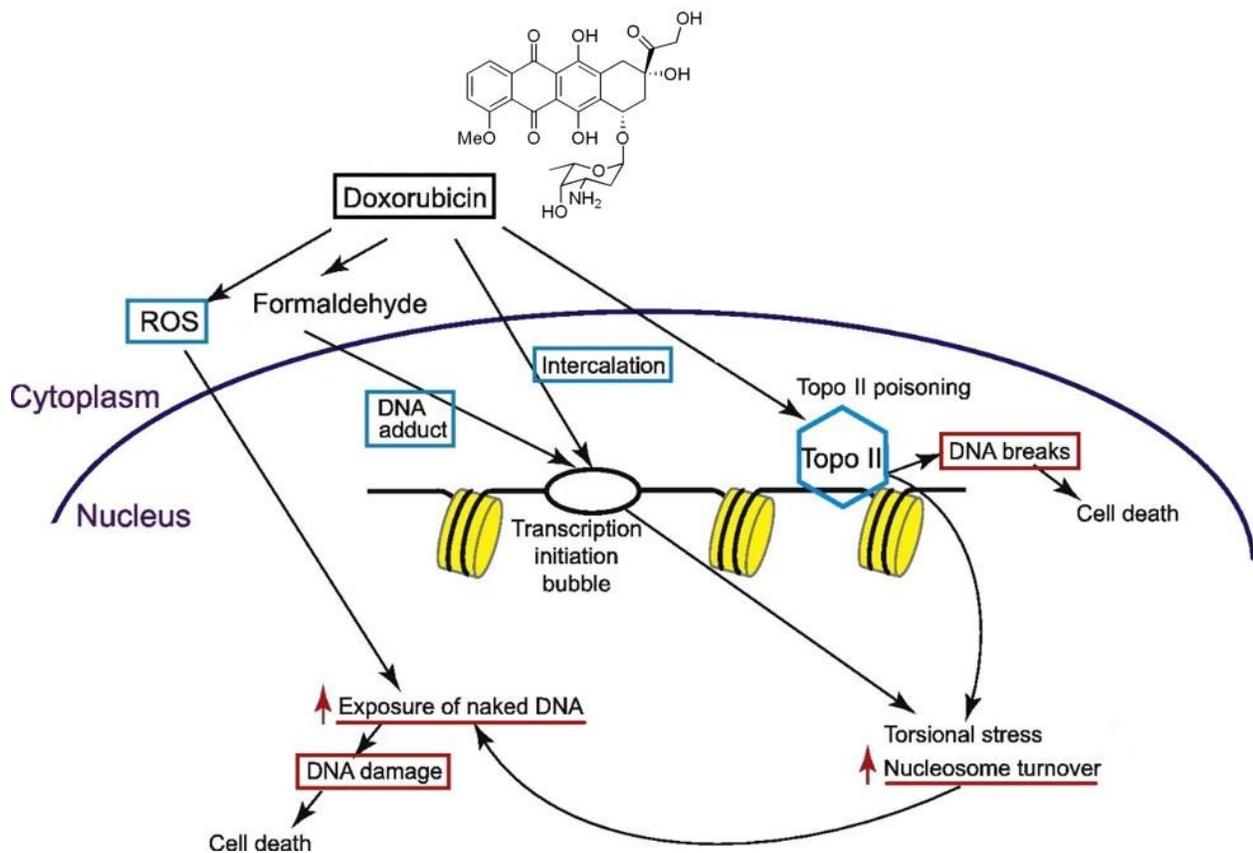
La doxorubicine, de la famille des anthracyclines, est largement utilisée en oncologie chez les enfants, mais également chez l'adulte (Rochette *et al.* 2015). Selon la société canadienne du cancer, la doxorubicine est utilisée en association avec la vincristine durant la phase d'induction et de consolidation (Bertolone *et al.* 2011). Son efficacité joue un rôle prépondérant dans la rémission du cancer.

De multiples voies d'action de la doxorubicine sont connues, mais le mécanisme par lequel la doxorubicine permet l'élimination des cellules cancéreuses est encore incertain. Une diffusion passive permet l'entrée de la doxorubicine dans les cellules (Skovsgaard & Nissen 1982), mais des transporteurs ABC permettent la sortie active de la doxorubicine (Doyle *et al.* 1998). Ces transporteurs ont démontré jouer un rôle dans la résistance aux traitements anti-cancéreux et notamment contre la doxorubicine (Doyle *et al.* 1998). L'action principale connue est une activité antibiotique par inhibition de la topoisomérase II, enzyme éliminant le surenroulement de l'ADN (Rochette *et al.* 2015). Par affinité, la doxorubicine fixe la topoisomérase II et l'ADN. La catalyse de l'enzyme est bloquée, son activité est perturbée, induisant l'arrêt de la réplication et des cassures des brins d'ADN (figure 4).

La doxorubicine peut également induire du stress oxydatif dans la cellule, entraînant divers dommages (Zhang *et al.* 2005). D'une part, la structure quinone de la doxorubicine peut être oxydée en semiquinone, réaction catalysée par des NAD(P)H-oxydoréductases (figure 4). La semiquinone réagit spontanément avec l'oxygène. Le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène formés à l'issue de la réaction peuvent causer des dommages à l'ADN (Rochette *et al.* 2015). D'autre part, la doxorubicine a une forte affinité pour le fer. Le complexe doxorubicine-fer induit la formation de radicaux libres et d'un métabolite le doxorubicinol. Le

complexe réagit également avec la membrane plasmique induisant la peroxydation des lipides. L'ensemble de ces événements causent des dommages à la cellule pouvant induire l'apoptose (Rochette *et al.* 2015). Le stress oxydatif a particulièrement été décrit dans les cardiomyocytes (Zhang *et al.* 2005, Ruan *et al.* 2015). La cardiotoxicité est l'effet secondaire limitant l'utilisation de la doxorubicine ; liée à la dose cumulative administrée, la doxorubicine reste contre indiquée chez les patients qui présentent des troubles cardiaques (Baud & Garnier 2017).

Enfin, divers mécanismes liés à la toxicité de la doxorubicine ont également été décrits, comme la perturbation du métabolisme du calcium (Olson *et al.* 2005), ou la répression de l'expression de la protéine *calcium/calmoduline-dependant protein kinase II* impliquée dans la survie des cardiomyocytes (Little *et al.* 2009) (figure 4).



**Figure 4 : Les diverses actions moléculaires de la doxorubicine**

Adapté de (Yang *et al.* 2014), et image Wikipédia. La doxorubicine peut former des espèces réactives à l'oxygène (ROS ; *reactive oxygen species*) pouvant induire des réactions toxiques pour l'ADN. La métabolisation peut entraîner la production de molécule de formaldéhyde impliqué dans l'intercalation d'une molécule de doxorubicine dans l'ADN. Enfin, la doxorubicine peut fixer la topoisomérase II induisant des torsions de l'ADN et des cassures doubles brins de l'ADN.

### **1.3 - La qualité de vie des survivants après rémission du cancer**

Parmi les hommes âgés de 20 à 39 ans, 1 homme sur 530 est un survivant de cancer pédiatrique aux États-Unis (Ward *et al.* 2014). Les principaux enjeux de la recherche se sont donc tournés vers la réduction des cancers secondaires, de meilleurs soins contre les formes agressives des cancers, et la réduction des effets secondaires associés aux traitements (Green *et al.* 2010). C'est sur ce dernier point que nous nous sommes intéressés pour les travaux de cette présente thèse.

Les chimiothérapies ne s'attaquent pas uniquement aux cellules cancéreuses. Toutes cellules activement en prolifération, cancéreuses ou saines, peuvent être endommagées induisant des effets secondaires. Le plus courant est la formation de cancers secondaires (Metayer *et al.* 2000, Swerdlow *et al.* 2000). Les effets indésirables principaux de chaque agent de chimiothérapie varient en fonction de leur propriété et mécanisme d'action. Comme décrit précédemment, la doxorubicine induit particulièrement une cardiotoxicité qui peut être évitée par ajustement de la dose administrée (Lipshultz *et al.* 1991). En revanche, l'origine de certains effets indésirables reste encore inconnue. L'origine de troubles de la fertilité peut encore à l'heure actuelle s'avérer imprévisible dans certains cas.

La fertilité est une préoccupation importante pour les jeunes survivants du cancer. Dans cette population croissante de survivant, plus de la moitié expriment le désir d'avoir des enfants biologiques dans le futur et ressentent que leur expérience du cancer les rendront de meilleurs parents (Schover *et al.* 2002b). Même si la majorité des hommes interrogés dans ces études évoquent qu'ils se sentent encore trop jeunes pour avoir des enfants (Reinmuth *et al.* 2008), ceux qui ne réussissent pas à avoir d'enfant développent à long terme une détresse psychologique (Schover 2009). Il y a donc un réel besoin pour ces survivants de cancers pédiatriques d'avoir la possibilité de réaliser leur projet familial. Préserver la fertilité de cette communauté d'homme en constante augmentation devient un enjeu de société.

## **2 - LA FERTILITÉ MASCULINE**

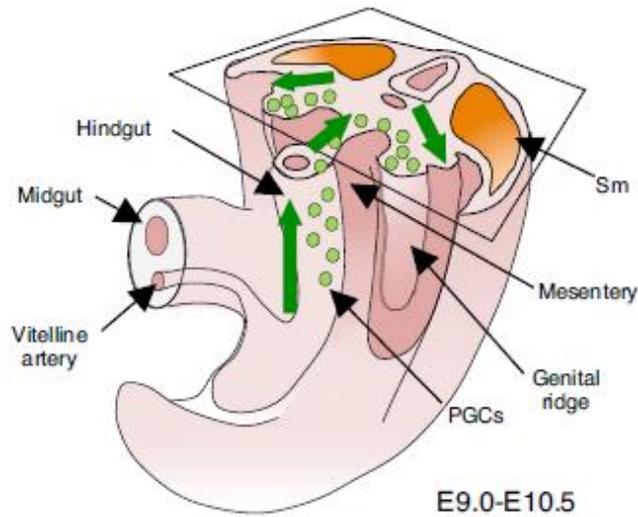
### **2.1 – Le testicule prépubère**

Les cellules germinales souches sont déjà présentes au stade embryonnaire (figure 5). Appelées à ce stade les cellules germinales progénitrices (PGC ; *primordial germ cells*), elles sont situées dans un premier temps dans la partie proximale de l'épiblaste qui deviendra la base de l'allantoïde. Les PGC entament ensuite une migration dans les crêtes génitales jusqu'à la colonisation complète des gonades

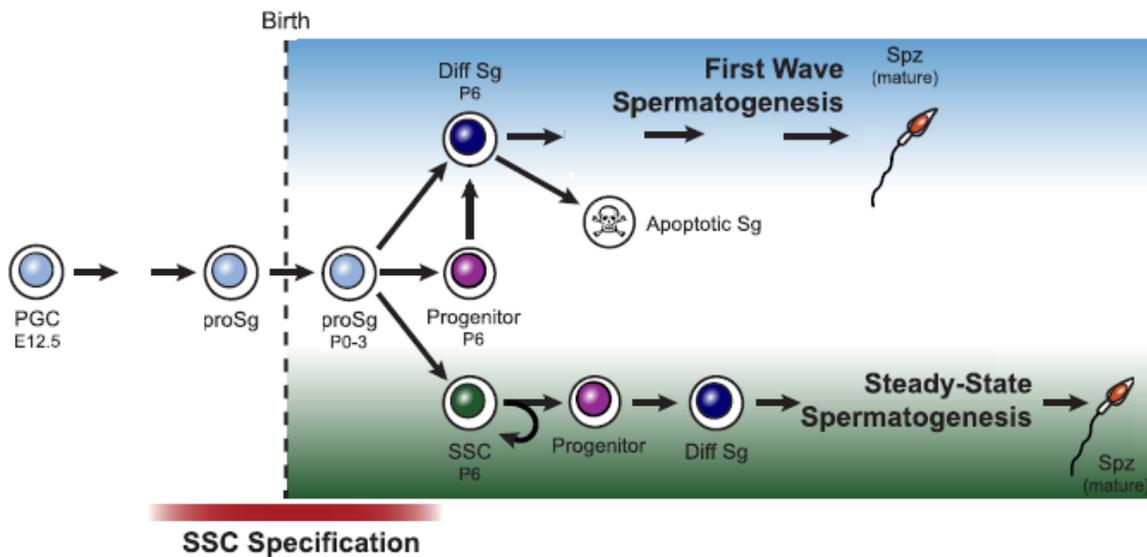
indifférenciées à 12 jpc (jours post-coïtum) chez le rat et 35 jpc chez l'homme (figure 5) (Jost *et al.* 1973, Olaso & Habert 2000). La différenciation de la gonade en testicule débute sous le contrôle du gène *SRY* (Sex determining Region of Y chromosome) à 13,5 jpc chez le rat, et 42 jpc chez l'homme (Magre & Jost 1980, Olaso & Habert 2000). Les cellules somatiques (les cellules de Sertoli) se différencient, prolifèrent et sécrètent l'hormone antimüllérienne à l'origine de la dégénérescence des canaux de Müller (Schmahl *et al.* 2000). La prolifération des cellules de Sertoli atteindra son maximum à 20 jpc chez le rat, avec plus de 25% de cellules en prolifération contre environ 15% à 6 jpp (jours post-partum) (Olaso & Habert 2000). Dès la mise en place des cordons séminifères, les cellules germinales appelées gonocytes à ce stade, débutent une phase de prolifération (Clermont & Perey 1957). En période périnatale, les gonocytes sont en quiescence. À 3 jpp chez le rat, les gonocytes reprennent leur prolifération, mais certains entrent en dégénérescence (Boulogne *et al.* 1999). Au même moment, les gonocytes commencent à migrer du centre des cordons séminifères vers la membrane basale (McGuinness & Orth 1992, Orth *et al.* 1997). À partir de 5-6 jpp chez le rat, les gonocytes se différencient en spermatogonies dont certaines sont des cellules souches spermatogoniales (SSC ; *spermatogonial stem cells*) (Clermont & Perey 1957, Sun *et al.* 2015). Chez l'homme, les gonocytes reprennent leur prolifération à 8 semaines après la naissance et se différencient dans les six premiers mois de vie (Hadziselimovic *et al.* 2004, Culty 2009). Plusieurs sous-types de spermatogonies indifférenciées seraient présent à ce stade (figure 6) (Hermann *et al.* 2015). Différenciées par leur transcriptome, leur fonction reste encore inconnue (Hermann *et al.* 2015). Les SSC qui initient la spermatogenèse jusqu'au stade de spermatogonies B à 5-6 jpp, se différencient jusqu'au stade de spermatocyte primaire à partir de 9 jpp, et jusqu'au stade de spermatide à partir de 23 jpp chez le rat, marquant le début de la puberté (Clermont & Perey 1957).

Les cordons séminifères sont délimités par une gaine péri-tubulaire composée d'une membrane basale, de fibres de collagènes, et des cellules myoépithéliales (Thibault & Levasseur 2001). L'espace interstitiel, formé de tissu conjonctif lâche, comprend des vaisseaux sanguins, des cellules de Leydig stéroïdogènes, des nerfs, des fibroblastes, et des cellules du système immunitaire tel que les macrophages (Thibault & Levasseur 2001). Enfin, une membrane fibreuse, l'albuginée, assure la compaction de la pulpe testiculaire (Harrison & Weiner 1949).

Dans le compartiment interstitiel, les cellules de Leydig assurent la production de la testostérone. La concentration circulante de testostérone est faible chez les enfants à partir de 6 mois et jusqu'à la puberté, mais dans le testicule la concentration en testostérone représente en moyenne 36 fois la concentration sanguine (Bidlemaier *et al.* 1983).



**Figure 5 : Partie postérieure et coupe transversale d'un embryon de souris schématisant la migration des cellules germinales primordiales dans les crêtes génitales**  
 Adapté de (Saitou & Yamaji 2012). Les cellules germinales primordiales situées à la base de l'allantoïde migrent dans les crêtes génitales jusqu'à la colonisation complète des gonades indifférenciées. Sm : somite, PGC : cellule germinale primordiale (*Primordial Germ Cell*)



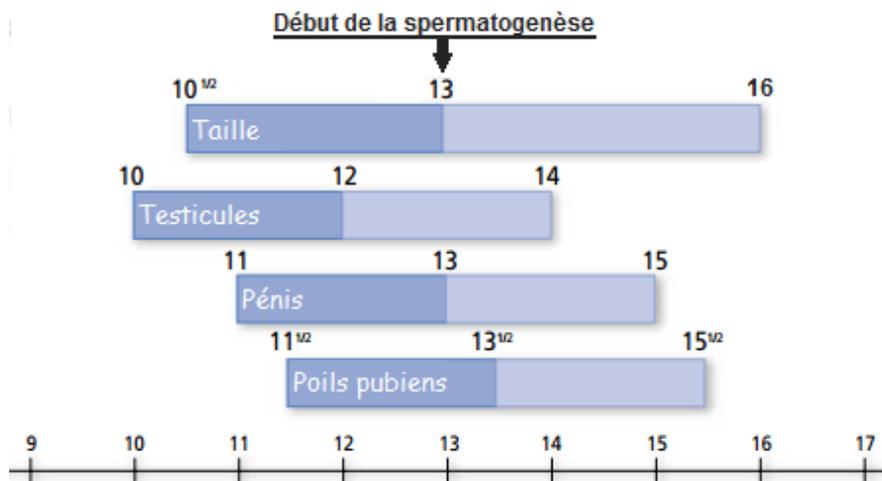
**Figure 6 : Hétérogénéité de la population spermatogonale chez le rat en période périnatale**  
 Adapté de (Hermann *et al.* 2015). Des changements moléculaires dynamiques contribuent à la différenciation des cellules germinales primordiales en gonocytes. Les gonocytes suivent des voies de différenciation différentes vers la formation de spermatogonies souches ou différenciées. E : jours de développement embryonnaire, P : jours de développement postnatal, PGC : cellule germinale primordiale (*Primordial Germ Cell*), proSg : prospermatogonie (aussi appelée gonocytes), Diff Sg : spermatogonie différenciée, SSC : spermatogonie souche (*spermatogonial stem cell*), Sg : spermatogonie, Spz : spermatozoïde

## 2.2 – La puberté

Au début de la puberté chez les primates, les cordons séminifères continuent de s'allonger, principalement *via* la prolifération des cellules de Sertoli (Rey et al. 1993). Une lumière se forme dans les cordons séminifères, qui deviennent alors des tubes séminifères. Le diamètre du tube s'épaissit avec la prolifération et la différenciation des cellules germinales, en accord avec la mise en place de la spermatogenèse (Rey et al. 1993). Pendant la puberté chez les primates, la mise en place de la spermatogenèse se traduit par le déclenchement d'une vingtaine de vagues incomplètes sur deux années (Rey *et al.* 1993, Chemes 2001). Une barrière hémato-testiculaire (BHT) se met en place entre deux cellules de Sertoli adjacentes. La prolifération des cellules de Sertoli mesurée avant la puberté prend fin lors de la formation de la BHT (Cortes *et al.* 1987). Le nombre de cellules de Sertoli déterminera en partie le nombre de cellules germinales à l'âge adulte, influençant ainsi la fertilité masculine (Rey *et al.* 1993). Dans le compartiment interstitiel, la concentration en testostérone, produite par les cellules de Leydig, augmente (Andersson *et al.* 1998). La testostérone permet la maturation des cellules de Sertoli, stimule la spermatogenèse tout au long de la vie, et l'apparition des caractères secondaires pendant la puberté (Palmert *et al.* 2014).

Pour l'ensemble du corps, la puberté est une longue période de modification physique et hormonale, où chaque événement débute à des âges variables et se met en place progressivement (figure 7) (Pienkowski & Grandjean 2017). Par exemple chez l'homme, la croissance osseuse comporte trois stades dont une phase de vitesse maximale (10 cm/an) est mesurée vers l'âge de 14 ans chez les garçons (De La Rochebrochard 1999). En revanche, la croissance du volume testiculaire, hautement corrélée avec le degré de maturation de l'épithélium testiculaire, pourrait commencer plus tôt vers l'âge de 12 ans en moyenne, avec un début de la spermatogenèse vers 13 ans (De La Rochebrochard 1999). En dehors de ces normes d'âge, le garçon peut être considéré comme ayant une puberté précoce ou un retard pubertaire. Ainsi par définition, un garçon de 14 ans sans signe de puberté pourrait être en retard pubertaire, dépendamment des antécédents familiaux et de la courbe de croissance à l'adolescence (Taddeo & Girard 2007, Palmert *et al.* 2014). Dans le cadre d'une étude rétrospective sur les effets d'une exposition prépubère à un agent toxique pour la spermatogenèse, il peut donc être difficile d'établir un âge précis de l'entrée en phase de puberté pour chaque individu. De plus, un consensus a été établi entre l'institut national du cancer aux États-Unis et le réseau européen pour les cancers chez les enfants et les adolescents, où les enfants ont de 0 à 14 ans, les adolescents et les jeunes adultes ont entre 15 et 39 ans, et les adultes ont de 40 à 69

ans (Trama *et al.* 2016). Pour les travaux présentés dans le chapitre 1, l'âge de 14 ans chez l'homme sera considéré comme la dernière limite de la période prépubère.



**Figure 7 : Calendrier pubertaire**

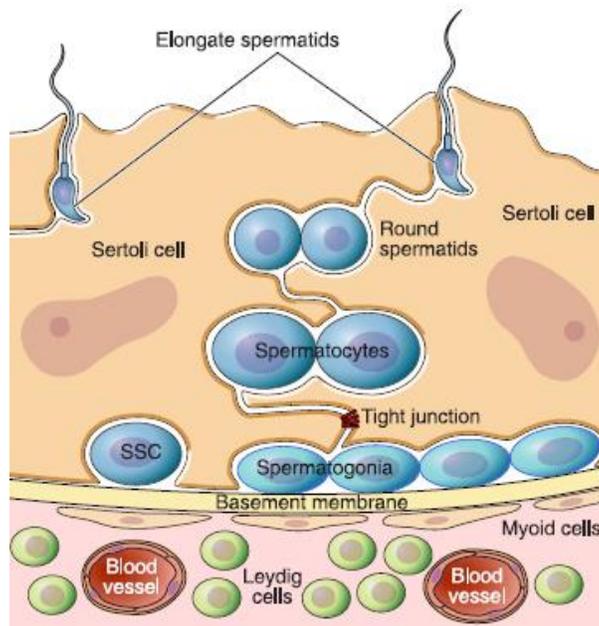
Adapté de (De La Rochebrochard 1999, Pienkowski & Grandjean 2017). L'âge normatif de début et fin de chaque événement pubertaire sont indiqués aux extrémités des périodes, tandis que de l'âge moyen du début de l'évènement est indiqué au centre.

### 2.3 – Le testicule adulte

La sécrétion de la testostérone et la production de spermatozoïdes sont à présent régulées hormonalement par l'axe hypothalamo-hypophysaire (Thibault & Levasseur 2001, Kelnar *et al.* 2002a). La GnRH, sécrétée par l'hypothalamus, déclenche la sécrétion pulsatile d'hormones hypophysaires, la LH (*Luteinizing hormone*) et la FSH (*Follicle-Stimulating Hormone*) (Thibault & Levasseur 2001). La LH agit sur les cellules de Leydig pour stimuler la production de testostérone. D'une part, la testostérone stimule la spermatogénèse et d'autre part, assure un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de LH. La FSH stimule la spermatogénèse *via* les cellules de Sertoli, qui exerce, en réponse, un rétrocontrôle négatif par la sécrétion d'inhibine B.

L'épithélium des tubes séminifères renferme une couche de cellules de Sertoli, soutenant plusieurs couches de cellules germinales (figure 8). Les cellules de Sertoli sont organisées sous forme d'épithélium pseudo-stratifié ; les noyaux sont organisés sur plusieurs rangées, mais les cellules de Sertoli sont

attachées à la membrane basale (Chemes 2001). Par l'action des jonctions serrées, la BHT permet de limiter la diffusion de substance hydrosoluble (Cheng *et al.* 2011). Des jonctions cellulaires adhérentes et de type gap sont également présentes entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales (Goossens & van Roy 2005). L'ensemble de ces jonctions crée un micro-environnement pour les cellules germinales indifférenciées, leur donnant accès à des facteurs de croissance nécessaires au maintien de leur état indifférencié et à leur prolifération (GDNF, bFGF, GFR $\alpha$ 1) (Kubota *et al.* 2004). Ainsi, les cellules de Sertoli assurent un soutien physique, et un rôle nourricier pour les cellules germinales (Rey *et al.* 1993).



**Figure 8 : Épithélium des tubes séminifères à l'âge adulte**

(Oatley & Brinster 2012). Dans le compartiment interstitiel se situent les vaisseaux sanguins et les cellules de Leydig. Dans les tubes séminifères sont retrouvés les cellules de Sertoli et l'ensemble des stades de maturation des cellules germinales.

La spermatogenèse est composée de trois phases majeures : une phase de prolifération mitotique, une phase de prolifération méiotique, et une phase de différenciation. Au fil de ces mécanismes de division et de maturation, les cellules germinales se déplacent du compartiment basal au compartiment adluminal des cellules de Sertoli (figure 8) (Clermont 1972). Lors de la phase mitotique, les SSC se divisent pour former les spermatozoaires (Huckins 1971, Oakberg 1971, Clermont 1972). La nature des SSC est discutée dans la section suivante (section 2.4). Chez les rongeurs, à partir d'une cellule individualisée appelée spermatozoaire  $A_{single}$ , sont formées deux cellules filles liées par un pont cytoplasmique. Ces spermatozoaires  $A_{paired}$  résultent de la scission incomplète des cytoplasmes lors de l'étape finale de la

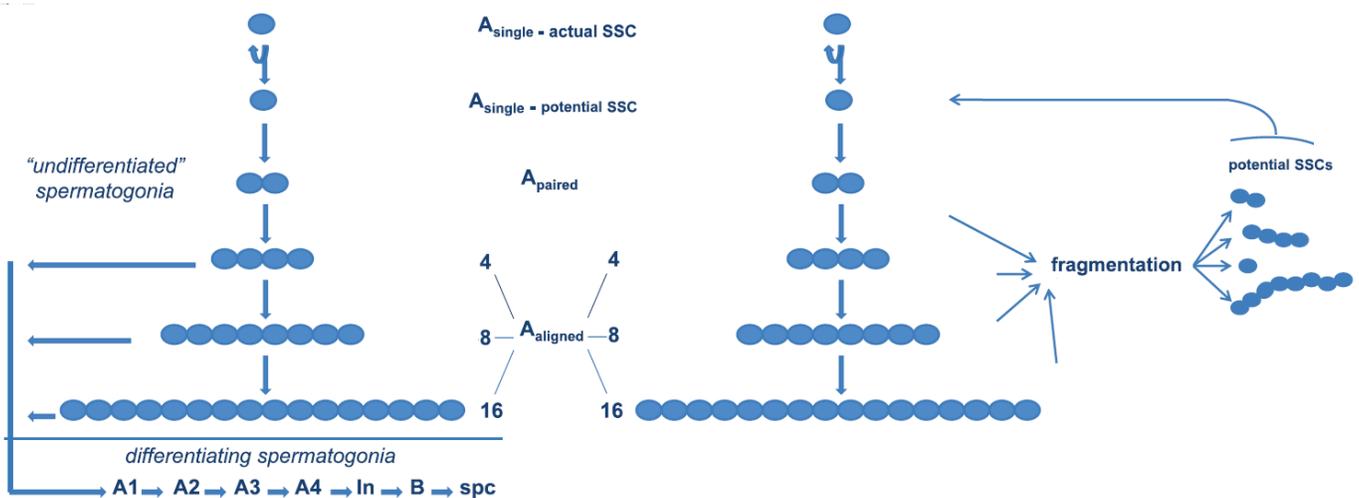
mitose, la cytotiérèse (Huckins 1971, Oakberg 1971, Clermont 1972). De nouvelles mitoses incomplètes forment une chaîne de 4 à 16 spermatogonies nommée  $A_{aligned}$ . Sans division mitotique, les spermatogonies  $A_{aligned}$  se différencient en spermatogonies  $A_1$ . Par mitose, six générations de spermatogonies différenciées sont par la suite produites ( $A_{1-4}$ ,  $A_{in}$ , B), ainsi que les spermatocytes primaires (Huckins 1971, Oakberg 1971, Clermont 1972) (figure 8). Chez l'homme, les spermatogonies sont composées uniquement des spermatogonies  $A_{dark}$ ,  $A_{pale}$ , et les spermatogonies B (Clermont 1969). Les spermatogonies  $A_{dark}$ , considérées comme la réserve de spermatogonies souches, sont majoritairement en quiescence, mais reprennent une activité mitotique en cas de déplétion des spermatogonies (Alphen *et al.* 1988). Les spermatogonies  $A_{pale}$  forment par mitose les spermatogonies B. Les spermatogonies  $A_{pale}$  n'auraient pas d'habileté de division asymétrique ; la division d'une spermatogonie  $A_{pale}$  engendre deux spermatogonies  $A_{pale}$  ou deux spermatogonies B (Clermont 1969, Ehmcke *et al.* 2005).

Les spermatocytes primaires se divisent ensuite par méiose pour former les spermatocytes secondaires puis, les spermatides (de Rooij & Russell 2000). Au cours de la méiose, le spermatocyte passe au travers de la BHT. Tandis que les spermatogonies sont situées dans le compartiment basal des cellules de Sertoli, les spermatides produites seront dans la face adluminal (figure 8) (Oatley & Brinster 2012). La BHT protège les cellules haploïdes de réaction immunitaire (Cheng *et al.* 2011). Lors de la spermiogenèse, de nombreuses étapes de différenciation permettent la maturation des spermatides en spermatozoïdes, dont la formation de l'acrosome et le remodelage de la chromatine (Boissonneault 2002). Une fois différenciés, la spermiation se caractérise par les spermatozoïdes se détachant des cellules de Sertoli pour être libérés dans la lumière des tubes séminifères. La spermatogenèse dans le testicule a une durée d'environ 52 ou 74 jours chez le rat ou l'homme respectivement (Thibault & Levasseur 2001). De six à 11 jours supplémentaires dans l'épididyme, selon les espèces, seront nécessaires aux spermatozoïdes pour acquérir leur pouvoir fécondant (Robaire & Hinton 2002).

## 2.4 - Les spermatogonies souches (SSC)

Les SSC, à l'origine de la spermatogenèse, sont essentielles au maintien de la fertilité tout au long de la vie de l'homme. Majoritaire jusqu'à 9 jpp chez le rat (cf chapitre 3), la proportion de SSC diminue avec la mise en place des autres stades de maturation des cellules germinales, pour uniquement représenter 0,02% à 0,03% des cellules germinales à l'âge adulte (Tegelenbosch & de Rooij 1993). Situées en bordure de la membrane basale du tube séminifère, elles se divisent de façon asymétrique par mitose permettant un auto-renouvellement de la réserve de SSC.

Des incertitudes persistent autour de la nature des SSC. Alors que la population entière de spermatogonies  $A_s$  chez les rongeurs, ou les spermatogonies  $A_{\text{dark}}$  chez les primates, a longtemps été considérée comme les cellules souches dans le testicule, de nouveaux paradigmes décrivent plusieurs populations de SSC (Oatley & Brinster 2012). Une hypothèse décrit les SSC comme une sous-population de spermatogonies  $A_{\text{single}}$  où une partie serait en prolifération assurant la spermatogénèse, et une autre partie serait en quiescence (figure 9) (Nakagawa *et al.* 2007). Les SSC en quiescence servant de réserve en cas d'altération des SSC en prolifération (de Rooij & Russell 2000). D'autres hypothèses suggèrent l'existence d'une population de SSC potentielle où des spermatogonies A différenciées pourraient revenir à un état indifférencié et acquérir les caractéristiques de cellules souches (figure 9) (Nakagawa *et al.* 2010). Ces SSC potentielles pourraient être les spermatogonies  $A_p$  ou les  $A_{\text{al}}$ . Cette théorie est fondée sur l'hypothèse que les ponts intra-cytoplasmiques reliant les spermatogonies A différenciées pourraient se rompre, libérant des cellules individualisées et favorisant l'acquisition du caractère souche (Nakagawa *et al.* 2010). A l'heure actuelle, aucun consensus n'est établi sur la nature des SSC.



**Figure 9 : Schéma de la multiplication des spermatogonies et du renouvellement des SSC selon les théories du groupe de Yoshida**

Adapté de (de Rooij & Griswold 2012), et d'après (Nakagawa *et al.* 2007, Nakagawa *et al.* 2010). Les SSC se définissent comme une sous population de spermatogonies  $A_{\text{single}}$ . Selon une différente théorie, les spermatogonies différenciées peuvent également devenir des SSC potentielles.

### 2.4.1 - les marqueurs des SSC

Peu de connaissances sont acquises sur les cellules germinales à caractères souches en raison de la difficulté de les isoler. En effet, non seulement présentes en faible nombre, les différences morphologiques et phénotypiques entre les stades de spermatogonies pré-méiotiques sont subtiles (Tegelenbosch & de Rooij 1993, Neuhaus *et al.* 2017). De nombreux marqueurs de SSC ont été décrits (tableau 2), mais à l'heure actuelle il n'existe aucun marqueur spécifique des SSC. L'isolation des SSC ne sera donc pas une purification, mais un enrichissement de ces cellules par sélection positive ou négative de marqueurs en combinaison (Shinohara *et al.* 2000). Ainsi, le marqueur CD9 permet la sélection d'une population cellulaire 5 fois plus enrichie en SSC chez la souris, contre 183,7 fois avec le marqueur E-cadhérine (Kanatsu-Shinohara *et al.* 2004, Kanatsu-Shinohara *et al.* 2013). La sélection négative couplée à ces facteurs peut également être une stratégie d'enrichissement. En effet, la sélection positive du marqueur CD9 est améliorée chez la souris lorsqu'elle est couplée à la sélection négative du marqueur EPCAM, permettant d'enrichir en SSC avec un facteur de 48,7 (Kanatsu-Shinohara *et al.* 2011b). L'efficacité de l'enrichissement en SSC, se vérifie à l'aide d'une technique de transplantation (Schlatt *et al.* 1999, Honaramooz *et al.* 2002, Shinohara *et al.* 2002, Hermann *et al.* 2012), décrite dans la section 3.4.2. Ainsi, le nombre de colonies de cellules germinales rétablissant la spermatogenèse après transplantation, permet de déterminer la proportion de SSC présente dans la population de cellules injectées (Hermann *et al.* 2012).

Depuis les dernières années, des études de transcriptomiques à l'échelle d'une cellule semblent révéler que les SSC sont une population hétérogène (Neuhaus *et al.* 2017). L'acquisition progressive de marqueur de différenciation rend la caractérisation des SSC d'autant plus difficile. Bien que certains marqueurs aient été identifiés dans les SSC (tableau 2), il n'existe pas encore de consensus sur leur spécificité.

**Tableau 2 : Liste non exhaustive des marqueurs des spermatogonies souches**

Marqueur	Modèle	Référence	Marqueur	Modèle	Référence
CD9	souris	(Kanatsu-Shinohara <i>et al.</i> 2004)	NCAM	rat	(Paul <i>et al.</i> 2013)
	rat	(Kanatsu-Shinohara <i>et al.</i> 2004)	NGN3	singe	(Hermann <i>et al.</i> 2010)
	homme	(Zohni <i>et al.</i> 2012a)	Oct4	souris	(Pesce <i>et al.</i> 1998)
E cadhérine	souris	(Tokuda <i>et al.</i> 2007)		homme	(Mitchell <i>et al.</i> 2008)
	souris	(Zhang <i>et al.</i> 2011)	PLZF	souris	(Costoya <i>et al.</i> 2004)
EPCAM	rat	(Ryu <i>et al.</i> 2004)		rat	(Paul <i>et al.</i> 2013)
	souris	(Kanatsu-Shinohara <i>et al.</i> 2011b)		singe	(Hermann <i>et al.</i> 2010)
	homme	(Altman <i>et al.</i> 2014)	Ret	rat	(Paul <i>et al.</i> 2013)
GFR $\alpha$ 1	souris	(Ebata <i>et al.</i> 2005)	Sox2	rat	(Paul <i>et al.</i> 2013)
	singe	(Hermann <i>et al.</i> 2010)	SSEA4	homme	(Izadyar <i>et al.</i> 2011)
	homme	(He <i>et al.</i> 2010)	Thy-1	souris	(Kubota <i>et al.</i> 2003)
GPR125	homme	(He <i>et al.</i> 2010)		rat	(Goldschneider <i>et al.</i> 1978)
HSP90 $\alpha$	souris	(Gruppi <i>et al.</i> 1991)		singe	(Eildermann <i>et al.</i> 2012)
ID4	rat	(Paul <i>et al.</i> 2013)	Thy-1.2	souris	(Yeh <i>et al.</i> 2007)
	souris	(Sun <i>et al.</i> 2015)	VASA	singe	(Mitchell <i>et al.</i> 2008)
Intégrine $\alpha$ 6	souris	(Shinohara <i>et al.</i> 1999)			
Intégrine $\beta$ 1	Souris	(Shinohara <i>et al.</i> 1999)			
Intégrine $\beta$ 3	rat	(Ryu <i>et al.</i> 2004)			
MCAM	souris	(Kanatsu-Shinohara <i>et al.</i> 2012)			

#### 2.4.2 - les modèles d'études

La création de lignées spermatogoniales est un atout dans la recherche de leur caractérisation. Des cultures primaires de spermatogonies ont été développées avec ou sans la présence de cellules nourricières (Kubota *et al.* 2004, Kanatsu-Shinohara *et al.* 2011a). Toutefois, les co-cultures avec les cellules nourricières permettent un meilleur maintien de la culture. Les lignées cellulaires prolifèrent en absence de cellules nourricières (Kubota *et al.* 2004, Nagano 2011). Les effets directs des traitements de chimiothérapies sur les spermatogonies peuvent alors être déterminés. Avec des modèles en co-culture, les traitements peuvent avoir une incidence sur les cellules nourricières qui ont un rôle de soutien, mais également une activité paracrine (Kubota *et al.* 2004). Il est alors impossible de déterminer si tous changements moléculaires dans les spermatogonies proviennent des traitements eux-mêmes ou de leur action indirecte sur ces cellules de soutien.

Tout comme les cellules souches neurales ou de l'épithélium ovarien (Wang *et al.* 2015, Lee *et al.* 2017), les SSC prolifèrent sous forme d'agrégats, ou colonies, où chaque cellule conserve son caractère souche (Yeh *et al.* 2007). Basé sur ce principe, Kubota et ses collaborateurs ont développé un système de culture dans lequel les SSC sont prélevées à partir de testicules prépubères de souris (Kubota *et al.* 2004). La récupération des SSC est réalisée par MACS par sélection positive du marqueur de surface Thy-1. Toutefois, il faut noter que l'utilisation de ce marqueur de surface peut être critiquée, puisque son expression est marquée à 5 jpp chez le rat mais diminue dans les SSC entre 8 et 14 jpp (Ryu *et al.* 2004). Après individualisation des cellules isolées, chaque cellule de la colonie est capable d'en former une nouvelle. En effet, l'équipe du Pr Makoto Nagano a pu établir une corrélation entre le nombre de colonies obtenu en culture et le nombre de colonies de SSC formé après une transplantation *in vivo* (Yeh *et al.* 2007). Le comptage des colonies permet donc d'évaluer la prolifération des SSC, et par ce biais, de mesurer l'impact d'agents toxiques sur la fonction de SSC en évitant la longue procédure de la transplantation (Marcon *et al.* 2010).

Des rats exprimant spécifiquement la protéine GFP dans les cellules germinales (GCS-EGFP) (Cronkhite *et al.* 2005) ont permis de développer un nouveau modèle de culture primaire de spermatogonie (Marcon *et al.* 2010). Cette lignée de rat, développée par l'équipe de Robert E. Hammer (Cronkhite 2005), est issue de la transfection aléatoire des transgènes de l'EGFP et de la phosphatase alcaline soumise à l'activité du promoteur ROSA, dans le chromosome 11. La GFP est exprimée dans l'ensemble des cellules germinales à partir du stade de zygote à 2 cellules. Grâce à cette fluorescence, les cellules germinales peuvent être triées par cytométrie en flux (FACS). La fluorescence de la GFP offre également le grand avantage d'analyser aisément la multiplication des SSC en temps réel. En effet, la plupart des cultures *in vitro* de SSC nécessitant le support de cellules nourricières, la fluorescence de la GFP permet de s'assurer de la nature des cellules observées, et de suivre en temps réel la multiplication des SSC par un système d'imagerie automatisé (Marcon *et al.* 2010).

Peu de lignées de spermatogonies sont à ce jour disponibles. Ces lignées ont été obtenues par immortalisation *via* la transfection de l'antigène SV40 large T. Les premières lignées de spermatogonies avec des caractéristiques de cellules souches ont été générées chez le rat par le Dr Ans Van Pelt (Van Pelt *et al.* 2002). Avant prélèvement des testicules, les animaux ont subi un régime privé en vitamine A, précurseur de l'acide rétinoïque et indispensable à la différenciation des spermatogonies (Ismail *et al.* 1990, Van Pelt & De Rooij 1990). Ainsi, bien que les testicules soient prélevés entre 8 et 11 semaines de vie, la spermatogenèse est arrêtée chez ces rats permettant d'obtenir une population de cellules

germinales majoritairement composée de spermatogonie A. Ces cellules ont été isolées par un gradient de Percoll avant d'être transfectées (Van Pelt *et al.* 2002). Deux lignées ont été obtenues (GC-5spg et GC-6spg). Toutes deux expriment Hsp90 $\alpha$  (un marqueur des cellules germinales), Oct-4 (un marqueur des cellules souches), et n'expriment pas c-kit (un marqueur de spermatogonie différenciée). Cependant, ces cellules n'assument pas les propriétés souches *in vivo* ; capables après transplantation de se loger dans la niche testiculaire, elles ne peuvent pas s'autorenouveler et finissent par disparaître. Ces deux lignées arborent donc un phénotype de spermatogonie aux caractéristiques de cellules souches (Van Pelt *et al.* 2002). Elles sont donc un modèle de choix pour des études de toxicologie sur les SSC.

L'équipe de Hofmann a développé deux lignées de spermatogonie chez la souris (Hofmann *et al.* 1992, Hofmann *et al.* 2005). Pour la première (GC-1spg), la transfection a été réalisée sur une population hétérogène de spermatogonie B et de spermatocytes primaires isolés par gradient de Percoll (Hofmann *et al.* 1992). En effet, les cellules germinales ont été récupérées à partir de testicules de souris de 10 jpp. À ce stade, des SSC, des spermatogonies et des spermatocytes sont présents dans le testicule immature. En revanche, la seconde lignée (C18-4) fut la première lignée murine de spermatogonies indifférenciées (Hofmann *et al.* 2005). Les testicules de souris ont été prélevés à 6 jpp, âge où les spermatogonies indifférenciées sont encore peu implantées (Culty 2009). Par la suite, un gradient de BSA a optimisé l'isolement de spermatogonies de type A. Enfin, l'expression de marqueurs de SSC, tel que Oct-4, suggère le caractère souche de ces cellules. Des techniques de transplantation n'ont pas été réalisées pour vérifier la capacité à rétablir la spermatogenèse dans un testicule dépourvu de cellules germinales (Hofmann *et al.* 2005).

Hou *et al.* ont établi la première lignée humaine de SSC (Hou *et al.* 2015). À partir de tissu de testicule adulte congelé, les cellules germinales ont été immortalisées avec l'antigène SV40 large T couplé à un gène rapporteur codant pour la GFP. À l'aide de la fluorescence GFP, les cellules transfectées ont été isolées, puis purifiées par sélection immuno-magnétique (MACS) du marqueur de surface des SSC, GPR125 (He *et al.* 2010, Hou *et al.* 2015). La propriété souche de la lignée obtenue a été validée d'une part par la mesure de l'expression des gènes et des protéines connus pour être des marqueurs des SSC, et d'autre part, par transfection xénogénique dans un testicule de souris aboutissant après deux mois à la formation de colonie exprimant la GFP.

Les lignées cellulaires et la culture primaire de spermatogonie aux caractéristiques souches s'inscrivent parfaitement dans le cadre de la réduction d'utilisation d'animaux pour la recherche expérimentale (loi des trois R) (Russell & Burch 1959). Pour les travaux de cette thèse, trois lignées de SSC étaient

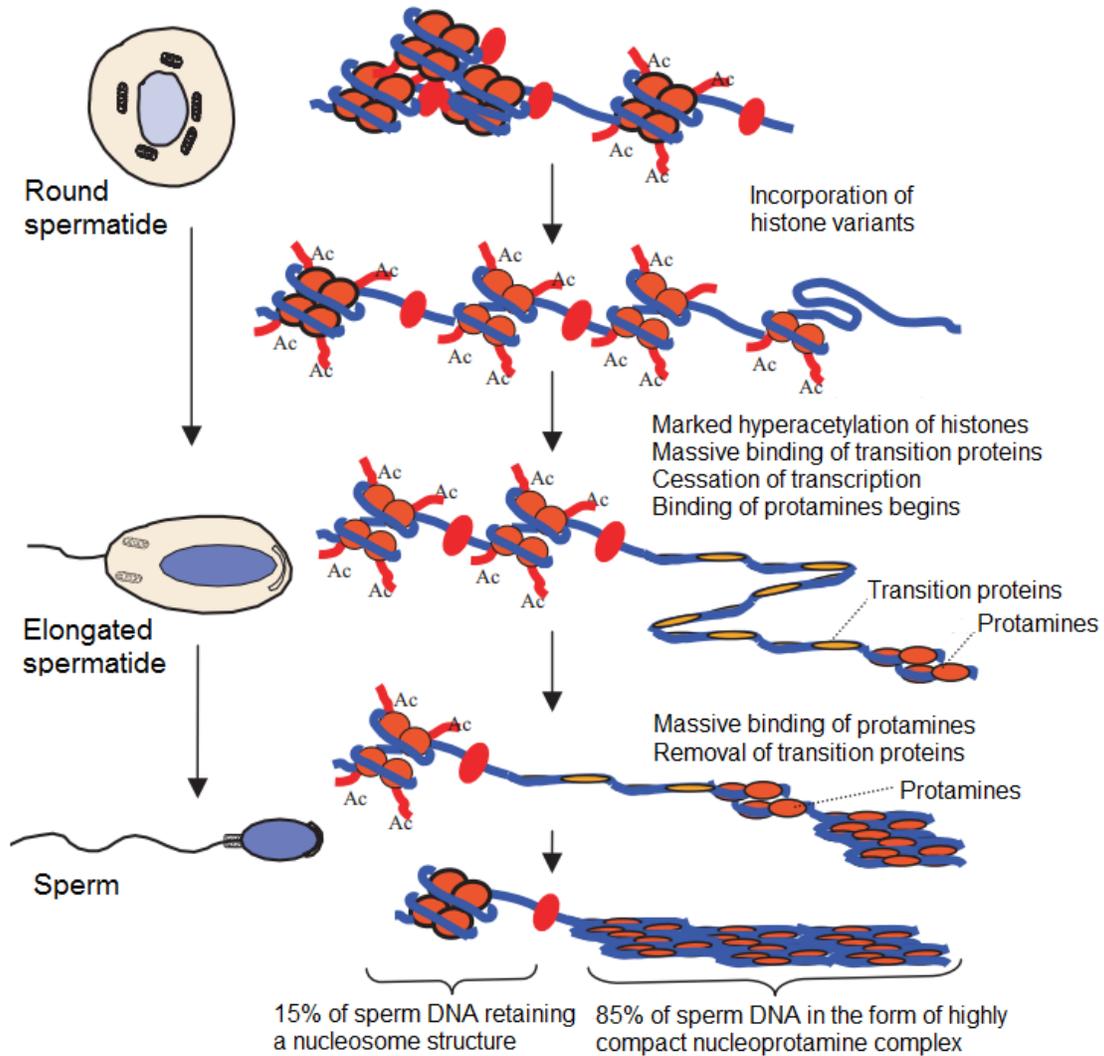
disponibles au début de mon doctorat, deux lignées chez le rat (GC-5spg et GC-6spg) et une lignée chez la souris (C18-4). Parmi les lignées du Dr Ans Van Pelt, les GC-6spg semblent avoir de meilleures capacités à migrer à la membrane basale des tubes séminifères après transplantation. De ce fait, nous avons utilisé la lignée GC-6spg en premier lieu pour analyser une large gamme de doses de traitement et trois temps de traitement (cf chapitre 2), afin de réduire les conditions et paramètres évalués *in vivo* (cf chapitre 3). En comparaison des lignées cellulaires, la culture primaire de cellules germinales est plus longue à mettre en place. Dans le laboratoire, la culture primaire, telle que décrite par Marcon *et al.* à partir du modèle de rat de Robert E. Hammer, a été entreprise dans le laboratoire comme perspective de modèle d'étude.

## 2.5 - Les spermatozoïdes

Le spermatozoïde est une cellule ultraspécialisée. En effet, la spermiogenèse est une étape de maturation où les spermatides subissent des modifications morphologiques, membranaires, et génomiques pour aboutir au spermatozoïde mature (Clermont & Tang 1985). Parmi ces modifications, on peut noter le remodelage de la chromatine (figure 10). L'ADN du spermatozoïde est compacté davantage pour, entre autres, être protégé des atteintes de l'environnement externe. Pour cela dans les spermatides, les histones autour desquels l'ADN est enroulé sont remplacées par des protéines de transition, qui sont à leur tour remplacées par des protamines (Grimes & Smart 1985, Boissonneault 2002). Cependant, 1% des histones chez la souris et 15% chez l'homme sont conservés, suggérant une transcription résiduelle (Siklenka *et al.* 2015). Une plus grande accessibilité de la chromatine dans le spermatozoïde humain suggère une plus grande vulnérabilité aux agents génotoxiques.

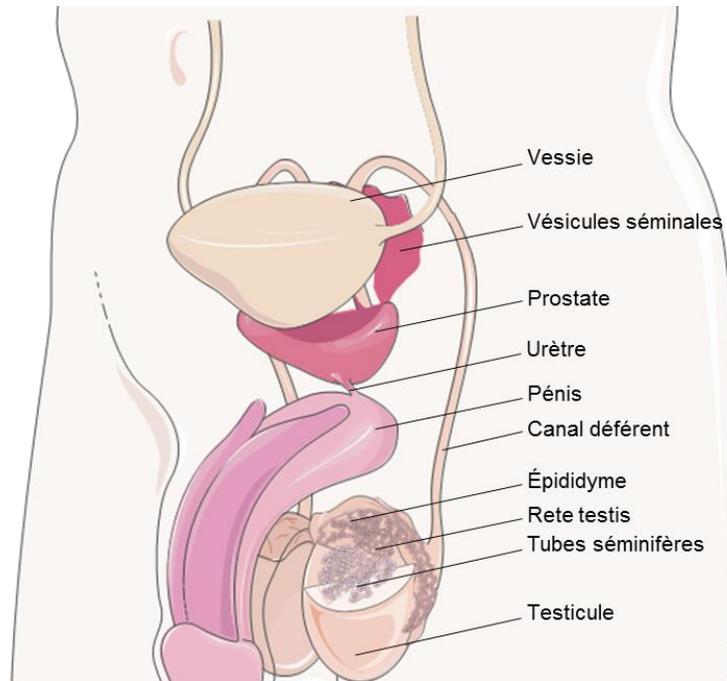
Une fois la spermiogenèse achevée, le spermatozoïde est relâché dans la lumière du tube séminifère (Thibault & Levasseur 2001), c'est la spermiation. Les spermatozoïdes étant immobiles, leur cheminement à travers l'appareil reproducteur mâle est passif. Dans la lumière des tubes séminifères du testicule, la contraction des tubes grâce aux cellules myoépithéliales permet le transport des spermatozoïdes jusqu'au rete testis (figure 11) (Thibault & Levasseur 2001). Les spermatozoïdes traversent le canal éférent pour atteindre l'épididyme, où ils acquièrent la motilité et leur pouvoir fécondant (Soler *et al.* 1994). Dans le tube unique de l'épididyme, les spermatozoïdes arrivent par la tête de l'épididyme, sont acheminés vers le corps, puis stockés dans la queue de l'épididyme (Thibault & Levasseur 2001). Au moment de l'éjaculation, les spermatozoïdes sont transportés par le canal déférent vers l'urètre. La prostate permet entre autres de produire du liquide prostatique, stockés dans les vésicules séminales et ajoutés au sperme

au moment de l'éjaculation (Figure 11). Dans l'appareil reproducteur féminin, la capacitation des spermatozoïdes leur permettra de féconder éventuellement l'ovocyte.



**Figure 10 : Compaction de l'ADN des spermatozoïdes chez l'homme par remplacement des histones par les protamines**

Adapté de (Oliva 2006).



**Figure 11 : L'appareil reproducteur mâle ; le cheminement des spermatozoïdes de la lumière des tubes séminifères à l'urètre**

Adapté de la banque d'image Servier

## 2.6 - diagnostic de fertilité

### 2.6.1 - le spermogramme

La diminution du compte spermatique de 50% à 60% chez les hommes depuis une quarantaine d'années (Levine *et al.* 2017) s'est associée avec une augmentation de l'utilisation de techniques de procréation médicalement assistée (PMA). En centre de procréation, la fertilité de l'homme est principalement évaluée à l'aide d'un spermogramme. En effet, la baisse de la concentration des spermatozoïdes dans l'éjaculat et la baisse de leur motilité progressive, et l'altération de la morphologie ont été corrélées avec le risque d'infertilité (Larsen *et al.* 2000). Ainsi ces paramètres sont mesurés en routine *via* le système CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) (Farrell *et al.* 1996). Les mesures de chaque patient sont comparées à des normes mondiales établies par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (tableau 3) (Cooper *et al.* 2010).

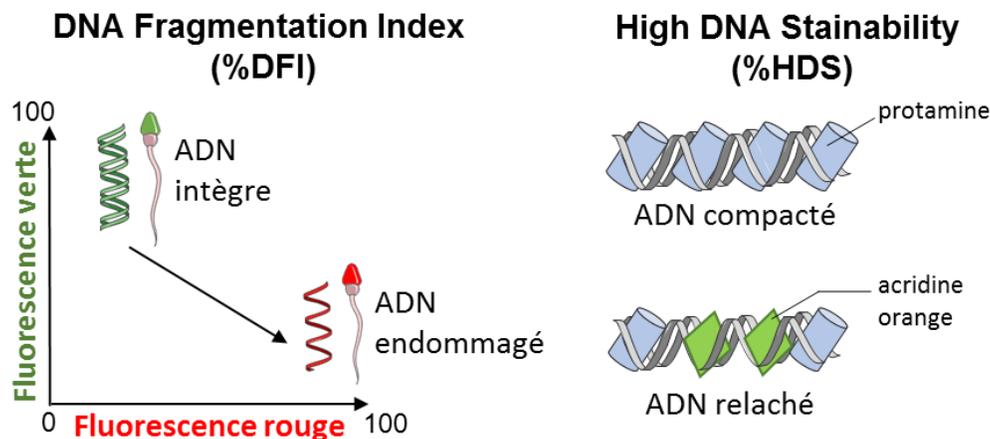
**Tableau 3 : Valeur de référence de l'OMS pour les paramètres du compte spermatique**  
D'après (Cooper *et al.* 2010)

Paramètre	5 <sup>e</sup> centile
Concentration spermatique	15 millions/ml
Compte spermatique	40 millions
Motilité totale	40%
Morphologie normale	4%

### 2.6.2 - le SCSA et le test de COMET

Bien que des tests d'analyse de la fertilité soient établis en routine dans les centres de procréation, encore 30% des couples ont une infertilité inexplicée (absence de conception d'enfant après un an de rapport sexuel sans contraception malgré un spermogramme normal et pas de cause chez la femme) (Quaas & Dokras 2008). L'infertilité idiopathique de ces couples pourrait en partie être associée au manque d'outil diagnostique pour l'évaluation de la fertilité masculine. En effet, les paramètres évalués à l'aide d'un spermogramme n'apportent qu'une évaluation partielle de la fertilité des hommes. De nombreuses techniques, peu ou pas utilisées en clinique de fertilité, ont été développées pour établir de nouveaux critères de qualité des spermatozoïdes (Delbes *et al.* 2010a). Ces nouvelles techniques déterminent les anomalies chromosomiques (mesurées par FISH (*fluorescent in situ hybridization*)), les cassures de l'ADN (mesurées par le test de COMET, de dispersion de la chromatine, ou de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*)), l'intégrité de la chromatine (mesurée par SCSA (*sperm chromatin structure assay*)), ou encore la compaction de l'ADN (mesurée par SCSA ou le marquage de la chromomycine A3 (Evenson *et al.* 1980, Fernández *et al.* 2003, Schmid & Jamieson 2004, O'Flaherty *et al.* 2008, Mougou-Zerelli *et al.* 2011)). La plupart de ces techniques ont permis de corrélérer l'atteinte de l'intégrité génomique des spermatozoïde avec des défauts de développement embryonnaire ou des échecs de PMA (Morris *et al.* 2002, Bungum *et al.* 2007, Delbes *et al.* 2010a). Parmi ces techniques, seuls le SCSA et le COMET ont été développés en haut débit (Evenson & Wixon 2006, Albert *et al.* 2016), permettant l'analyse rapide et reproductible d'un grand nombre de spermatozoïdes. Le SCSA et le test de COMET mesurent les dommages à l'ADN selon des paramètres différents. Des études de corrélation ont montré que les résultats du SCSA et du test de COMET étaient complémentaires (Delbès 2007).

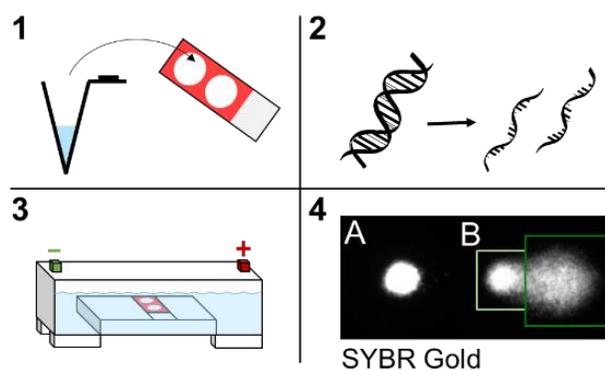
Le SCSA a été développé il y a une trentaine d'années (Evenson *et al.* 1980). L'utilisation de la cytométrie en flux dans cette technique permet une lecture rapide d'un grand nombre de spermatozoïdes. D'une part, l'indice de fragmentation de l'ADN (DFI ; *DNA Fragmentation Index*) est mesuré par la sensibilité de l'ADN à se dénaturer en milieu acide (figure 12). Plus l'ADN a des anomalies de la chromatine, telle que des agents intercalés entre les brins d'ADN ou des cassures de l'ADN, plus il aura tendance à se dénaturer en milieu acide (Evenson *et al.* 1980). L'acridine orange émet une fluorescence verte en présence d'ADN bicaténaire et une fluorescence rouge en présence de brins d'ADN monocaténaire (figure 12). Cette fluorescence est ensuite lue par cytométrie en flux. De plus dans les mêmes spermatozoïdes, la densité de compaction de la chromatine, révélateur d'une bonne maturation du spermatozoïde, est indirectement mesurée par la capacité de l'acridine orange à s'insérer entre les brins bicaténaires (figure 12). Ainsi, la mesure d'une haute fluorescence verte (HDS; *High DNA Stainability*) est révélatrice d'une mauvaise compaction de la chromatine. La mesure simultanée du DFI d'une part, et du HDS d'autre part sur la même population de spermatozoïde permet d'obtenir différentes informations sur l'intégrité de la chromatine, même dans les échantillons de faible concentration spermatique. Des protocoles standardisés développés par Evenson *et al.*, ont permis de définir une valeur seuil pour laquelle une infertilité peut être diagnostiquée. Une valeur supérieure à 25% DFI et/ou 15% HDS indiquent respectivement, une perte de l'intégrité de la chromatine et/ou un défaut de compaction des spermatozoïdes. Les chances d'engendrer une grossesse sont diminuées au-delà de ces valeurs seuils (Evenson *et al.* 1980, Bungum *et al.* 2004, Virro *et al.* 2004, Bungum *et al.* 2007, Oleszczuk *et al.* 2016, Evenson 2017).



**Figure 12 : Principe des deux paramètres (DFI et HDS) mesurés par SCSA**

D'après la banque d'image Servier. Le %DFI mesure la sensibilité de l'ADN à une dénaturation en milieu acide. Le %HDS mesure les défauts de compaction de l'ADN.

Le test de COMET est une méthode sensible, transposable dans de nombreuses espèces, qui mesure spécifiquement les cassures de l'ADN à l'échelle d'une cellule (figure 13) (Singh *et al.* 1988, Anderson *et al.* 1997, Dhawan *et al.* 2009). Lorsque les spermatozoïdes lysés et dénaturés sont soumis à un champ d'électrophorèse, plus les brins d'ADN sont courts en raison de cassures de l'ADN, plus ils migrent loin de l'emplacement du noyau cellulaire. Une dénaturation en condition alcaline permet la quantification des cassures simples et doubles brins de l'ADN tandis qu'une dénaturation en condition neutre permet de quantifier uniquement les cassures doubles brins. L'importance des dommages dans l'ADN de chaque cellule peut être évaluée par analyse d'image *via* le pourcentage de fluorescence en dehors de l'emplacement du noyau (queue de la comète) (%Tail DNA), ou *via* la mesure de la longueur de la queue de la comète (Tail length) (Schnurstein & Braunbeck 2001, Perreault *et al.* 2003). Le *Tail extent moment* permet l'intégration du %Tail DNA et Tail length en un seul paramètre (Olive *et al.* 1996). Parmi ces paramètres de quantification des cassures de l'ADN, le %Tail DNA peut facilement être comparé d'une étude à l'autre (Dhawan *et al.* 2009). Cependant, bien que le test de COMET soit accepté dans la communauté scientifique, un faible nombre de cellules peut être analysé (de l'ordre de la centaine par échantillon), et de nombreuses heures sont nécessaires pour acquérir les données. Récemment, l'équipe de recherche du Pr Bernard Robaire a développé une technique de COMET à haut débit pour les échantillons de spermatozoïdes (HT-COMET; *high throughput COMET*) (Albert *et al.* 2016). L'automatisation de l'étape d'enrobage des cellules dans l'agarose, l'étape de détection des COMET et de leur analyse, permet une meilleure reproductibilité, un gain de temps, et donc l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons par expérimentation (figure 13) (Albert *et al.* 2016).



- 1\* Enrobage des spermatozoïdes dans un gel d'agarose
- 2 Lyse membranaire et dénaturation de l'ADN en condition alcaline
- 3 Électrophorèse
- 4\* Mesure de la fluorescence dans les profils de comètes
- \* Étapes automatisées pour l'utilisation en haut débit

**Figure 13: Schéma original des principales étapes du test de COMET en haut débit (HT-COMET)**

## **3 - LES EFFETS SECONDAIRES DES CHIMIOTHÉRAPIES SUR LA FERTILITÉ MASCULINE**

### **3.1 - Évidences épidémiologiques issues de cancers chez l'adulte**

Les cellules germinales pré-méiotiques et méiotiques (les spermatogonies et les spermatocytes) sont les cibles des agents de chimiothérapie en raison de leur forte activité de division cellulaire (Meistrich *et al.* 1982). Il en résulte une diminution du compte spermatique après le début du traitement de chimiothérapie (Meistrich 1986). Cette déplétion peut être permanente ou transitoire (Schilsky *et al.* 1980). Les mécanismes assurant le rétablissement du compte spermatique ainsi que le temps nécessaire pour y arriver ne sont toujours pas clairs. Une combinaison de facteurs pourrait être à l'origine de la complexité des recherches. En effet, le statut de fertilité du patient avant les traitements, la nature, la dose et la combinaison des agents de chimiothérapie utilisés, ainsi que la variabilité génétique des patients entraînant une sensibilité différente aux traitements, seraient à prendre en compte pour déterminer les risques d'infertilité après rémission du cancer (Jacobsen *et al.* 2000, Martinez *et al.* 2017). Ainsi, l'intégration de l'ensemble de ces paramètres rend d'autant plus complexe l'analyse des effets des traitements sur les survivants de cancer.

#### **3.1.1 - L'influence de la maladie**

Le cancer peut être impliqué dans l'altération de la fertilité masculine. La qualité des paramètres du spermogramme (concentration, motilité, morphologie) avant les traitements de chimiothérapies est dépendante de la nature du cancer et de son stade (Rueffer *et al.* 2001, O'Flaherty *et al.* 2008). Le cancer des testicules et la prédisposition aux pathologies liées aux cellules testiculaires pourraient influencer la qualité de la production de spermatozoïdes (Jacobsen *et al.* 2000). En effet, les hommes diagnostiqués avec un cancer des testicules ont, avant le traitement de chimiothérapie, de moins bons paramètres spermatiques que les hommes témoins ; la concentration et la motilité spermatique sont significativement diminuées, et la morphologie et l'intégrité de la chromatine des spermatozoïdes sont altérées par rapport aux témoins (O'Flaherty *et al.* 2008). Dans le cas de cancer hématologique (leucémies et lymphome), des études ont démontré que le stade de la maladie est positivement corrélé avec l'atteinte de la spermatogenèse (Rueffer *et al.* 2001, Gandini *et al.* 2003). Cependant, ces résultats restent controversés (Hallak *et al.* 2000, Sieniawski *et al.* 2008). Dans l'étude de Rueffer *et al.*, le lymphome de Hodgkin semble grandement affecter la fertilité, puisque 70% des 158 hommes ont au moins un paramètre du

spermogramme altéré avant de débiter les traitements anti-cancéreux (Rueffer *et al.* 2001). Rueffer *et al.* supportent l'hypothèse que la corrélation mesurée entre le stade de la maladie et le statut de fertilité pourrait être due à l'activation du système immunitaire qui entraîne entre autres de la fièvre, décrite pour être associée avec un fort taux d'infertilité (Marmor *et al.* 1986, Rueffer *et al.* 2001).

Des anomalies de la chromatine, des cassures de l'ADN, et une augmentation de la fréquence d'aneuploïdie dans les spermatozoïdes peuvent également être mesurées en amont des traitements par rapport aux témoins (Tempest *et al.* 2008, O'Flaherty *et al.* 2010, Bujan *et al.* 2014, Paoli *et al.* 2015, Martinez *et al.* 2017). L'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes est affectée par le cancer, quel que soit la nature du cancer (Meseguer *et al.* 2008, O'Flaherty *et al.* 2008, Stahl *et al.* 2009, Bujan *et al.* 2013, Bujan *et al.* 2014, Kumar *et al.* 2018). Utilisant un test de COMET ou un test de dispersion de la chromatine avant le traitement de chimiothérapie, des groupes de 6 à 26 hommes diagnostiqués pour divers cancers présentent une fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes statistiquement similaire entre eux, mais significativement altérée par rapport au groupe témoin (Meseguer *et al.* 2008, O'Flaherty *et al.* 2008). Les hommes diagnostiqués avec un lymphome de Hodgkin révèlent également avant le traitement une perte de l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes, mesurée par SCSA (%DFI) et par CMA3, en comparaison des hommes du groupe témoin (O'Flaherty *et al.* 2008).

À l'échelle individuelle, l'analyse de l'intégrité de la chromatine par SCSA avant le traitement de chimiothérapie ne permet pas de prédire les chances de produire des spermatozoïdes intègres après l'arrêt du traitement (Fossa *et al.* 1997). En effet, le traitement de chimiothérapie peut également affecter l'intégrité de la chromatine des spermatozoïdes (Bujan *et al.* 2014, Martinez *et al.* 2017).

### **3.1.2 - les agents alkylants**

Les premières évidences d'altération de la spermatogenèse suite à des traitements de chimiothérapie ont été observées post-mortem sur des coupes histologiques chez 27 hommes sur 30 ayant reçu des traitements de moutarde azotée, un agent alkylant (Spitz 1948). L'utilisation des traitements à forte dose cumulée d'agent alkylant permet d'obtenir de haut taux de rémission, mais en contrepartie les hommes sont plus à risque de développer une azoospermie définitive (absence de spermatozoïde dans l'éjaculat) (Viviani *et al.* 1985, Pryzant *et al.* 1993, Sanders *et al.* 1996, van der Kaaij *et al.* 2007, Paoli *et al.* 2016). De fortes doses d'agents alkylants administrées en amont de transplantation de moelle osseuse ont induit une absence de production de spermatozoïdes chez 80 hommes survivants du cancer sur 155 (Sanders *et al.* 1996). Il a également été démontré que les chances de retrouver une concentration spermatique dans

les normes de l’OMS après rémission, sont réduites de 33% lors de l’administration d’une dose supérieure à 9,5 g/m<sup>2</sup> de cyclophosphamide, un agent alkylant, comparé à des chimiothérapies avec des doses inférieures de cyclophosphamide (tableau 4) (Pryzant *et al.* 1993). De plus, l’administration d’agents alkylants en comparaison de chimiothérapies dépourvues d’agent alkylant réduit de 30% les chances d’avoir une concentration de FSH dans les normes, inversement corrélée avec la production de spermatozoïdes (van der Kaaij *et al.* 2007, Gordetsky *et al.* 2012). L’effet des agents alkylants est donc largement dépendant de la dose, mais la nature de la molécule reçue peut également modifier l’impact sur la spermatogenèse. Lorsque l’agent alkylant est de la procarbazine, des doses inférieures à 9,5 g/m<sup>2</sup> (>4 g/m<sup>2</sup>) sont déjà nuisibles à la production de spermatozoïdes (tableau 4) (Meistrich 2013).

**Tableau 4: Principales classes de chimiothérapie et effets de chaque agent sur la spermatogenèse chez l’homme**  
D’après (Spitz 1948, Pryzant *et al.* 1993, Meistrich 2013, Vakalopoulos *et al.* 2015)

Classe de chimiothérapie	Agent	Effet sur la spermatogenèse
Agent alkylant	Cyclophosphamide (>10g/m <sup>2</sup> ) Moutarde azotée Procarbazine (>4g/m <sup>2</sup> ) Cisplatine (>500mg/m <sup>2</sup> )	Azoospermie prolongée
	Busulfan (>600mg/m <sup>2</sup> )	Azoospermie potentielle Effet additif potentiel
Anthracycline, Antibiotique	Doxorubicine (>770mg/m <sup>2</sup> )	Réduction temporaire Effet additif potentiel
Antibiotique	Bléomycine	Réduction temporaire Effet additif potentiel
Antimétabolite	6-Mecaptopurine Méthotrexate	Réduction temporaire Effet additif potentiel
Alcaloïde	Vincristine Vinblastine (>50mg/m <sup>2</sup> ) Étoposide	Réduction temporaire Effet additif potentiel
Corticostéroïde	Prednisone	Pas d’effet toxique

### 3.1.3 - les agents non alkylants

De nos jours, les traitements anti-cancéreux correspondent à une combinaison d’agent pouvant inclure des agents alkylants, des anthracyclines, des alcaloïdes, des corticostéroïdes, et des anti-métabolites

(tableau 4). Afin de réduire la toxicité des chimiothérapies sur la fertilité, certains agents alkylants ont été remplacés dans les protocoles de traitement par des anthracyclines, notamment la doxorubicine, connues pour avoir des effets gonadotoxiques moindres (tableau 4) (Viviani *et al.* 1985). Ainsi dans le traitement du lymphome, la combinaison d'agent MOPP (moutarde azotée, vincristine, procarbazine, prednisone) hautement gonadotoxique a été remplacée par le traitement ABVD (doxorubicine, bléomycine, vinblastine, dacarbazine) faiblement gonadotoxique (Viviani *et al.* 1985, van der Kaaij *et al.* 2007, Paoli *et al.* 2016, Martinez *et al.* 2017). Tous ces agents de chimiothérapie ciblent les mécanismes de division cellulaire et peuvent induire une azoo- ou oligozoospermie (diminution du compte spermatique) temporaire ou permanente en affectant les cellules germinales (O'Flaherty *et al.* 2010, Bujan *et al.* 2014, Martinez *et al.* 2017).

Il est difficile, lors d'études épidémiologiques, de distinguer les effets de chaque molécule anti-cancéreuse sur les cellules germinales, et par conséquent, le classement d'agent de chimiothérapie comme faiblement ou moyennement gonadotoxique pourrait être erroné. Tout comme les agents alkylants, la dose cumulée de chaque agent de chimiothérapie est un indicateur de la gonadotoxicité potentielle. Par exemple, le traitement BEP (bléomycine, étoposide, cisplatine), utilisé contre le cancer du testicule, est majoritairement non gonadotoxique lorsque 2 cycles de traitement sont administrés, mais plus de 2 cycles de traitement diminuent le compte spermatique jusqu'à un an après l'arrêt du traitement (Bujan *et al.* 2014). Il est également important de prendre en considération la période de temps écoulée entre l'arrêt du traitement et l'analyse. Plus l'analyse de l'histologie testiculaire ou un spermogramme sera réalisé dans un laps de temps court après l'arrêt du traitement, plus des effets toxiques pourront être mesurés (Howell & Shalet 2005, Paoli *et al.* 2015), sans être nécessairement révélateur des effets permanents sur la fertilité de l'homme. En effet, Lampe *et al.* ont démontré que la probabilité d'un rétablissement de la spermatogenèse après un traitement contre un cancer du testicule est de 48% après 2 ans et 80% après 5 ans (Lampe *et al.* 1997).

#### **3.1.4 - atteinte de l'intégrité génomique des cellules germinales**

Bien que le compte spermatique puisse revenir à des valeurs normales avec le temps (Bujan *et al.* 2014, Paoli *et al.* 2015, Paoli *et al.* 2016), des anomalies de la chromatine, des cassures de l'ADN, et une augmentation de la fréquence d'aneuploidie dans les spermatozoïdes peuvent être mesurées après rémission du cancer (Tempest *et al.* 2008, O'Flaherty *et al.* 2010, Bujan *et al.* 2014, Paoli *et al.* 2015, Martinez *et al.* 2017).

Trois à six mois après l'arrêt de la chimiothérapie, l'intégrité de la chromatine, mesurée par SCSA (%DFI), est altérée, et les cassures de l'ADN, mesurées par test de COMET (%Tail DNA), sont augmentées par rapport aux témoins (O'Flaherty *et al.* 2010, O'Flaherty *et al.* 2012, Paoli *et al.* 2015). Moins d'un an après l'arrêt du traitement contre un cancer du testicule ou un lymphome de Hodgkin, l'intégrité de la chromatine des spermatozoïdes (%DFI) révèle des valeurs normales (<30% DFI) (Smit *et al.* 2010, O'Flaherty *et al.* 2012, Paoli *et al.* 2015), et le nombre de cassures de l'ADN (%Tail DNA) retourne à des valeurs similaires aux témoins (O'Flaherty *et al.* 2010, Bujan *et al.* 2014). Toutefois, chez les survivants de cancer du testicule des défauts de compaction de la chromatine (%HDS) persistent jusqu'à deux ans après l'arrêt du traitement (O'Flaherty *et al.* 2012). De plus, l'étude de Bujan *et al.*, chez des survivants de lymphomes hodgkinien et non hodgkiniens, met en évidence la persistance d'altération de la chromatine (%DFI) par rapport aux témoins jusqu'à deux ans après l'arrêt du traitement, sans pour autant mesurée une persistance des cassures de l'ADN, mesurée par TUNEL, ou une persistance de mauvaise compaction de la chromatine (%HDS) (Bujan *et al.* 2014). En comparaison aux études précédemment citées (Smit *et al.* 2010, O'Flaherty *et al.* 2012, Paoli *et al.* 2015), Bujan *et al.* ont recrutés 34 survivants de lymphome hodgkinien et non hodgkinien, alors que 15 survivants de lymphomes hodgkiniens composent la cohorte de l'étude de O'Flaherty *et al.*, et 5 survivants de lymphome non hodgkinien ont également pu être suivi à long terme dans l'étude de Smit *et al.* (Smit *et al.* 2010, O'Flaherty *et al.* 2012, Bujan *et al.* 2014, Paoli *et al.* 2015). Ainsi, la divergence de ces résultats pourrait être expliquée d'une part par le pouvoir statistique plus faible dans l'étude de O'Flaherty *et al.* et Smit *et al.*, et d'autre part, par le fait que les survivants de lymphomes non hodgkiniens pourrait être plus sensible au traitement (O'Flaherty *et al.* 2010, O'Flaherty *et al.* 2012, Bujan *et al.* 2014). Par conséquent, bien que l'intégrité de la chromatine des spermatozoïdes semble s'améliorer un an après l'arrêt du traitement, il n'est pas clair si le diagnostic de lymphome non hodgkinien et/ou le traitement de chimiothérapie associé affectent l'intégrité des spermatozoïdes.

Une augmentation de l'aneuploïdie dans les spermatozoïdes peut aussi être mesurée six mois après l'arrêt du traitement (Tempest *et al.* 2008, Martinez *et al.* 2017). Il a été montré qu'un ou deux ans après l'arrêt du traitement, les taux d'aneuploïdie dans les spermatozoïdes pouvaient retourner à des valeurs similaires à celles mesurées avant le traitement ou similaires au groupe témoin (Thomas *et al.* 2004, Tempest *et al.* 2008, Martinez *et al.* 2017). Cependant, le retour à un taux basal serait dépendant du traitement administré (Martinez *et al.* 2017). En effet, alors que les hommes survivants de cancer ayant reçu pour traitement l'ABVD retrouvent des valeurs normales après arrêt du traitement, les survivants ayant reçu le CHOP (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prednisone) ou le MOPP-ABV (mechlorethamine,

oncovin, procarbazine, prednisone–doxorubicin, bleomycin, vinblastine) auraient en moyenne un taux d'aneuploïdie toujours élevé deux ans après l'arrêt du traitement (Martinez *et al.* 2017).

Une perte de l'intégrité du génome des spermatozoïdes après un historique de cancer pourrait être l'origine du développement d'anomalies congénitales dans la descendance. Dans une large cohorte de 8670 enfants d'hommes traités entre 1994 et 2005, une faible augmentation significative a été mesurée pour le risque relatif de développer des anomalies congénitales (risque relatif de 1,12), et particulièrement des anomalies congénitales majeures (risque relatif 1,17) (Stahl *et al.* 2011). Toutefois, une augmentation significative de la prévalence d'anomalies congénitales mesurée dans une sous cohorte d'enfants issus d'hommes traités entre 1955 et 1964 (PR 2,77), suggère que l'amélioration des traitements anti-cancéreux depuis les dernières années a permis de diminuer les effets secondaires sur la descendance (Seppanen *et al.* 2016). De plus, les hommes survivants de cancer ont plus de difficulté à concevoir et sont donc plus susceptibles d'utiliser les techniques de PMA (Stensheim *et al.* 2013). Bien que dans ces techniques la sélection naturelle des spermatozoïdes soit contournée, les enfants de pères survivants de cancers issus de la PMA ne semblent pas avoir plus d'anomalies congénitales que les autres enfants issus de PMA (Stahl *et al.* 2011). L'ensemble de ces études a été rapporté dans le cadre d'une revue de littérature (voir annexe I) (Tremblay *et al.* 2017).

### **3.2 - Études épidémiologiques dans le cas de cancers pédiatriques**

Comme les cancers diagnostiqués à l'âge adulte, les effets secondaires à long terme d'un historique de cancer pédiatrique sur la fertilité reste imprévisibles (Jaffe *et al.* 1988, Müller *et al.* 1988). L'impact d'un historique de cancer pédiatrique sur la fertilité dépend du type de traitement et de la dose des chimiothérapies administrée, ainsi que la variabilité individuelle.

#### **3.2.1 - influence de la maladie**

Dans une cohorte de 938 survivants de cancers pédiatriques essayant d'avoir des enfants, 46% sont infertiles contre 17,5% de leurs frères sans historique de cancer (Wasilewski-Masker *et al.* 2014). Le faible compte spermatique serait la principale cause de l'infertilité, avec 18 à 30% de survivants de cancers pédiatriques souffrant d'azoo- ou oligozoospermie (Whitehead *et al.* 1982, Wallace *et al.* 1991, Andreu *et al.* 2000, Thomson *et al.* 2002, Romerius *et al.* 2011). Les survivants de lymphome de Hodgkin semblent être plus affectés que les survivants d'ALL avec 53 à 83% d'azoospermie contre 14 à 19% respectivement

(Jaffe *et al.* 1988, Wallace *et al.* 1991, Thomson *et al.* 2002, Romerius *et al.* 2011). Avant la puberté, le testicule est indépendant de l'axe hypothalamo-hypophysaire, il ne produit pas de spermatozoïdes, et la concentration circulante en testostérone est faible (Birlingmaier *et al.* 1983, Kelnar *et al.* 2002b). Ces paramètres ne peuvent donc pas être utilisés pour évaluer le statut de fertilité des patients avant le traitement anti-cancéreux. L'impact du diagnostic de cancer sur l'intégrité du testicule prépubère pourrait être analysé à l'aide de biopsie testiculaire. Or à ma connaissance, aucune étude n'a analysé l'impact de la maladie en amont du traitement. Il est donc difficile de déterminer dans le cas de cancer pédiatrique, si la plus grande sensibilité des survivants de lymphome de Hodgkin par rapport au survivant d'ALL est due à la maladie ou au traitement reçu. De plus, les études regroupent les survivants de cancer pédiatrique malgré la divergence des traitements afin d'avoir un fort pouvoir statistique, rendant difficile d'isoler l'effet des chimiothérapies de l'effet de la radiothérapie (Thomson *et al.* 2002, Green *et al.* 2010).

### **3.2.2 - les agents alkylants**

L'implication évidente d'agent alkylant dans l'atteinte à long terme de la fertilité a été soulignée dans plusieurs études (Müller *et al.* 1988, Sanders *et al.* 1996, van Casteren *et al.* 2009, Green *et al.* 2010). Plus précisément, Green *et al.* ont établi une formule permettant d'analyser le rôle de la dose cumulée des agents alkylants (Green *et al.* 2014). Par pondération des potentiels toxiques de chaque agent alkylant par rapport à la cyclophosphamide (CED ; *cumulative equivalent dose*), cette formule a permis de mettre en évidence une association entre la CED et la diminution de la fécondité chez les survivants de cancers pédiatriques (Chow *et al.* 2016). Dans cette même étude, une large cohorte de 5640 survivants de cancers pédiatriques révèle que l'infertilité augmente avec la dose cumulée de cyclophosphamide, d'ifosfamide, ou de procarbazine (Chow *et al.* 2016). Les diagnostics de cancers agressifs ou à risque de rechute, sont associés à des doses importantes d'agent alkylant (Sanders *et al.* 1996). A contrario, un diagnostic avec un bon pronostic vital est traité avec des combinaisons d'agents moins gonadotoxiques, limitant le risque de trouble de la fertilité (Meistrich 2009, Nurmio *et al.* 2009, van Casteren *et al.* 2009, Jahnukainen *et al.* 2011). Lorsque la dose d'agent alkylant est réduite (CED <10 g/m<sup>2</sup>), le rétablissement de la spermatogenèse après rémission du cancer reste toutefois imprédictible, suggérant l'implication d'autres paramètres dans l'induction de trouble de la fertilité (Pryzant *et al.* 1993).

### 3.2.3 - atteinte de l'intégrité génomique des cellules germinales

Chez les hommes survivants de cancer diagnostiqué avant la puberté, l'impact des chimiothérapies sur l'intégrité de la chromatine des futurs spermatozoïdes est encore peu documenté. Alors que plusieurs études s'intéressent aux paramètres du spermogramme pour déterminer la fertilité des hommes survivants de cancers pédiatriques, seulement deux études à ma connaissance ont mesuré la qualité de la chromatine des spermatozoïdes (Thomson *et al.* 2002, Romerius *et al.* 2010). Des techniques de TUNEL ou SCSA ont été utilisées pour comparer l'intégrité de la chromatine entre le groupe témoin et les hommes survivants de cancers pédiatriques traités avec des chimiothérapies, combinées ou non avec de la radiothérapie. Dans l'étude de Thomson *et al.*, l'intégrité de la chromatine mesurée par test de TUNEL dans les spermatozoïdes de 23 hommes survivants n'est pas significativement différente de celle du groupe témoin (Thomson *et al.* 2002). Dans la cohorte de 99 survivants de l'étude de Romerius *et al.*, l'augmentation d'anomalies de la chromatine, mesurée par SCSA, est à la limite d'être significative ( $p=0,051$ ) (Romerius *et al.* 2010), suggérant que le pouvoir statistique de ces études n'est pas suffisant pour détecter des différences avec le groupe témoin. Le risque de mutations *de novo*, d'anomalies chromosomiques ou de développement de cancer chez les enfants d'hommes survivants de cancer pédiatrique ne semble pas plus élevé que dans la population générale, après correction des facteurs d'hérédité familiale (Hawkins *et al.* 1995, Byrne *et al.* 1998, Winther *et al.* 2004, Kryukov *et al.* 2016), suggérant qu'il n'y a pas de transmission d'anomalie génétique. Cependant, le risque d'effet intergénérationnel des chimiothérapies reste encore incertain puisqu'une récente étude a démontré la modification du profil de méthylation de certaine région de l'ADN des spermatozoïdes de survivants de cancer pédiatrique (Shnorhavorian *et al.* 2017).

### 3.2.4 - Sensibilité du testicule pré-pubère

Dans la plupart des études, les cancers pédiatriques se définissent comme des cancers diagnostiqués avant l'âge de 18 ans ou de 21 ans pour les États-Unis. La définition se base donc sur l'âge légal plutôt que sur l'âge biologique. Les garçons survivants de cancer diagnostiqué avant la puberté, particulièrement après un diagnostic de leucémie, acquièrent une concentration circulante moyenne de testostérone dans les normes, et développent les caractères sexuels secondaires attendus pendant la puberté (Wallace *et al.* 1991). De ce fait, l'impact d'un historique de cancers avant la puberté a longtemps été minimisé. Il a été spéculé que chez ces patients l'absence de spermatogenèse complète pendant le traitement les

protégeait des effets secondaires des chimiothérapies. En effet, dans l'étude de Green *et al.*, les survivants de cancers diagnostiqués avant l'âge de 4 ans ont plus de facilité à avoir des enfants que ceux diagnostiqués entre 15 et 20 ans (Green *et al.* 2010). Cependant, les hommes survivants de cancer diagnostiqués avant la puberté peuvent aussi souffrir d'azoospermie (Jaffe *et al.* 1988, Romerius *et al.* 2011, Poganitsch-Korhonen *et al.* 2017), suggérant que le testicule immature peut être altéré par l'historique de cancer. En effet, des biopsies testiculaires de garçons traités avec des chimiothérapies avant la puberté, incluant des agents alkylants, montrent une déplétion massive des cellules germinales (Poganitsch-Korhonen *et al.* 2017), dont des cellules positives pour les marqueurs OCT4 et CD9, deux marqueurs connus des SSC (Nurmio *et al.* 2009). Toutefois à ma connaissance, aucune étude ne différencie l'effet d'un traitement avant ou après la puberté sur l'intégrité de la chromatine du spermatozoïde.

### **3.3 - Données expérimentales**

#### **3.3.1 - modèles *in vivo***

Les effets des agents de chimiothérapies sur la fertilité masculine ont été largement étudiés sur des modèles expérimentaux pour une exposition chez l'adulte. Cependant, les études restent limitées dans le cas d'une exposition prépubère. Les effets secondaires varient en fonction du mécanisme d'action de l'agent de chimiothérapie administré, et en fonction de la dose reçue (Meistrich *et al.* 1982, Hou *et al.* 2005, Zohni *et al.* 2012b)

Le cyclophosphamide est l'un des agents alkylants les plus étudiés (Chabner & Roberts Jr 2005). Son action dose dépendante peut entraîner l'ablation des spermatogonies différenciées. En effet, 1,05 g/kg de cyclophosphamide en dose cumulée (7 injections sur 24 jours) chez la souris induit la déplétion d'environ la moitié de la réserve de spermatogonie différenciée (Drumond *et al.* 2011). Plus de 7 semaines après l'arrêt du traitement, un rétablissement partiel de la spermatogenèse est cependant mesuré, démontrant la survie de SSC quiescentes (Drumond *et al.* 2011). Dans les stades plus différenciés de la spermatogenèse, des perturbations de l'expression génique sont mesurées chez le rat (Aguilar-Mahecha *et al.* 2002, Codrington *et al.* 2007), ainsi qu'une altération de l'intégrité de la chromatine dans les spermatozoïdes (Aguilar-Mahecha *et al.* 2002, Codrington *et al.* 2007). Une étude pionnière chez le rat a démontré qu'un traitement de 30-92 mg/kg de cyclophosphamide était associé à une augmentation significative des pertes embryonnaires et des anomalies congénitales dans la descendance (Trasler *et al.* 1985). En effet, chez les rongeurs les traitements composés d'agents alkylants peuvent être responsables

de mutations génétiques et de modifications du profil de méthylation de l'ADN dans les spermatozoïdes (Glen & Dubrova 2012, Klaver *et al.* 2015), pouvant être à l'origine de défaut embryonnaire (Barton *et al.* 2005).

Parmi les chimiothérapies comportant un agent alkylant, un traitement de 9 semaines au BEP (bléomycine, étoposide, cisplatine) chez des rats adultes, à des doses et intervalles de temps équivalents au traitement chez l'homme (1X), altère la spermatogenèse (Bieber *et al.* 2006). Une diminution du nombre de SSC est mesurée, ainsi que l'altération du compte, de la motilité, et de la morphologie des spermatozoïdes (Bieber *et al.* 2006, Marcon *et al.* 2011), et une augmentation des cassures de l'ADN dans les spermatozoïdes, mesurée par des tests de TUNEL et de COMET (Delbes *et al.* 2007). Ces cassures pourraient, en partie, être expliquées par l'absence d'activation de gènes de réparation de l'ADN dans les spermatides rondes (Delbes *et al.* 2009). De plus, le profil de méthylation est altéré sur 42 loci dans les spermatides rondes et sur 101 loci dans les spermatozoïdes (Chan *et al.* 2012). De plus, le traitement étant étendu sur neuf semaines, correspondant à plus d'un cycle de spermatogenèse chez le rat, les altérations mesurées dans les spermatozoïdes peuvent être la conséquence d'altération des SSC. En effet, le nombre de SSC est rétabli après rémission, les cassures de l'ADN ne persistent pas dans les spermatozoïdes (Marcon *et al.* 2011, Maselli *et al.* 2012, Maselli *et al.* 2013), mais la compaction de la chromatine des spermatozoïdes est toujours altérée (Maselli *et al.* 2013). La modification de l'expression de gènes impliqués dans le remodelage de la chromatine dans les spermatides allongées pourrait expliquer ce défaut de maturation des spermatozoïdes (Maselli *et al.* 2013). Ces résultats sont en accord avec les études chez l'homme, où un défaut de compaction de la chromatine, sans affecter l'intégrité globale, est mesuré par SCSA *via* les paramètres HDS et DFI respectivement (O'Flaherty *et al.* 2012).

La persistance d'altération des spermatozoïdes après arrêt du traitement de chimiothérapie a également été mesurée chez le rat après un traitement CHOP, utilisé contre les lymphomes. Le traitement de quatre cycles de trois semaines, à des doses équivalentes à celles de l'homme, diminue le compte spermatique et altère la chromatine des spermatozoïdes, mesurée par SCSA (Vaisheva *et al.* 2007). Le compte spermatique se rétablit neuf semaines après l'arrêt du traitement, mais des dommages à l'ADN sont toujours mesurés par test de COMET et sont accompagnés de pertes embryonnaires (Delbes *et al.* 2010b). L'induction de cassures de l'ADN au moment du traitement, et leur persistance trois mois au-delà de l'arrêt du traitement sont en accord avec l'étude d'O'Flaherty réalisée sur une cohorte d'hommes survivants de lymphomes de Hodgkin diagnostiqués à l'âge adulte (O'Flaherty *et al.* 2010).

Les SSC sont des cibles potentielles des chimiothérapies, et il a été démontré que les chances d'avoir une spermatogenèse complète après rémission chez les survivants de cancer, dépend de la proportion de SSC atteinte par les agents de chimiothérapie (Zohni *et al.* 2012b). Dans les études décrites ci-dessus, la cinétique de traitement suggère, sans le démontrer, une atteinte des SSC. Cependant, cette idée est supportée par l'effet de traitements prépubères, permettant une exposition ciblée des spermatogonies et des SSC, induisant à l'âge adulte la production de spermatozoïdes altérés (tableau 5) (Vendramini *et al.* 2012, Cabral *et al.* 2014, Cabral *et al.* 2018).

Les agents non alkylants ne sont pas sans risque pour la fertilité. La doxorubicine a été décrite comme un risque modéré pour la fertilité masculine puisqu'elle induirait seulement une azoospermie temporaire (Howell & Shalet 2005, Wallace *et al.* 2005, Meistrich 2009). Chez le rat prépubère, une injection intrapéritonéale d'une faible dose de doxorubicine (3 mg/kg) induit, 2 à 3 jours après le traitement, une forte déplétion en spermatogonie incluant les SSC (Bechter *et al.* 1987, Hou *et al.* 2005). À long terme, plus de 4 mois après le traitement, les effets de la doxorubicine se traduisent par une oligozoospermie sévère (Bechter *et al.* 1987). Une dose équivalente à un cycle de chimiothérapie chez les enfants (5 mg/kg), administrée chez des rats de 30 jours, induit également à long terme une altération de la spermatogenèse par réduction du nombre de spermatogonies (Vendramini *et al.* 2010). Des altérations du compte, de la motilité, et de la morphologie des spermatozoïdes sont également démontrées, ainsi que des cassures dans l'ADN et une perte de l'intégrité de la chromatine dans les spermatozoïdes, mesurés par test de COMET et de SCSA respectivement (Vendramini *et al.* 2010, Cabral *et al.* 2014, Cabral *et al.* 2018). Le stade de SSC jusqu'au stade de spermatocytes primaires sont ciblée lors d'une exposition prépubère (Clermont & Perey 1957, Chemes 2001), et chez l'adulte, un délai supérieur à un cycle de spermatogenèse permet de mesurer, entre autres, dans les spermatozoïdes des altérations des SSC (Clermont 1972). Ainsi, les altérations mesurées jusqu'à 70 jours après le traitement à la doxorubicine supportent l'hypothèse que des altérations des SSC pourraient être à l'origine de la perte de l'intégrité des spermatozoïdes. De plus, une diminution du taux d'implantation et une augmentation des pertes pré- et post-implantatoires s'associent à une diminution du nombre de ratons par portée lorsque le mâle a été traité avec de la doxorubicine avant la puberté (Vendramini *et al.* 2010, Vendramini *et al.* 2012, Cabral *et al.* 2018). Ainsi, l'ensemble des effets observés *in vivo* sur les modèles animaux suggèrent que les traitements de chimiothérapie pourraient participer à la dérégulation de la production de spermatozoïdes en ciblant préférentiellement la population souche des spermatogonies, et ainsi pourraient augmenter le risque d'infertilité des survivants de cancer pédiatrique.

**Tableau 5 : Effets d'un traitement prépubère à la doxorubicine sur les cellules germinales et sur la fertilité des rats.**

Dose (mg/kg)	Âge au traitement	Âge au sacrifice	Effets significatifs de la doxorubicine	Référence
3	J6	J9	Forte déplétion en spermatogonie. Déplétion partielle des SSC	(Bechter <i>et al.</i> 1987)
		J80	4/10 rats morts dûs à la cardiotoxicité, dont 3 rats stériles. Diminution du poids du corps, des testicules, et de l'épididyme. Présence uniquement de quelques spermatogonies. Cellules de Sertoli atrophiées.	
		J129	Présence de quelques spermatides. Oligozoospermie sévère. Cellules de Leydig hyperplasiques	
3	J6	J8	Apoptose des cellules germinales (TUNEL)	(Hou <i>et al.</i> 2005)
5	J30	J60	Réduction du nombre de spermatogonies	(Vendramini <i>et al.</i> 2010)
		J90	Réduction du nombre de spermatogonies et de spermatides. Diminution du compte et de la motilité des spermatozoïdes. Altération de la morphologie des spermatozoïdes Diminution du nombre de ratons par portée	
5	J30	J94	Augmentation des cassures de l'ADN des spermatozoïdes (COMET). Altération de la chromatine des spermatozoïdes (SCSA). Augmentation des pertes pré- et post-implantatoire.	(Vendramini <i>et al.</i> 2012)
5	J30	J64	Diminution du volume testiculaire et du volume des tubes séminifères. Présence uniquement de spermatogonies. Augmentation de l'apoptose (TUNEL)	(Cabral <i>et al.</i> 2014)
		J100	Augmentation de l'apoptose (TUNEL). Altération de la morphologie des spermatozoïdes. Augmentation des cassures de l'ADN des spermatozoïdes (COMET) Diminution du compte spermatique dans l'épididyme.	
5	J30	J100	Diminution du compte, de la motilité des spermatozoïdes. Diminution de l'activité mitochondriale des spermatozoïdes ( <i>sperm mitochondrial activity</i> ). Altération de l'intégrité de l'acrosome, et de la chromatine des spermatozoïdes (SCSA). Diminution du taux d'implantation. Augmentation des pertes post-implantatoire. Diminution du nombre de ratons par portée	(Cabral <i>et al.</i> 2018)

### 3.3.2 - modèles *in vitro*

Les évidences épidémiologiques et les études *in vivo* mettent en avant que les cellules germinales sont la cible des agents de chimiothérapie, indépendamment de l'âge au traitement (Bechter *et al.* 1987, Hou *et al.* 2005, Green *et al.* 2010, Wasilewski-Masker *et al.* 2014). L'absence de spermatogenèse suite à une exposition à un agent de chimiothérapie démontre une déplétion des SSC dans les tubes séminifères (Zohni *et al.* 2012b). De plus, l'ensemble des dommages observés à long terme sur les cellules germinales suggère que l'atteinte des SSC par les agents de chimiothérapies serait responsable de la transmission d'altération génétique (Vendramini *et al.* 2012, Cabral *et al.* 2018). Toutefois, il est important de noter que la perte d'intégrité à long terme des spermatozoïdes pourrait être due à l'altération de cellules somatiques, comme les cellules de Sertoli (Kato *et al.* 2001, Brillhante *et al.* 2012).

Trois études *in vitro*, réalisées sur une lignée murine de spermatogonie A ou sur des cultures primaires de spermatogonie de rongeur, confirment l'induction de cassures de l'ADN par l'action individuelle de la bléomycine, l'étoposide, le cisplatine, le cyclophosphamide, et la doxorubicine (Marcon *et al.* 2010, Liu *et al.* 2014, Habas *et al.* 2016). Les deux agents alkylants, le cisplatine et le cyclophosphamide, induisent une réduction de la longueur des télomères des spermatogonies, qui pourrait être un facteur contribuant à l'infertilité (Liu *et al.* 2014). A ma connaissance, une seule étude *in vitro* a analysé les effets d'agent de chimiothérapie spécifiquement sur les SSC (Marcon *et al.* 2010). Dans cette étude, un modèle de rat, exprimant spécifiquement la GFP dans les cellules germinales (Cronkhite *et al.* 2005), a permis la culture primaire de SSC, et ainsi démontrer la cytotoxicité directe du traitement BEP (Marcon *et al.* 2010). De plus, des cassures de l'ADN, mesurées par marquage de  $\gamma$ H2AX, sont induites de façon dose dépendante par le cisplatine (Marcon *et al.* 2010). Toutefois, il serait intéressant de suivre l'évolution de ces dommages après arrêt du traitement, afin de déterminer leur disparition ou leur persistance à long terme dans les SSC.

Des études *in vitro* supplémentaires sont donc nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes d'action des chimiothérapies et déterminer leur impact à long terme sur les SSC. Ainsi, déterminer les mécanismes d'action des agents de chimiothérapies contre les SSC, pourrait permettre de prédire et prévenir les risques d'effets secondaires sur la fertilité, comme l'azoospermie ou la persistance d'anomalie de l'ADN et de la chromatine dans les spermatozoïdes, chez les hommes survivants de cancer pédiatrique.

### 3.4 - Préservation de la fertilité après un cancer

Dans le cas des cancers diagnostiqués chez l'adulte des protocoles de sauvegarde de la fertilité visent à congeler les spermatozoïdes des hommes avant leur traitement anti-cancéreux (Hallak *et al.* 1999). Or dans le cas de cancers diagnostiqués avant la puberté, le testicule immature ne produit pas de spermatozoïdes ; seuls les spermatogonies et quelques spermatocytes sont présents (Chemes 2001). Par conséquent, aucun protocole effectif standard de préservation de la fertilité n'est actuellement proposé à ces jeunes patients. Seuls des cryoconservations de biopsies de testicules sont réalisées. Cependant, cette approche reste expérimentale, car beaucoup de problématiques restent à être élucidées (Struijk *et al.* 2013, Pietzak *et al.* 2015).

#### 3.4.1 - cryopréservation de sperme

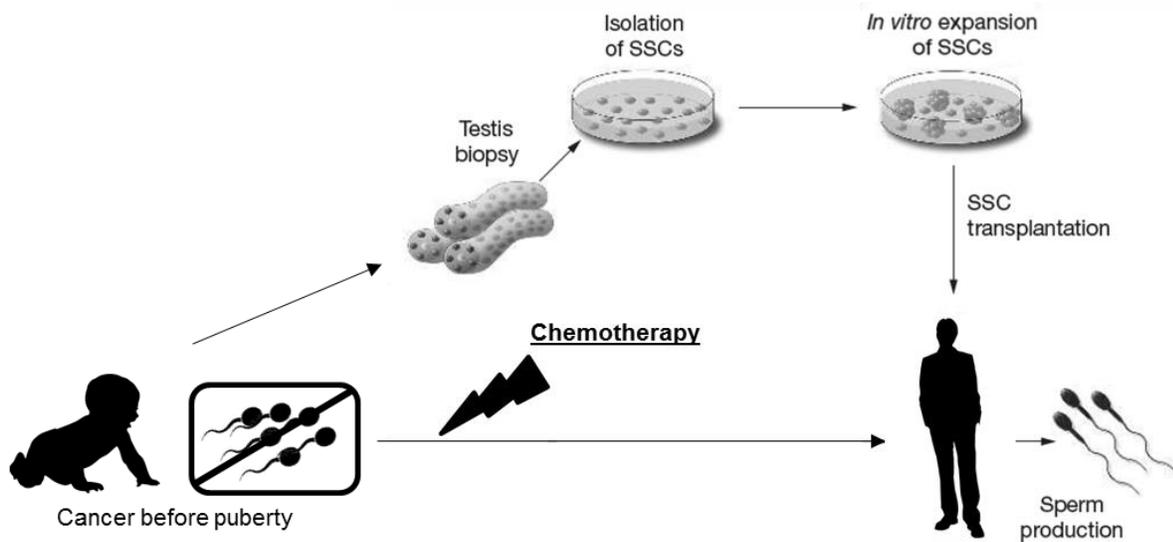
Les protocoles actuels de sauvegarde de la fertilité en milieu clinique visent à pallier l'impact des traitements de chimiothérapies. La technique de cryopréservation de sperme utilisée en amont des traitements de chimiothérapies permet de prévenir les effets secondaires des agents anti-cancéreux sur les cellules germinales (Bunge & Sherman 1953, Hallak *et al.* 1999). Cette technique permet le prélèvement rapide et non invasif (effectué par auto-masturbation) des spermatozoïdes. Toutefois, lorsque le patient est un jeune adolescent, les médecins doivent aborder la question de la fertilité et de la pratique de masturbation, rapidement après l'annonce du diagnostic du cancer. Un sujet délicat à discuter en présence des parents, mais pourtant aucune recommandation sur la meilleure approche n'est proposée au corps médical (Achille *et al.* 2006, Williams 2010, Hayden & Kashanian 2017). De plus par manque d'information, une trop grande proportion d'oncologue n'adresse pas en consultation d'oncofertilité les jeunes hommes, ou ne les informe pas suffisamment avant le début des traitements (Schover *et al.* 2002a, Anderson *et al.* 2008). Pour les jeunes adolescents ou adultes dans l'incapacité de fournir un échantillon de sperme par masturbation, une électrostimulation sous anesthésie ou une chirurgie pour récolter les spermatozoïdes épидидymaires peuvent être discutées (Achille *et al.* 2006).

Lorsque le traitement anti-cancéreux ne provoque pas de stérilité (azoospermie non obstructive), un débat persiste sur l'utilisation de semences cryopréservées avant le traitement contre l'utilisation de semence fraîche (Vakalopoulos *et al.* 2015). En effet, quelques années après l'arrêt du traitement, l'intégrité des spermatozoïdes peut être meilleure qu'avant le traitement dû à l'impact de la maladie (Paoli *et al.* 2016). De plus, la cryopréservation de semence peut induire un stress oxydatif dans les

spermatozoïdes et causer des dommages à l'ADN (Thomson *et al.* 2009). Des spermogrammes et analyses de l'intégrité de l'ADN et de la chromatine des spermatozoïdes devraient être recommandés avant et après la cryopréservation de spermatozoïdes.

### 3.4.2 - biopsie testiculaire

Des solutions de sauvegarde de la fertilité chez les garçons diagnostiqués avant la puberté doivent être proposées pour prévenir l'altération de leur fertilité par les chimiothérapies. Bien que la cryoconservation de spermatozoïdes ne soit pas réalisable chez ces jeunes patients, une stratégie prometteuse vise à utiliser les SSC présentes dans le testicule immature pour rétablir la spermatogenèse à l'âge adulte. A cette fin, une cryopréservation de biopsies testiculaires est proposée dans certains établissements hospitaliers, mais l'issue de cette pratique reste à l'heure actuelle à l'état expérimental (Struijk *et al.* 2013). Le but serait de pouvoir isoler les SSC à partir des biopsies cryopréservées, de les amplifier *in vitro*, pour ensuite les transplanter dans le testicule du patient en rémission devenu adulte et ayant un projet familial (figure 14) (Kubota & Brinster 2006). Les SSC remontent à contre sens les tubes séminifères, passe la BHT et colonisent la niche testiculaire (Takashima *et al.* 2011). Les SSC du testicule, qui atteignent la membrane basale des tubes séminifères, restaurent la fertilité dans un délai d'un mois chez la souris (Nagano 2003).



**Figure 14 : Stratégie expérimentale de sauvegarde de la fertilité avant les traitements anti-cancéreux chez les garçons prépubères**

Adapté de (Kubota & Brinster 2006)

Les premières transplantations décrites furent une injection allogénique de cellules germinales de souris juvéniles (Brinster & Avarbock 1994, Brinster & Zimmermann 1994) et une injection xénogénique de cellules germinales de rat adulte (Clouthier *et al.* 1996), dans le testicule d'une souris receveuse. Ces transplantations ont toutes débouché sur la production de spermatozoïdes matures (Brinster & Avarbock 1994, Brinster & Zimmermann 1994, Clouthier *et al.* 1996). La technique de transplantation allogénique fut par la suite optimisée chez les porcins et les primates, et sur des testicules disséqués de bovins et d'humain (Schlatt *et al.* 1999, Dobrinski *et al.* 2000, Honaramooz *et al.* 2002, Shinohara *et al.* 2002, Hermann *et al.* 2012). La transplantation allo- ou xénogénique de cellules germinales de souris ou de lapin dans une souris receveuse a permis la production de spermatozoïdes et, après microinjection dans un ovocyte, de descendance (Shinohara *et al.* 2002).

Cependant, chaque étape de cette stratégie a été ou représente encore un défi technique. Le site d'injection des cellules germinales peut influencer le rendement de colonisation, en altérant le nombre de tubes séminifères exposé à la solution de cellules du donneur (Schlatt *et al.* 1999). Dans des testicules disséqués de primates ou d'humain, une injection dans le rete testis aurait le meilleur rendement qu'une injection dans les tubes séminifères ou dans le canal efférent (Schlatt *et al.* 1999). De plus, une étude cinétique de colonisation des cellules germinales murines a déterminé que seulement 12% des SSC injectées investiront la niche testiculaire (Nagano 2003). L'optimisation du nombre de SSC injectées et donc l'optimisation de la prolifération des SSC *in vitro* pour augmenter leur nombre, sont des étapes nécessaires afin d'être capable de rétablir la spermatogenèse dans le testicule receveur. À partir de biopsies cryoconservées de testicule prépubère humain, l'isolement et la prolifération *in vitro* de cellules germinales ont été réalisés avec succès en laboratoire (Sadri-Ardekani *et al.* 2011, Sadri-Ardekani & Atala 2014). La propriété souche de ces cellules germinales a ensuite été vérifiée par xénotransplantation dans un testicule de souris.

Un des plus grands défis à relever encore aujourd'hui, est l'élimination, sans exception, de toutes cellules cancéreuses qui pourraient se trouver dans la solution à transplanter. En effet, dans le cas de leucémie ou lymphome, les cellules cancéreuses peuvent se retrouver dans la circulation sanguine testiculaire (Akhtar *et al.* 1991). Il est indispensable de purifier la suspension cellulaire transplantée de toute contamination pouvant entraîner une récurrence du cancer. Une étude injectant 2, 20, 200 ou 6000 lymphoblastes leucémiques mélangés à une solution de cellules germinales saines, a démontré que l'injection de seulement 20 cellules cancéreuses était suffisante pour induire une tumeur dans les testicules des rats receveurs (Jahnukainen *et al.* 2001). L'autogreffe intratesticulaire de tissu testiculaire cryoconservé, une

autre méthode de préservation de la fertilité, est donc à exclure chez les survivants de cancer (Goossens & Tournaye 2013). Des techniques de purification des SSC ont été optimisées pour extraire les cellules cancéreuses chez les rongeurs, les primates, et chez l'homme en allogreffe (Fujita *et al.* 2005, Geens *et al.* 2007, Geens *et al.* 2011, Hermann *et al.* 2011, Dovey *et al.* 2013). Bien que les résultats soient contradictoires, il semblerait que les cellules de leucémie lymphoblastique aiguë ne survivent pas au-delà d'un mois aux conditions de culture *in vitro*, optimisés pour l'expansion des SSC (Sadri-Ardekani *et al.* 2014). Toutefois, avant de pouvoir tester en clinique la technique de transplantation, il est impératif de développer une stratégie fiable d'extraction des cellules cancéreuses. Le succès de cette technique chez l'homme reste d'autant plus lointain, que chaque type de cancer possède ses propres marqueurs.

La contamination de cellules cancéreuses pourrait être évitée par production de spermatozoïde *in vitro* (Oblette *et al.* 2017). Le spermatocyte ou spermatozoïde généré *in vitro* serait injecté directement dans un ovocyte (ICSI ; injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde) (Rives *et al.* 2012). Cependant, la culture à partir de biopsie chez l'homme comme chez les enfants prépubères est au stade d'optimisation (Sadri-Ardekani *et al.* 2011, Gat *et al.* 2017). Une étude de Perrard *et al.* a réussi à induire des cellules haploïdes après 1 mois de culture *in vitro* de biopsie testiculaire d'homme adulte (Perrard *et al.* 2016). Cette avancée importante pour le domaine nécessite de vérifier l'intégrité et la capacité de ces cellules haploïdes à former une descendance en santé.

De nombreux oncologues ne proposent pas la cryoconservation de biopsie testiculaire, soit par manque de connaissance sur ce sujet interdisciplinaire, soit à cause de l'avenir incertain de cette alternative (Chan 2009). A cela s'ajoute les complications possibles suite à la chirurgie, et à l'urgence de commencer le traitement de chimiothérapies (Hohmann *et al.* 2011).

### **3.4.3 - co-traitement avec des anti-oxydants**

Certaines études visent à contrer *in situ* les effets secondaires d'agent de chimiothérapies sur la fertilité masculine. Par exemple, dans l'idée que la doxorubicine peut induire du stress oxydatif, des molécules anti-oxydantes ont été testées chez le rat en complément du traitement à la doxorubicine. Ainsi, un prétraitement avec l'amifostine a démontré réduire la déplétion en cellules germinales par la doxorubicine, comme observée sur des coupes histologiques (Vendramini *et al.* 2010), et améliore le compte et la motilité des spermatozoïdes. Toutefois, le prétraitement à l'amifostine amplifie les effets de la doxorubicine en augmentant les cassures de l'ADN et l'altération de la chromatine des spermatozoïdes,

mesurées par test de COMET et SCSA respectivement, et en augmentant le taux de perte embryonnaire préimplantatoire (Vendramini *et al.* 2012).

Le prétraitement à la carnitine a également permis de réduire la déplétion en cellules germinales par la doxorubicine, comme observée sur des coupes histologiques, et le compte spermatique est également préservé (Cabral *et al.* 2014). Bien que la motilité progressive des spermatozoïdes soit préservée de l'action de la doxorubicine, la carnitine ne permet pas la protection de l'activité mitochondriale des spermatozoïdes (Cabral *et al.* 2018). Toutefois, l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes, le taux d'implantation des embryons, et le nombre de fœtus par portée sont préservés par le prétraitement à la carnitine (Cabral *et al.* 2018).

Ces méthodes de protection *in situ* restent toutefois encore expérimentales, et l'impact d'un prétraitement aux agents de chimiothérapie reste à être analysé sur la santé de la descendance.

#### **3.4.4 - autres protocoles de préservation**

Après rémission du cancer, les hommes survivants de cancer non azoospermiques peuvent présenter des troubles de la fertilité (Wasilewski-Masker *et al.* 2014). Ainsi, dans l'hypothèse que des dommages à l'ADN soient responsables de l'infertilité, des études visent à développer des techniques de purification de spermatozoïdes intègre. Le tri cellulaire magnétique (MACS) des spermatozoïdes apoptotiques, via une sélection négative du marqueur annexine V, permettrait de prévenir l'utilisation en ART de spermatozoïdes avec des dommages à l'ADN (Delbes *et al.* 2013).

Dans le cas d'un diagnostic d'azoospermie après rémission du cancer, des SSC de petites tailles et de type embryonnaire, retrouvées dans les biopsies testiculaires, pourraient également être dérivées afin de reprogrammer la spermatogenèse (Kurkure *et al.* 2015). Cette approche reste toutefois expérimentale.

L'ensemble de ces défis pour préserver la fertilité des survivants de cancers pédiatriques nous incite à mieux comprendre les effets des agents de chimiothérapies sur les cellules germinales, et en particulier sur les SSC. Les travaux de la présente thèse visent à comprendre l'impact d'agents de chimiothérapies sur les cellules germinales, et déterminer les capacités de réponse des spermatogonies face à ces agents. Plus précisément, nous avons étudié les dommages à l'ADN induits par les agents de chimiothérapies, et dans le chapitre 2 et 3, l'activation de gènes de réparation de l'ADN dans des modèles de spermatogonies souches.

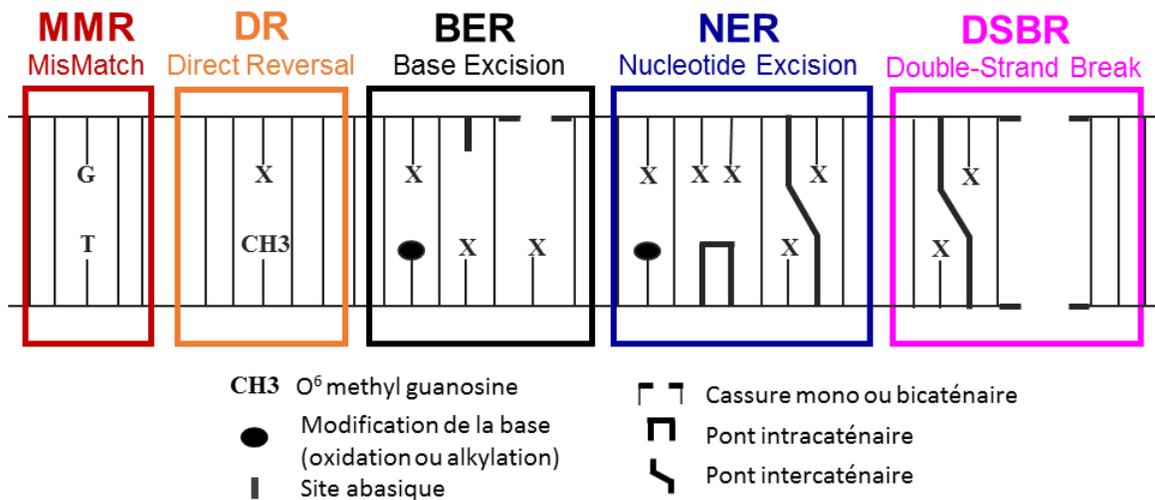
## 4 - LA RÉPARATION DE L'ADN

L'homme produit chaque jour des millions de spermatozoïdes (Cooper *et al.* 2010). Cette production intensive nécessite l'intervention de mécanismes ordonnés et régulés pour assurer le maintien de l'intégrité génétique des cellules germinales. Ainsi, des dommages non réparés dans l'ADN des cellules germinales peuvent promouvoir l'infertilité masculine, des fausses couches, ou des anomalies génétiques dans la descendance (Evenson *et al.* 1980, Morris *et al.* 2002, Bungum *et al.* 2007, Tempest *et al.* 2008, Stahl *et al.* 2011, Oleszczuk *et al.* 2016, Martinez *et al.* 2017). L'altération de l'intégrité des spermatozoïdes pourrait subvenir selon deux mécanismes : perturbation de la distribution des chromosomes dans les spermatozoïdes (aneuploïdie) (Rubio *et al.* 2001) ou l'induction de mutation *de novo* (Ji *et al.* 1997, Saleh *et al.* 2002, Gregoire *et al.* 2013). A chaque stade de la spermatogenèse des anomalies peuvent survenir et persister jusqu'au stade du spermatozoïde mature ; lors de la mitose dans les spermatogonies, lors de la recombinaison méiotique dans les spermatocytes, lors de la ségrégation des chromosomes dans les spermatogonies, les spermatocytes primaires et les spermatocytes secondaires, et enfin lors de la compaction de l'ADN dans les spermatides (Baarends *et al.* 2001, Gregoire *et al.* 2013). Dans le cas particulier de la méiose, des réarrangements chromosomiques se produisent inévitablement. La recombinaison du matériel génétique est indispensable au brassage génétique, mais devient source de mutation et de cassures de l'ADN. Les mécanismes de réparation jouent alors un rôle important dans la balance de l'évolution de l'espèce et la préservation de l'intégrité du code génétique (Baarends *et al.* 2001). Dans le cas particulier de la spermiogenèse, un nombre important de cassures de l'ADN permettent le remodelage de la chromatine dans les spermatides allongées (Laberge & Boissonneault 2005). Des activités de réparation de l'ADN ont été mesurées dans les spermatides, et permettraient le maintien de l'intégrité du génome (Laberge & Boissonneault 2005, Leduc *et al.* 2008). Toutefois à ma connaissance, aucun mécanisme de réparation de l'ADN n'a à ce jour été décrit dans les spermatozoïdes (Sotomayor & Segal 2000, Jaroudi & SenGupta 2007). A ces mécanismes propres à la spermatogenèse s'ajoute les agressions exogènes comme les traitements de chimiothérapies, décrits précédemment, pouvant induire des cassures de l'ADN et autres dommages à la chromatine.

#### 4.1 - Les principales voies de réparation dans les cellules germinales

Dans chaque cellule en réplication, une erreur est commise à chaque  $10^7$  nucléotides insérés. Ces erreurs sont en majorité corrigées par des systèmes de réparation (Baarends *et al.* 2001). Chez l'homme, plus de 130 gènes sont impliqués dans la réparation de l'ADN (Wood *et al.* 2001). Lorsqu'une altération de l'ADN est induite, le cycle cellulaire s'arrête pour laisser le temps au système de réparation d'intervenir. Les acteurs du cycle cellulaire jouent donc un rôle important dans le recrutement d'agents de la réparation de l'ADN, et la réussite du processus de réparation des dommages à l'ADN. En cas de dommage trop important, les acteurs pro-apoptotiques tels que p53 et Bax seront activés aux dépens des inhibiteurs de l'apoptose comme Bcl2 (Miyashita *et al.* 1994). Par conséquent, il existe un équilibre étroit entre les mécanismes de contrôle du cycle cellulaire, de la réparation de l'ADN, et de l'apoptose. La distinction de ces mécanismes intriqués peut s'avérer d'autant plus complexe dans les cellules germinales, que la balance entre l'activation des systèmes de réparation et les mécanismes d'apoptose varient en fonction du stade de maturation des cellules germinales (Paul *et al.* 2008, Forand & Bernardino-Sgherri 2009).

Les voies de réparation s'activent de façon spécifique selon la nature du dommage à l'ADN (figure 15). L'ensemble de ces voies implique des réseaux complexes de plus d'une dizaine de protéines.

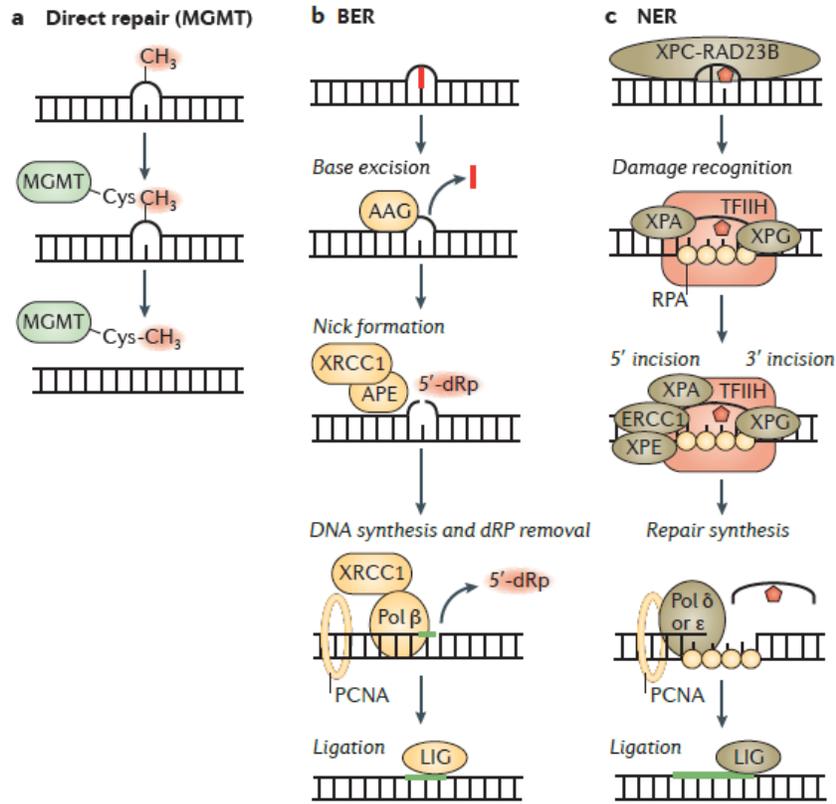


**Figure 15 : Voies de réparation de l'ADN associées aux principales anomalies pouvant être retrouvées dans l'ADN**  
Adapté de (Baarends *et al.* 2001)

La voie MMR (*Mismatch repair*) corrige les mésappariements de base (figure 15). Cette voie comporte chez l'homme et la souris de nombreuses protéines (MSH1-6, MLH1, MLH3, PMS1, PMS2) nommées après leurs homologues chez les procaryotes (Baarends *et al.* 2001). Deux protéines MSHX formeront un complexe hétérotétramérique avec MLH1 et MLH3. Ce complexe reconnaît les erreurs d'appariement de nucléotide, et recrute des endonucléases et autres protéines afin de corriger l'erreur (Arnheim & Shibata 1997).

La voie DR (*Direct Reversal*) comprend l'action de la protéine MGMT (*O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase*). Cette protéine nucléaire permet la correction de la méthylation aberrante de la guanine en position O<sup>6</sup>. Son action non mutagène est cependant coûteuse pour la cellule, puisque MGMT agit selon une réaction stœchiométrique ; une molécule de MGMT permet le retrait d'un seul groupement méthyle (figure 16) (Tubbs *et al.* 2007).

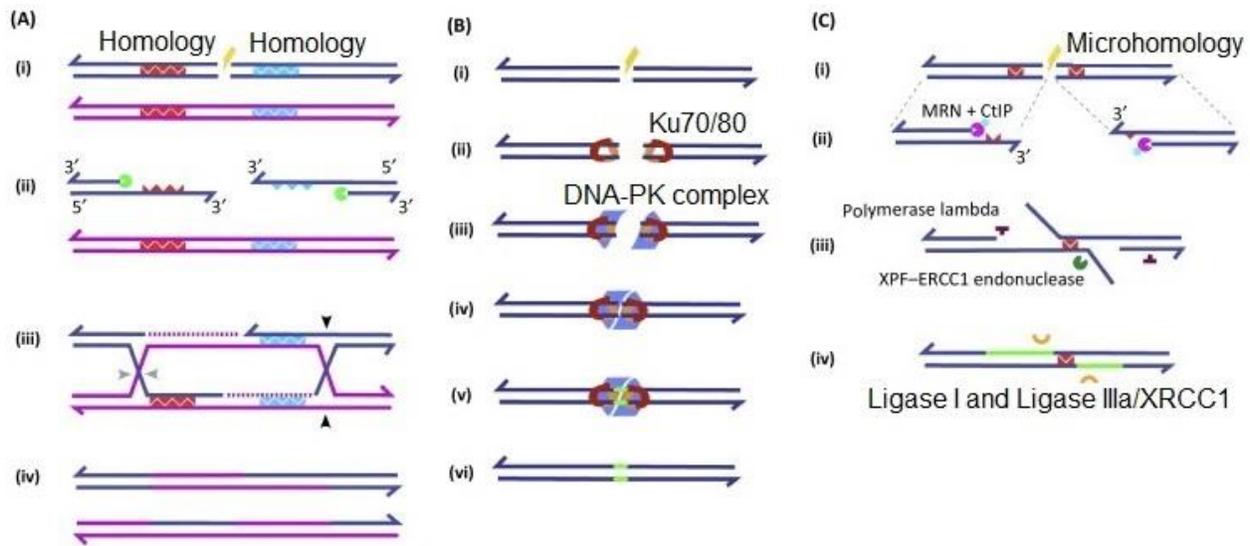
La voie BER (*Base excision repair*) retire les petits groupements alkyles et les bases oxydées de l'ADN. La voie NER (*Nucleotide excision repair*) retire entre autres les ajouts volumineux à l'ADN, certains groupements alkyles, et les distorsions d'hélice d'ADN (figure 15). La voie NER possède à elle seule plus de 25 protéines organisées selon trois voies de signalisation (Ozturk & Demir 2011). Les voies BER et NER opèrent selon les mêmes étapes, mais font intervenir des acteurs différents (figure 16). Le processus de réparation débute par la reconnaissance du site de dommage à l'ADN. Dans la voie BER, le recrutement de XRCC1 au site du dommage n'a pas un but enzymatique, mais est une étape clé dans le recrutement de complexe protéique nécessaire à l'enchaînement des étapes de réparation. Une incision est faite autour de la lésion, puis la brèche est comblée par synthèse à l'aide de la complémentarité de l'autre brin d'ADN. Ces voies impliquant la formation de cassure monocaténaire dans le processus de réparation, les deux extrémités sont rejointes par ligation (figure 16) (Huber *et al.* 2004, Fu *et al.* 2012).



**Figure 16 : Mécanisme de réparation de dommages à l'ADN par les voies DR (*Direct reversal*), BER (*Base excision repair*), et NER (*Nucleotide excision repair*)**

Adapté de (Fu *et al.* 2012). (a) O6-méthylguanine DNA méthyltransférase (MGMT) catalyse le transfert du groupement méthyle aberrant sur la cystéine de son site actif (b) La voie BER débute avec le recrutement d'une glycosylase, telle que l'*alkyladenine-DNA glycosylase* (AAG), qui retire le dommage, entraînant la formation d'un site abasique. Le recrutement immédiat de XRCC1 permet l'assemblage d'un complexe protéique, dont *apurinic-apyrimidinic endonuclease* (APE) excise autour du site abasique. La polymérase β (Pol β) synthétise l'ADN à partir du brin complémentaire qui sera lié en 5'-OH par une ligase (LIG). (c) La voie NER débute par l'excision de 27 à 29 nucléotides autour de la lésion. L'ADN est resynthétisé par l'action des polymérases Pol δ ou Pol ε. TFIIH, *transcription factor IIIH*; XP, *xeroderma pigmentosum protein*.

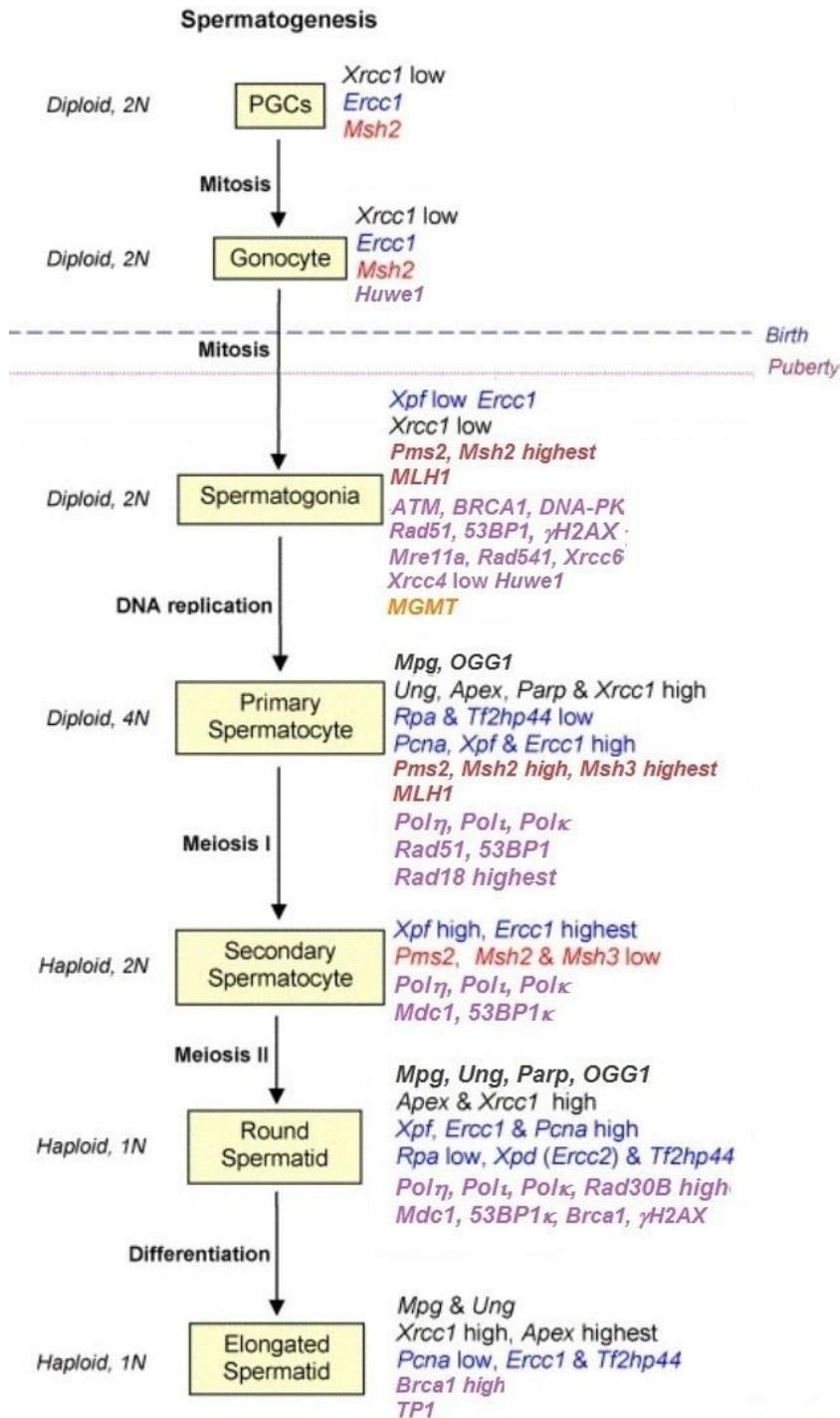
Enfin, les cassures doubles brins de l'ADN seront prises en charge par des systèmes de réparation appelés DSBR (*Double Strand Break Repair*). Les DSBR comprennent, des voies de réparation agissant par recombinaison homologue (HR ; *Homologous recombinaison*), par ligation d'extrémité chromosomique (NHEJ ; *Non-homologous end-joining*) ou d'autres voies alternatives comme la voie TLS (*Translesion synthesis*) (figure 17) (Branzei & Foiani 2008). La voie HR implique de nombreuses protéines codées par la famille de gène FANC (*Fanconi anemia complementation group*), dont la mutation conduit à une hypersensibilité de l'ADN aux agents alkylants. La voie HR utilise la complémentarité du brin d'ADN sœur pour reproduire fidèlement l'information génétique à l'emplacement de la cassure double brin (figure 17A). Nécessitant la duplication du matériel génétique, cette voie de réparation n'intervient qu'en phase S/G2 du cycle cellulaire (Rothkamm *et al.* 2003). La voie de réparation NHEJ sera active par défaut durant les autres phases du cycle cellulaire, lors d'un défaut d'activation de la voie HR, ou lorsque les cellules sont haploïdes (Audebert *et al.* 2004, Velic *et al.* 2015). La voie NHEJ peut être subdivisée en deux voies de réparation (Ottaviani *et al.* 2014). Les deux voies NHEJ utiliseraient le complexe MRN (MRE11/RAD50/NBS1) pour détecter le site de cassures et déclencher une cascade de recrutement de messager et d'acteur de la réparation de l'ADN comme la protéine ATM phosphorylant à son tour l'histone H2AX ( $\gamma$ H2AX) (Lavin 2007). La voie canonique de NHEJ ne prenant pas en compte l'homologie de séquence. Ku70/80 et le complexe DNA-PK, codé respectivement par les gènes *Xrcc6*, *Xrcc5*, et *Prkdc*, procéderont à la ligation des deux brins d'ADN sectionné, pouvant induire des insertions ou délétions de bases (figure 17B). L'implication de cette voie dans la réparation des cassures bicaténares peut conduire à la production d'une information génétique infidèle et donc à la formation de mutations (Ozturk & Demir 2011). La voie alternative de NHEJ limiterait l'induction de mutation en utilisant des séquences courtes d'homologies aux abords de la lésion bicaténaire (figure 17C) (Ottaviani *et al.* 2014). Cette voie alternative encore peu décrite impliquerait l'action de la protéine XRCC1 (Audebert *et al.* 2004, Ahmed *et al.* 2010).



**Figure 17 : Voies de réparation des cassures bicaténaire par les voies NHEJ (Non homologous end joining), HR (Homologous recombinaison), et la voie NHEJ alternative**

Adapté de (Ottaviani *et al.* 2014). (i) Induction de cassures double brin de l'ADN. (A) La voie HR: (ii) La cassure à bout franc est transformée en cassure à bout décalée par section de l'extrémité 5' à l'extrémité 3' (iii) les deux extrémités 3'-OH libre s'insèrent dans la chromatide sœur (violet), et s'apparient aux sites d'homologie. La synthèse s'effectue par des endonucléase (flèches grises et noires). (iv) Ligation. (B) La voie NHEJ: (ii) l'hétérodimère Ku70/80 lie l'extrémité libre de l'ADN. (iii) La sous-unité catalytique, la protéine kinase (PK), et l'hétérodimère Ku70/80 forment le complexe DNA-PK, (iv) permettent le rapprochement des extrémités libres, et (v) leur ligation. (vi) La voie NHEJ peut induire l'insertion ou la délétion de nucléotides (vert). (C) Modèle de voie NHEJ alternative: (ii) Les extrémités 5' et 3' sont sectionnées par le complexe Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) et *retinoblastoma binding protein 8* (CtIP), révélant des microsites d'homologie. (iii) Les deux extrémités s'apparient aux sites de microhomologie et les portions d'ADN non complémentaires sont sectionnées par le complexe d'endonuclease XPF-ERCC1. Les extrémités sont reliées par synthèse par l'ADN polymérase lambda, et (iv) par ligation par la Ligase I et IIIa, enzymes recrutées par XRCC1.

L'ensemble de ces voies de réparation a été décrite aux différents stades de la spermatogenèse (figure 18) (Jaroudi & SenGupta 2007). De mêmes acteurs de la réparation de l'ADN peuvent être présents dans des stades différents de maturation des cellules germinales, mais leur expression peut varier. Par exemple, les gènes de la voie MMR sont fortement exprimés dans les stades pré-méiotique et méiotique (c'est-à-dire dans les spermatogonies et dans les spermatocytes), mais deviennent indétectables dans les spermatides allongées (figure 18) (Jaroudi & SenGupta 2007). Le rôle essentiel de la voie MMR dans la correction des erreurs d'insertion de nucléotide pendant la réplication de l'ADN pourrait expliquer ce phénomène.



**Figure 18 : Liste non exhaustive de l'expression des gènes et des protéines acteurs de la réparation de l'ADN aux différents stades de maturation de la spermatogénèse**

Adapté de (Jaroudi & SenGupta 2007), d'après (Thompson *et al.* 2000, Kierszenbaum 2001, Olsen *et al.* 2001, Hamer *et al.* 2003, Ahmed *et al.* 2007, Paul *et al.* 2008, Forand & Bernardino-Sgherri 2009, Ahmed *et al.* 2010, Fok *et al.* 2017).  
 BER (noir) : expression tout au long de la spermatogénèse.  
 NER (bleu) : faible expression qui diminue après la méiose.  
 DSBR (violet) : expression tout au long de la spermatogénèse, qui diminue après la méiose, et devient indétectable dans les spermatozoïdes allongés.

## 4.2 - Réparation de l'ADN dans les SSC

Peu de connaissances sont acquises sur les voies possibles de réparation de l'ADN dans les SSC (tableau 6). La plupart des études s'intéressent à une population hétérogène de spermatogonie par manque d'outils pour isoler les SSC (Richardson *et al.* 2000, Intano *et al.* 2002, Hamer *et al.* 2003, Xu *et al.* 2005). Puisque les gonocytes sont à l'origine des SSC, et que les spermatogonies A dérivent des SSC, il serait pertinent de penser que ces types cellulaires partagent des systèmes de réparation de l'ADN communs à ceux des SSC. Cependant, Forand *et al.* ont montré que l'expression constitutive de trois gènes de réparation de cassures double brin de l'ADN (*Atm*, *Brca1*, et *Xrcc4*) était deux à trois fois plus élevées dans les spermatogonies A que dans les gonocytes (Forand & Bernardino-Sgherri 2009, Forand *et al.* 2009). De plus, une activation différentielle de gènes de réparation a été mesurée entre les deux types cellulaires après induction de cassures doubles brins de l'ADN par irradiation (Forand *et al.* 2009). Entre autres, le gène *Atr*, codant une protéine impliquée dans la détection des cassures monocaténaïres, est 47 fois surexprimé dans les gonocytes, alors qu'il est quatre fois moins exprimé dans les spermatogonies. Ensemble, ces résultats démontrent l'hétérogénéité des systèmes de réparation dans les gonocytes et les spermatogonies A. Il est donc important d'isoler chaque stade de maturation des cellules germinales pour étudier leur propre système de réparation de l'ADN.

**Tableau 6 : Acteur de la réparation de l'ADN mis en évidence dans les spermatogonies**

Voie	Acteur	Modèle	Technique	Commentaires	Référence
DR	MGMT	souris inhibées pour MGMT	IHC, TUNEL	Rôle suggéré dans les SSC par manque de reprise de la spermatogenèse	(Thompson <i>et al.</i> 2000)
DSBR	53BP1	souris ATM -/- irradiées	IF, IHC	Expression dans les SSC (PLZF+)	(Rube <i>et al.</i> 2011)
DSBR	ATM	souris ATM -/- irradiées	IF, IHC	Accumulation de cassure dans les SSC (PLZF+)	(Rube <i>et al.</i> 2011)
DSBR	ATM	souris ATM-/-	IF, Transplantation	Accumulation de cassure dans les SSC (PLZF+) et perte de la capacité de recolonisation des TS	(Takubo <i>et al.</i> 2008)
DSBR	ATM	souris Huwe-/- 6jpp & C18-4	IF, IHC, COMET, WB, CultureP	Expression dans les SSC	(Fok <i>et al.</i> 2017)
DSBR	BRCA1	souris Huwe-/- 6jpp & C18-4	IF, IHC, COMET, WB, cultureP	Expression dans les SSC	(Fok <i>et al.</i> 2017)
DSBR	H2AX	souris Huwe-/- 6jpp & C18-4	IF, IHC, COMET, WB, cultureP	Accumulation de $\gamma$ H2AX dans les SSC entraînant une catastrophe mitotique	(Fok <i>et al.</i> 2017)
NHEJ	DNA-PK	souris DNA-PK-/- irradiées	IF, IHC	Expression dans les SSC (PLZF+)	(Rube <i>et al.</i> 2011)
Médiation BER/HR	p53 PARP1	souris ATM-/- homme	IF IHC	Expression dans les SSC (PLZF+)	(Takubo <i>et al.</i> 2008) (Agarwal <i>et al.</i> 2009)
DSBR	ATM	souris 8jpp	IF, qPCR		(Forand <i>et al.</i> 2009)
DSBR	ATR	souris 8jpp	IF, qPCR		(Forand <i>et al.</i> 2009)
DSBR	BRCA1	souris 8jpp	qPCR		(Forand <i>et al.</i> 2009)
DSBR	FANCA	souris Fanca -/-	Histologie	Déplétion des spermatogonies dans certaines portions de TS	(Cheng <i>et al.</i> 2000)
DSBR	H2AX	souris 8jpp	qPCR		(Forand <i>et al.</i> 2009)
DSBR	H2AX	souris	IHC, IF		(Ahmed <i>et al.</i> 2007)
DSBR	H2AX	souris irradiées	IF, IHC		(Rube <i>et al.</i> 2011)
DSBR	MDC1	souris irradiées	IF, IHC		(Rube <i>et al.</i> 2011)
DSBR	MRE11A	souris 8jpp	qPCR		(Forand <i>et al.</i> 2009)
DSBR	53BP1	souris	IHC, IF		(Ahmed <i>et al.</i> 2007)
HR	RAD51	souris 8jpp	IF, qPCR		(Forand <i>et al.</i> 2009)
HR	RAD51	souris	IHC, IF		(Ahmed <i>et al.</i> 2007)
HR	RAD54I	souris 8jpp	qPCR		(Forand <i>et al.</i> 2009)
MMR	MSH2	souris 8jpp	IF, qPCR, WB		(Richardson <i>et al.</i> 2000)
MMR	PMS2	souris 8jpp	IF, qPCR, WB		(Richardson <i>et al.</i> 2000)
NER	ERCC1	souris 8jpp	Northern blot		(Shannon <i>et al.</i> 1999)
NER	XPF	souris 8jpp	Northern blot	Gène faiblement exprimé dans les spermatogonies	(Shannon <i>et al.</i> 1999)
NHEJ	DNA-PKcs	souris DNA-PKcs -/-	IHC, TUNEL		(Hamer <i>et al.</i> 2003)
NHEJ	DNA-PKcs	souris 8jpp	IF, qPCR		(Forand <i>et al.</i> 2009)
NHEJ	Ku80	souris DNA-PKcs -/-	IHC, TUNEL		(Hamer <i>et al.</i> 2003)
NHEJ	Ku70	souris DNA-PKcs -/-	IHC, TUNEL		(Hamer <i>et al.</i> 2003)
NHEJ	Ku70	souris 8jpp	qPCR		(Forand <i>et al.</i> 2009)
NHEJ	XRCC4	souris 8jpp	qPCR		(Forand <i>et al.</i> 2009)
NHEJ	53BP1	souris 8jpp	IF, qPCR		(Forand <i>et al.</i> 2009)
Médiation	p53	souris p53 -/- irradiées	IHC, WB		(Beumer <i>et al.</i> 1998)

CultureP : culture primaire, IF: immunofluorescence, IHC: immunohistochimie, qPCR: réaction de polymérase en chaîne quantitative, WB: Western blot, TS : tubes séminifères, DSBR : *Double strand break repair*, HR : *Homologous recombination*, NER: *Nucleotide excision repair*, DR : *Direct repair*, BER : *Base excision repair*, NHEJ : *Non-homologous end-joining*

Utilisant l'inhibiteur pharmacologique O6-Benzylguanine (BG) de MGMT, une étude chez la souris suggère le rôle de MGMT dans les défenses des SSC contre des agents alkylants, tel que le BCNU (Thompson et al. 2000). A une dose non gonadotoxique de BCNU, une diminution du poids des testicules et une déplétion drastique des cellules germinales est mesurée 42 jours après le co-traitement avec BCNU et BG. La spermatogenèse durant 35 jours chez la souris (Clermont 1972), l'absence de rétablissement suggère une atteinte des SSC (Thompson et al. 2000). L'utilisation de marqueur de SSC serait toutefois nécessaire pour confirmer ces résultats.

Des systèmes de réparation de cassure de l'ADN semblent également être fonctionnels dans les SSC (Takubo *et al.* 2008, Rube *et al.* 2011, Fok *et al.* 2017). La voie NHEJ est présumée être la voie principale de réparation des cassures bicaténares dans les SSC. En effet, la plupart des spermatogonies PLZF<sup>+</sup> (marqueur des SSC) sont au stade G0/G1 du cycle cellulaire, ne permettant pas l'activation de la voie de recombinaison homologue (Rube *et al.* 2011). Cette hypothèse est appuyée par un modèle de souris invalidée pour le gène *Atm*, démontrant le rôle essentiel de la protéine ATM dans la préservation des SSC (Takubo *et al.* 2008, Rube *et al.* 2011). L'expression de gènes de la voie canonique de NHEJ, tels que *Xrcc6*, *Xrcc5*, et *Prkdc*, sont également connus pour être exprimés dans les spermatogonies indifférenciées (Hamer *et al.* 2003, Rube *et al.* 2011). Toutefois, la voie alternative de NHEJ pourrait être le système de défense majeur des SSC. En effet, l'implication d'une voie indépendante de DNA-PK a été démontrée dans un modèle d'irradiation de souris knockout pour le gène *Prkdc* (Rube *et al.* 2011). De plus,  $\gamma$ H2AX et MDC1, acteurs de la voie canonique de NHEJ, n'ont pas pu être mis en évidence par immunomarquage (Ahmed *et al.* 2007, Rube *et al.* 2011). L'absence de  $\gamma$ H2AX est appuyée par une étude récente montrant l'implication d'une ubiquitine-ligase, HUWE1, dans la dégradation de  $\gamma$ H2AX dans les SSC de souris (Fok *et al.* 2017). Dans cette étude, trois modèles murins d'invalidation du gène *Huwe1* ont été utilisés afin de vérifier l'expression de *Huwe1* dans les SSC : un modèle *in vivo* de knock-out conditionnel dans les cellules germinales, des cultures primaires de SSC par isolation des cellules germinales Thy1.2, et une lignée de spermatogonie aux caractéristiques souches (C18-4) (Fok *et al.* 2017).

Bien que les modèles d'irradiation *in vivo* apportent des pistes sur les voies possibles de réparation de l'ADN des SSC, il est nécessaire de déterminer si les SSC sont capables de se défendre contre des agents génotoxiques, pour mieux comprendre les mécanismes d'action des agents de chimiothérapies. Ainsi dans les travaux de la présente thèse, l'impact des chimiothérapies sera étudié sur l'expression de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN.

## 5 – PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS

À l'issue de cette revue de la littérature, il apparaît que les agents de chimiothérapies utilisés contre les cancers pédiatriques peuvent induire des effets secondaires sur la fertilité masculine. Des évidences épidémiologiques et expérimentales mettent en évidence l'atteinte des spermatogonies et à long terme des spermatozoïdes par les agents anti-cancéreux. Chez l'adulte, des dommages à l'ADN des spermatozoïdes persistent des années après l'arrêt du traitement. Cependant, il est encore incertain si le diagnostic et le traitement d'un cancer avant la puberté affectent la qualité des spermatozoïdes à l'âge adulte. De plus, les mécanismes par lesquels les agents de chimiothérapies altèrent les SSC sont encore peu décrits. Dans un contexte où aucune solution efficace de préservation de la fertilité ne peut être proposée lors d'un diagnostic de cancer avant la puberté, il est nécessaire de caractériser les dommages induits aux SSC et de déterminer l'évolution de ces dommages après arrêt du traitement. Ces connaissances pourraient permettre de mieux prédire les risques d'infertilité chez les survivants de cancers, et pourraient ouvrir de nouvelles pistes de recherche pour protéger les cellules germinales des effets secondaires des chimiothérapies.

Ce projet de doctorat repose sur les hypothèses que 1) les composés de chimiothérapie causent des dommages permanents à l'ADN des SSC dans le testicule prépubère, et 2) une fois à l'âge adulte, des altérations de la chromatine du spermatozoïde peuvent être mesurées. Nos objectifs sont 1) déterminer l'impact du cancer pédiatrique et de son traitement sur la qualité de la chromatine des spermatozoïdes chez l'homme, 2) définir dans un modèle *in vitro* de SSC, les effets cytotoxiques, génotoxiques et sur l'expression de gènes de réparation de l'ADN, d'une exposition aux chimiothérapies couramment utilisées en oncologie pédiatrique et, 3) établir un modèle d'étude où les SSC de rat prépubère sont exposées *in vivo* à la DXO, afin de déterminer l'expression de gènes de réparation de l'ADN mis en évidence *in vitro*.

Le premier objectif déterminera si l'intégrité de l'ADN et de la chromatine des spermatozoïdes d'hommes survivants de cancers pédiatriques a été affectée par l'historique de cancer. Une analyse de corrélation entre les effets mesurés et les doses de traitement reçu visera à établir un lien entre les agents de chimiothérapie reçu pendant l'enfance et les effets secondaires mesurés à l'âge adulte.

Dans le deuxième objectif, les effets cytotoxiques et génotoxiques de la doxorubicine seule ou en combinaison avec la vincristine seront caractérisés sur une lignée de spermatogonie de rat aux caractéristiques de cellules souches. L'analyse de l'expression de gènes de réparation de l'ADN permettra de déterminer les capacités de ces cellules à répondre à un stress génotoxique.

Enfin, le troisième objectif vise à établir un modèle d'exposition des SSC de rat prépubère à la DXO, lorsque ces cellules sont enrichies dans le testicule et avec la possibilité de les isoler. L'extraction des SSC exposées *in vivo* permettra l'analyse de l'expression de gènes de réparation de l'ADN mis en évidence *in vitro* dans le deuxième objectif.

## **PARTIE II : RÉSULTATS**

### **CHAPITRE 1 : SPERM DNA INTEGRITY IN ADULT SURVIVORS OF PAEDIATRIC LEUKEMIA AND LYMPHOMA PATIENTS**

**Titre en français :** L'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes chez les hommes non-azoospermiques, survivants de leucémie ou lymphome pédiatriques.

**Auteurs :** Hermance BEAUD<sup>1</sup>, Océane ALBERT<sup>2</sup>, Bernard ROBAIRE<sup>2,3</sup>, Marie Claude ROUSSEAU<sup>1</sup>, Peter T. CHAN<sup>4</sup>, Géraldine DELBES<sup>1</sup>

**Affiliations :**

<sup>1</sup>INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, (Québec) Canada.

<sup>2</sup>Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, (Quebec) Canada.

<sup>3</sup>Department of Obstetrics & Gynecology, McGill University, Montreal, QC, H4A 3J1, Canada

<sup>4</sup>Division of Urology, McGill University Health Center, Montreal, (Quebec) Canada.

**Référence du journal :** Andrology, soumis le 6 mars 2018

**Contributions des différents auteurs :**

HB : Suivi du recrutement des patients, exécution des expériences, analyse des données et rédaction de l'article

OA : Exécution des expériences de HT-COMET, correction de l'article

BR : Conseils théoriques, correction de l'article

MCR : Participation au design de l'étude, à l'analyse statistique et relecture de l'article

PC : Recrutement des patients, design de l'étude, correction de l'article

GD : Conception du projet, mise en place et coordination du recrutement des patients, analyse des données et rédaction / correction de l'article

### **Mise en contexte du chapitre :**

Il est établi que les survivants de cancers pédiatriques ont plus de difficulté à avoir des enfants que leur frère sans historique de cancer. Ces troubles de la fertilité ne peuvent pas être prévus jusqu'à l'heure actuelle, l'origine de ces troubles n'a pas été totalement élucidée. Une production insuffisante ou de mauvaise qualité des spermatozoïdes peut être à l'origine d'infertilité. Cependant, à notre connaissance il n'existe pas d'étude faisant la différence entre les survivants traités avant la puberté de ceux traités après la puberté. L'immaturation du testicule avant la puberté pourrait influencer la sensibilité des cellules germinales déjà présentes face aux agents de chimiothérapie. Dans ce chapitre, nous avons évalué quantitativement et qualitativement la production de spermatozoïde chez des survivants de cancer pédiatrique diagnostiqué avant ou après la puberté. Les paramètres étudiés ont ensuite été corrélés aux doses d'agent de chimiothérapies reçues, afin d'ouvrir des pistes de recherche dans la prévention des risques d'effets secondaires sur la fertilité masculine.

Avant d'être soumis pour publication, les travaux de ce chapitre ont été communiqués par affiche au congrès de l'American Society of Andrology (ASA) en 2017 à Miami. Pour assister à ce congrès, j'ai obtenu une bourse de voyage du NIH Trainee Travel Award et une bourse du Centre de recherche en reproduction développement et santé intergénérationnelle (CRDSI). J'ai également obtenu le prix Trainee merit award pour ma présentation de l'affiche. Le résumé de l'affiche a été publié dans une édition spéciale consacrée au congrès dans le journal *Andrology*.

*H. Beaud, O. Albert, B. Robaire, M.C. Rousseau, P. Chan, G. Delbes. "Sperm DNA integrity in adult survivors of paediatric leukemia and lymphoma" American Society of Andrology, 42nd annual meeting (Beaud et al. 2017a).*

## Résumé en français :

Des études prospectives chez des adultes survivants du cancer montrent que les cassures de l'ADN corrélant avec l'infertilité masculine et des défauts de développement embryonnaire, peuvent persister des années après la chimiothérapie. Dans le cas de cancer pédiatrique, les survivants sont plus susceptibles que leurs frères d'avoir un faible compte spermatique et d'utiliser des techniques de procréation assistée. Dans cette étude pilote, nous avons testé si les spermatozoïdes produits des années après la rémission d'un cancer pédiatrique sont endommagés et si l'âge au diagnostic par rapport à la puberté peut avoir un effet. Des survivants de leucémie lymphoblastique aiguë et de lymphome pédiatrique ont été recrutés en 2 groupes: ceux diagnostiqués avant (n=6) ou après la puberté (n=7). Par l'utilisation du système CASA (*computer assisted sperm analysis*), du test de SCSA® (*sperm chromatin structure assay*), et du test de HT-COMET (*high throughput COMET assay*), nous avons évalué les paramètres de fertilité des survivants de cancers pédiatriques (CCS), et les avons comparés à ceux d'hommes sans historique de cancer (témoins, n=12). Les concentrations moyennes d'hormones circulantes (LH, FSH, testostérone, œstradiol), les concentrations spermatiques et la motilité progressive n'ont pas montré de différence entre les groupes. Cependant, 38,5% des CCS étaient azoo- ou oligozoospermiques, dont 3 diagnostiqués avant la puberté et 2 après la puberté. Le compte spermatique a été corrélé avec les doses cumulées d'agents alkylants. L'indice de fragmentation de l'ADN, la compaction de la chromatine et les cassures de l'ADN étaient similaires entre les groupes. De façon intéressante, les dommages à la chromatine et à l'ADN des spermatozoïdes ont été fortement corrélés avec les doses cumulées de doxorubicine. Bien que l'effectif de la cohorte soit limité, ces données indiquent que les CCS, indépendamment de l'âge au diagnostic, présentent un risque plus élevé de compte spermatique faible ou nul et lorsque les spermatozoïdes sont produits, les anomalies de l'ADN et de la chromatine semblent similaires à celles observées dans la population générale. Néanmoins, l'exposition aux anthracyclines, et en particulier à la doxorubicine, pourrait avoir des conséquences à long terme sur l'intégrité des spermatozoïdes. Cette étude souligne l'importance d'informer les familles sur l'impact à long terme de la chimiothérapie sur la fertilité masculine, indépendamment de l'âge au moment du diagnostic.

## **1.1 - Abstract :**

Prospective studies on adult cancer survivors show that biomarkers of sperm damage correlated to male infertility and poor embryo development, can persist years post-chemotherapy. In the case of childhood cancer, survivors are more likely than siblings to report low sperm count and to use assisted reproductive technologies. In this pilot study,, we tested if sperm produced years after remission of childhood cancer are damaged and whether age at diagnosis in relation to puberty can have an impact. Survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia and lymphoma were recruited into 2 groups: diagnosed before (n=6) or after puberty (n=7). Using computer assisted sperm analysis, sperm chromatin structure assay (SCSA®), and high throughput COMET assay, we assessed reproductive parameters of childhood cancer survivors (CCS) and compared to those of men with no history of cancer (control, n=12). Average levels of circulating hormones (LH, FSH, testosterone, estradiol), sperm concentrations and progressive motility showed no difference among groups. However, 38.5% of CCS were azoo/oligozoospermic, including 3 diagnosed pre-puberty and 2 after puberty. Sperm count was correlated with the cumulative doses of alkylating agents. DNA fragmentation index, high DNA stainability and the percentage of tail DNA were similar across groups. Interestingly, sperm DNA and chromatin damage were strongly correlated with the cumulative doses of doxorubicin. Although limited by the small number of subjects, these data indicate that CCS, independently of the age of diagnosis, have a higher risk of no or low sperm count and when sperm are present, chances of DNA and chromatin abnormalities appear similar to those seen in the general population. Nevertheless, exposure to anthracyclines, and doxorubicin in particular, could have long-term consequences on sperm integrity. This study underlines the importance of informing families about the potential long-term impact of chemotherapy on male fertility regardless of age at diagnosis.

## **1.2 - Introduction :**

The incidence of childhood cancer has been steadily increasing worldwide over the past 50 years and the estimated risk in Canada is now 1 in 581 (Ries et al. 2007, Baade et al. 2010, Kaatsch 2010, Steliarova-Foucher et al. 2017). The success of treatments and consequent higher survival after childhood cancer has led to a shift in parental and patients' worries. While survival was the primary concern, now, the late effects of cancer and the therapies for treatment are becoming major issues (Green et al. 2010, Prasad et al. 2010, Reulen et al. 2010). Approximately half of childhood cancers are hematologic malignancies, including acute lymphocytic leukemia (ALL), Hodgkin (HL) and non-Hodgkin lymphoma (NHL), all with an

anticipated long-term survival rate greater than 80%. With an emphasis on the quality of life, survivorship of this increasing number of cancer patients is an important growing healthcare issue.

Epidemiological studies from more than 11,000 male participants in the Childhood Cancer Survivor Study have shown a significant decrease in male fertility when compared to their healthy siblings (Green et al. 2003, Green et al. 2010, Chow et al. 2016). In particular, those with a diagnosis of HL, NHL or leukemia had lower chance of getting their partners pregnant (hazard ratio 0.34, 0.60 and 0.70 respectively) (Green et al. 2010). The most common cause of infertility in these patients is low sperm count or azoospermia (Wasilewski-Masker et al. 2014). Studies on sperm from adult cancer patients showed that cancer itself and its treatment induced sperm aneuploidy, chromatin damage, and epigenetic changes that persist years post-chemotherapy (Delbes et al. 2007, Tempest et al. 2008, O'Flaherty et al. 2010, Chan et al. 2012, Bujan et al. 2014). In the case of childhood cancer, data from the Childhood Cancer Survivor Study showed that survivors were more likely than siblings to report low sperm count and to use assisted reproductive technologies (ART) (Stensheim et al. 2013, Wasilewski-Masker et al. 2014). However, it is still unclear whether the sperm produced years after remission of cancer have more chromatin and DNA damage. Most studies on the offspring fathered by male cancer survivors did not show elevated risks of stillbirth or neonatal death. But, large epidemiological studies have shown lower birth rates among male cancer survivors and a slightly higher risk of major congenital abnormalities among their offspring (reviewed in (Tremblay et al. 2017)). Such defects may be due to the potential mutagenic effects of anti-cancer drugs on the paternal germline.

Only two studies investigated DNA breaks and/or chromatin integrity in sperm from CCS, years after chemotherapy and/or radiotherapy ended (Thomson et al. 2002, Romerius et al. 2010). In their study of 33 CCS, Thomson et al. did not observe any difference in sperm DNA integrity measured by the TUNEL assay when compared to age-matched controls (Thomson et al. 2002). On the other hand, Romerius et al. used the sperm chromatin structure assay and studied 99 CCS for which they observed an increased DNA fragmentation index compared to aged-matched controls which was of borderline statistical significance (Romerius et al. 2010). Both studies grouped CCS with various diagnostics, heterogeneous treatments and a range of age at diagnosis. Therefore, analyses were done without segregating the impact of pre-pubertal and post-pubertal treatment. While it was thought that being pre-pubertal during anti-cancer therapy conferred protection against gonadal damage, more recent evidence of the impact on long-term sperm production has led some researchers to conclude that the prepubertal gonad is even more vulnerable to the cytotoxic effects of chemotherapy than the adult testis (Revel & Revel-Vilk 2008). To our knowledge,

the importance of age at diagnosis in relation to puberty, on potential long-term effect on sperm DNA and chromatin remains poorly understood.

Chemotherapy regimens may include cocktails of alkylating agents, vinca alkaloids, anthracyclines, and anti-metabolites that target proliferating cells. As such, actively dividing spermatogonial stem cells (SSCs) and spermatogonia can be the target of chemotherapeutic agents (Marcon et al. 2011, Meistrich 2013, Beaud et al. 2017). Recently, we have demonstrated the direct induction of DNA breaks in a rat spermatogonial cell line having SSCs characteristics after exposure to doxorubicin (Beaud et al. 2017). The extent of injury post-chemotherapy depends on the dosage, duration and the type of agents used (Meistrich 2013). There are few data using pre-pubertal animal models to elucidate the mechanism(s) of action of such exposures. Exposure to single agents such as doxorubicin, etoposide or cisplatin has been shown to primarily deplete the testis of germ cells and to have a long-term impact on Sertoli cells (Lirdi et al. 2008, Okada et al. 2009, Brilhante et al. 2012). Importantly, Vendramini et al., have shown that doxorubicin-exposed rat spermatogonia produced long-term damage to sperm DNA and that this might be the cause of compromised conceptus development and reduced pregnancy outcome (Vendramini et al. 2012). However it is still unclear whether pre-pubertal chemotherapy can damage the sperm produced in adulthood in the human population.

In this study, we tested the long-term impact of childhood cancers and their therapies on sperm chromatin and DNA integrity. Using complementary assays, namely computer assisted sperm analysis (CASA), sperm chromatin structure assay (SCSA<sup>®</sup>), and high throughput single-cell gel electrophoresis assay (HT-COMET), we assessed sperm quantity and quality among male survivors of ALL, HL, or NHL. With the aim to specifically address issues of the influence of age at diagnosis or the type of treatment received on sperm count, sperm chromatin and sperm DNA integrity in men with a history of childhood cancer, we attempted to focus our subject recruitment with specific types of cancer diagnoses and treatments along with well-defined ages of diagnosis.

### **1.3 - Materials & Methods :**

#### **Study design**

In this cross-sectional study, reproductive parameters of CCS are compared to those of age-matched men who have never been diagnosed with cancer. Participants were recruited from follow-up oncology clinics at the McGill University Health Center (Montreal, Canada) and from the general public. Two groups of

cancer survivors and one cancer-free group are designated as: group A, CCS treated before puberty ( $\leq 14$  years old,  $n=6$ ); group B, CCS treated after puberty (15-19 years old,  $n=7$ ); and group C, adult males without a history of cancer ( $n=12$ ) hereafter referred to as controls (Table 1). Informed and written consent, in accordance with the Institutional Ethics Review Board, (IRB #A01-M03-14A), were obtained from each participant recruited with the following inclusion and exclusion criteria. Inclusion criteria were: 1) be over 18 years old to consent to participate; 2) be below the age of 40 years; 3) have completed treatment before the age of 19 years; 4) be in remission for at least 3 years with respect to their cancer; 5) be able to ejaculate by masturbation to provide semen samples; 6) be free of additional co-morbidities that can affect their fertility status as evaluated by an eligibility questionnaire. Exclusion criteria were: 1) inability to provide informed consent; 2) received total body or pelvic radiation treatment.

### **Personal and medical characteristics**

Each participant completed a questionnaire which elicited information on personal characteristics and lifestyle such as education level, height, weight, smoking, and alcohol consumption status. Body mass index ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) was calculated as follows:  $\text{weight (kg)} / [\text{height} \times \text{height}] (\text{m}^2)$  (Deurenberg et al. 1998). Written consent from each participant was obtained to allow access to their medical records. Details on the diagnosis, the age at diagnosis as well as type of cancer, and the doses and duration of treatment were collected retrospectively when available (Table 2). The cumulative dose of alkylating agent was determined by the cyclophosphamide equivalent dose (CED) as previously described (Green et al. 2014). The CED was calculated using the following equation:  $\text{CED (mg}/\text{m}^2) = 1.0 (\text{cumulative cyclophosphamide dose (mg}/\text{m}^2)) + 0.857 (\text{cumulative procarbazine dose (mg}/\text{m}^2)) + 100 (\text{cumulative nitrogen mustard dose (mg}/\text{m}^2))$ . The cumulative doses of vinca alkaloids or anthracyclines were determined by adding cumulative doses of each compounds received.

### **Samples collection and preparation**

From each participant, serum samples were obtained and assayed for total testosterone, estradiol (E2), luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), albumin, and sex hormone-binding globulin (SHBG) at the McGill Reproductive Centre (O'Flaherty et al. 2010). A semen sample after 3 to 7 days of abstinence was collected by masturbation. Sperm concentration, and progressive motility were measured within one hour after collection by CASA (SpermVision; Sperm Processor Pvt. Ltd, Garkheda, India) (Delbes

et al. 2013). Total sperm motility was assessed by the sum of progressive (rapid and slow) and non-progressive motility (Cooper et al. 2010). As previously described, semen samples were aliquoted and stored at -80°C in the absence of cryoprotectants (O'Flaherty et al. 2008). The maximum storage time was 4 years. For further analysis, non-azoospermic samples were thawed 1.5 minutes at 37°C, diluted 1:10 with phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4), and centrifuged at 500 x g for 5 min at 4°C to remove the seminal plasma. Spermatozoa from the pellet were then diluted in PBS, prepared for each assay and kept at -80°C until further analysis.

### **Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®)**

In order to determine the susceptibility of sperm DNA to acid-induced denaturation, the SCSA® was used as described previously (Delbes et al. 2013). Briefly, sperm samples were analysed at 2 million sperm/ml using a MACSQuant Analyser (Miltenyi Biotec) equipped with a 585/625 nm filter and a laser tuned to 488-nm line excitation. Green and red fluorescence emissions were measured using 525–550 nm and a 655–730-nm bandpass filters respectively. An internal quality control was used to calibrate the flow cytometer and sperm treated 1h with 5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used as a positive control. Sample IDs were hidden from the experimenter before the analysis. The raw data were processed using WinList Software (Verity Software House, Topsham, ME, USA). The percent of DNA fragmentation index (%DFI) was analysed as previously described (mean red fluorescence/total of red and green fluorescence) (Evenson & Wixon 2006). The percent of high DNA stainability (HDS), representing the lack of sperm DNA compaction, was also analysed as previously described (O'Flaherty et al. 2010). A minimum of 10,000 events were analysed per sample and each sample was run in duplicate.

### **High throughput comet assay (HT-COMET):**

Single and double strand DNA breaks were evaluated using the HT-COMET assay, as previously described (Albert et al. 2016). Sperm samples were analysed at 1.5 million spermatozoa/ml. Sperm treated with DNase solution [30 mM Tris-HCl; 4 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM dithiothreitol (DTT; Roche Diagnostics, Basel, Switzerland); 100 Kunitz units (KU)/ml DNase (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, USA)] at 37°C for 20 min was used as positive control. The experimenter was blinded to treatment groups. Comets were imaged using the fully automated Operetta high content imaging system (PerkinElmer®). Each sample was assessed in triplicate. A minimum of 30 comets per replicate (116 comets/replicate on average) were

scored with the Columbus™ software (PerkinElmer®). The percentage of tail DNA was calculated by dividing the sum of pixel-intensities in the tail by the combined sum of pixel-intensities in nucleus and tail. Tail extent moment (TEM) was calculated as the proportion of tail intensity multiplied by tail length.

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were done using GraphPad Prism version 5.01 (GraphPad software, La Jolla, CA, USA). Gaussian distributions of the data were assessed by the Kolmogorov-Smirnov normality test. Comparisons of average values between groups were done using a Student's t-test or a Mann-Whitney test according to the normality test results. Correlations between parameters were determined using a Spearman test. Non-numerical data were modified to obtain binary data and were analyzed using a Fisher's exact test. Significance was defined as  $p \leq 0.05$ .

## **1.4 - Results:**

### **Characteristics of the cohort**

In order to limit variations in types of cancer and treatment, we have targeted our recruitment to survivors of three of the most prevalent hematologic malignancies, namely ALL, HL and NHL. To distinguish differential impact of cancer and its treatment on immature or mature testis, survivors of cancer diagnosed before puberty (ages 4-14, n=6) were analyzed separately from survivors diagnosed after puberty (ages 15-17, n=7). At the time of the study, there was no significant difference in the age of participants between groups (Table 1). But, if diagnosed before puberty, participants were in remission for 19.6 years on average while those diagnosed after puberty were in remission for 9.0 years on average (Table 1). From the questionnaire, we observed no difference between education level, smoking or alcohol consumption status between controls and CCS subgroups (Table 1). Interestingly, we observed that CCS had a significantly higher body mass index than controls, although only significant for CCS diagnosed after puberty (Table 1).

### **Hormonal profiles**

No differences were observed in the average circulating testosterone, LH, FSH, estradiol, albumin and SHBG between controls and CCS and further between controls and the two subgroups of CCS (Fig. 1).

Individual values revealed that 5 CCS had FSH levels higher than the clinical standard of 8IU/L that suggests non obstructive azoospermia (Fig. 1C). Importantly, these non-standard values were observed in both sub-groups of CCS regardless of the age at diagnosis.

### **Semen analysis**

Standard clinical semen analysis by CASA showed that the average sperm concentrations, counts, and total motility were not different across groups (Fig. 2A, 2C, 2D). As well, the rapid and slow progressive motility showed no difference between groups (data not shown). Nevertheless, individual values revealed that 5 out of the 13 CCS had sperm concentrations below the World Health Organization (WHO) standards of 15 million /ml (Fig. 2A) (Cooper et al. 2010); three samples were azoospermic and two were oligozoospermic (10.9 and 1.4 million sperm/ml) (Fig. 2A). This corresponds to a prevalence of 38.5% of azoo/oligozoospermia among CCS (Fig. 2B). Importantly, no or low sperm concentration was observed regardless of the age at diagnosis. Similar profiles were measured with the analysis of the total sperm count (Fig. 2C).

### **#Sperm chromatin structure and DNA integrity**

SCSA<sup>®</sup> was used to analyze sperm chromatin structure measured by the DFI and proper sperm chromatin compaction determined by the HDS. Amongst non-azoospermic subjects, the average values of %DFI were not different between groups (Fig. 3A). Similarly, the average values of HDS were not different between CCS and controls, and all values were within the normal range. Nevertheless, CCS diagnosed before puberty had significantly lower %HDS than controls (Fig. 3B) suggesting higher level of DNA compaction. Interestingly, individual values revealed that two controls and two CCS had %DFI higher than the threshold established at 25% (Evenson 2017) (Fig. 3A). The two CCS with high %DFI were both diagnosed after puberty (one diagnosed with ALL at 15 years old and one diagnosed with HL at 17 years old).

In parallel, sperm DNA integrity was quantified using the HT-COMET assay, according to two different parameters that are representative of DNA breaks. The average values for each parameter showed no significant difference between groups (Fig. 3C and 3D). Despite the absence of a consensus threshold value for HT-COMET, we observed that both CCS previously described with high %DFI displayed the highest values for the HT-COMET parameters.

### **Correlations between sperm parameters and treatment characteristics**

In order to determine if the azoo-, oligo- or asthenozoospermia, high %DFI or high tail DNA observed in CCS were due to the type of treatment received, these variables were correlated with treatment characteristics based on the participants' medical record. Complete information on treatments could be obtained for 10 out of the 13 CCS. Treatments and doses received are summarized in Table 2 according to the 4 main classes of drugs received: vinca alkaloids, alkylating agents, anthracyclines and corticosteroids. All participants received vinca alkaloids and no significant correlation could be observed between the cumulative doses received and any sperm parameters (Table 3). We noticed that only azoospermic men received mustargen with or without procarbazine as alkylating agent (see #1 and #4 in Table 2). Besides, we observed a significant negative correlation between the calculated CED of alkylating agents and sperm count (Table 3). In parallel, we did not observe any significant negative correlation between sperm count and other drugs received, but it is interesting to note that prednisone had a significant positive correlation with sperm count (Table 3).

Correlation analyses for sperm quality parameters measured by the % DFI and the % tail DNA revealed no association with the cumulative dose of vinca alkaloids, alkylating agents or prednisone. Interestingly, we observed a strong positive correlation between the cumulative dose of anthracyclines and the %DFI (Table 3). More specifically, the cumulative dose of doxorubicin was significantly correlated with the %DFI and %Tail DNA (Table 3).

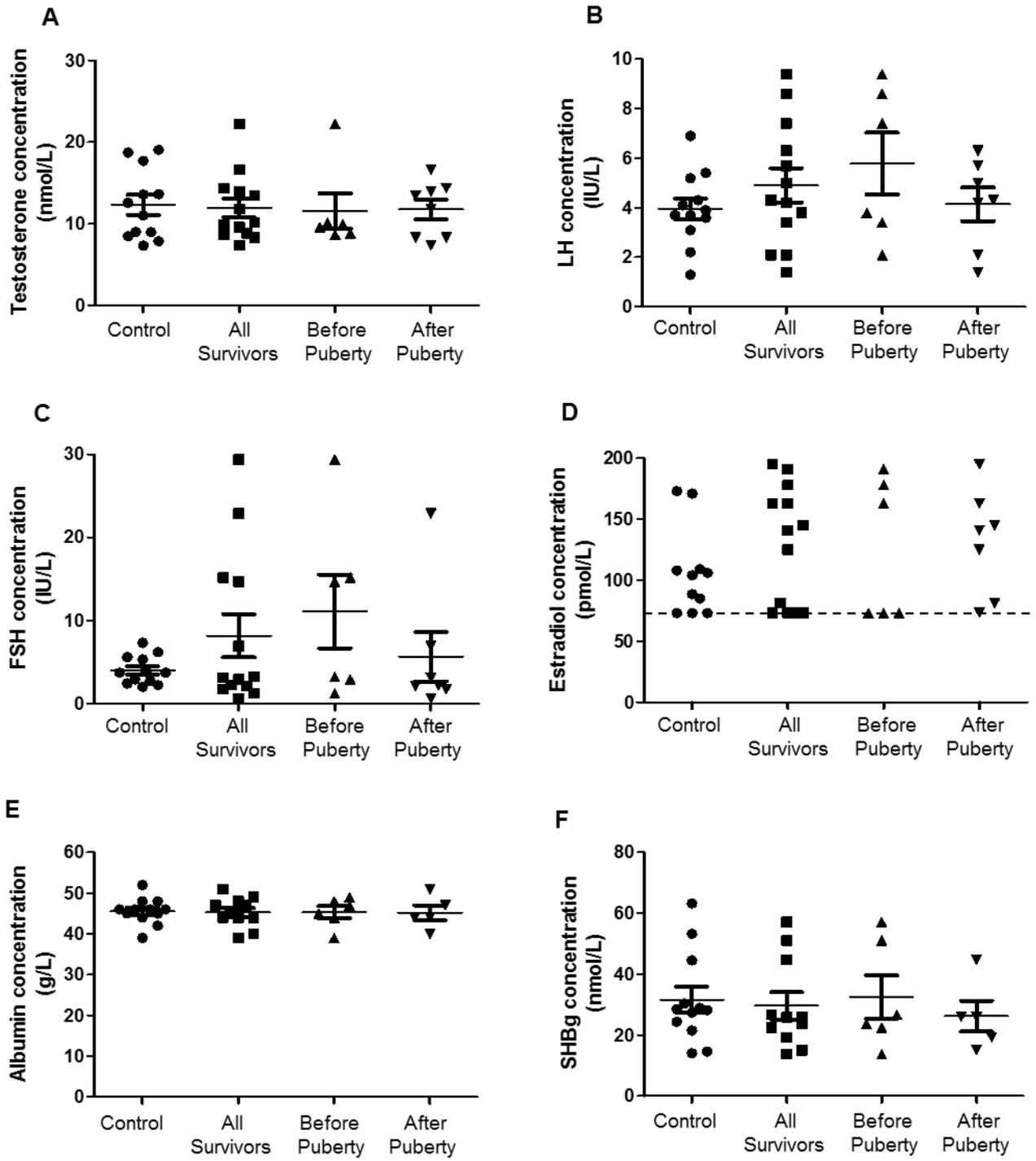
Although limited by the small number of subjects, our experimental design allows to reveal the expected strong positive correlation between sperm count and sperm motility (Table 3). As well, the fact that sperm count did not correlate with sperm quality parameters such as the % DFI and the % tail DNA confirmed that these assays analyse different parameters (Table 3). Our study did not reveal a link between any sperm parameters and the duration of treatment, the time of remission or the age at diagnosis (Table 3).

**Table 1: Personal and medical characteristics of participants.**

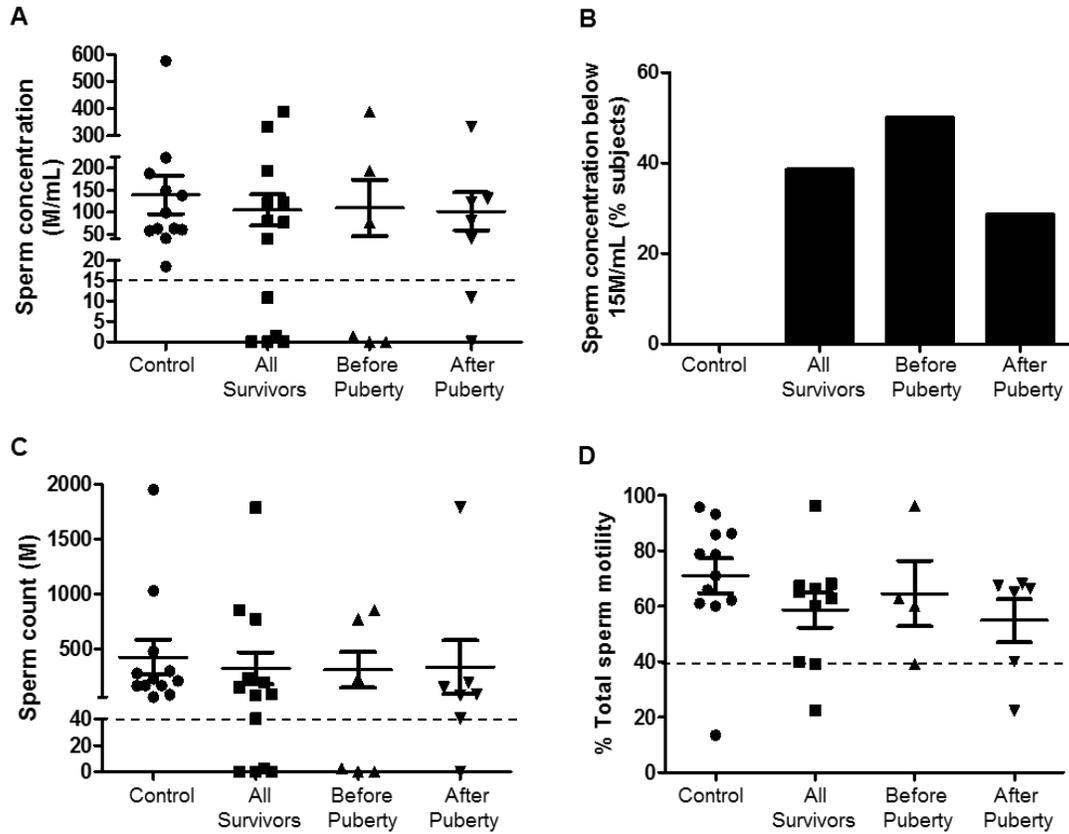
<b>Characteristics</b>	<b>Controls (n=12)</b>	<b>CCS (n=13)</b>	<b>CCS diagnosed before puberty (n=6)</b>	<b>CCS diagnosed after puberty (n=7)</b>
Diagnosis	-	3 ALL 8 HL 2 NHL	2 ALL 2 HL 2 NHL	1 ALL 6 HL
Age at diagnosis (years, mean $\pm$ SEM)	-	12.8 $\pm$ 1.3	9.2 $\pm$ 1.8	16.0 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>
Age at recruitment (years, mean $\pm$ SEM)	30.7 $\pm$ 1.7	27.8 $\pm$ 1.6	30.3 $\pm$ 2.1	25.6 $\pm$ 2.2
Remission (years, mean $\pm$ SEM)	-	13.4 $\pm$ 2.3	19.6 $\pm$ 3.9	9.0 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>
BMI (kg/m <sup>2</sup> , mean $\pm$ SEM)	22.9 $\pm$ 0.5	26.3 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	24.5 $\pm$ 0.7	27.8 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>
University graduate (%, 95% CI)	66.7 (39.1-86.2)	46.2 (23.2-70.9)	50.0 (18.8-81.2)	42.9 (15.8-75.0)
Smoker at interview (%, 95% CI)	16.7 (4.7-44.8)	23.1 (8.2-50.3)	16.7 (3.0-56.4)	28.6 (8.2-64.1)
>5 alcoholic drinks/week (%, 95% CI)	33.3 (13.8-60.9)	30.8 (12.7-57.6)	33.3 (9.7-70.0)	28.6 (8.2-64.1)

CCS: male Childhood Cancer Survivor, ALL: Acute Lymphoblastic Leukemia, HL: Hodgkin's Lymphoma, NHL: Non-Hodgkin's Lymphoma, CI: confidence interval. <sup>a</sup>: p<0.01 using an unpaired Student's t-test compared to CCS diagnosed before puberty. <sup>b</sup>: p<0.01 using a Mann Whitney test compared to controls.

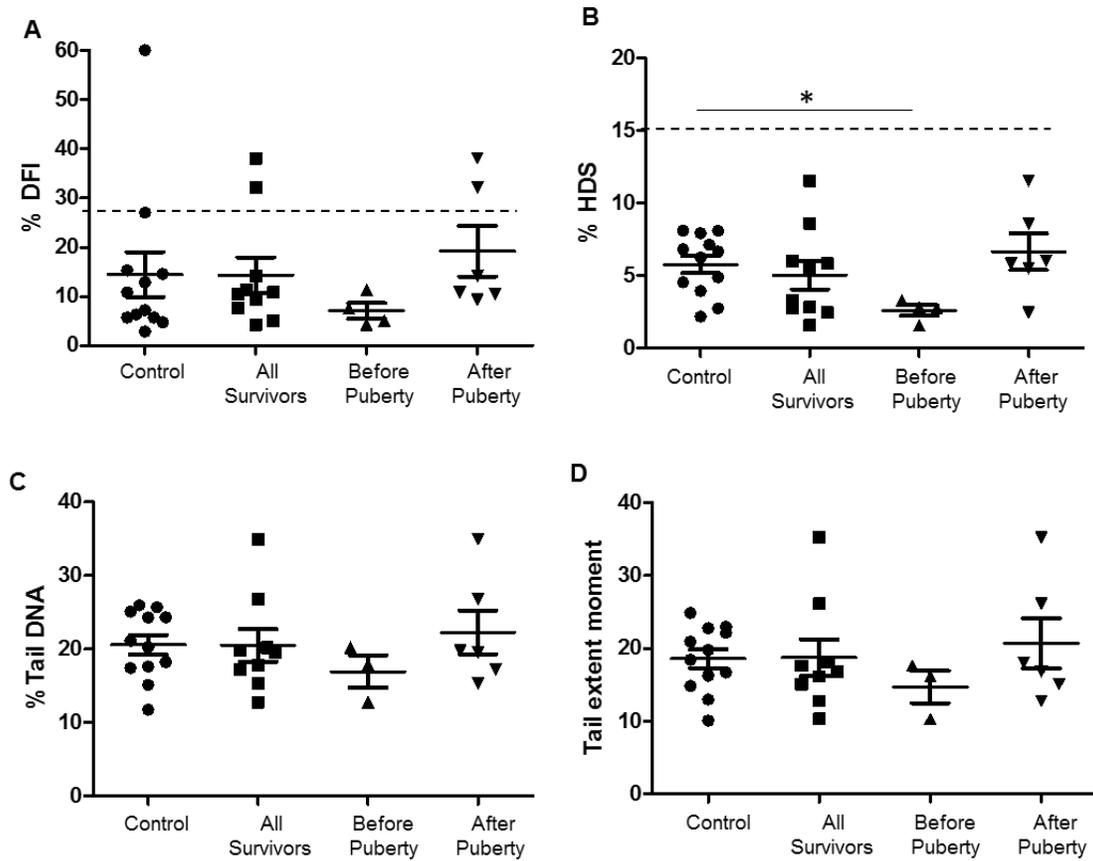
**Figure 1: Circulating hormone levels in adult controls and CCS.** (A) total testosterone, (B) Luteinizing Hormone (LH) (C) Follicle-Stimulating Hormone (FSH), (E) albumin and, (F) SHBG concentrations are expressed as mean  $\pm$  SEM and each point represents an individual value. For level of estradiol (D), the lower detection limit is represented by a dashed line. No significant difference in average values was detected between groups.



**Figure 2: Semen parameters in adult controls and CCS.** Sperm concentration (A), sperm count (C) and total motility (D) were measured by CASA for each participant. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM and each point represents an individual value. Dash lines represent WHO standards. The prevalence of azoo/oligozoospermia according to the WHO standard of 15 million/ml is represented in (B). No significant difference in average values was detected between groups.



**Figure 3: Sperm chromatin structure and DNA integrity in adult controls and CCS.** The susceptibility of sperm DNA to acid-induced denaturation was evaluated by the SCSA<sup>®</sup> determining (A) the percentage of sperm DNA fragmentation index (DFI) and (B) the percentage of high DNA stainability (HDS). DNA breaks were measured by the high throughput comet assay (HT-COMET) determining (C) the percentage of DNA in the comet tail and (D) the Tail extent moment. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM and each point represents an individual value. Dashed lines represent threshold values in humans according to (Evenson *et al.*, 2016). \*P<0.05, using a Mann-Whitney test.



**Table 2: Diagnosis and sperm concentration in relation to cancer treatment.** Classes of drugs, details on the molecules and the cumulative dose received are given for each participating CCS. Underlined CCS numbers correspond to male CCS diagnosed before puberty.

CCS	Type of cancer	Sperm count (Millions)	Vinca Alkaloids (mg/m <sup>2</sup> )	Alkylating agents (CED mg/m <sup>2</sup> )	Anthracyclines (mg/m <sup>2</sup> )	Corticosteroids (mg/m <sup>2</sup> )	Other
<u>#1</u>	HL	0	Vincristine Vinblastine (60)	Mustargen Procarbazine (4286)	DXO (200) Bleomycin (80)	Prednisone (40) Dexamethasone	
<u>#2</u>	NHL	2.4	Vincristine (11)	CPA (2250)	DXO (120)	Prednisone (360) Hydrocortisone	G-CSF Methotrexate Cytarabine
<u>#3</u>	ALL	854.7	Vincristine (30)	-	-	Prednisone (4440)	Methotrexate L-Asp. Cytarabine 6-MP
<u>#4</u>	HL	0	Vincristine Vinblastine (54)	Mustargen (4800)	DXO (175) Bleomycin (70)	Dexamethasone	Radiation
<u>#5</u>	HL	40.1	Vincristine (7)	CPA (5250)	DXO (350)	Prednisone (188) Dexamethasone	Radiation Rituxan
<u>#6</u>	HL	76.3	Vincristine (8)	CPA (3600)	DXO (150)	Prednisone (840)	Radiation G-CSF
<u>#7</u>	HL	88.2	Vincristine (44.8)	CPA (3200)	DXO (200) Bleomycin (60)	Prednisone (1120)	Radiation Etoposide G-CSF
<u>#8</u>	HL	147.4	Vincristine (11.2)	CPA (5200)	DXO (100) Bleomycin (60)	Prednisone (1120) Hydrocortisone	Radiation Etoposide G-CSF Singulair
<u>#9</u>	HL	194.6	Vincristine (10.5)	-	DXO (175) Bleomycin (70)	-	Etoposide
<u>#10</u>	ALL	1792.3	Vincristine (78)	-	DXO (360)	Prednisone (20040) Hydrocortisone	Radiation Septra Methotrexate L-Asp. Cytarabine 6-MP

CCS: Childhood Cancer Survivor, ALL: Acute Lymphoblastic Leukemia, HL: Hodgkin's Lymphoma, NHL: Non-Hodgkin's Lymphoma, CPA: Cyclophosphamide, DXO: Doxorubicin, L-Asp: L-Asparaginase, 6-MP: mercaptopurine.

**Table 3: Correlations between sperm parameters and cancer treatment characteristics.**

	<b>Sperm count</b>	<b>Sperm motility</b>	<b>%DFI</b>	<b>%tail DNA</b>
<b>Sperm count</b>		<i>0.85*</i>	<i>0.19</i>	<i>-0.07</i>
<b>%DFI</b>	<i>0.19</i>	<i>-0.31</i>		<i>0.53</i>
<b>% Tail DNA</b>	<i>-0.07</i>	<i>-0.67</i>	<i>0.53</i>	
<b>Vinca Alkaloids</b>	<i>0.07</i>	<i>-0.16</i>	<i>0.16</i>	<i>-0.21</i>
<b>Alkylating agents (CED)</b>	<i>-0.62*</i>	<i>-0.52</i>	<i>0.31</i>	<i>0.00</i>
<b>Anthracyclines:</b>				
Doxorubicin + Bleomycin	<i>-0.02</i>	<i>-0.47</i>	<i>0.92*</i>	<i>0.71</i>
Doxorubicin	<i>-0.07</i>	<i>-0.55</i>	<i>0.76*</i>	<i>0.82*</i>
Bleomycin	<i>-0.38</i>	<i>-0.38</i>	<i>0.12</i>	<i>-0.59</i>
<b>Prednisone</b>	<i>0.68*</i>	<i>0.57</i>	<i>0.13</i>	<i>0.28</i>
<b>Duration of treatment</b>	<i>0.13</i>	<i>0.01</i>	<i>-0.17</i>	<i>0.25</i>
<b>Time of remission</b>	<i>-0.40</i>	<i>-0.33</i>	<i>-0.25</i>	<i>0.00</i>
<b>Age at diagnostic</b>	<i>0.13</i>	<i>0.09</i>	<i>0.47</i>	<i>-0.18</i>

Correlation coefficients are shown. \*  $p \leq 0.05$  using the Spearman test.

### 1.5 - Discussion:

The aims of this study were to determine the long-term impact of childhood cancer and their therapies on sperm quantity and quality and to test if age at diagnosis in relation to puberty can have an impact. To achieve these goals, we recruited young adults with a history of the most commonly diagnosed cancers in children, namely, leukemia and lymphomas. In order to further address if the long-term effects on fertility depend on the maturity of the testis, we sub-divided the cohort of survivors according to the timing of treatment related to puberty. The US National Cancer Institute and the European Network for Cancer in Children and Adolescents have reached a consensus whereby individuals between the ages of 0 and 14 years old are considered children and 15 to 39 year-olds are considered adolescents and young adults (Trama et al. 2016). The retrospective nature of our study design limited our ability to determine the onset of puberty, but using this consensus, participants diagnosed and treated before 15 years old were considered prepubertal, whereas those diagnosed between 15 and 18 years old were considered as pubescent.

Our data showed that the history of childhood cancer did not affect the average sperm concentration but increased the prevalence of azoo/oligozoospermia compared to controls. Because of the small sample

size, the statistical power to observe differences in average values is low, but the prevalence of 38% that we observed corresponds to what has been described by others for childhood cancer survivors (Wallace et al. 1991, Thomson et al. 2002, van Casteren et al. 2009, Romerius et al. 2011, Green et al. 2014). Importantly, both groups of CCS had comparable prevalence azoo/oligozoospermia, supporting the premise that the prepubertal testis is not protected from injury after a history of pediatric cancer (Revel & Revel-Vilk 2008). Testosterone and gonadotropins are essential for the maintenance of spermatogenesis. Average levels of these circulating hormones were similar between groups, suggesting that pituitary and Leydig cell functions were not altered by the history of cancer, and that potential fertility disorders in these patients were not related to endocrine disruption. These results are supported by studies on CCS reporting the proper development of secondary sexual characteristics at the time of puberty (Wallace et al. 1991, Wallace et al. 2011, Wasilewski-Masker et al. 2014). However, all azoo/oligozoospermic CCS had FSH value above clinical standards which is most probably a consequence of spermatogenesis failure (Gordetsky et al. 2012).

All azoo/oligozoospermic survivors in our study were diagnosed with a lymphoma (HL or NHL) which is in accordance with the fact that chemotherapy regimen used to treat these malignancies are the most susceptible to induce gonadal impairment (van Casteren et al. 2009). In order to determine if a specific drug could be the origin of azoo/oligozoospermia, we analysed the combination of drugs administered, and conducted correlation analyses between the sperm count and dose of anti-cancer drugs. For example, it had been suggested that HL survivors treated with the full MOPP regimen (Mustargen, Vincristine, Prednisone, Procarbazine) are more likely to develop gonadal dysfunction than HL survivors treated with the MOP regimen (MOPP without procarbazine, a well known gonadotoxic alkylating agent) (van Casteren et al. 2009). However, in our study, the two azoospermic patients for which we had treatment details, received MOP, but only one of them received procarbazine (CCS #1 and #4 in Table 2). Because the CED were similar for these two CCS, this suggests that the dose of alkylating agents is what matters more than the type of compound. Indeed, we have observed a significant negative correlation between CED of alkylating agents and sperm count in our cohort which is in accordance with earlier reports (Meistrich 2013, Green et al. 2014). Interestingly, the only other correlation observed with sperm count was a positive one for prednisone. A recent study described the improvement of sperm concentration, sperm count, and sperm motility one month after a daily treatment with prednisone (Milardi et al. 2017). However, in that study, prednisone was given to oligozoospermic men with signs of accessory gland inflammation. Studies are needed to elucidate the role of prednisone on spermatogenesis during anti-cancer treatment and test its potential protective role.

Routine semen analysis does not provide information with respect to the quality of spermatozoa, more specifically in terms of their genomic integrity (Perreault et al. 2003, Delbes et al. 2010). This is of concern because pregnancy failure might be associated with immature or damaged sperm DNA and chromatin. Several assays were developed to quantify these parameters, aiming to better diagnose male infertility and improve ART success rates (Delbes et al. 2010). Most of these techniques were able to establish a correlation between genetic integrity of the human sperm and poor embryo development or failure of ART (Delbes et al. 2010). Studies on sperm from adult cancer patients showed that cancer itself and its treatment induced sperm chromatin and DNA damage that persist years post-chemotherapy (Delbes et al. 2007, Tempest et al. 2008, O'Flaherty et al. 2010, Chan et al. 2012, Bujan et al. 2014). In the case of cancer diagnosed before puberty, it is still unclear if the sperm produced years after remission of cancer contain more chromatin and DNA damage. To date, only two studies assessed sperm chromatin integrity in CCS and measured low risk of sperm damage compared to age-matched controls (Thomson et al. 2002, Romerius et al. 2010). But these two studies included CCS with a range of age at diagnosis without segregating the impact of pre-pubertal and post-pubertal treatment. In the present study, we also did not observe any difference in the average values of %DFI of %tail DNA between CCS and controls. However, by considering individual values and age at diagnosis, we observed that two CCS diagnosed after puberty displayed %DFI above 25% and the highest %tail DNA, suggesting that sperm chromatin and DNA might be more likely impaired if the cancer is diagnosed after puberty. Importantly, larger studies are greatly needed to further investigate if the maturity of the testis modulates the sensitivity to the treatments and the long-term impact of sperm quality.

In order to determine if the type or dose of anti-cancer drugs could affect sperm chromatin or sperm DNA integrity, we conducted correlation analyses similarly to what was done for sperm count. Interestingly, the cumulative dose of anthracyclines was highly significantly correlated to sperm DNA fragmentation. Out of the two anthracyclines received, the cumulative dose of doxorubicin was the one significantly correlated to both DNA fragmentation and DNA damage, while bleomycin dose was not associated with these parameters. To our knowledge, this is the first observation of such a correlation. Doxorubicin is a known gonadotoxic with multiple mechanisms of action (Wallace et al. 2011, Rochette et al. 2015). The suggestion that doxorubicin could induce long-term impact on sperm DNA integrity is supported by exposure to prepubertal rat to doxorubicin inducing sperm DNA breaks and chromatin denaturation in adult animals (Vendramini et al. 2012). Moreover, we have previously shown in our in vitro study that doxorubicin directly targets rat spermatogonia with stem cell characteristics (Beaud et al. 2017). One can therefore hypothesize that persistent DNA damage in the SSCs could be maintained years after treatment

ended, spread in the germline through spermatogenesis cycles, and in turn affect sperm quality. We demonstrated that doxorubicin induced DNA breaks in spermatogonia (Beaud et al. 2017) but more mechanistic studies are needed to better understand the long-term link between childhood cancer treatment and mature sperm chromatin quality. Moreover, such correlation will need to be replicated in larger studies.

Today, chemotherapy protocols include some restrictions to limit side effects (Pritchard-Jones et al. 2013). For example, when possible, the use of alkylating compounds, known for their long-term harmful systemic effects, is reduced. In parallel, to lower toxicity, more recent protocols tend to favor mixing several therapeutic agents at lower doses (Pinto et al. 2011). According to the present data and others, reducing the use of alkylating agents should greatly help decrease the risk of azoospermia for cancer survivors (Wallace et al. 1991, Thomson et al. 2002, van Casteren et al. 2009, Romerius et al. 2011, Green et al. 2014, Poganitsch-Korhonen et al. 2017). However, *in vitro* studies using model of SSCs showed that combination of drugs induced higher toxicity than each drug alone (Marcon et al. 2010, Beaud et al. 2017). Even a mixture without alkylating agents commonly used in hematologic cancer treatment (doxorubicin plus vincristine) induced spermatogonial cell death *in vitro* at doses comparable to clinical use (Beaud et al. 2017). Notably, such toxicity data are not available for each chemotherapeutic compound used to treat paediatric hematologic cancer, and the impact of chemotherapy cocktails on male germline remains largely unknown. Our present study evaluated the effect of drug combinations, but further studies are needed to evaluate the potential additivity on SSCs cytotoxicity and/or DNA damages.

## **CONCLUSION:**

The present study demonstrates that CCS have higher prevalence of infertility due to no or low sperm count. Azoo/oligozoospermia was correlated with the cumulative dose of alkylating agents received, but the possibility of infertility could not be predicted based on the age of diagnosis and treatment. As fifty percent of men diagnosed in 2000 to 2004 have no memory of counselling on the risk of infertility following childhood cancer treatment (Hohmann et al. 2011), our study underlines the importance of informing families about the potential long-term impact on male fertility before anti-cancer treatment starts, and this recommendation should be considered regardless of age at diagnosis. In parallel, we did not measure a difference in the incidence of sperm chromatin or DNA damage in CCS when compared to controls, but such impairment was correlated to cumulative dose of anthracyclines, and, in particular, to doxorubicin. It is therefore essential to determine the mechanisms by which chemotherapeutic

compounds can have long-term effects on sperm quality to help reduce the side effects of cancer treatment and improve the quality of life of CCS.

### **1.6 - Acknowledgements:**

The authors are grateful to Lorraine Lavigne (MUHC), who coordinated all visits and follow up of participants, Dr. Freemann, Abbish and Johnson (Oncology follow-up Clinics, MUHC) for active recruitment of participants. We would also like to acknowledge Xinfang Li and Marie-France Lusignan (MUHC Research institute) for their technical help with the SCSA®.

### **1.7 - Funding informations:**

This work was supported by a transition grant to GD from the Cole Foundation. OA is the recipient of a postdoctoral fellowship from the CIHR Training Program in Reproduction, Early Development, and the Impact on Health (REDIH), and a postdoctoral fellowship from the Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS). BR is a James McGill Professor.

### **1.8 - References:**

Albert O, Reintsch WE, Chan P & Robaire B (2016) HT-COMET: a novel automated approach for high throughput assessment of human sperm chromatin quality. *Hum Reprod* 31 938-946. [10.1093/humrep/dew030](https://doi.org/10.1093/humrep/dew030)

Baade PD, Youlden DR, Valery PC, Hassall T, Ward L, Green AC & Aitken JF (2010) Trends in incidence of childhood cancer in Australia, 1983-2006. *Br J Cancer* 102 620-626. [10.1038/sj.bjc.6605503](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605503)

Beaud H, van Pelt AM & Delbes G (2017) Doxorubicin and vincristine affect undifferentiated rat spermatogonia. *Reproduction*. [10.1530/REP-17-0005](https://doi.org/10.1530/REP-17-0005)

Brilhante O, Okada FK, Sasso-Cerri E, Stumpp T & Miraglia SM (2012) Late morfofunctional alterations of the Sertoli cell caused by doxorubicin administered to prepubertal rats. *Reproductive Biology and Endocrinology* 10. [10.1186/1477-7827-10-79](https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-79)

Bujan L, Walschaerts M, Brugnon F, Daudin M, Berthaut I, Auger J, Saias J, Szerman E, Moinard N, Rives N & Hennebicq S (2014) Impact of lymphoma treatments on spermatogenesis and sperm deoxyribonucleic

acid: a multicenter prospective study from the CECOS network. *Fertil Steril* 102 667-674 e663. 10.1016/j.fertnstert.2014.06.008

Chan D, Delbes G, Landry M, Robaire B & Trasler JM (2012) Epigenetic alterations in sperm DNA associated with testicular cancer treatment. *Toxicol Sci* 125 532-543. 10.1093/toxsci/kfr307

Chow EJ, Stratton KL, Leisenring WM, Oeffinger KC, Sklar CA, Donaldson SS, Ginsberg JP, Kenney LB, Levine JM, Robison LL, Shnorhavorian M, Stovall M, Armstrong GT & Green DM (2016) Pregnancy after chemotherapy in male and female survivors of childhood cancer treated between 1970 and 1999: a report from the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *Lancet Oncol* 17 567-576. 10.1016/S1470-2045(16)00086-3

Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT & Vogelsong KM (2010) World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 16 231-245. 10.1093/humupd/dmp048

Delbes G, Hales BF & Robaire B (2007) Effects of the chemotherapy cocktail used to treat testicular cancer on sperm chromatin integrity. *J Androl* 28 241-249; discussion 250-241. 10.2164/jandrol.106.001487

Delbes G, Hales BF & Robaire B (2010) Toxicants and human sperm chromatin integrity. *Mol Hum Reprod* 16 14-22. 10.1093/molehr/gap087

Delbes G, Herrero MB, Troeung ET & Chan PT (2013) The use of complimentary assays to evaluate the enrichment of human sperm quality in asthenoteratozoospermic and teratozoospermic samples processed with Annexin-V magnetic activated cell sorting. *Andrology* 1 698-706. 10.1111/j.2047-2927.2013.00106.x

Deurenberg P, Yap M & van Staveren WA (1998) Body mass index and percent body fat: a meta analysis among different ethnic groups. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22 1164-1171.

Evenson D & Wixon R (2006) Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reprod Biomed Online* 12 466-472.

Evenson DP (2017) Evaluation of sperm chromatin structure and DNA strand breaks is an important part of clinical male fertility assessment. *Transl Androl Urol* 6 S495-S500. 10.21037/tau.2017.07.20

Gordetsky J, van Wijngaarden E & O'Brien J (2012) Redefining abnormal follicle-stimulating hormone in the male infertility population. *BJU Int* 110 568-572. 10.1111/j.1464-410X.2011.10783.x

Green DM, Kawashima T, Stovall M, Leisenring W, Sklar CA, Mertens AC, Donaldson SS, Byrne J & Robison LL (2010) Fertility of male survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol* 28 332-339. 10.1200/JCO.2009.24.9037

Green DM, Liu W, Kutteh WH, Ke RW, Shelton KC, Sklar CA, Chemaitilly W, Pui CH, Klosky JL, Spunt SL, Metzger ML, Srivastava D, Ness KK, Robison LL & Hudson MM (2014) Cumulative alkylating agent exposure and semen parameters in adult survivors of childhood cancer: a report from the St Jude Lifetime Cohort Study. *Lancet Oncol* 15 1215-1223. 10.1016/S1470-2045(14)70408-5

Green DM, Whitton JA, Stovall M, Mertens AC, Donaldson SS, Ruymann FB, Pendergrass TW & Robison LL (2003) Pregnancy outcome of partners of male survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol* 21 716-721.

Hohmann C, Borgmann-Staudt A, Rendtorff R, Reinmuth S, Holzhausen S, Willich SN, Henze G, Goldbeck L & Keil T (2011) Patient counselling on the risk of infertility and its impact on childhood cancer survivors: results from a national survey. *J Psychosoc Oncol* 29 274-285. 10.1080/07347332.2011.563344

Kaatsch P (2010) Epidemiology of childhood cancer. *Cancer Treat Rev* 36 277-285. 10.1016/j.ctrv.2010.02.003

Lirdi LC, Stumpp T, Sasso-Cerri E & Miraglia SM (2008) Amifostine protective effect on cisplatin-treated rat testis. *Anat Rec (Hoboken)* 291 797-808. 10.1002/ar.20693

Marcon L, Zhang X, Hales BF, Nagano MC & Robaire B (2010) Development of a short-term fluorescence-based assay to assess the toxicity of anticancer drugs on rat stem/progenitor spermatogonia in vitro. *Biol Reprod* 83 228-237. 10.1095/biolreprod.110.083568

Marcon L, Zhang X, Hales BF, Robaire B & Nagano MC (2011) Effects of chemotherapeutic agents for testicular cancer on rat spermatogonial stem/progenitor cells. *J Androl* 32 432-443. 10.2164/jandrol.110.011601

Meistrich ML (2013) Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis in humans. *Fertil Steril* 100 1180-1186. 10.1016/j.fertnstert.2013.08.010

Milardi D, Luca G, Grande G, Ghezzi M, Caretta N, Brusco G, De Filipo G, Marana R, Pontecorvi A, Calafiore R, Foresta C & Garolla A (2017) Prednisone treatment in infertile patients with oligozoospermia and accessory gland inflammatory alterations. *Andrology* 5 268-273. 10.1111/andr.12300

O'Flaherty C, Hales BF, Chan P & Robaire B (2010) Impact of chemotherapeutics and advanced testicular cancer or Hodgkin lymphoma on sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril* 94 1374-1379. 10.1016/j.fertnstert.2009.05.068

O'Flaherty C, Vaisheva F, Hales BF, Chan P & Robaire B (2008) Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy. *Hum Reprod* 23 1044-1052. 10.1093/humrep/den081

Okada FK, Stumpp T & Miraglia SM (2009) Carnitine reduces testicular damage in rats treated with etoposide in the prepubertal phase. *Cell Tissue Res* 337 269-280. 10.1007/s00441-009-0801-2

Perreault SD, Aitken RJ, Baker HW, Evenson DP, Huszar G, Irvine DS, Morris ID, Morris RA, Robbins WA, Sakkas D, Spano M & Wyrobek AJ (2003) Integrating new tests of sperm genetic integrity into semen analysis: breakout group discussion. *Adv Exp Med Biol* 518 253-268.

Pinto AC, Moreira JN & Simões S (2011) *Combination chemotherapy in cancer: Principles, evaluation and drug delivery strategies*: INTECH Open Access Publisher.

Poganitsch-Korhonen M, Masliukaite I, Nurmio M, Lahteenmaki P, van Wely M, van Pelt AM, Jahnukainen K & Stukenborg JB (2017) Decreased spermatogonial quantity in prepubertal boys with leukaemia treated with alkylating agents. *Leukemia*. 10.1038/leu.2017.76

Prasad PK, Bowles T & Friedman DL (2010) Is there a role for a specialized follow-up clinic for survivors of pediatric cancer? *Cancer Treat Rev* 36 372-376. 10.1016/j.ctrv.2010.02.014

Pritchard-Jones K, Pieters R, Reaman GH, Hjorth L, Downie P, Calaminus G, Naafs-Wilstra MC & Steliarova-Foucher E (2013) Sustaining innovation and improvement in the treatment of childhood cancer: lessons from high-income countries. *Lancet Oncol* 14 e95-e103. 10.1016/S1470-2045(13)70010-X

Reulen RC, Winter DL, Frobisher C, Lancashire ER, Stiller CA, Jenney ME, Skinner R, Stevens MC & Hawkins MM (2010) Long-term cause-specific mortality among survivors of childhood cancer. *JAMA* 304 172-179. 10.1001/jama.2010.923

Revel A & Revel-Vilk S (2008) Pediatric fertility preservation: is it time to offer testicular tissue cryopreservation? *Mol Cell Endocrinol* 282 143-149. 10.1016/j.mce.2007.11.003

Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ, Clegg L, Horner M, Howlader N, Eisner MP & Reichman M. (2007). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2004*, National Cancer Institute.

Rochette L, Guenancia C, Gudjoncik A, Hachet O, Zeller M, Cottin Y & Vergely C (2015) Anthracyclines/trastuzumab: new aspects of cardiotoxicity and molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 36 326-348. 10.1016/j.tips.2015.03.005

Romerius P, Ståhl O, Moëll C, Relander T, Cavallin-Ståhl E, Gustafsson H, Thapper KL, Jepson K, Spanò M, Wiebe T, Giwercman YL & Giwercman A (2010) Sperm DNA integrity in men treated for childhood cancer. *Clinical Cancer Research* 16 3843-3850.

Romerius P, Stahl O, Moell C, Relander T, Cavallin-Stahl E, Wiebe T, Giwercman YL & Giwercman A (2011) High risk of azoospermia in men treated for childhood cancer. *Int J Androl* 34 69-76. 10.1111/j.1365-2605.2010.01058.x

Steliarova-Foucher E, Colombet M, Ries LAG, Moreno F, Dolya A, Bray F, Hesselning P, Shin HY & Stiller CA (2017) International incidence of childhood cancer, 2001-10: a population-based registry study. *Lancet Oncol* 18 719-731. 10.1016/s1470-2045(17)30186-9

Stensheim H, Klungsoyr K, Skjaerven R, Grotmol T & Fossa SD (2013) Birth outcomes among offspring of adult cancer survivors: a population-based study. *Int J Cancer* 133 2696-2705. 10.1002/ijc.28292

Tempest HG, Ko E, Chan P, Robaire B, Rademaker A & Martin RH (2008) Sperm aneuploidy frequencies analysed before and after chemotherapy in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients. *Hum Reprod* 23 251-258. 10.1093/humrep/dem389

Thomson AB, Campbell AJ, Irvine DS, Anderson RA, Kelnar CJH & Wallace WHB (2002) Semen quality and spermatozoal DNA integrity in survivors of childhood cancer: A case-control study. *Lancet* 360 361-367.

Trama A, Botta L, Foschi R, Ferrari A, Stiller C, Desandes E, Maule MM, Merletti F & Gatta G (2016) Survival of European adolescents and young adults diagnosed with cancer in 2000-07: population-based data from EURO CARE-5. *Lancet Oncol* 17 896-906. 10.1016/S1470-2045(16)00162-5

Tremblay A, Beaud H & Delbès G (2017) Effets transgénérationnels des chimiothérapies : l'exposition du père influence-t-elle la santé des générations futures ? *Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie* 45 609-618. <https://doi.org/10.1016/j.gofs.2017.09.004>

van Casteren NJ, van der Linden GH, Hakvoort-Cammel FG, Hahlen K, Dohle GR & van den Heuvel-Eibrink MM (2009) Effect of childhood cancer treatment on fertility markers in adult male long-term survivors. *Pediatr Blood Cancer* 52 108-112. 10.1002/pbc.21780

Vendramini V, Robaire B & Miraglia SM (2012) Amifostine-doxorubicin association causes long-term prepubertal spermatogonia DNA damage and early developmental arrest. *Hum Reprod* 27 2457-2466. 10.1093/humrep/des159

Wallace WH, Anderson RA & Meirow D (2011). The effect of chemotherapy and radiotherapy on the human reproductive system. In *Principles and Practice of Fertility Preservation*, pp. 11-22. 10.1017/CBO9780511921896.005

Wallace WH, Shalet SM, Lendon M & Morris-Jones PH (1991) Male fertility in long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Int J Androl* 14 312-319.

Wasilewski-Masker K, Seidel KD, Leisenring W, Mertens AC, Shnorhavorian M, Ritenour CW, Stovall M, Green DM, Sklar CA, Armstrong GT, Robison LL & Meacham LR (2014) Male infertility in long-term survivors of pediatric cancer: a report from the childhood cancer survivor study. *J Cancer Surviv* 8 437-447. 10.1007/s11764-014-0354-6

## **CHAPITRE 2 : DOXORUBICIN AND VINCRIStINE AFFECT UNDIFFERENTIATED RAT SPERMATOGONIA**

**Titre en français :** La doxorubicine et la vincristine affectent les spermatogonies indifférenciées de rat.

**Auteurs :** Hermance BEAUD<sup>1</sup>, Ans Van PELT<sup>2</sup>, Géraldine DELBES<sup>1</sup>.

**Affiliations :**

<sup>1</sup>INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, (Québec) Canada.

<sup>2</sup>Center for Reproductive Medicine, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, the Netherlands.

**Référence :** Reproduction, 2017 Jun;153(6):725-735. doi: 10.1530/REP-17-0005. Epub 2017 Mar 3.

**Contributions des différents auteurs :**

HB : Exécution des expériences, analyse des données et rédaction de l'article.

AVP : Don de la lignée cellulaire GC-6spg, conseils pratiques et correction de l'article

GD : Conception du projet, analyse des données et rédaction/correction de l'article

**Mise en contexte du chapitre :**

Dans le chapitre précédent, nous avons mis en évidence une corrélation entre la proportion d'anomalies de la chromatine des spermatozoïdes, mesurées par SCSA et HT-COMET, et la dose cumulée de doxorubicine reçue. De nombreuses années se sont écoulées entre le traitement de chimiothérapies administré pendant l'enfance, et les analyses que nous avons faites à l'âge adulte. De nombreux facteurs ont pu s'ajouter aux conséquences des traitements, tel que des expositions environnementales ou d'autres antécédents médicaux. Par conséquent, une relation stricte de cause à effet ne peut pas être établie entre ces altérations de la chromatine des spermatozoïdes et la dose de doxorubicine. Dans ce deuxième chapitre, nous voulons caractériser les mécanismes de toxicité de la doxorubicine. Plus particulièrement, à l'aide d'une lignée de spermatogonies de rat aux caractéristiques de cellules souches, nous souhaitons déterminer si la doxorubicine induit des cassures de l'ADN, et si les spermatogonies ont la capacité de déclencher des mécanismes de défense contre l'action de la doxorubicine.

Avant d'être soumis pour publication, ces résultats ont été communiqués par présentation affiche et orale dans de multiples congrès locaux de 2014 à 2016 (Réseau Québécois en Reproduction, Toxen, Biomed, et

Congrès Armand-Frappier). J'ai obtenu le prix de la troisième meilleure présentation orale lors du congrès Armand-Frappier. Ces résultats ont également fait l'objet de présentations dans le congrès national de la Société de Toxicologie du Canada (STC) en 2014 à Ottawa, et le congrès international de la Society for the Study of Reproduction (SSR) en 2016 à San Diego. Pour chacun de ces congrès, j'ai obtenu respectivement la bourse de voyage de la fondation Armand-Frappier et la bourse Larry Ewing Memorial Trainee Travel Fund de la SSR.

*H.Beaud, AM. Van Pelt, G.Delbès. "Cytotoxicity of chemotherapeutic compounds used to treat pediatric leukemia on rat spermatogonia" Society of Toxicology of Canada, 46<sup>e</sup> Symposium.*

*H.Beaud, AM. Van Pelt, G. Delbès. "DNA repair in spermatogonia after exposure to doxorubicin alone or in mixture with vincristine" Society for the Study of Reproduction, 49<sup>e</sup> Symposium.*

### **Résumé en français :**

Les médicaments anti-cancéreux, tels que les agents alkylants, peuvent affecter la fertilité en ciblant l'ADN des spermatogonies souches en division. De ce fait, pour diminuer les effets secondaires, d'autres agents de chimiothérapies sont utilisés. Cependant, le potentiel génotoxique de ces composés sur les spermatogonies souches est encore peu connu. De plus, les mécanismes de réparation de l'ADN dans les spermatogonies souches sont peu décrits. Afin de modéliser des traitements couramment utilisés contre le cancer, et dépourvus d'agents alkylants, nous avons évalué l'impact d'une exposition à la doxorubicine et à la vincristine, seuls ou en combinaison (MIX), sur une lignée de spermatogonies de rat ayant des propriétés de cellules souches (GC-6spg). La vincristine seule a induit un arrêt du cycle cellulaire et la mort cellulaire sans induire de génotoxicité. D'autre part, la doxorubicine et le MIX ont induit une mort cellulaire dose-dépendante. De plus, la doxorubicine et le MIX ont induit des cassures de l'ADN, mesurées par le test de COMET. Afin de comprendre quelle voie de réparation de l'ADN est activée dans les spermatogonies après exposition à la doxorubicine, nous avons criblé l'expression de 75 gènes impliqués dans la réparation de l'ADN. De façon intéressante, tous les gènes étaient exprimés constitutivement dans les GC-6spg, suggérant un fort potentiel de réponse à un stress génotoxique. Les traitements avec la doxorubicine ont affecté l'expression de 16 gènes ( $>1.5$  d'amplification ;  $P < 0.05$ ) impliqués dans le cycle cellulaire, les voies de réparation par excision de base ou de nucléotide, par recombinaison homologue et par ligature de chromosome non homologue (NHEJ). L'augmentation significative de CDKN1A et XRCC1 suggère un arrêt du cycle cellulaire et l'implication d'une voie de réparation alternative à celle de NHEJ en réponse aux cassures de l'ADN induites par la doxorubicine. Ensemble, nos résultats supportent l'idée que

les spermatogonies indifférenciées ont la capacité de répondre à des dommages à l'ADN induits par des composés de chimiothérapies et échappent à l'accumulation de cassure de l'ADN.

## **2.1 - Abstract :**

Anticancer drugs, such as alkylating agents, can affect male fertility by targeting the DNA of proliferative spermatogonial stem cells (SSC). Therefore, to reduce such side effects, other chemotherapeutics are used. However, less is known about their potential genotoxicity on SSC. Moreover, DNA repair mechanisms in SSC are poorly understood. To model treatments deprived of alkylating agents that are commonly used in cancer treatment, we tested the impact of exposure to doxorubicin and vincristine, alone or in combination (MIX), on a rat spermatogonial cell line with SSC characteristics (GC-6spg). Vincristine alone induced a cell cycle arrest and cell death without genotoxic impact. On the other hand, doxorubicin and the MIX induced a dose-dependent cell death. More importantly, doxorubicin and the MIX induced DNA breaks, measured by the COMET assay, at a non-cytotoxic dose. To elucidate which DNA repair pathway is activated in spermatogonia after exposure to doxorubicin, we screened the expression of 75 genes implicated in DNA repair. Interestingly, all were expressed constitutively in GC-6spg, suggesting great potential to respond to genotoxic stress. Doxorubicin treatments affected the expression of 16 genes (>1.5 fold change;  $P < 0.05$ ) involved in cell cycle, base/nucleotide excision repair, homologous recombination and non-homologous end joining (NHEJ). The significant increase in CDKN1A and XRCC1 suggest a cell cycle arrest and implies an alternative NHEJ pathway in response to doxorubicin-induced DNA breaks. Together, our results support the idea that undifferentiated spermatogonia have the ability to respond to DNA injury from chemotherapeutic compounds and escape DNA break accumulation.

## **2.2 - Introduction :**

Over the past 30 years, the quality of life of the growing population of cancer survivors has been an increasing healthcare issue. Indeed, among other side effects, chemotherapy treatment can affect the fertility of men, with an increased risk of azoospermia, incidence of aneuploidy and abnormal chromatin structure in sperm even two years after chemotherapy (Meistrich 1986, Tempest *et al.* 2008, O'Flaherty *et al.* 2012). This is of concern because human spermatozoa with damaged chromatin and/or DNA are linked to poor embryo development and assisted reproductive technology (ART) failure (Delbes *et al.* 2010a). The fact that sperm quality is impaired in cancer survivors even years after treatment suggests

that these long-term side effects originate from DNA damage that occurred in spermatogonial stem cells (SSC) after treatment (Marcon *et al.* 2010). In fact, one can hypothesize that long-term fertility injury comes from unrepaired DNA damage in SSC spreading in the germline through spermatogenesis cycles, and in turn affects sperm quality. As anticancer drugs target cell division, actively dividing SSCs are indeed the target of most chemotherapeutic agents (Hou *et al.* 2005, Drumond *et al.* 2011, Marcon *et al.* 2011, Zohni *et al.* 2012, Liu *et al.* 2014).

Alkylating agents are known to impair the germline through the induction of DNA crosslinks and the depletion of spermatogonia (Meistrich *et al.* 1992, Aguilar-Mahecha *et al.* 2002, Drumond *et al.* 2011, Green *et al.* 2014). Therefore, nowadays, efforts are made to decrease the use of alkylating agents in chemotherapy treatment with the aim of reducing side effects such as gonadotoxicity. Instead, cocktails of chemotherapy could include anthracyclines and alkaloids that are less mutagenic. Nevertheless, doxorubicin (DXO), one of the most used anthracyclines, is described as medium risk for fertility by inducing only a temporary azoospermia (Howell & Shalet 2005, Wallace *et al.* 2005, Meistrich 2009). Moreover, in rat, doxorubicin-exposed SSC in prepubertal animals produced long-term damage to mature sperm DNA that might be the cause of compromised conceptus development and reduced pregnancy outcome (Hou *et al.* 2005, Vendramini *et al.* 2012). More studies are needed to better understand the mechanisms by which such compounds affect SSC.

Maintenance of paternal genome integrity is essential to prevent the risks of paternally mediated adverse progeny outcomes later in life (Tesarik *et al.* 2004, Vaisheva *et al.* 2007). Therefore, the germline must be armed with DNA repair systems to reverse potential damage. DNA double-strand breaks (DSB), the most deleterious DNA injury, are classically repaired by the non-homologous end-joining (NHEJ) and homologous recombination (HR) pathways (Rothkamm *et al.* 2003). Components of both pathways have been shown to be expressed in the male germline suggesting repair ability throughout spermatogenesis (Ozturk & Demir 2011). However, yet, these mechanisms are still poorly understood in SSC, mainly because these cells are rare and hard to purify. In fact, it is only possible to enrich germ cell population in SSC (Yeh & Nagano 2009). As a consequence, most prior studies analyzed DNA repair in a mixed population of spermatogonia (Richardson *et al.* 2000, Intano *et al.* 2002, Hamer *et al.* 2003, Xu *et al.* 2005). Using animal knockout models or pharmacological inhibitors, some specific components of DNA repair have been shown to be necessary for the maintenance of spermatogenesis, suggesting an essential role in the survival of SSC. This is the case for the ATM protein that is involved in NHEJ (Takubo *et al.* 2008, Rube *et al.* 2011) or MGMT that represents an independent DNA repair pathway (Thompson *et al.* 2000). However,

to our knowledge, the response of SSC to chemotherapy has not been fully characterized with respect to DNA repair capability and mechanisms. We have previously established the first rat spermatogonial cell line, GC-6spg, with SSC characteristics (Van Pelt et al. 2002). This cell line can be cultured without feeder cells and is capable of homing to the basal membrane of seminiferous tubules after testicular transplantation. This, therefore, provides an excellent model to study the mechanisms by which chemotherapeutic agents affect SSC. We support the hypothesis that SSCs have the ability to trigger DNA repair. The goal of the present study was to characterize the repair gene pathways activated in SSC in response to commonly used combination of anthracyclines and alkaloids. Using DXO and VCR as model anthracyclines and alkaloids respectively, we first characterized their cytotoxicity and genotoxicity on GC-6spg. As VCR is an inhibitor of microtubule polymerization, we did not expect to measure the genotoxic effect. On the other hand, DXO is known to induce DNA breaks, and we analyzed its effect alone or in combination with VCR.

## **2.3 – Materials and Methods :**

### **Chemicals and solutions**

Culture medium was modified Eagle's medium (MEM) supplemented with non-essential amino acids (1×), HEPES (15 mM), gentamicin (40 µg/mL), penicillin/streptomycin (100 U/mL), l-glutamine (4 mM), FBS Australian origin (2.5%), G418 (200 µg/mL), recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF; 2 ng/mL) (Thermo Fisher Scientific), sodium bicarbonate (0.12%), platelet-derived growth factor-BB (10 ng/mL), forskolin (20 µM), 17β-estradiol (1 nM) (Sigma) and recombinant human LIF (10 ng/mL) (PeproTech, Rocky Hill, USA). VCR sulfate (CAS #2068-78-2) and DXO hydrochloride (CAS #25316-40-9) were obtained from LKT Laboratories Inc (St Paul, MN, USA). Stock solutions of VCR, DXO and the MIX 1:1 were made up at 1000× in sterile water and stored at –80°C. Trypsin/EDTA 0.25% was from Thermo Fisher Scientific (#25200-056).

### **Cell culture and treatment**

The GC-6spg cell line was maintained at 32°C and 5% CO<sub>2</sub>, as described previously (Van Pelt et al. 2002). Cells were passaged once per week, and the culture medium was changed after three days. The day before treatment, GC-6spg were seeded at 19,000 cells/cm<sup>2</sup>. 1000× stock solutions of DXO, VCR and their mixture were diluted to 1× (1 nM–10 µM) into the culture media immediately before use, and control cells received

1:1000 of the water vehicle. GC-6spg cells were exposed to 1 nM–10  $\mu$ M DXO, VCR or their MIX for 24–72 h. The range of concentrations was chosen to first establish the subtoxic dose based on cell death and proliferation assays, and further select sub-lethal dose for characterizing the capacity for DNA repair in this cell line. In a recovery study, cells were exposed to 0.1  $\mu$ M DXO for 24 h and further maintained in control medium for 5 days. For viability and BrdU incorporation assays, cells were proceeded directly in culture plates, whereas they were resuspended by trypsin treatment (3 min at room temperature) for apoptosis and COMET assays and for RNA or protein extractions.

### **Viability assay**

Cell viability after treatment was investigated using the MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide) assay as previously described with few modifications (Riss et al. 2004). Briefly, GC-6spg were incubated in a 96-well plate with 0.05 mg/ well of MTT (#M5655, Sigma), diluted in culture medium for 3 h at 32°C, after which half of the medium was replaced by DMSO/isopropanol (1:1). The optical density was revealed by spectrometry at 540 nm and expressed as a percentage of formazan formation in control cells treated with vehicle. Wells without cells served as a blank, and cells exposed for at least 24 h to 10% DMSO were used as positive control.

### **Apoptosis and cell death assay**

Apoptosis and cell death were quantified by flow cytometry using the AnnexinV-FITC kit from Miltenyi Biotec (Auburn, CA, USA) as previously described (Delbes et al. 2013). According to the manufacturer's recommendations, resuspended GC-6spg cells were incubated with Annexin-V-FITC (10  $\mu$ L per 10<sup>5</sup> cells) for 15 min in the dark at room temperature. After one wash, cells were resuspended in propidium iodide (PI) solution (1:60) and immediately analyzed using the FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada). Experimental gates were established using unstained GC-6spg as a negative threshold value. GC-6spg treated 16 h with 5% DMSO were used as positive control. Data were analyzed using the 3D WinList 8.0 software (Verity Software House, Topsham, USA). The Annexin V<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup> represents the viable cells, PI-positive cells are dead and cells Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> are apoptotic.

### **Cell proliferation assay**

Proliferation was evaluated by bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation using the FITC BrdU kit (BD Biosciences) as previously described (Delbes et al. 2007a). Briefly, cells were fixed after a 4-h incubation at 32°C with 1 mM BrdU followed by immunofluorescent staining according to the manufacturer's recommendations (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Cells were visualized using the Nikon Eclipse Ti inverted fluorescent microscope equipped with a DS-Ri2 camera (Nikon). The BrdU incorporation index (percentage of labeled cells) was obtained by counting at least 100 cells spread over 4 random areas.

### **DNA break assay**

Single- and double-strand DNA breaks were evaluated using the alkaline COMET assay, as previously described with some modifications (Delbes et al. 2007b). Briefly, 2000 cells were resuspended 1:10 in low melting point agarose and evenly spread onto slides in duplicate (Trevigen Inc., Gaithersburg, MD, USA). After the gel solidified, slides were incubated in lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO and 1% Triton X-100; final pH 10) for 30 min on ice in the dark. Slides were then immersed in a freshly prepared alkaline solution (1 mM EDTA, pH 13) for 30 min at room temperature before electrophoresis was performed in the same solution at 1 V/cm for 30 min in the dark. Slides were then fixed in ice-cold 70% ethanol for 5 min and stored at room temperature. Sample IDs were hidden from the experimenter before storing images. DNA was stained using SYBR Gold solution (Life Technologies) (1:30,000 in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) and immediately analyzed using the Nikon Eclipse Ti inverted fluorescent microscope equipped with a DS-Ri2 camera (Nikon). Fifty cells per replicate were randomly analyzed for a total of 100 cells per sample, and fluorescent images were scored for COMET parameters (KOMET 6.0; Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, UK) (Andor Technology Ltd., Belfast, UK).

### **RNA extraction**

Total RNA was extracted from GC-6spg ( $0.3\text{--}1.9 \times 10^6$  cells) using the RNeasy mini kit according to the manufacturer's recommendations (Qiagen). Residual genomic DNA was degraded by deoxyribonuclease treatment for 15 min. RNA quality and quantity was evaluated by using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

### **Gene expression analysis by PCR array**

RNA (1 µg) was reverse transcribed with the RT2 first strand kit (Qiagen). cRNA (9 ng) was amplified in the CFX96 qPCR cycler (Bio-Rad) using the DNA damage signaling PCR array RT2 Profile (#PARN-029ZD, Qiagen), according to the manufacturer's instructions. PCR efficiency and genomic DNA contamination were evaluated using the control supplied by the manufacturer. The analysis was done using the  $\Delta\Delta C_t$  method ([pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php](http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php)). All data were normalized using Ldha and Rplp1 housekeeping genes. Statistical significance was tested by nonparametric ANOVA using a P value of 0.05, and probe sets from that list were filtered for those that had an expression of a minimum of 1.5-fold.

### **Protein extraction and Western blotting**

Protein was extracted from GC-6spg (0.5–3 × 10<sup>6</sup> cells) in RIPA buffer (150 mM NaCl; 1% Triton; 0.5% deoxycholate; 0.1% SDS and 50 mM Tris pH 8) containing protease inhibitor cocktail (Roche) using a needle (Gauge 20) and/or sonication (Q125, QSonica, Newtown, CT, USA) and centrifuged at 10,000 g for 8 min at 4°C. The remaining supernatant from each sample was aliquoted and stored at –80°C for protein assay (Pierce BCA, Thermo Fisher Scientific) and Western blotting. 10–15 µg protein of each sample were separated with 10% SDS-PAGE and immediately transferred onto PVDF membrane (Trans-Blot Turbo RTA transfer kit, Bio-Rad) using the Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). Total lane protein was stained with reversible MemCode protein stain PVDF (Thermo Scientific, Pierce) for normalization of the signal blotting. Membranes were blocked in 5% milk diluted in Tris buffer containing 0.1% Tween and further probed overnight with primary antibodies against P21 (1:2500; Abcam ab109199) or XRCC1 (1:200; Abcam ab1838) diluted in 3% non-fat milk. Horseradish peroxidase-coupled anti-rabbit or anti-mouse antibodies (Cell Signaling Technology) were used to detect antigen–antibody interactions by enhanced chemiluminescence (Bio-Rad). Capturing the signal was performed with Chemidoc MP Imaging Systems and quantified by densitometric analysis using Image Lab 5.2.1 software (Bio-Rad).

### **Statistical analysis**

All experiments were repeated at least three times in duplicate. Statistical analyses were done using GraphPad Prism, version 5.01 (GraphPad Software). Dose- and time- dependent cytotoxicity due to the treatments was determined using a 2-way analysis of variance followed by the Bonferroni test (P < 0.05).

Dose-dependent effects of the treatments on apoptosis, DNA breaks and protein expression were analyzed using a 1-way analysis of variance followed by the Dunn's post hoc tests ( $P < 0.05$ ). Time-dependent effects after treatment arrest compared to the time-matched control group on cytotoxicity, proliferation and DNA breaks were analyzed using a 2-way analysis of variance followed by the Bonferroni test ( $P < 0.05$ ).

## **2.4 - Results :**

### **Cytotoxicity of VCR, DXO and the MIX**

The cytotoxicity of VCR (1 nM–10  $\mu$ M), DXO (1 nM–10  $\mu$ M) and their MIX (1 nM–1  $\mu$ M) was tested on the GC-6spg cell line using the MTT assay, after 24, 48 and 72 h of exposure (Fig. 1). A dose- and time-dependent cytotoxicity was observed for VCR (Fig. 1A) and DXO (Fig. 1B), with a lowest observed adverse effect level (LOAEL) of 0.1  $\mu$ M at 72 h for both compounds (Table 1). Importantly, the effect of the MIX was more cytotoxic than each compound alone as we measured an LOAEL of 0.01  $\mu$ M at 72 h (Fig. 1C and Table 1), suggesting a synergic effect of the mixture. Interestingly, the dose–response curves in response to the two compounds alone showed very different shapes. At each time, the maximum effect of VCR was obtained with 0.1  $\mu$ M. Moreover, although the maximum effect of exposure to VCR was a significant reduction of half of the MTT signal (Fig. 1A), exposure to DXO drastically shut off the MTT signals (Fig. 1B). On the other hand, the MIX showed similar response curves to DXO alone. To further understand the differential cytotoxicity response curves in response to VCR, DXO or their MIX, the Annexin V /propidium iodide assay was done to quantify apoptosis and cell death in GC-6spg (Fig. 2). After 48 h of treatment, VCR alone induced a significant increase in apoptosis and cell death from 0.1  $\mu$ M (Fig. 2A), suggesting that the maximum of cytotoxicity could be due to a balance between cell proliferation and cell death. On the other hand, DXO and the MIX did not induce apoptosis but cell death significantly at 1  $\mu$ M and 0.1  $\mu$ M respectively (Fig. 2B and C), corresponding to the doses when the MTT signal shut off at that time.

### **Induction of DNA breaks by DXO and the MIX but not VCR**

To assess the potential of VCR, DXO and the MIX to induce DNA strand breaks on GC-6spg, we measured the % tail DNA using the COMET assay in alkaline conditions after 24 h of exposure to increasing doses (Fig. 3). Although we did not observe any effect of VCR at the doses tested, exposure to DXO and the MIX from 0.1  $\mu$ M significantly increased the % tail DNA in GC-6spg. These effects were observed on GC-6spg at

non-cytotoxic doses of DXO and the MIX (0.1  $\mu$ M; Fig. 1B and C). In addition, no difference was observed between exposure to DXO alone or the MIX, suggesting that there are no synergistic effects on DNA breaks between the two compounds. Because we aimed to determine the capacity of spermatogonia to respond to genotoxic stress in a non-cytotoxic condition, we restricted further analysis to the exposure to DXO or MIX at 0.1  $\mu$ M for 24 h.

### **DNA break recovery after DXO treatment**

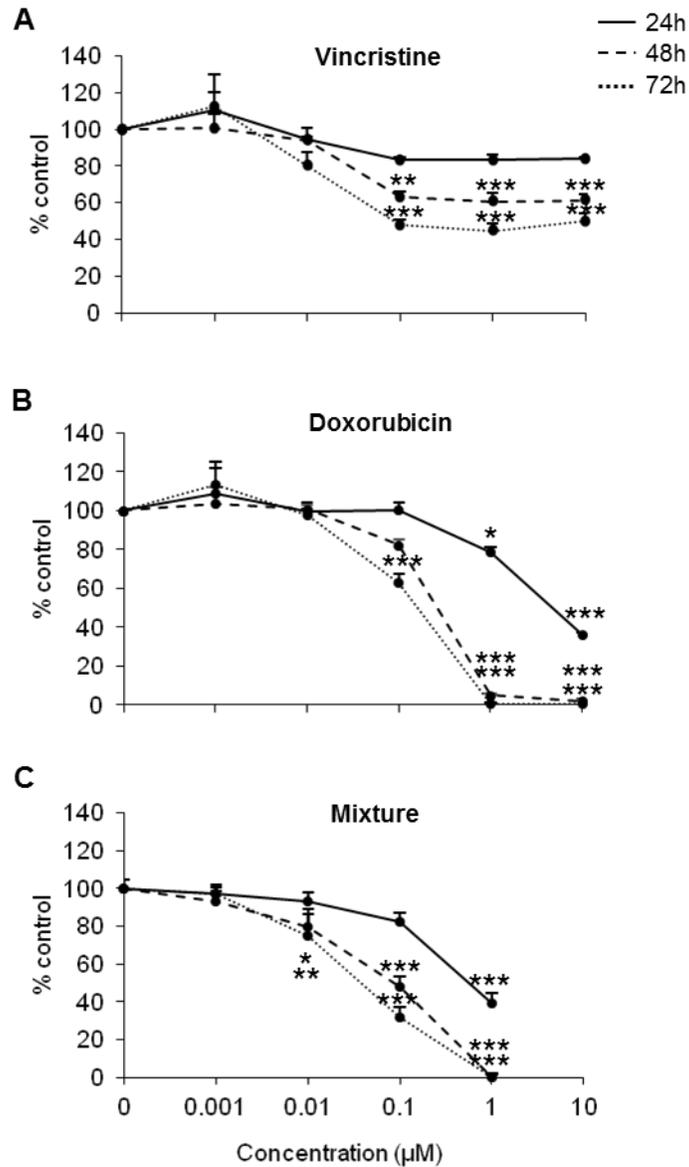
To determine the ability of spermatogonia to recover from exposure to 0.1  $\mu$ M DXO for 24 h, we maintained the cells after treatment for up to 5 days in control conditions and assessed cell viability, proliferation and the amount of DNA breaks (Fig. 4A). From day 0 (R0) to day 5 (R5) of the recovery period, cell number and viability were indirectly assessed using the MTT assay (Fig. 4B), and proliferation was evaluated by the BrdU incorporation index (Fig. 4C). In control conditions, the regular increasing MTT signal from R0 to R5 indicated a significant increase in cell number (Fig. 4B). This was correlated with the active proliferation rate at R0 (Fig. 4C). However, we observed a decrease in the percentage of proliferating cells over time in control cells up to R5, which may be due to over confluence in culture wells at that stage (Fig. 4C). In parallel, DXO treated cells did not show any change in the MTT signal, which became significantly different from controls from R2 to R5 (Fig. 4B). The proliferation rate was also significantly lower in DXO-treated cells at R0 compared to that in controls and remained low throughout the recovery period. Interestingly, in three prolonged experiments, we observed an increasing number of cells in DXO-treated wells after about 13 days of recovery (data not shown). More importantly, using the COMET assay, we observed that the significant increase of DNA breaks induced by the treatment recovered with time (Fig. 4D). Indeed, although in control cells, we did not observe any change in the % tail DNA measured by the COMET assay from R0 to R5, the significant increase in the percentage of tail DNA measured in DXO-treated cells at R0 significantly decreased to become similar to the controls from R2 to R5.

### **Expression of genes involved in cell cycle and DNA damage signaling**

To further assess which DNA repair pathway is activated in spermatogonia after exposure to DXO, we screened the expression of 75 genes implicated in DNA repair using the DNA damage signaling PCR array RT2 (Supplementary Table 1). In control GC-6spg, we determined the level of expression of the 75 genes

involved in DNA repair according to their CT (Table 2). Most of the DNA repair genes studied are moderately to highly expressed in GC-6spg. We further showed that 0.1  $\mu$ M DXO and the MIX significantly affected the expression of 16 genes (14 and 13 genes respectively) with a fold-change at least 1.5-fold in GC-6spg (Fig. 5A, B and C). Out of the 16 deregulated genes, 11 were commonly affected by both treatments, 3 genes were exclusively activated by DXO (*Bard1*, *Cdc25c* and *Terf1*), and 2 others were exclusively changed by the MIX (*Gadd45g* and *Ung*). However, the genes that are significantly affected exclusively by one treatment are in fact also affected by the other but with lower significance or fold-change (Fig. 5C). Affected genes were further subdivided based on their known function. Out of the 16 significantly affected genes, 8 are linked to cell cycle and apoptosis and 8 others are actors of different DNA repair pathways (Fig. 5C). Interestingly, *Cdk1a* (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) was the most upregulated gene with a fold change of 11.17 after DXO treatment. Further analysis of the level of CDKN1A protein in GC-6spg after 24h exposure to 0.1  $\mu$ M DXO or MIX was done by Western blot. Although this protein was very weakly expressed in controls GC-6spg, CDKN1A protein level was significantly increased by each treatment (Fig. 6A). Most importantly, as shown in Fig. 5C, the expression of 8 genes implicated in DNA repair was affected by at least one of the treatments: 7 were upregulated (*Mgmt*, *Polh*, *Xrcc1*, *Rev1*, *Gadd45a/g* and *Bard1*) and 1 was downregulated (*Ung*). The expression of four of these genes (*Mgmt*, *Xrcc1*, *Gadd45a* and *Polh*) was similar to the control after exposure to the non-genotoxic dose of 0.01  $\mu$ M (Supplementary Fig. 1), showing that the DNA repair gene activation is DNA break dependent. Interestingly, these 8 genes cover different DNA repair pathways such as base/nucleotide excision repair (BER/NER), homologous recombination (HR), or non-homologous end-joining (NHEJ) (Supplementary Table 1), suggesting that no specific pathway is activated in response to exposure to DXO or the MIX. Because *Xrcc1* is known to play a key role in the BER and NHEJ pathways, we further quantified its protein level by Western blot. XRCC1 protein level was not affected by the exposure to DXO or MIX after 24h but was significantly increased after 48h exposure (Fig. 6B). Together, these data demonstrated the ability of GC-6spg to activate DNA repair pathways after exposure to DXO.

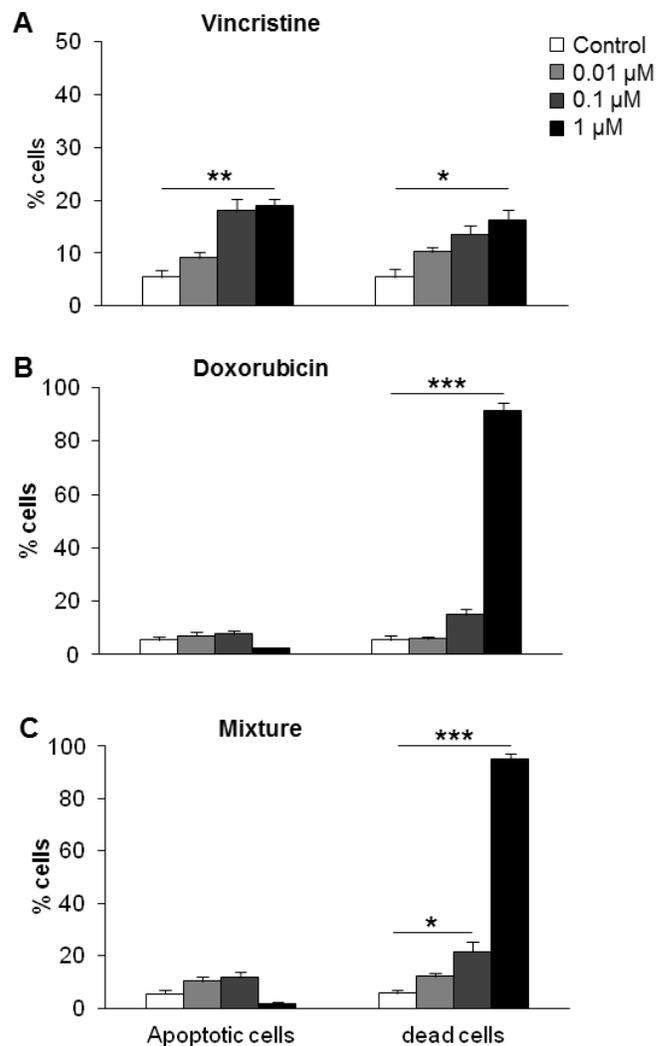
**Figure 1. Cytotoxicity of vincristine, doxorubicin, and their mixture on GC-6spg viability.** GC-6spg cells were exposed to vehicle (control), or to different concentrations of vincristine (A), doxorubicin (B), or their mixture 1:1 (C). Cytotoxicity was evaluated using the MTT assay after 24h, 48h, and 72h (A-C). Data are expressed as the % of control and represent the mean  $\pm$  SEM (n=4). Time (P<0.0001), and dose effects were analyzed by a two-way 2-way analysis of variance followed by the Bonferroni test. \*P<0.05 \*\*P<0.01 \*\*\*P<0.001 compared to the time-matched control group.



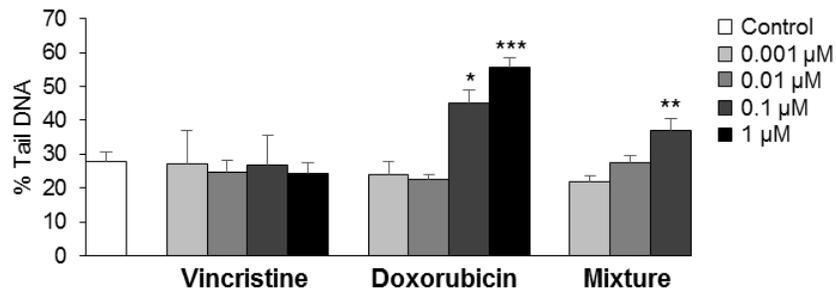
**Table 1. Determination of the Lowest Observed Adverse Effect Level (LOAEL) of doxorubicin, vincristine, and their mixture 1:1 on GC-6spg.** Cells were exposed to increasing doses of vincristine, doxorubicin, or their mixture 1:1. LOAEL was evaluated on cytotoxicity measured by MTT based on Figure 1.

LOAEL ( $\mu\text{M}$ )	24h	48h	72h
Vincristine	-	0.1	0.1
Doxorubicin	1	1	0.1
Mixture	1	0.01	0.01

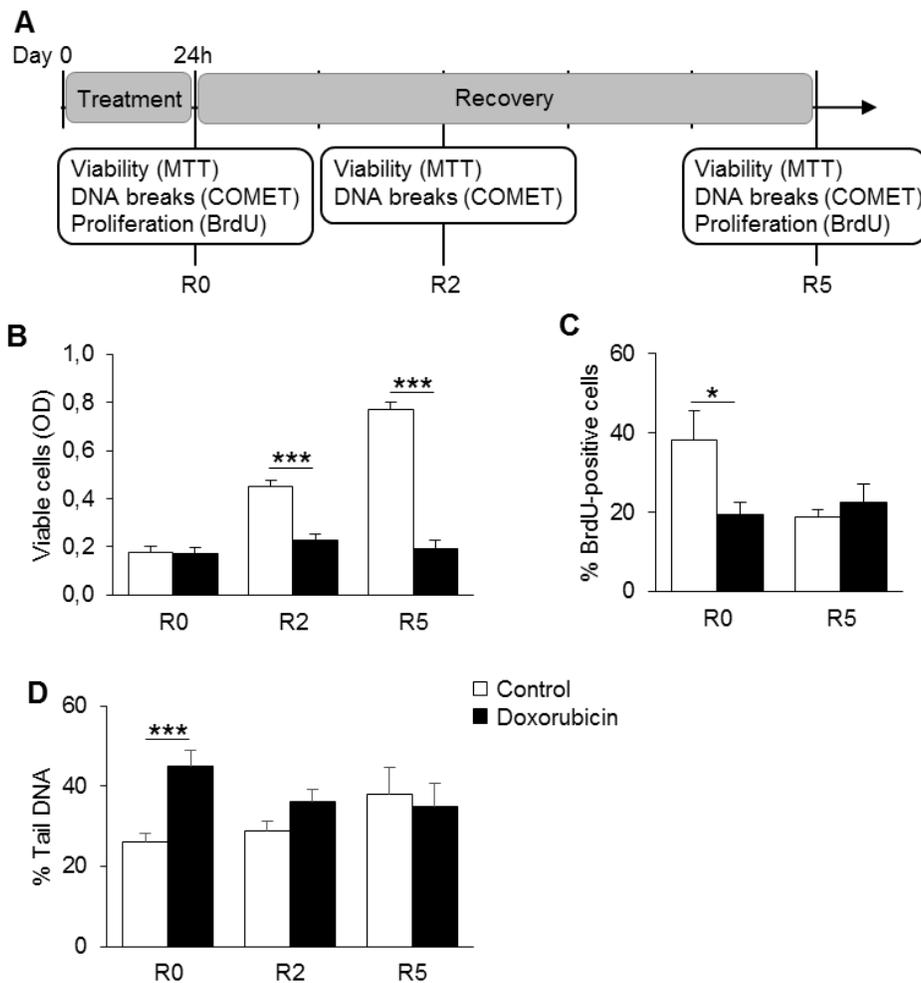
**Figure 2. Impact of vincristine, doxorubicin, and their mixture on apoptosis and cell death.** GC-6spg cells were exposed to vehicle (control), or to different doses of vincristine (A), doxorubicin (B), and their mixture 1:1 (C) for 48h. Percentages of apoptosis and cell death were quantified by annexin V and propidium iodide staining, respectively. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=4-6). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 using a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test to control group.



**Figure 3. Impact of vincristine, doxorubicin and their mixture on DNA breaks in GC-6spg.** DNA breaks were quantified using the COMET assay after 24h of exposure to vehicle (control), or different doses of vincristine, doxorubicin or their mixture 1:1. Data are expressed as the mean percentage of tail DNA  $\pm$  SEM (n=5-13). \*P<0.05 \*\*P<0.001 \*\*\*P<0.0001, using a one-way analysis of variance followed by a Dunnett's multiple comparison test to control group.



**Figure 4. Survival, proliferation, and DNA breaks in GC-6spg after 24h exposure to 0.1 $\mu$ M doxorubicin and after a recovery period.** GC-6spg cells were exposed to vehicle (control) or 0.1 $\mu$ M doxorubicin for 24h. Viability, proliferation, and DNA breaks were measured at the end of treatment (R0), or after a recovery period of 2 and 5 days (R2, R5) (A). Optical density (OD) measured after the MTT assay (n=3-5) (B), percentage BrdU-positive cells (n=3) (C), and percentage of tail DNA measured by the COMET assay (n=4-16) (D) are expressed as the mean  $\pm$  SEM and analysed by a two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test. \*P<0.05 \*\*P<0.01 \*\*\*P<0.001 compared to the time-matched control group.

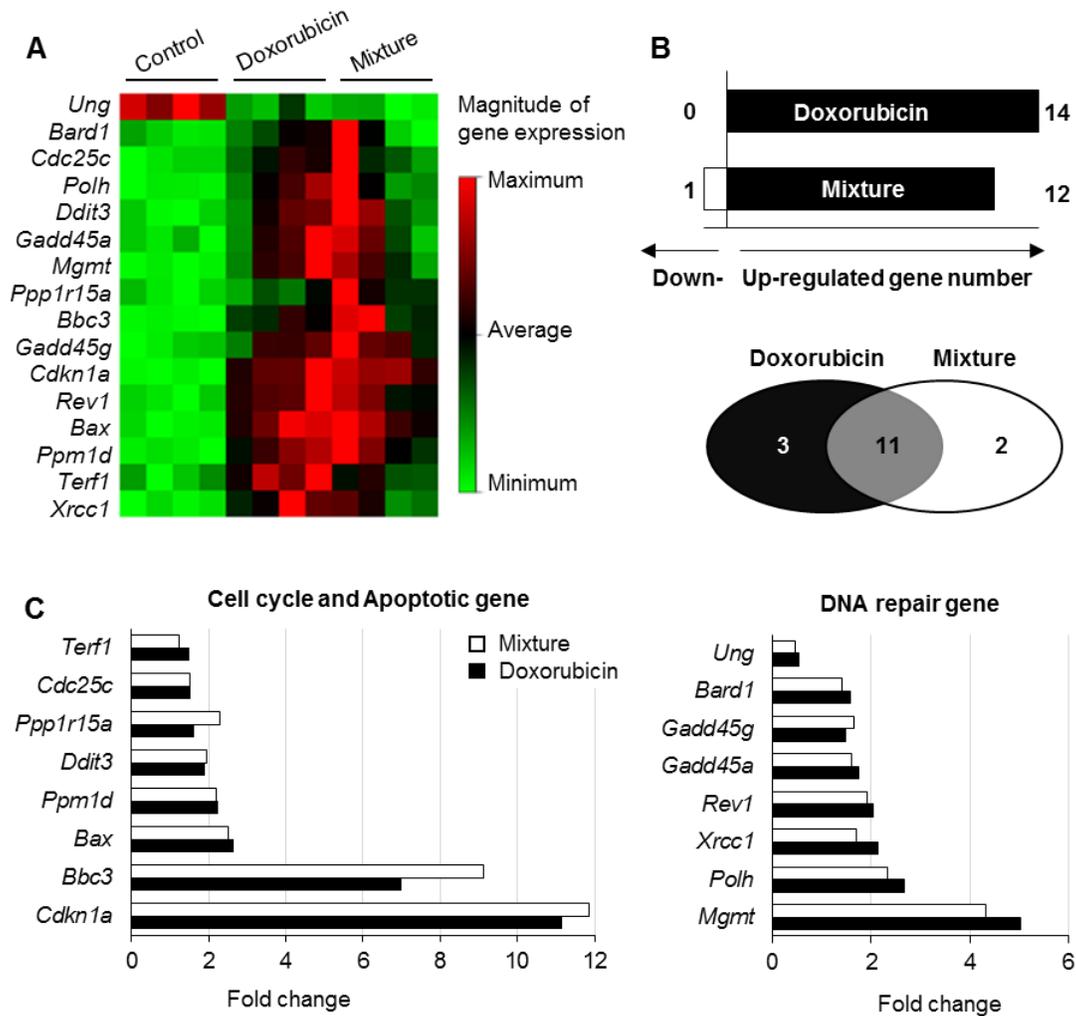


**Table 2. Expression levels of DNA repair genes in GC-6spg.** Expressed genes are presented according to their level of expression: high (21>Ct<25), moderate (25>Ct<30), and low (30>Ct<32); and their associated repair pathway.

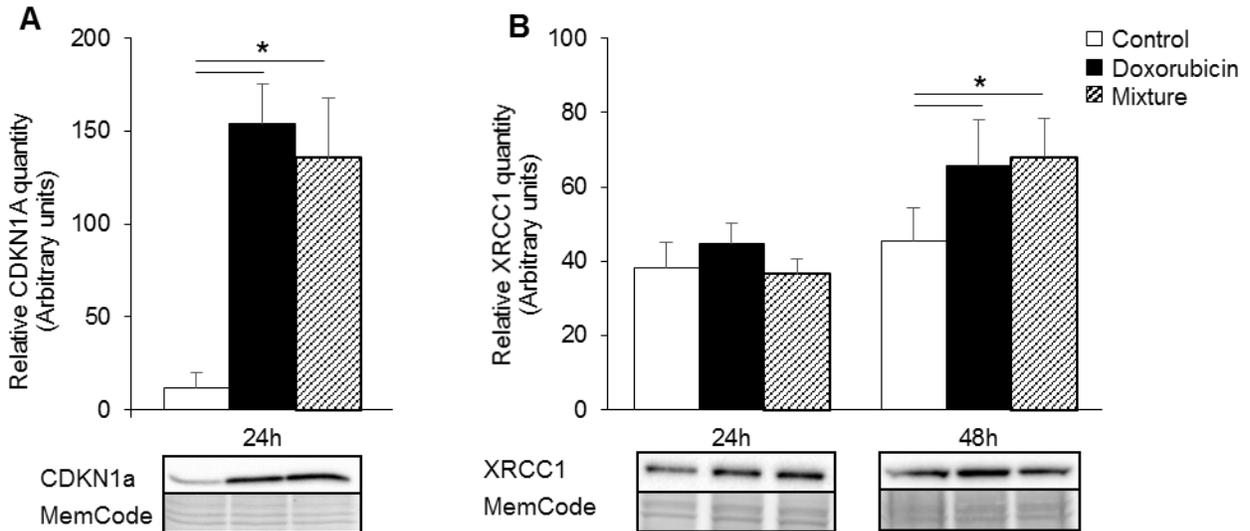
Level of expression	DNA repair pathway	Gene name
21>Ct<25	ATM	<i>Csnk2a2</i> .
	Multiple	<i>Tp53, Parp1, PcnA, Smc1a</i> .
	Other	<i>Pttg1, Rad21, Smc3, Sumo1, Wrnip1</i> .
25>Ct<30	ATM	<i>Cdc25a</i> .
	BER	<i>Ung, Apex1, Fen1, Xrcc1, Mpg, Wrn</i> .
	DSB	<i>Rad51, Rad52, Xrcc2, Xrcc6, Tp53bp1, Mre11a, Blm, Nbn, Prkdc</i> .
	NER	<i>Dclre1a, Ddb2, Ercc2, Pold3, Sirt3, Xpc</i> .
	MMR	<i>Msh2, Msh3, Abl1, Exo1, Pms1, Pms2, Mlh1</i> .
	Multiple	<i>Atm, Bard1, Brca1, Brca2, Chek1, Chek2, Fancd2, Hus1, Lig1, Nthl1, Ogg1, Parp2, Pole, Rad9, Rad17, Rad50, Rnf8, Rpa1, Topbp1</i> .
30>Ct<32	Other	<i>Mgmt, Atrx, Fanca, Fancg, Gadd45a, Gadd45b, Polh, Poli, Rad1, Rad18, Rad51b, Rad51c, Rev1</i> .
	BER	<i>Mbd4</i> .
	NER	<i>Ercc1, FancC</i> .
	MMR	<i>Mlh3</i> .

ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated, BER/NER: Base/Nucleotide Excision Repair, DSB: Double Strand Break repair, MMR: Mismatch Repair.

**Figure 5. Impact of DXO alone or in mixture with vincristine on gene expression after 24h of exposure to 0.1µM.** GC-6spg cells were exposed for 24h to the vehicle (control) or to 0.1µM doxorubicin alone or in mixture 1:1 with vincristine (Mixture). Gene expression was evaluated by RT-qPCR using the PCR array RT2 kit from Qiagen in GC-6spg (n=4). Significantly affected genes are represented according to their magnitude of gene expression in each biological replicate by row clustering (A), the number of up- or down-regulated genes in each with the corresponding Venn diagram (B) and their fold-change among the cell cycle/apoptotic genes and DNA repair genes (C).



**Figure 6. Protein quantification of CDKN1a and XRCC1 in GC-6spg cells after 24h or 48h of treatment with doxorubicin alone or the mixture 1:1.** After 24h or 48h exposure to vehicle (Control), 0.1 $\mu$ M of doxorubicin alone or in mixture 1:1 with vincristine (Mixture), proteins were extracted from GC-6spg cells and used to quantify CDKN1a (A) or XRCC1 (B) by Western blot. For each protein, representative blots are shown and their quantification by densitometry represent the mean  $\pm$  SEM (n=4-7). \*P<0.05 compared with the corresponding control group using a paired t-test.



## 2.5 - Discussion :

In this study, we evaluated the toxicity of DXO and VCR, two commonly used anticancer drugs, on a rat spermatogonial cell line with SSC characteristics (Van Pelt et al. 2002). It is well established that most chemotherapeutic agents can target the dividing male germ cells (Meistrich 2013) and very recently, Habas and coworkers have shown that DXO induces apoptosis and DNA breaks in male germ cells, with spermatogonia being the most sensitive type of germ cell (Habas et al. 2016). Indeed, diploid cells in proliferation are the main target of the chemotherapeutic compounds, which explains the high sensitivity of the precursors and pre-meiotic germ cells compared to the non-replicative meiotic germ cells (Jahnukainen et al. 2000). SSCs are at the origin of spermatogenesis and any damage in these cells can have consequences on the fertility of the individual. Evidence of a direct negative impact specifically on SSC comes from a small number of studies using transplantation assays or in vitro models (Marcon et al. 2010, 2011, Liu et al. 2014). However, to our knowledge, the direct effect of VCR and DXO had never been tested before using an in vitro model of a spermatogonial cell line. We have demonstrated that both

compounds are cytotoxic to GC-6spg with synergistic effects. Interestingly, their profiles of cytotoxicity are very different; although VCR reduces the MTT signal by half with a maximum effect that plateaus at 0.1  $\mu$ M, DXO completely shuts the signal off in a dose-dependent manner. This is in line with their mechanisms of action. In fact, as VCR classically inhibits microtubule polymerization (Jordan & Wilson 2004), our results suggest that GC-6spg are mitotically arrested with few dying by apoptosis. On the other hand, DXO is primarily used as a topoisomerase II inhibitor in many types of cancer, but it has been shown to induce DNA crosslinks also, DNA double-strand breaks (DSB) and produce oxidative stress inducing high cytotoxicity and many side effects (Rochette et al. 2015). In GC-6spg, DXO induced a dose-dependent cell death.

According to cytotoxicity assay, we observed a synergistic effect on cell viability when GC-6spgs were exposed to a mixture of both compounds. Indeed, the LOAEL of the MIX was lower than the one of each compound alone. These results underline the importance of considering the impact of each compound alone and in combination to evaluate the chemotherapy damage on the germline. This is important to consider as one strategy to improve the efficacy of chemotherapy is to give combinations of drugs. Such mixtures allow each drug to be given at a lower dose with the hope of reducing toxic side effects. Our present data, in accordance with others, suggest that such combinations even at lower doses are cytotoxic to SSC (Marcon et al. 2010).

Chemotherapeutic compounds are known to induce DNA damage in the male germline of cancer survivors (O'Flaherty et al. 2010, 2012). In vitro studies have demonstrated the genotoxic potential of some chemotherapeutic compounds using spermatogonial cell lines (Liu et al. 2014) or primary culture of germ cells (Habas et al. 2016) and SSC (Marcon et al. 2010). To test the mutagenic potential of VCR and DXO alone or in mixture, we used the COMET assay to reveal double- and single-strand breaks. We showed that DXO but not VCR induced DNA breaks in GC-6spg. This is in accordance with the DXO mode of action that intercalates into DNA and binds the topoisomerase II to block its progression leading to DNA DSB (Rochette et al. 2015). Importantly, DXO-induced DNA breaks at a dose below its cytotoxic LOAEL. Interestingly, genotoxicity at a non-cytotoxic dose had already been demonstrated for etoposide, another topoisomerase II inhibitor in a mouse spermatogonial cell line (Liu et al. 2014). The MIX induced comparable effect as DXO alone which is in accordance with the fact that VCR alone had no effect on DNA breaks. In vivo, it was shown that doxorubicin exposed SSC in prepubertal animals resulted in long term damage to mature sperm DNA (Hou et al. 2005, Vendramini et al. 2012). Moreover, we have shown that male rats exposed to DXO in combination with other anticancer drugs (CHOP regimen) had significantly

increased the amount of DNA breaks in spermatozoa even after a recovery period (Delbes et al. 2010b, Vendramini et al. 2012). Such persistent DNA damage in spermatozoa after a recovery period suggests impaired DNA repair ability in male germ cells. Our model of DNA break induction at a non-cytotoxic dose of DXO or MIX is therefore a unique opportunity to study the defense mechanisms existing in precursor male germ cells against genotoxic stress.

Classically, the response of mammalian cells to DNA damage is an arrest of the cell cycle and DNA repair, which if deficient is followed by cell death. Our data strongly suggest such a cell cycle arrest in GC-6spg in response to 0.1  $\mu$ M of DXO for 24 h. Indeed, GC-6spg proliferation measured by BrdU incorporation was significantly decreased for up to 5 days after the end of treatment. Interestingly, we observed that GC-6spg re-enters mitosis about 13 days after treatment arrest (data not shown). In addition, the demonstration of the increased expression of Cdkn1a mRNA and protein in GC-6spg in response to DXO strengthens the hypothesis of a cell cycle arrest. Interestingly, in most adult stem cells, such as hematopoietic stem cells and mammary stem cells, the cell cycle arrest by CDKN1a was shown to induce a reduction of DNA damage accumulation (Insinga et al. 2014). This temporary cell cycle arrest observed in our in vitro model nicely mimics the common in vivo kinetics of oligospermia during chemotherapy followed by spermatogenesis recovery after treatment arrest (Vendramini et al. 2010, Bujan et al. 2014) and suggests that our in vitro model is very relevant to investigate germ cell response to chemotherapeutic insult. In the recovery study, we have further demonstrated that GC-6spg can recuperate from the DNA breaks induced by the treatment. It is important to consider that the level of DNA damage could have decreased over time in treated cells because GC-6spg with slight DNA damage had taken over highly damaged cells. Nevertheless, assessing the DNA repair pathways at the time of treatment arrest would help better understand the mechanism by which spermatogonial stem cells respond to DNA injury.

To elucidate the ability of GC-6spg to repair DXO-induced DNA damage, we screened many DNA repair genes using the DNA damage signaling PCR array RT2. Our data showed that all the 75 DNA repair genes tested were expressed, suggesting the high ability to respond to genotoxic stress. To the best of our knowledge, this is the first demonstration of the constitutive expression of a large library of DNA genes in spermatogonia with SSC characteristics. In GC-6spg, we showed that DXO treatment alone or in mixture affected the expression of 16 genes playing roles in cell cycle regulation and DNA repair. This high overlap of effects between the two treatments strongly suggests that in the MIX, DXO is responsible for all gene expression changes observed. Importantly, DXO treatments activated genes related to various DNA repair pathways. Genotoxic stress activates specific DNA repair pathways depending on the nature of the injury

(Genois et al. 2014). DXO toxicity is mediated by different modes of action as described previously, and as a consequence, multiple DNA repair pathways could be triggered. Surprisingly, the *Mgmt* gene (O6-methylguanine–DNA methyltransferase) was the most activated DNA repair gene with a fold-change of 5.04 after exposure to DXO alone. MGMT protein is involved in direct damage reversal as it catalyzes the repair of alkylated guanines by stoichiometrically and irreversibly transferring O6-alkyl adducts in a suicide reaction (Tubbs et al. 2007). Thompson and coworkers have already demonstrated the role of MGMT in the survival of SSC after alkylating treatment (Thompson et al. 2000). It was shown that DXO-induced oxidative stress can lead to the alkylation of DNA (Taatzes et al. 1997), but to our knowledge, this is the first demonstration of *Mgmt* mRNA expression activation in response to DXO.

DXO-induced DSBs, the most deleterious DNA damage, could be processed by two main DNA repair pathways: the error-free HR pathway that happens during the S/G2 phase of the cell cycle and the NHEJ pathway that proceeds by default through the errorprone ligation of broken DNA ends without sequence homology (Rothkamm et al. 2003). The NHEJ pathway is presumed to be the main repair mechanism of DSBs in undifferentiated spermatogonia (Rube et al. 2011). Indeed, SSCs are mostly in the G0/G1 phase and components of the canonic NHEJ pathway, including DNA-PKcs (encoded by the *Prkdc* gene), Ku70 (encoded by the *Xrcc6* gene) and Ku80 (encoded by *Xrcc5* gene) are known to be expressed by undifferentiated spermatogonia (Hamer et al. 2003, Rube et al. 2011). In agreement with these previous studies, the expression of *Prkdc* and *Xrcc6* were detected in GC-6spg. Unfortunately, we could not test the expression of *Xrcc5* as it was not included in the PCR array design. The NHEJ pathway can be further subdivided in the canonic and alternative pathways. Both use the MRE11/RAD50/NBS1 protein complex to detect DSBs and activate the ATM protein (Lavin 2007). The activation of ATM then triggers a cascade of reactions indirectly triggering the cell cycle regulator CDKN1a and the components of apoptosis, BBC3 and BAX, by the activation of P53 (Insinga et al. 2014). In our model, the activation of *Cdkn1a*, *Bbc3* (Bcl-2 binding component 3) and *Bax* (Bcl2-associated X), therefore suggests that the NHEJ pathway can be involved in the GC-6spg response to DXO-induced DNA breaks. On the other hand, the alternative NHEJ that is DNA-PK independent was also suggested to be involved in the repair of DSBs in SSC (Rube et al. 2011). Indeed, a deficiency of the canonic NHEJ could be compensated by an alternative NHEJ pathway involving XRCC1 (Audebert et al. 2004, Velic et al. 2015). Interestingly, in our model, *Prkdc* and *Xrcc6*, coding for proteins involved in the DNA–PK complex, were not affected after DXO treatment, whereas *Xrcc1* was significantly activated. According to these results, we hypothesize that the alternative NHEJ pathway is activated in undifferentiated spermatogonia in response to DXO. This hypothesis is supported by data showing the complete absence of components of the canonic NHEJ pathway such as  $\gamma$ H2AX and

MDC1 (Rube et al. 2011). However, our data show that DXO induced the expression of genes related to various other DNA repair pathways such as BER and NER, which are known to be active in spermatogonia (Intano et al. 2002, Xu et al. 2005).

In the present study, we originally tested a range of concentrations of DXO and VCR alone or in mixture to establish the sub-toxic dose based on cell viability, and further select sub-lethal dose for characterizing the capacity for DNA repair. However, the concentrations tested also included the reported plasmatic concentrations of DXO and VCR after clinical i.v. injections in children with acute lymphoblastic leukemia or non-Hodgkin lymphoma (Sethi & Kimball 1981, Hempel et al. 2002). Plasma levels may not reflect the levels of exposure of spermatogonia but intratesticular levels of chemotherapeutic compounds after treatment in human is unknown. On the other hand, pharmacokinetic studies in rats suggest that testicular levels of DXO are higher than plasma levels after acute exposure (Arakawa et al. 1991, Nwankwoala et al. 2008). In addition, testicular levels appear to remain stable 48 h after treatment, whereas plasma levels decrease. This suggests that testicular cells are exposed to doses equivalent to or greater than plasma concentrations. Even though it is difficult to extrapolate in vivo exposure and in vitro experiments, together, these data suggest that the cellular outcomes quantified in this study are relevant to human exposure.

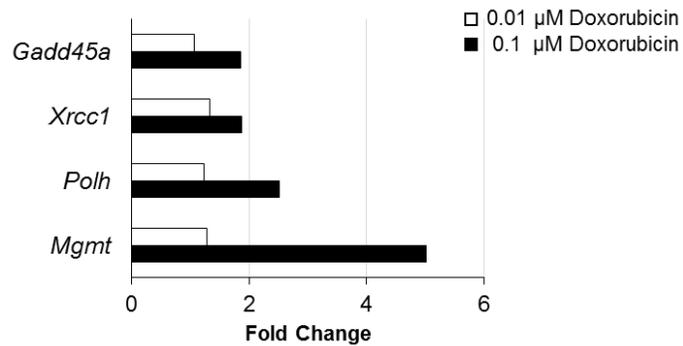
Considering the imperative use of chemotherapy to combat malignant cells, the improvement of anticancer clinical protocols to decrease side effects and provide protection of healthy cells is urgently needed. Toward this objective, decreasing doses and combining drugs have been successful. As well, co-treatment with cytoprotective compounds are now included in oncology clinical guidelines to reduce neurotoxicity (Hershman et al. 2014). Here, we show that a common combination of DXO and VCR can be toxic to rat GC-6spg. However, more importantly, we have established a model to study DNA repair in undifferentiated spermatogonia. Our results support the idea that undifferentiated spermatogonia have the ability to respond to DNA injury and escape from DNA break accumulation. Further studies will be needed to elucidate which pathway is essential for the maintenance of DNA integrity in SSC. To open up fertility protection strategies, understanding the mechanism by which anticancer drugs affect human SSC is essential.

## **2.6 - Acknowledgements :**

The authors would like to acknowledge Guylaine Lassonde (INRS) for all her technical advice and support throughout this study.

## 2.7 - Supplementary figures :

**Figure S1. Impact of 0.01 $\mu$ M and 0.1 $\mu$ M doxorubicin on the expression level of selected DNA repair genes.** GC-6spg cells were exposed to 0.01  $\mu$ M or 0.1  $\mu$ M of doxorubicin for 24h. Gene expression of *Mgmt*, *Polh*, *Xrcc1*, and *Gadd45a* were measured by RT-qPCR. Values represent the means of relative expression level  $\pm$  SEM (n=4-8). \*P<0.05 \*\*P<0.01 \*\*\*P<0.001 compared to the corresponding control group using a paired t-test.



**Table S1: Complete gene list from the DNA damage signaling PCR array.** The 16 significantly affected genes are listed in the top of the table. The associated DNA repair pathway is indicated for each gene and the fold change and p values in doxorubicin- and mixture-treated cells are detailed.

Cell cycle	Apoptosis	DNA repair	Symbol	Description	Doxorubicin		Mixture	
					Fold Change	p-value	Fold Change	p-value
		Mgmt	Mgmt	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	5,04	0,009	4,32	0,012
		Other	Polh	Polymerase (DNA directed), eta	2,67	0,005	2,32	0,050
		Multiple	Xrcc1	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1	2,14	0,003	1,70	0,011
		Other	Rev1	REV1 homolog (S. cerevisiae)	2,05	0,000	1,91	0,001
		BER	Ung	Uracil-DNA glycosylase	0,54	0,000	0,47	0,000
		Other	Gadd45g	Growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma	1,48	0,003	1,64	0,002
		Other	Gadd45a	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	1,76	0,017	1,61	0,049
		Multiple	Bard1	BRCA1 associated RING domain 1	1,57	0,005	1,40	0,233
			Bbc3	Bcl-2 binding component 3	7,00	0,000	9,13	0,006
			Bax	Bcl2-associated X protein	2,64	0,000	2,52	0,001
			Cdkn1a	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	11,17	0,000	11,85	0,000
			Ppp1r15a	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	1,63	0,015	2,29	0,011
			Terf1	Telomeric repeat binding factor (NIMA-interacting) 1	1,50	0,001	1,23	0,008
			Ppm1d	Protein phosphatase 1D magnesium-dependent, delta isoform	2,24	0,000	2,18	0,003
			Ddit3	DNA-damage inducible transcript 3	1,90	0,006	1,93	0,030
			Cdc25c	Cell division cycle 25 homolog C (S. pombe)	1,53	0,001	1,50	0,056
		BER	Mbd4	Methyl-CpG binding domain protein 4	1,47	0,124	1,44	0,174
		BER	Wrn	Werner syndrome	1,25	0,097	1,28	0,017
		BER	Fen1	Flap structure-specific endonuclease 1	1,25	0,176	1,25	0,292
		BER	Mpg	N-methylpurine-DNA glycosylase	1,02	0,737	0,84	0,130
		BER	Apex1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1	0,99	0,940	0,67	0,295
		NER	Dclre1a	DNA cross-link repair 1A, PSO2 homolog (S. cerevisiae)	1,24	0,124	1,20	0,229
		NER	Pold3	Polymerase (DNA-directed), delta 3, accessory subunit	1,20	0,131	1,05	0,619
		NER	Ercc1	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1	1,14	0,433	1,36	0,216
		NER	Xpc	Xeroderma pigmentosum, complementation group C	1,13	0,286	1,07	0,531
		NER	Fancc	Fanconi anemia, complementation group C	1,12	0,251	1,26	0,061
		NER	Ddb2	Damage specific DNA binding protein 2	1,04	0,689	0,88	0,380
		NER	Ercc2	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2	1,01	0,843	0,98	0,933
		DSB	Rad52	RAD52 homolog (S. cerevisiae)	1,42	0,001	1,49	0,002
		DSB	Rad51	RAD51 homolog (RecA homolog, E. coli) (S. cerevisiae)	1,27	0,000	1,40	0,007
		DSB	Xrcc2	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2	1,25	0,024	1,25	0,034
		DSB	Blm	Bloom syndrome, RecQ helicase-like	1,23	0,002	1,19	0,007
		DSB	Nbn	Nibrin	1,15	0,212	1,00	0,988
		DSB	Mre11a	MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)	1,14	0,114	1,10	0,130
		DSB	Xrcc6	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6	1,09	0,433	0,81	0,413
		MMR	Mlh1	MutL homolog 1 (E. coli)	1,17	0,271	0,93	0,973
		MMR	Msh2	MutS homolog 2 (E. coli)	1,12	0,382	0,88	0,797
		MMR	Exo1	Exonuclease 1	1,11	0,454	1,02	0,759
		MMR	Pms2	PMS2 postmeiotic segregation increased 2 (S. cerevisiae)	1,10	0,390	0,95	0,945
		MMR	Msh3	MutS homolog 3 (E. coli)	1,07	0,545	0,85	0,645

	MMR	Pms1	Postmeiotic segregation increased 1 ( <i>S. cerevisiae</i> )	1,04	0,547	0,95	0,808
	MMR	Abl1	C-abl oncogene 1, receptor tyrosine kinase	1,03	0,718	0,84	0,667
	MMR	Mlh3	MutL homolog 3 ( <i>E. coli</i> )	0,89	0,098	0,87	0,212
	Other	Fanccg	Fanconi anemia, complementation group G	1,33	0,003	1,21	0,036
	Other	Poli	Polymerase (DNA directed), iota	1,19	0,076	1,03	0,720
	Other	Rad18	RAD18 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	1,18	0,002	1,26	0,000
	Other	Fanca	Fanconi anemia, complementation group A	1,12	0,063	0,99	0,954
	Other	Sumo1	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1 ( <i>S. cerevisiae</i> )	1,12	0,026	1,08	0,011
	Other	Rad51b	RAD51 paralogue B	1,10	0,088	1,08	0,015
	Other	Wrip1	Werner helicase interacting protein 1	1,07	0,274	1,01	0,851
	Other	Rad51c	RAD51 homolog c ( <i>S. cerevisiae</i> )	1,05	0,249	0,92	0,114
	Other	Smc3	Structural maintenance of chromosomes 3	1,03	0,410	1,00	0,960
	Other	Rad1	RAD1 homolog ( <i>S. pombe</i> )	0,99	0,792	0,99	0,949
	Other	Pttg1	Pituitary tumor-transforming 1	0,97	0,780	0,85	0,051
	Other	Atrx	Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked (RAD54 homolog, <i>S. cerevisiae</i> )	0,85	0,261	0,91	0,553
	Multiple	Rad50	RAD50 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	1,45	0,000	1,38	0,003
	Multiple	Nth1	Nth (endonuclease III)-like 1 ( <i>E. coli</i> )	1,43	0,006	1,27	0,054
	Multiple	Brc2	Breast cancer 2	1,31	0,123	1,29	0,249
	Multiple	Rpa1	Replication protein A1	1,25	0,001	1,08	0,149
	Multiple	Topbp1	Topoisomerase (DNA) II binding protein 1	1,22	0,028	1,18	0,103
	Multiple	Fancc2	Fanconi anemia, complementation group D2	1,18	0,001	1,14	0,060
	Multiple	Rnf8	Ring finger protein 8	1,17	0,255	1,05	0,643
	Multiple	Smc1a	Structural maintenance of chromosomes 1A	1,17	0,119	1,17	0,130
	Multiple	Rad17	RAD17 homolog ( <i>S. pombe</i> )	1,16	0,265	1,13	0,454
	Multiple	Pole	Polymerase (DNA directed), epsilon	1,13	0,107	1,13	0,075
	Multiple	Lig1	Ligase I, DNA, ATP-dependent	1,11	0,269	1,06	0,570
	Multiple	Ogg1	8-oxoguanine DNA glycosylase	1,11	0,128	0,96	0,826
	Multiple	Pona	Proliferating cell nuclear antigen	1,02	0,788	1,02	0,824
	Multiple	Hus1	HUS1 checkpoint homolog ( <i>S. pombe</i> )	1,00	0,980	1,00	0,960
	Multiple	Parp1	Poly (ADP-ribose) polymerase 1	0,99	0,868	0,85	0,035
	Multiple	Parp2	Poly (ADP-ribose) polymerase 2	0,94	0,247	0,87	0,024
	ATM	Csnk2a2	Casein kinase 2, alpha prime polypeptide	1,03	0,653	0,92	0,716
	DSB	Tp53bp1	Tumor protein p53 binding protein 1	1,05	0,581	0,91	0,550
	DSB	Prkdc	Protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide	0,97	0,722	1,02	0,799
	NER	Sirt1	Sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1 ( <i>S. cerevisiae</i> )	1,24	0,127	1,12	0,417
	Other	Rad21	RAD21 homolog ( <i>S. pombe</i> )	0,97	0,689	0,88	0,185
	Multiple	Brc1	Breast cancer 1	1,21	0,132	1,24	0,303
	Multiple	Rad9	RAD9 homolog ( <i>S. pombe</i> )	1,07	0,566	1,08	0,560
	Multiple	Tp53	Tumor protein p53	1,26	0,007	1,46	0,000
	Multiple	Chek2	CHK2 checkpoint homolog ( <i>S. pombe</i> )	1,07	0,437	0,93	0,614
	Multiple	Atm	Ataxia telangiectasia mutated homolog (human)	1,02	0,770	0,76	0,714
	Multiple	Chek1	CHK1 checkpoint homolog ( <i>S. pombe</i> )	1,02	0,760	0,93	0,482
	ATM	Cdc25a	Cell division cycle 25 homolog A ( <i>S. pombe</i> )	1,24	0,007	1,23	0,116
		Mif	Macrophage migration inhibitory factor	0,92	0,178	1,00	0,982

## 2.8 - References :

Aguilar-Mahecha A, Hales BF & Robaire B 2002 Chronic cyclophosphamide treatment alters the expression of stress response genes in rat male germ cells. *Biology of Reproduction* 66 1024–1032. (doi:10.1095/biolreprod66.4.1024)

Arakawa H, Mueller KJ, Doubek WG, Stern JA, La Regina MC, Tolman KC, Coscia CJ & Johnson FE 1991 Distribution and metabolism of doxorubicin in rats undergoing testicular circulatory isolation. *American Journal of Surgical Pathology* 162 572–575. (doi:10.1016/0002-9610(91)90111-p)

Audebert M, Salles B & Calsou P 2004 Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *Journal of Biological Chemistry* 279 55117–55126. (doi:10.1074/jbc.M404524200)

Bujan L, Walschaerts M, Brugnol F, Daudin M, Berthaut I, Auger J, Saias J, Szerman E, Moinard N, Rives N et al. 2014 Impact of lymphoma treatments on spermatogenesis and sperm deoxyribonucleic acid: a multicenter prospective study from the CECOS network. *Fertility and Sterility* 102 667.e663–674.e663. (doi:10.1016/j.fertnstert.2014.06.008)

Delbes G, Duquenne C, Szenker J, Taccoen J, Habert R & Levacher C 2007a Developmental changes in testicular sensitivity to estrogens throughout fetal and neonatal life. *Toxicological Sciences* 99 234–243. (doi:10.1093/toxsci/kfm160)

Delbes G, Hales BF & Robaire B 2007b Effects of the chemotherapy cocktail used to treat testicular cancer on sperm chromatin integrity. *Journal of Andrology* 28 241–249; discussion 250–241. (doi:10.1093/molehr/gap087)

Delbes G, Hales BF & Robaire B 2010a Toxicants and human sperm chromatin integrity. *Molecular Human Reproduction* 16 14–22. (doi:10.1093/molehr/gap087)

Delbes G, Vaisheva F, Luu T, Marcon L, Hales BF & Robaire B 2010b Reversibility of the effects of the chemotherapeutic regimen for non-Hodgkin lymphoma, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone, on the male rat reproductive system and progeny outcome. *Reproductive Toxicology* 29 332–338. (doi:10.1016/j.reprotox.2010.01.007)

Delbes G, Chan D, Hales BF, Trasler JM & Robaire B 2013 Selective induction of glutathione S-transferases in round spermatids from the Brown-Norway rat by the chemotherapeutic regimen for testicular cancer. *Reproductive Toxicology* 36 24–32. (doi:10.1016/j.reprotox.2012.10.012)

Drumond AL, Weng CC, Wang G, Chiarini-Garcia H, Eras-Garcia L & Meistrich ML 2011 Effects of multiple doses of cyclophosphamide on mouse testes: accessing the germ cells lost, and the functional damage of stem cells. *Reproductive Toxicology* 32 395–406. (doi:10.1016/j.reprotox.2011.09.010)

Genois MM, Paquet ER, Laffitte MC, Maity R, Rodrigue A, Ouellette M & Masson JY 2014 DNA repair pathways in trypanosomatids: from DNA repair to drug resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 78 40–73. (doi:10.1128/MMBR.00045-13)

Green DM, Liu W, Kutteh WH, Ke RW, Shelton KC, Sklar CA, Chemaitilly W, Pui CH, Klosky JL, Spunt SL et al. 2014 Cumulative alkylating agent exposure and semen parameters in adult survivors of childhood cancer: a report from the St Jude Lifetime Cohort study. *Lancet Oncology* 15 1215–1223. (doi:10.1016/s1470-2045(14)70408-5)

Habas K, Anderson D & Brinkworth MH 2016 Germ cell responses to doxorubicin exposure in vitro. *Toxicology Letters* 265 70–76. (doi:10.1016/j.toxlet.2016.11.016)

Hamer G, Roepers-Gajadien HL, van Duyn-Goedhart A, Gademan IS, Kal HB, van Buul PP, Ashley T & de Rooij DG 2003 Function of DNA-protein kinase catalytic subunit during the early meiotic prophase without Ku70 and Ku86. *Biology of Reproduction* 68 717–721. (doi:10.1095/biolreprod.102.008920)

Hempel G, Flege S, Wurthwein G & Boos J 2002 Peak plasma concentrations of doxorubicin in children with acute lymphoblastic leukemia or non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 49 133–141. (doi:10.1007/s00280-001-0392-4)

Hershman DL, Lacchetti C, Dworkin RH, Lavoie Smith EM, Bleeker J, Cavaletti G, Chauhan C, Gavin P, Lavino A, Lustberg MB et al. 2014 Prevention and management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in survivors of adult cancers: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *Journal of Clinical Oncology* 32 1941–1967. (doi:10.1200/JCO.2013.54.0914)

Hou M, Chrysis D, Nurmiö M, Parvinen M, Eksborg S, Söder O & Jahnukainen K 2005 Doxorubicin induces apoptosis in germ line stem cells in the immature rat testis and amifostine cannot protect against this cytotoxicity. *Cancer Research* 65 9999–10005. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2004)

Howell SJ & Shalet SM 2005 Spermatogenesis after cancer treatment: damage and recovery. *Journal of the National Cancer Institute Monographs* 34 12–17. (doi:10.1093/jncimonographs/lgi003)

Insinga A, Cicalese A & Pelicci PG 2014 DNA damage response in adult stem cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 52 147–151. (doi:10.1016/j.bcmd.2013.12.005)

Intano GW, McMahan CA, McCarrey JR, Walter RB, McKenna AE, Matsumoto Y, MacInnes MA, Chen DJ & Walter CA 2002 Base excision repair is limited by different proteins in male germ cell nuclear extracts prepared from young and old mice. *Molecular and Cellular Biology* 22 2410–2418. (doi:10.1128/MCB.22.7.2410-2418.2002)

Jahnukainen K, Hou M, Parvinen M, Eksborg S & Soder O 2000 Stagespecific inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis and induction of apoptosis by antracyclines in cultured rat spermatogenic cells. *Biology of Reproduction* 63 482–487. (doi:10.1095/biolreprod63.2.482)

Jordan MA & Wilson L 2004 Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer* 4 253–265. (doi:10.1038/nrc1317) Lavin MF 2007 ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks. *Oncogene* 26 7749–7758. (doi:10.1038/sj.onc.1210880)

Liu M, Hales BF & Robaire B 2014 Effects of four chemotherapeutic agents, bleomycin, etoposide, cisplatin, and cyclophosphamide, on DNA damage and telomeres in a mouse spermatogonial cell line. *Biology of Reproduction* 90 72. (doi:10.1095/biolreprod.114.117754)

Marcon L, Zhang X, Hales BF, Nagano MC & Robaire B 2010 Development of a short-term fluorescence-based assay to assess the toxicity of anticancer drugs on rat stem/progenitor spermatogonia in vitro. *Biology of Reproduction* 83 228–237. (doi:10.1095/biolreprod.110.083568)

Marcon L, Zhang X, Hales BF, Robaire B & Nagano MC 2011 Effects of chemotherapeutic agents for testicular cancer on rat spermatogonial stem/progenitor cells. *Journal of Andrology* 32 432–443. (doi:10.2164/jandrol.110.011601)

Meistrich ML 1986 Relationship between spermatogonial stem cell survival and testis function after cytotoxic therapy. *British Journal of Cancer* 7 89–101.

Meistrich ML 2009 Male gonadal toxicity. *Pediatric Blood and Cancer* 53 261–266. (doi:10.1002/pbc.22004)

Meistrich ML 2013 Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis in humans. *Fertility and Sterility* 100 1180–1186. (doi:10.1016/j.fertnstert.2013.08.010)

Meistrich ML, Wilson G, Brown BW, Dacunha MF & Lipshultz LI 1992 Impact of cyclophosphamide on long-term reduction in sperm count in men treated with combination chemotherapy for ewing and soft-tissue sarcomas. *Cancer* 70 2703–2712. (doi:10.1002/1097-0142(19921201)70:11<2703::AID-CNCR2820701123>3.0.CO;2-X)

Nwankwoala R, Georgewill O & Georgewill U 2008 Pharmacokinetics of adriamycin after intravenous administration in rat. *Internet Journal of Oncology* 6 1–4.

O’Flaherty C, Hales BF, Chan P & Robaire B 2010 Impact of chemotherapeutics and advanced testicular cancer or Hodgkin lymphoma on sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertility and Sterility* 94 1374–1379. (doi:10.1016/j.fertnstert.2009.05.068)

O’Flaherty CM, Chan PT, Hales BF & Robaire B 2012 Sperm chromatin structure components are differentially repaired in cancer survivors. *Journal of Andrology* 33 629–636. (doi:10.2164/jandrol.111.015388)

Ozturk S & Demir N 2011 DNA repair mechanisms in mammalian germ cells. *Histology and Histopathology* 26 505–517.

Richardson LL, Pedigo C & Ann Handel M 2000 Expression of deoxyribonucleic acid repair enzymes during spermatogenesis in mice. *Biology of Reproduction* 62 789–796. (doi:10.1095/biolreprod62.3.789)

Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ & Minor L 2004 Cell viability assays. In *Assay Guidance Manual*.

GS Sittampalam, NP Coussens, K Brimacombe, et al., (Editors). *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>

Rochette L, Guenancia C, Gudjoncik A, Hachet O, Zeller M, Cottin Y & Vergely C 2015 Anthracyclines/trastuzumab: new aspects of cardiotoxicity and molecular mechanisms. *Trends in Pharmacological Sciences* 36 326–348. (doi:10.1016/j.tips.2015.03.005)

Rothkamm K, Kruger I, Thompson LH & Lobrich M 2003 Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Molecular and Cellular Biology* 23 5706–5715. (doi:10.1128/MCB.23.16.5706-5715.2003)

Rube CE, Zhang S, Miebach N, Fricke A & Rube C 2011 Protecting the heritable genome: DNA damage response mechanisms in spermatogonial stem cells. *DNA Repair* 10 159–168. (doi:10.1016/j.dnarep.2010.10.007)

Sethi VS & Kimball JC 1981 Pharmacokinetics of vincristine sulfate in children. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 6 111–115.

Taatjes DJ, Gaudiano G, Resing K & Koch TH 1997 Redox pathway leading to the alkylation of DNA by the anthracycline, antitumor drugs adriamycin and daunomycin. *Journal of Medicinal Chemistry* 40 1276–1286. (doi:10.1021/jm960835d)

Takubo K, Ohmura M, Azuma M, Nagamatsu G, Yamada W, Arai F, Hirao A & Suda T 2008 Stem cell defects in ATM-deficient undifferentiated spermatogonia through DNA damage-induced cell-cycle arrest. *Cell Stem Cell* 2 170–182. (doi:10.1016/j.stem.2007.10.023)

Tempest HG, Ko E, Chan P, Robaire B, Rademaker A & Martin RH 2008 Sperm aneuploidy frequencies analysed before and after chemotherapy in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients. *Human Reproduction* 23 251–258. (doi:10.1093/humrep/dem389)

Tesarik J, Greco E & Mendoza C 2004 Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Human Reproduction* 19 611–615. (doi:10.1093/humrep/deh127)

Thompson MJ, Abdul-Rahman S, Baker TG, Rafferty JA, Margison GP & Bibby MC 2000 Role of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in the resistance of mouse spermatogenic cells to O6-alkylating agents. *Journal of Reproduction and Infertility* 119 339–346. (doi:10.1530/jrf.0.1190339)

Tubbs JL, Pegg AE & Tainer JA 2007 DNA binding, nucleotide flipping, and the helix-turn-helix motif in base repair by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and its implications for cancer chemotherapy. *DNA Repair* 6 1100–1115. (doi:10.1016/j.dnarep.2007.03.011)

Vaisheva F, Delbes G, Hales BF & Robaire B 2007 Effects of the chemotherapeutic agents for non-Hodgkin lymphoma, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP), on the male rat reproductive system and progeny outcome. *Journal of Andrology* 28 578–587. (doi:10.2164/jandrol.106.002428)

Van Pelt AMM, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, Creemers LB, De Rooij DG & Van Dissel-Emiliani FMF 2002 Establishment of cell lines with rat spermatogonial stem cell characteristics. *Endocrinology* 143 1845–1850. (doi:10.1210/endo.143.5.8806)

Velic D, Couturier AM, Ferreira MT, Rodrigue A, Poirier GG, Fleury F & Masson JY 2015 DNA Damage signalling and repair inhibitors: the long-sought-after achilles' heel of cancer. *Biomolecules* 5 3204–3259. (doi:10.3390/biom5043204)

Vendramini V, Sasso-Cerri E & Miraglia SM 2010 Amifostine reduces the seminiferous epithelium damage in doxorubicin-treated prepubertal rats without improving the fertility status. *Reproductive Biology and Endocrinology* 8 3. (doi:10.1186/1477-7827-8-3)

Vendramini V, Robaire B & Miraglia SM 2012 Amifostine-doxorubicin association causes long-term prepubertal spermatogonia DNA damage and early developmental arrest. *Human Reproduction* 27 2457–2466. (doi:10.1093/humrep/des159)

Wallace WHB, Anderson RA & Irvine DS 2005 Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? *Lancet Oncology* 6 209–218. (doi:10.1016/S1470-2045(05)70092-9)

Xu GG, Spivak G, Mitchell DL, Mori T, McCarrey JR, McMahan CA, Walter RB, Hanawalt PC & Walter CA 2005 Nucleotide excision repair activity varies among murine spermatogenic cell types. *Biology of Reproduction* 73 123–130. (doi:10.1095/biolreprod.104.039123)

Yeh JR & Nagano MC 2009 Spermatogonial stem cell biomarkers: improved outcomes of spermatogonial transplantation in male fertility restoration? *Expert Review of Molecular Diagnostics* 9 109–114. (doi:10.1586/14737159.9.2.109)

Zohni K, Zhang X, Tan SL, Chan P & Nagano MC 2012 The efficiency of male fertility restoration is dependent on the recovery kinetics of spermatogonial stem cells after cytotoxic treatment with busulfan in mice. *Human Reproduction* 27 44–53. (doi:10.1093/humrep/der357)



## **CHAPITRE 3 : DNA REPAIR RESPONSE IN PREPUBERTAL RAT SPERMATOGONIA AFTER *IN VIVO* EXPOSURE TO DOXORUBICIN**

**Titre en français :** Réponse des systèmes de réparation de l'ADN dans des spermatogonies de rat prépubère, suite à une exposition *in vivo* à la doxorubicine.

**Auteurs :** Hermance BEAUD<sup>1</sup>, Amélie TREMBLAY<sup>1</sup>, Arlette RWIGEMERA<sup>1</sup>, Géraldine DELBES<sup>1</sup>.

**Affiliations :** <sup>1</sup>INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, (Québec) Canada.

### **Contributions des différents auteurs :**

HB : Design expérimental, Exécution des expériences, analyses des données et rédaction de l'article.

AT : Exécution du test d'ABTS

AR : Exécution des dosages de la testostérone

GD : Conception du projet, analyses des données et correction de l'article.

### **Mise en contexte du chapitre :**

Ce chapitre décrit une étude préliminaire ayant pour but de développer un modèle *in vivo* pour étudier les effets de la DXO dans les spermatogonies. Les résultats présentés ici correspondent à mon travail de mise en place du modèle et l'étude des gènes de réparation de l'ADN mis en évidence *in vitro*. L'écriture en anglais sous forme d'article a pour but d'avancer l'écriture de l'article final. Comme des expériences complémentaires sont prévues par le laboratoire, la discussion ne fait état que des résultats obtenus actuellement. Les perspectives de ce projet seront discutées dans la discussion générale de la présente thèse.

Ces travaux ont été communiqués par présentation orale en 2017 lors du congrès des 30 ans du Centre de recherche interdisciplinaire sur le bien-être, la santé, la société et l'environnement (Cinbiose) à Montréal et, lors du Congrès du Réseau Québécois en Reproduction (RQR) à Saint-Hyacinthe.

*H. Beaud, G. Delbès.* " Comprendre les effets des chimiothérapies sur les cellules germinales mâles pour améliorer la qualité de vie des hommes survivants de cancer pédiatrique" Cinbiose, congrès des 30 ans du centre.

*H. Beaud, A. Rwigemera, G. Delbès.* "DNA repair response in prepubertal rat spermatogonia after *in vivo* exposure to doxorubicin" Réseau Québécois en Reproduction, 10<sup>e</sup> symposium annuel.

## Résumé en français :

Les chimiothérapies peuvent affecter la fertilité des survivants de cancer pédiatrique, mais aucun protocole clinique standard n'existe actuellement pour préserver leur fertilité. Avant la puberté, chez les garçons, les cellules germinales sont principalement des spermatogonies en prolifération qui peuvent être la cible d'agent de chimiothérapie. Nous avons récemment démontré *in vitro* sur une lignée cellulaire de spermatogonie de rat, que la doxorubicine (DXO) induit des cassures à l'ADN réversibles. Nous avons également mesuré l'activation de l'expression de gènes de réparation (*Mgmt*, *Xrcc1*, *Polh* et *Gadd45α*). Pour déterminer si un mécanisme similaire de défense est activé *in vivo*, dans le testicule prépubère, nous avons développé un modèle animal en utilisant des rats transgéniques exprimant spécifiquement la GFP dans les cellules germinales. Des rats de six jours ont reçu une injection de 5 mg/kg de DXO ou d'équivalent en eau, dilués dans une solution saline et, ont été sacrifiés après 24h ou 48h (n=4-5/groupe). La concentration circulante de testostérone, mesurée par ELISA, n'était pas différente entre les animaux traités et les animaux témoins. Cependant, les poids relatifs des testicules étaient significativement réduits à partir de 24h chez les animaux exposés à la DXO par rapport aux témoins. Après 48h d'exposition, le nombre de cellules germinales a diminué significativement et le nombre de cellules apoptotiques a augmenté. Les cellules exprimant la GFP ont été isolées par cytométrie en flux après 24h de traitement pour quantifier l'expression de *Mgmt*, *Xrcc1*, *Polh* et *Gadd45α* par RT-qPCR. L'expression d'aucun des gènes testés n'a variés dans les cellules germinales exposées à la DXO par rapport aux cellules germinales témoins, suggérant l'absence d'activation du système de réparation de l'ADN. Nous émettons l'hypothèse qu'une défaillance de ces mécanismes pourrait être la cause de la toxicité de la doxorubicine. Cette étude pourrait ouvrir de nouvelles voies de recherche pour prévenir la gonadotoxicité des chimiothérapies pédiatriques.

### 3.1 - Abstract

Chemotherapy treatment can affect the fertility of childhood cancer survivors, but no standard clinical protocol currently exists to preserve their fertility. Before puberty, for boys, germ cells are mostly proliferative spermatogonia that could be the target of anti-cancer drugs. We recently demonstrated *in vitro*, using a rat spermatogonial cell line, that doxorubicin (DXO) induces reversible DNA breaks. We also measured the activation of DNA repair genes expression (*Mgmt*, *Xrcc1*, *Polh*, and *Gadd45α*). To determine if a similar defense mechanism is activated in prepubertal testis, the target of pediatric chemotherapy, we developed an animal model using transgenic rats with germ cell-specific expression of GFP. Six-day-

old pups received an injection of 5 mg/kg DXO or the equivalent volume of vehicle water, diluted in saline and were sacrificed after 24 or 48h (n=4-5/group). Circulating testosterone levels measured by Elisa, were not different between treated and control animals. However, relative testis weights were significantly reduced from 24h in DXO-exposed animals compared to controls. The number of germ cells significantly decreased and the number of apoptotic cells increased after 48h of exposure. GFP-positive cells were collected by flow cytometry 24h after treatment to quantify the gene expression of *Mgmt*, *Xrcc1*, *Polh*, and *Gadd45a* by RT-qPCR. None of the tested gene was different in DXO-exposed germ cells compared to controls, suggesting the absence of DNA repair system activation. We hypothesize that a failure of these mechanisms could be the cause of doxorubicin toxicity. Such research could open new research avenues to prevent the gonadotoxicity of pediatric chemotherapies.

### **3.2 - Introduction**

Since the 1970s, the survival rates from many childhood cancers have steadily risen (Armstrong *et al.* 2016). The quality of life of the growing population of cancer survivors is an increasing healthcare issue. Indeed, survivors of pediatric cancer could suffer from the side effects of the treatment, such as male infertility.

Men that survive childhood cancer are less likely to have children than siblings without a history of cancer, and as result, are more likely to use assisted reproductive technologies (ART) (Green *et al.* 2003, Green *et al.* 2010, Stensheim *et al.* 2013, Chow *et al.* 2016). For these patients, the most common cause of infertility is low sperm count or azoospermia (no sperm) (Wasilewski-Masker *et al.* 2014). In fact, we and others have shown a high prevalence of azoo- or oligozoospermia in adult survivors of pediatric cancer (Green *et al.* 2010, Romerius *et al.* 2011, Beaud *et al.* 2017a). Azoospermia can be a consequence of spermatogonial stem cell (SSC) population being depleted by the treatment (Meistrich 1986). Germ cells in prepubertal testes are only composed of spermatogonial germ cells. Depletion of the germ cells was observed in testicular biopsies of prepubertal boys follows chemotherapy (Müller *et al.* 1988, Nurmio *et al.* 2009, Poganitsch-Korhonen *et al.* 2017). Indeed, the recovery of sperm production has been correlated with the number of remaining SSC after remission, in a mouse model treated with busulfan (Zohni *et al.* 2012b). As anticancer drugs target cell division, actively dividing spermatogonia in the prepubertal testis are the target of most chemotherapeutic agents, including anthracyclines (Hou *et al.* 2005, Drumond *et al.* 2011, Marcon *et al.* 2011, Zohni *et al.* 2012b, Liu *et al.* 2014).

Doxorubicin (DXO) is one of the most commonly used anthracyclines to fight cancer diagnosed before or after puberty (Rochette *et al.* 2015). Several mechanisms of action have been described for DXO. Its main anti-cancer action is mediated by binding DNA topoisomerase, such as the topoisomerase II, which lead to the inhibition of DNA synthesis and S-phase arrest (Momparker *et al.* 1976). Importantly, the covalent bond with the DNA acts as a functional cross-link, promoting the activation of DNA repair pathways and topoisomerase-independent DNA double-strand breaks (Swift *et al.* 2006, Forrest *et al.* 2012). However, in cardiac tissue the major adverse side effect of the DXO is the induction of oxidative stress, causing DNA damage (Chen *et al.* 2007). Oxidative stress has also been reported in the kidney and the brain (Chen *et al.* 2007). In the testis, the impact of DXO on fertility was described as being of medium risk, by inducing only a temporary azoospermia (Howell & Shalet 2005, Wallace *et al.* 2005, Meistrich 2009). However, little is known on its primary mechanism of action in germ cells.

In a rat spermatogonia cell line with stem cells characteristics, we demonstrated that DXO induced a dose-dependent cytotoxicity through the induction of DNA breaks (Beaud *et al.* 2017b). DXO produced DNA damage *in vitro* to spermatogonia in short-term (Habas *et al.* 2016, Beaud *et al.* 2017b), and *in vivo*, to mature sperm in long-term that might be the cause of compromised conceptus development and reduced pregnancy outcome (Vendramini *et al.* 2012). The fact that DNA sperm quality is impaired in long-term support the idea that chemotherapy side effects on fertility could originate, in part, from DNA damage occurred in SSC (Marcon *et al.* 2010). Indeed, one can hypothesize that long-term fertility injury comes from unrepaired DNA damage in SSC, spreading in the germline through spermatogenesis cycles, and in turn affects sperm quality. In a cohort of men survivors of childhood cancer, we recently showed that DNA damage in sperm significantly correlated with cumulative dose of doxorubicine (Beaud *et al.* 2017a). However, persistent DNA damage is of concern in men because spermatozoa with damaged DNA was also linked to poor embryo development and ART failure (Delbes *et al.* 2010a).

Maintenance of paternal genome integrity is essential to prevent the risks of paternally mediated adverse progeny outcomes later in life (Meistrich 1986). The germline must be armed with DNA repair systems to reverse potential damage. However, DNA repair mechanisms are still poorly described in SSC, mainly because these cells are rare and hard to purify. In fact, most prior studies analyzed DNA repair in a mixed population of spermatogonia (Richardson *et al.* 2000, Intano *et al.* 2002, Hamer *et al.* 2003, Xu *et al.* 2005). Using animal knockout models or pharmacological inhibitors, some specific components of DNA repair have been shown to be necessary for the maintenance of spermatogenesis, suggesting an essential role in the maintenance of SSC (Takubo *et al.* 2008, Rube *et al.* 2011). This is the case for MGMT that represents

an independent DNA repair pathway (Thompson *et al.* 2000). In our *in vitro* model of DXO treatment, the expression of DNA repair gene like *Mgmt*, *Xrcc1*, *Polh*, and *Gadd45α*, were activated (Beaud *et al.* 2017b). The formation of functional DNA cross-link and DNA breaks by DXO can trigger nucleotide excision repair and double-strand break repair pathway, represented in the present study by *Gadd45α*, *Xrcc1*, and *Polh* (Ahmed *et al.* 2010, Strzalka & Ziemienowicz 2011, Tamura *et al.* 2012). Although no specific repair pathway had emerged from this analysis, the reduction of DNA breaks 48 hours after treatment recovery suggested the capacity of SSC to repair DXO-induced DNA breaks (Beaud *et al.* 2017b). Therefore, additional investigations are necessary to determine the *in vivo* role of these DNA repair genes following DXO treatment. Three research groups previously investigated the effects of DXO exposure on male fertility in rats (Bechter *et al.* 1987, Hou *et al.* 2005, Vendramini *et al.* 2010, Vendramini *et al.* 2012, Cabral *et al.* 2014, Cabral *et al.* 2018). In Pre Miraglia's research group, DXO treatment was performed in 30 post-natal days (PND) rats, just before puberty (40 PND), and the effects were analyzed 30 days after treatment (Vendramini *et al.* 2010, Vendramini *et al.* 2012, Cabral *et al.* 2014, Cabral *et al.* 2018). In the model of Bechter *et al.* and Hou *et al.*, the treatment was administered at 6 PND, and the immediate response was investigated 2 or 3 days after DXO treatment (Bechter *et al.* 1987, Hou *et al.* 2005). In both studies, spermatogonia depletion and apoptosis (measured by TUNEL) were shown after the exposure to 3 mg/m<sup>2</sup> of DXO (Bechter *et al.* 1987, Hou *et al.* 2005). In this study, the DXO will also be given in neonatal rats, but a dose of 5 mg/m<sup>2</sup> will be used to approach a dose equivalent to one cycle of chemotherapy in children (Hempel *et al.* 2002, Nair & Jacob 2016).

We hypothesize that *Mgmt*, *Xrcc1*, *Polh*, and *Gadd45α* activated by DXO *in vitro* are also increased *in vivo* in rat prepubertal spermatogonia. Our goal was to develop an animal model in which SSC could be purified after prepubertal exposure to DXO. This could allow the measurement of candidate DNA repair genes specifically in these cells. Rats expressing the GFP exclusively in germ cells (GCS-EGFP) was previously described (Cronkhite *et al.* 2005). Using the SSC marker CD9 on the GCS-EGFP rat (Kanatsu-Shinohara *et al.* 2004, Zohni *et al.* 2012a), we first determined the age at which SSC are enriched to treat them with DXO. Then, we characterized the impact of the DXO treatment on gonadal function and on germ cell number. Finally, we purified the GFP-positive cells by fluorescence-activated cell sorting to measure the expression of the 4 candidate DNA repair genes.

### 3.3 - Materials and Methods

#### Animals

Transgenic Sprague-Dawley rats expressing germ cell-specific GFP (GCS-EGFP) were generously provided by Robert E. Hammer (Cronkrite *et al.* 2005). Rats were housed under controlled 12h photoperiod conditions (lights on 6:00am-6:00pm) and were supplied with commercial feed and tap water *ad libitum*. The animal studies were conducted in accordance with the guidelines set out by the Canadian Council of Animal Care (CCAC) and as reviewed and approved by the Institutional Animal Care Committee of INRS (protocol 1605-03). Females were caged with males for one night, and vaginal smears were done the following day to identify sperm-positive females. Natural birth was counted as post-natal day 0 (0 PND). Rats were sacrificed at different times after birth by CO<sub>2</sub> asphyxiation followed by decapitation. Animals treated with DXO were sacrificed by decapitation.

#### DXO treatment

DXO hydrochloride (CAS #25316-40-9) was obtained from LKT Laboratories Inc (St. Paul, MN, USA) and prepared as previously described (Beaud *et al.* 2017b). Briefly, a 10mM stock solution was prepared in sterile water and stored at -80°C. Immediately before use, the DXO stock solution or the equivalent volume of water vehicle were diluted in 0.9% NaCl. Six days-old sibling rats were weighted and treated with a single dose of 5 mg/kg of DXO or equivalent dose of water intraperitoneally and relocated with their mother and other siblings until sacrifice. The dose of 5 mg/kg of doxorubicin is an equivalent of 30 mg/m<sup>2</sup> as calculated using the following equation: (dose in mg/m<sup>2</sup>) = (dose in mg/kg) x (Km factor), with Km factor = 6 in rats (Nair & Jacob 2016).

#### Weight gain, blood and testis sampling

Rats were weighed prior to treatment and prior to euthanasia at 24 hours (n=8) or 48 hours (n=6) after injection. Weight gain was calculated using the following equation: body weight prior sacrifice (g) - body weight prior DXO injection (g). The blood of each treated animal was mechanically sampled by aspiration from the carotid artery and kept at room temperature. Serum was isolated from the blood cells by centrifugation at 2000g 5 min, snap frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until use. Testes from DXO-treated rats and matched control were processed at the same time throughout the procedure. Testes

were removed and weighed. The relative testicular weight was calculated using the following equation: average right and left testis weight (mg) / body weight prior the sacrifice (g). One testis was fixed for histological analysis, and the remaining testis was processed for germ cells purification.

### **ABTS assay**

Antioxidant activity in serum samples was quantified using an ABTS assay as previously described (Re *et al.* 1999) with modifications. Briefly, 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS, ≥98%, CAS #30931-67-0) and potassium persulfate (≥99%, CAS #7727-21-1) from Sigma (Sigma, Oakville, ON, Canada) were dissolved at 7mM and 2,5mM respectively, in distilled water. To form the ABTS radical monocation, both solutions were mixed 1:1 volume ratio and incubated overnight at room temperature. Right before use, ABTS solution was diluted in distilled water to an optical density (OD) of 0.7 at 734nm. The antioxidant 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox, ≥97%, CAS #53188-07-1) was dissolved at 80mM in ethanol and stored at -20°C up to one month. Right before use, Trolox standards (0 -1mM) or serum samples (1/30) were diluted in PBS. 90µl diluted ABTS radical solution was added to 10µl of standards or serum samples, then incubated for 20min at room temperature in the dark. The optical density was measured with a microplate reader at 734nm. PBS was used as blank and samples were run in triplicate. Antioxidant activity in serum samples was determined in Trolox equivalent based on the standard curve.

### **Testosterone assay**

Testosterone concentrations were measured in the serum using a testosterone ELISA kit following the manufacturer's protocol (IBL, America #IB79106, Minneapolis, MN), as previously described (Lassonde *et al.* 2015). Each sample was run in duplicate.

### **Histology and immunostaining**

Testis were fixed by immersion overnight in Bouin's fixative at room temperature or in 4% paraformaldehyde fixative (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA) at 4°C. After dehydration, testis were embedded in paraffin and cut in 5 µm-thick sections. Tissue sections were deparaffinized, rehydrated, and processed for histology analysis, immunohistochemistry or immunofluorescence.

In order to quantify the number of apoptotic bodies, testis sections were stained with hematoxylin and eosin coloration. Briefly, tissue sections were immersed for 1 min at room temperature in hematoxylin Gill II (Surgipath, #3801520). Following a wash in water, slides were immersed for 30 seconds in 95% ethanol and then 1 min in eosin solution (Surgipath, #01600).

The germ cells were quantified using HSP90 as a germ cell-specific marker (Ohsako *et al.* 1995). Tissue sections were incubated with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in distilled water for 10 min to inactivate endogenous peroxidases. Following PBS wash, slides were immersed in a citrate buffer (1.8mM citric acid, and 8.2mM sodium citrate ; pH6), and microwaved for 3 min at full power, then 10 min at 40% power. Slides were left to cool down in the solution for 15 min at room temperature and then rinsed with double-distilled water. Tissue sections were blocked for 1 h at room temperature with 10% horse serum, and incubated overnight at 4 °C with a mouse anti-human HSP90 antibody (BD Biosciences, #610419). Following PBS washes, the primary antibody was detected using biotinylated anti-mouse secondary antibody and the avidin–biotin–peroxidase complex (Vector Laboratories, #PK4002). Peroxidase activity was visualized using 3,3-diaminobenzidine as a substrate (Vector Laboratories, #SK4100). Negative controls were done by omitting the primary antibody.

Five testis sections per biological replicate, separated by at least 100 µm, were analyzed. Using a Zeiss microscope (Primo Star Zeiss) coupled with an AxioCam ERc5s camera and the Zen software (Carl Zeiss, blue version), seminiferous cords area were delimited. In at least 200,000 µm<sup>2</sup> of seminiferous cords area per cross section, apoptotic bodies (characterized by pyknotic small dark cells with halo) or HSP90-positive cells were quantified using a 40X objective and data were expressed as mean cells number per surface unit of seminiferous cords. The person doing the quantification was blinded to the treatments.

The proportion of SSC in the germ cell population was quantified using CD9 as SSC marker (Kanatsu-Shinohara *et al.* 2004). Testis sections were blocked 30 minutes at room temperature with a solution of 2% BSA (Sigma-Aldrich, #A4503, Oakville, Ontario, Canada) and 5% goat serum diluted in PBS. Tissue sections were incubated overnight at 4 °C with a mouse anti-rat CD9 antibody (clone RPM.7; BD Biosciences). Following PBS washes, tissue sections were incubated 30 minutes at room temperature with goat anti-mouse 594 (1:200, NEB, #8890). Slides were washed in PBS and mounted in vectashield with Dapi (Vector laboratories, #H-1200). Negative controls were done by omitting the primary antibody. Using a Leica DMRE microscope (Leica Microsystems, Inc.), the number of CD9-positive and, CD9- and GFP-double-positive cells were quantified on 3 testis sections per biological replicate, separated by at least 100 µm. Data were expressed as mean percentage of double-positive cells.

### **Germ cells purification**

The exclusive expression of the GFP in the germ cells was used to purify them by Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS), as previously described (Rwigemera *et al.* 2017). The albuginea was removed and seminiferous cords were immersed in a solution of 1 mg/mL collagenase (Sigma, #C9891) and 0.02 mg/mL DNase (Sigma, #D4527) diluted in HBSS (Life technologies, #14175095) for 15 min at 37 °C and then centrifuged 5 min at 500g. The pellet was re-suspended in 0.25% trypsin–EDTA (Life Technologies, #25200-056) and incubated for 10 min at 37 °C after which 1:1 volume ratio of HBSS and 10% fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies, #10099-133) was added to neutralize trypsin. Cells were filtered with a 70 µm strainer (Fisher Scientific, #352350), and centrifuged 5 min at 500g. The pellet was re-suspended in presort buffer containing PBS (Gibco, #14200-75), EDTA 1 mM (Sigma, #EDS-500G), HEPES 25 mM (Invitrogen, #15630-056) and 1% FBS. Cell suspension was diluted to 5-8 million cells per ml prior to cell sorting with FACSJazz (BD Biosciences, San Jose, CA) at an event rate of ~2500/s and using a 488 nm laser. The emission was measured using a 530/40 band-pass filter. The sort gates were set on forward and side scatter, trigger pulse width and GFP expression, and cells were collected in FBS. After sorting, the purity of GFP-positive cell fractions was evaluated by the analysis of the GFP expression by flow cytometry on 1000 cells of the GFP-positive cells fractions. The cells were then washed with HBSS and counted in trypan blue to evaluate the cell viability. Sorted cells were aliquoted, snap frozen and stored at –80 °C until RNA extraction.

### **RNA extraction and gene expression analysis**

Total RNA was extracted from 50 000 GFP-positive cells using the Arcturus PicoPure RNA isolation kit (ThermoFisher, #KIT0204) according to the manufacturer's recommendations. Residual genomic DNA was degraded by deoxyribonuclease treatment for 15 min. RNA quality and quantity was evaluated by using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). RNA (180ng) was reverse transcribed with the qScript cDNA SuperMix (Quanta Biosciences, Beverly, USA) in a 20µl reaction. cRNA (9 ng) was mixed with SYBR Green mastermix (Qiagen, #330500), and primer to *Mgmt* (Qiagen, PPR44512A), *Xrcc1* (Qiagen, PPR45876A), *Gadd45α* (Qiagen, PPR06489F), *Polh* (Qiagen, PPR50694A), *Ldha* (Qiagen, PPR56603B), or *Rplp1* genes (Qiagen, PPR42363C). Each gene was amplified in the CFX96 qPCR cycler (Bio-Rad). Genomic DNA contamination in each sample was evaluated by the amplification of RNA samples without reverse transcription mix. Analysis was done using the  $\Delta\Delta C_t$  method, and all data were normalized using the

geometric mean expression of the *Ldha* and *Rplp1* housekeeping genes as previously described (Beaud *et al.* 2017b).

### **Statistics**

Statistical analyses were done using GraphPad Prism, version 5.01 (GraphPad Software). Time- and treatment-dependent effects on apoptosis were analyzed using a 2-way analysis of variance followed by the Bonferroni's *post hoc* test ( $p$ -value  $\leq 0.05$ ). All the other parameters were analyzed using a student T.test, paired when control and treated-rats were compared.

## **3.4 - Results**

### **SSC population in rat post-natal testis**

Because we aim to target exposure to DXO on SSC, we first determined the age at which SSC are enriched in post-natal testis. By immunofluorescence, using the endogen expression of the GFP exclusively in the germ cells in our rat model, and using CD9 as marker of SSC, we were able to discriminate the GFP and CD9-positive SSC from the total GFP-positive germ cells at PND6 ( $n=3$ ), PND8 ( $n=4$ ), and PND9 ( $n=4$ ) (Figure 1A). Double positive cells were significantly enriched in PND6 and PND8 testis compared to PND9 testis (Figure 1B). Therefore to expose to DXO when the SSC are the most represented germ cell types, the rats were treated at PND6 as it corresponded to the stage when the percentage of double positive cells was the highest.

### **Toxicity of DXO treatment**

Rat pups were weighed prior to treatment and prior to sacrifice. No significant differences in weight gain were found between controls and treated-pups at 24h and 48h after exposure to DXO (Figure 2A). Because DXO is known to induce oxidative stress, we analyzed the antioxidant levels in serum using the ABTS assay. No difference could be observed in the treated animal at 24h or 48h after DXO exposure compared to controls (Figure 3).

### **Gonadotoxicity of DXO treatment**

At sacrifice, both testes from each animal were weighed. There was no significant difference between the right and left testis (data not shown), indicating that the side of the injection did not influence the gonadal

toxicity. Interestingly, the relative testicular weight was significantly reduced following DXO treatment compared to the control (Figure 2B).

To measure the impact of DXO on steroidogenesis, circulating testosterone secretion was assessed by ELISA. No significant difference was observed between controls and treated rat at 24h and 48h after exposure to DXO, suggesting the absence of effect of DXO exposure on Leydig cells (Figure 4).

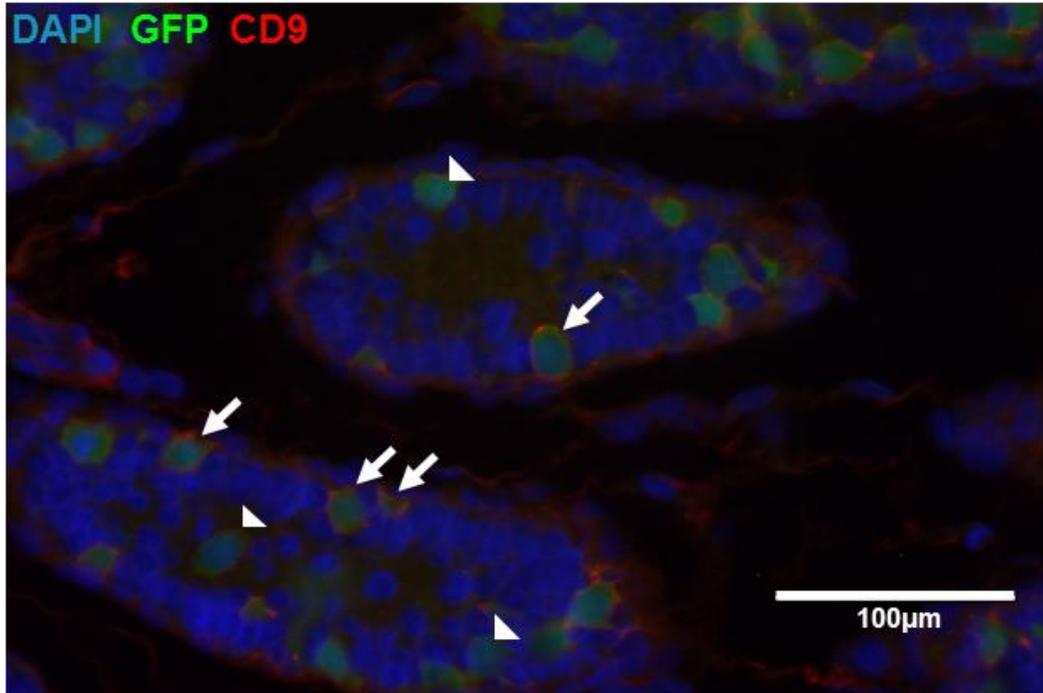
To determine the impact of DXO on spermatogenesis, quantification of germ cells number was done using immunohistochemistry (Figure 5). Germ cells were distinguished from somatic cells by staining for the HSP90 (figure 5A). The number of HSP90-positives cells per surface unit of seminiferous cords was not different compared to control at 24h, but a significant decrease (33.9%) in germ cells number was quantified 48h after DXO treatment (figure 5B). To determine if the decrease in germ cell number was due to apoptosis, apoptotic bodies were quantified after hematoxylin and eosin coloration, as illustrated in figure 6A. The number of apoptotic bodies per surface unit of seminiferous cords was significantly increased 48h after DXO treatment (figure 6B).

#### **DNA repair genes expression in the germ cells**

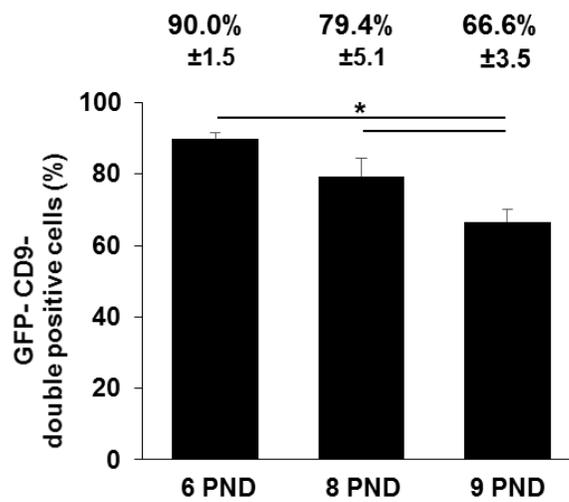
Prior to cell sorting, GFP-positive cells represented  $6.91\% \pm 0.69$  and  $5.51\% \pm 0.95$  of the total seminiferous cell suspension in control and treated-rat respectively (data not shown). In the GFP-positive cell fraction, cell viability and GFP-positive cell purity from the DXO-treated rats were not significantly different to the control (table 1). None of the 4 candidate DNA repair tested gene was different in DXO-exposed germ cells compared to controls (figure 7). Whereas the expression of *Gadd45a* and *Polh* were low, the *Mgmt* expression was significantly higher express than the other candidate genes (figure 7).

**Figure 1: Percentage of GFP- and CD9-double positive cells in 6 PND rat testis.** (A) Immunofluorescence staining of CD9, in a 9 PND GC-EGFP rat testis section. Double positive cells (arrows) and GFP-positive cell (arrowheads) were observed. (B) Quantification of the percentage of double positive cells in the GFP-positive cell population at 6 PND (n=3), 8 PND (n=4) and 9 PND (n=4). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*P<.05 by a paired student's t-test.

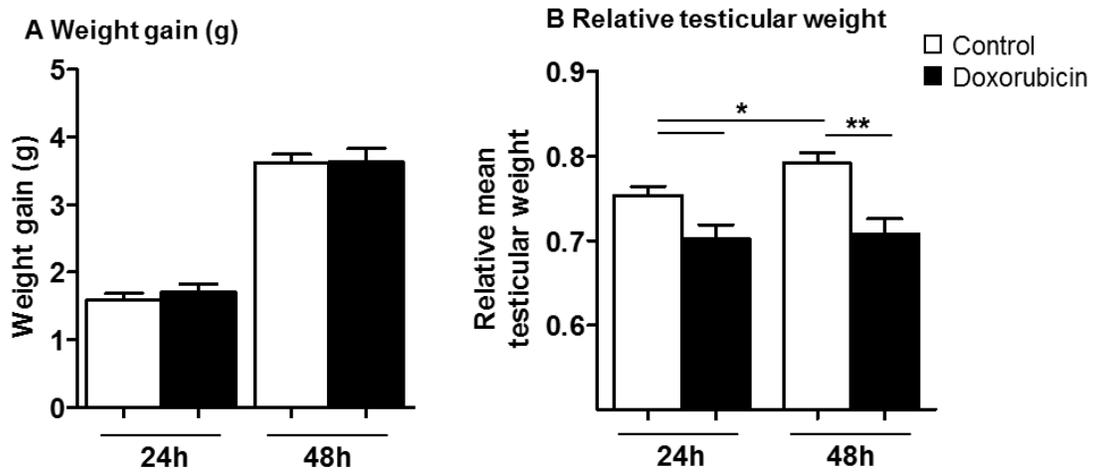
**A**



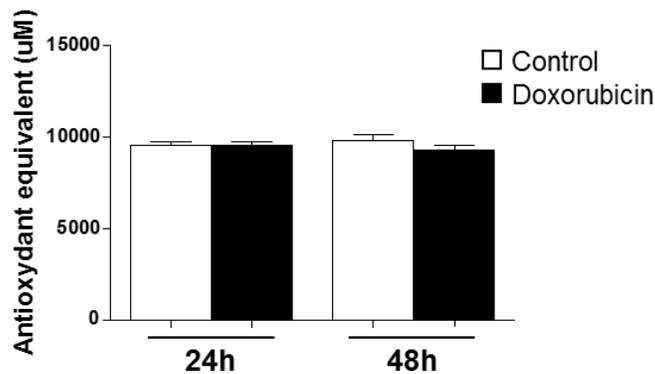
**B**



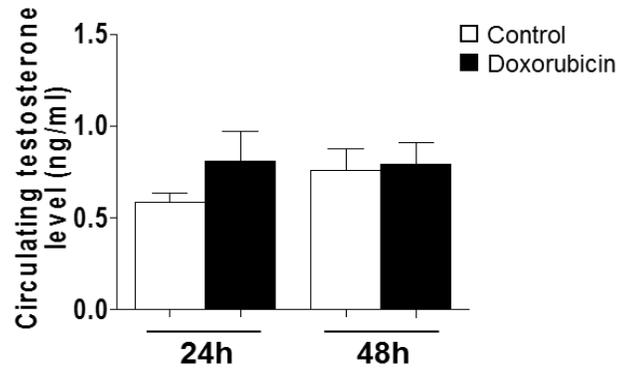
**Figure 2: Weight gain and relative testis weight after DXO injection in 6 PND rat.** Body weight gain (A) and relative testicular weight (B) were quantified 24h (n=8) and 48h (n=6) after DXO treatment. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*P<.05 \*\*P<.01 by a paired student's t-test.



**Figure 3: Antioxidant activity in the serum after DXO injection in 6 PND rat.** Quantification of antioxidant capacity in the serum 24h (n=4) and 48h (n=5) after DXO treatment. Data are expressed as mean antioxidant Trolox equivalent  $\pm$  SEM.

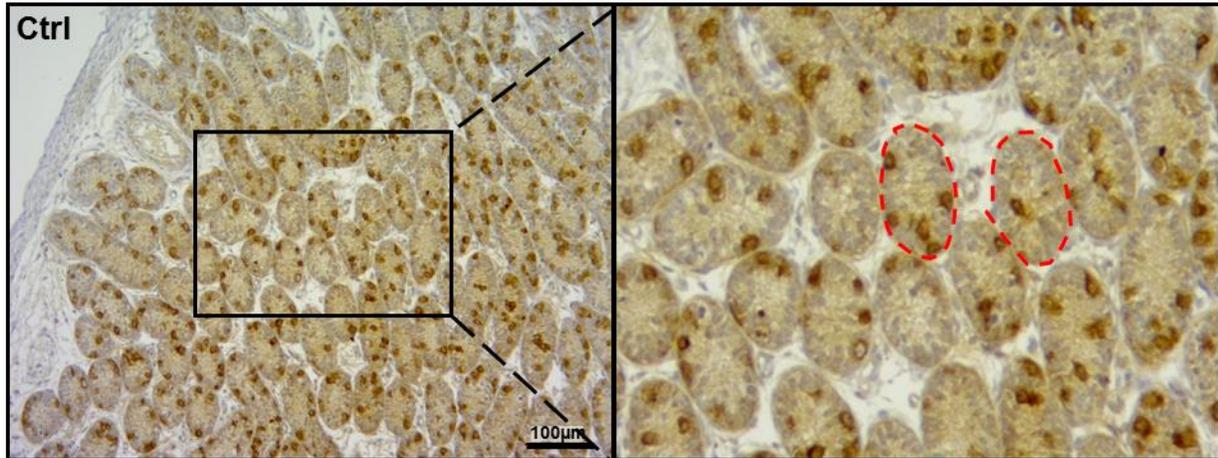


**Figure 4: Circulating testosterone level after DXO injection in 6 PND rat.** Circulating testosterone level was quantified 24h (n=3-5) and 48h (n=4-5) after DXO treatment. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM.

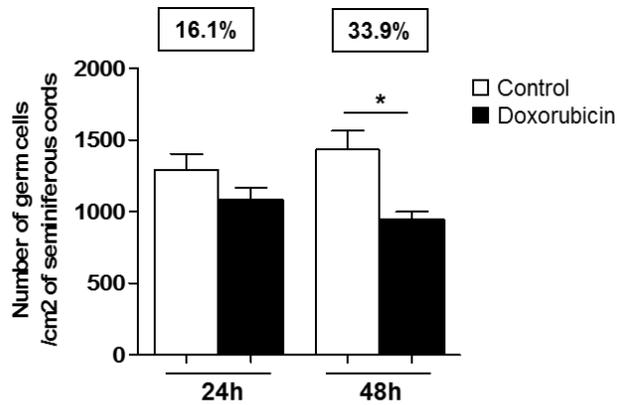


**Figure 5: Germ cells numeration after DXO injection in 6 PND rat.** HSP90-positive cells were quantified 24h (n=6) or 48h (n=5) after doxorubicin treatment. At least 130 seminiferous cords (or 1cm<sup>2</sup>) were analyzed. Data are expressed as number of HSP90-positive cells per unit of surface of seminiferous cords. Percentage represents the ratio of variation between the controls and the treated rats \*P<.05 by a paired student's t-test.

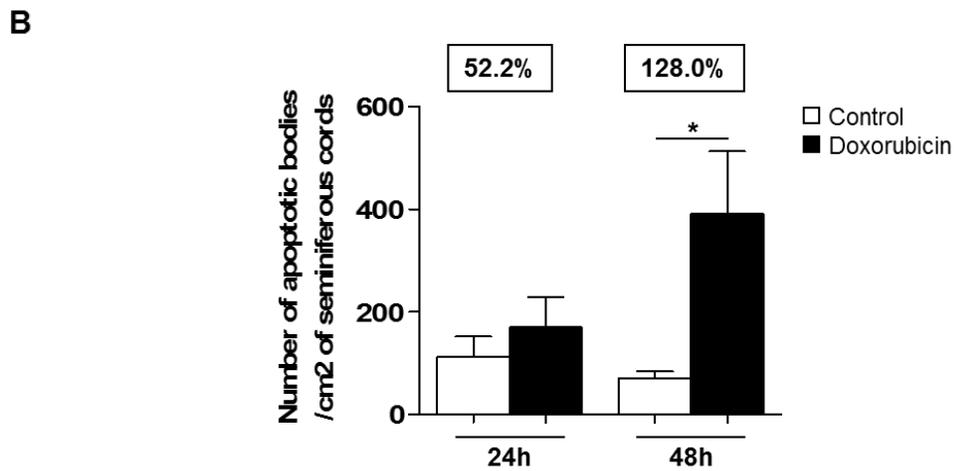
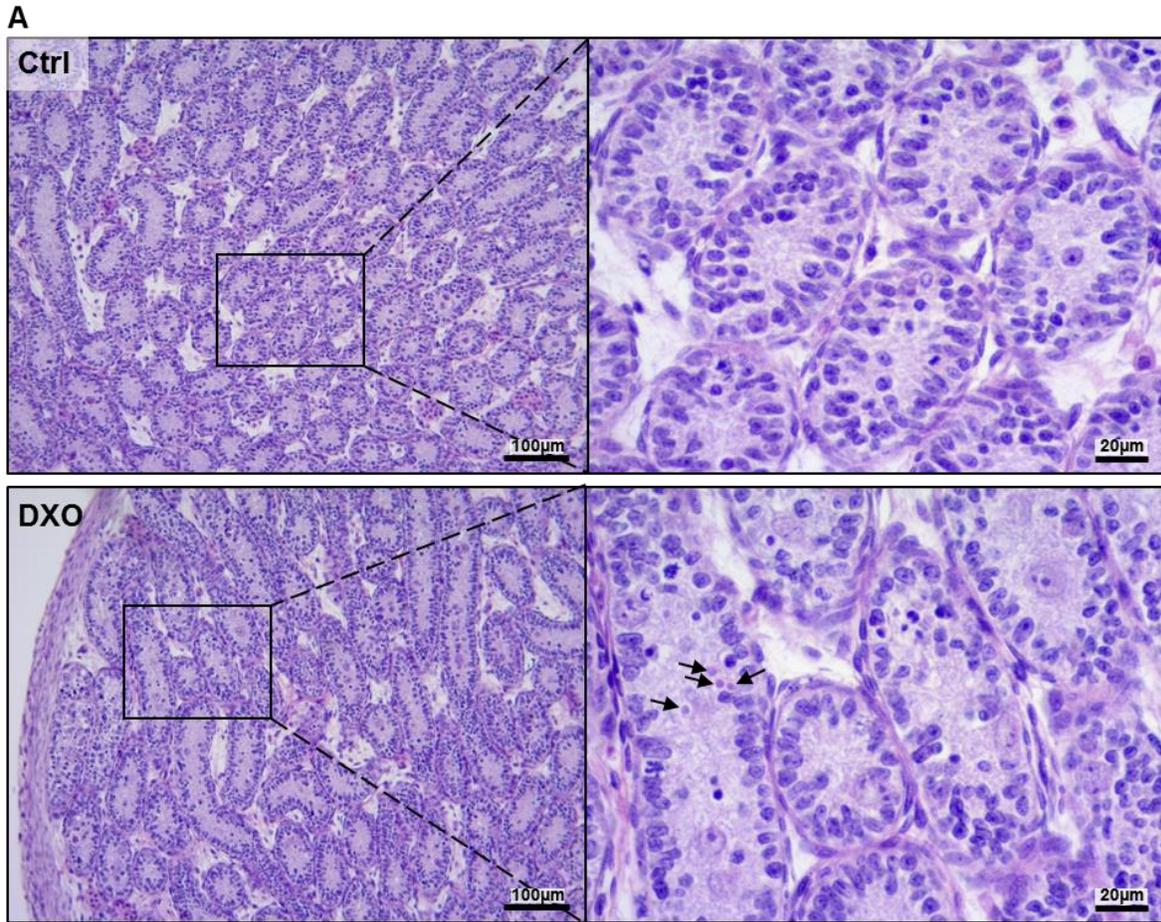
**A**



**B**



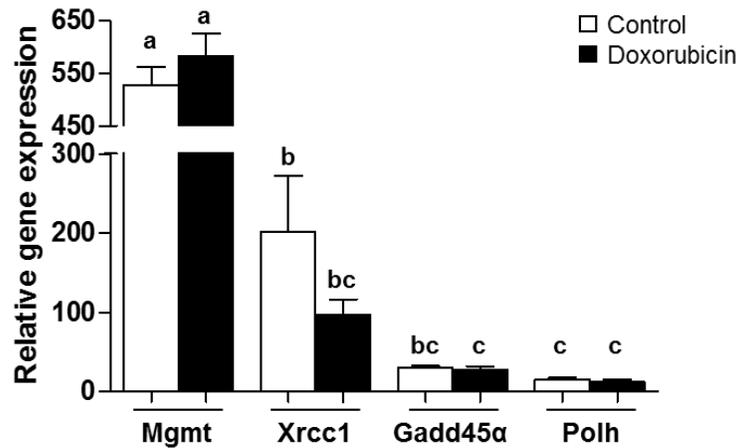
**Figure 6: Seminiferous cells apoptosis after DXO injection in 6 PND rat.** (A) Localization of the apoptotic bodies in control or treated-rat after hematoxylin and eosin staining. (B) Quantification of apoptotic bodies 24h and 48h after DXO treatment (n=5). Data are expressed as number of apoptotic bodies per unit of surface of seminiferous cords. Percentage represents the ratio of variation between the controls and the treated rats \*P<.05 by a 2way ANOVA.



**Table 1: Cell viability and purity after flow cytometry cell sorting 24h after the treatment of 6 PND rat.** Seminiferous cords cells obtained by double enzymatic digestion were purified 24h after the treatment (n=4) using the endogenous GFP expression in the germ cells. Data are expressed as percentage of the total cell sorted population  $\pm$  SEM. Significant differences were analyzed using a student paired T.test.

	Control (n=4)	DXO (n=4)
<b>Viability</b>	<b>98.7% <math>\pm</math>1.3</b>	<b>98.1% <math>\pm</math>0.8</b>
<b>Purity</b>	<b>92.9% <math>\pm</math>1.3</b>	<b>91.7% <math>\pm</math>1.3</b>

**Figure 7: DNA repair genes expression after DXO injection in 6 PND rat.** Quantification by qPCR of the expression of 4 DNA repair gene candidates 24h after DXO treatment (n=3). Data are expressed as relative gene expression  $\pm$  SEM.  $P < .05$ , using a student paired T.test.



### 3.5 - Discussion

In the present study, we aimed to evaluate the response of DNA repair gene expression in germ cells, enriched in SSC, after an *in vivo* exposure to DXO. To this end, we used germ cell-specific GFP expression rats to establish a model of prepubertal exposure to DXO with the possibility to purify a cell population enriched in SSC.

Knowledge on DNA repair response to genotoxic stress is poor in SSC, because of the difficulties to isolate them. Many SSC markers have been described (Shinohara *et al.* 1999, Kanatsu-Shinohara *et al.* 2004, Hermann *et al.* 2010). However to our knowledge, no membrane marker has been described to be SSC specific. Therefore, instead of a purification, only an enrichment in SSC can be done. In order to determine

the ability of a marker to enrich a cell population in SSC compare to a no-selected cell population, an *in vivo* and an *in vitro* method could be done (Brinster & Avarbock 1994, Marcon *et al.* 2010). For the *in vivo* method, the suspension of selected cells is transplanted in a germ-cell free testis recipient. The number of colonies establishing the spermatogenesis in the recipient seminiferous tubules, can be correlated to the proportion of SSC in the initial cell suspension (Brinster & Avarbock 1994). The cell surface protein CD9 is known to be expressed on somatic interstitial cells. However, CD9 has been described in the mouse, the rat, and the human to induced a 5-, 7-, and approximately a 3- to 4-fold enrichment respectively in SSC (Kanatsu-Shinohara *et al.* 2004, Zohni *et al.* 2012a). Therefore, we used the CD9 marker to determine the age at which SSC are enriched in the prepubertal rat testis.

In rat, germ cells start to differentiate from gonocyte to spermatogonia at 3 to 5 PND, and spermatogonia start to differentiate in spermatocyte at 9 PND (Clermont & Perey 1957, Culty 2009). Therefore, we quantified the proportion of CD9-positive cells in germ cells at 6 to 9 PND. At 6 PND, 90.0% of the germ cells, characterized by the GFP expression, were CD9-positive. A high proportion of SSC in 6 PND was also shown in the mouse with the observation by immunofluorescence of almost no overlap in the expression of GFRA1 (SSC marker) and KIT (marker of differentiated spermatogonia) (Niedenberger *et al.* 2015). To further investigate the impact of the exposure to doxorubicine in SSC, rats were treated at 6 PND when the proportion of GFP- and CD9- positive cells was the most enriched.

The reduction of the relative testicular weight compare to the control, suggests the gonadotoxicity of the DXO treatment. Two studies exposed 6 PND rats to DXO, but the testicular weight was not evaluated (Bechter *et al.* 1987, Hou *et al.* 2005). The treatment of 30 PND rats to DXO unchanged the testis weight in adulthood while histology damage occurs in the testis (Vendramini *et al.* 2010). The authors hypothesized that it might be explained by the increase of a testicular interstitial fluid volume that could be induced by a testosterone level disturbance and some secondary effects of oxidative stress (Vendramini *et al.* 2010). In our study, the circulating levels of testosterone in treated-rats were comparable to controls, suggesting that Leydig cell function was not altered by the DXO. Testosterone is essential during the puberty and in adulthood for the maintenance of spermatogenesis. Our data are in accordance with the literature on survivor males of pediatric cancer reporting the proper development of secondary sexual characteristics at the time of the puberty (Wallace *et al.* 1991, Wallace *et al.* 2011, Wasilewski-Masker *et al.* 2014). Using ABTS assay, we measured the antioxidant mechanisms in the serum after exposure to DXO (Re *et al.* 1999). The induction of oxidative stress is one of the DXO toxicity mechanism, and is well known to induce cardiotoxicity (Bechter *et al.* 1987, Zhang *et al.* 2005, Rochette

*et al.* 2015). We did not measure an elevation of antioxidant mechanisms after 24h or 48h of exposure to DXO, suggesting that oxidative stress induced by DXO treatment was at least sufficiently moderated to be undetectable in the systemic circulation. Due to technical limitation, we were not able to analyze by ABTS assay the oxidative stress within the testis. Immunostaining could be further used to measure oxidative stress marker in testis section, like the DNA oxidation (8-Oxo-2'-désoxyguanosine) or the lipid peroxidation (4-hydroxynonenal) (Jungsuwadee *et al.* 2006, Prahalathan *et al.* 2006).

In our model, we measured a decrease in germ cells number, 48h after the exposure to DXO. Apoptosis, proliferation arrest or a combination of both, could explain the reduction. Using a lower dose of DXO (3 mg/m<sup>2</sup>), two previous studies measured a germ cells depletion and apoptosis, 2 or 3 days after DXO treatment (Bechter *et al.* 1987, Hou *et al.* 2005). Using hematoxylin and eosin coloration, we measured a significant increase of apoptotic bodies 48h after DXO treatment. To confirm this result, additional experiments could be considered such as the staining of the cleaved caspase 3 by immunofluorescence (Lopes *et al.* 2016). However, Sertoli cells could also be targeted by the DXO (Brilhante *et al.* 2012). Prepubertal exposure to DXO induced morphological and functional impairment in adulthood. (Brilhante *et al.* 2012). We were not able to determine if the Sertoli cells could be part of the quantified apoptotic bodies. Therefore, the number of apoptotic bodies could include dying Sertoli cells. In accordance to what has been described by others, these results highlight the gonadotoxicity of the DXO, in part through germ cell reduction (Bechter *et al.* 1987, Hou *et al.* 2005, Vendramini *et al.* 2010, Vendramini *et al.* 2012).

In the aim to determine DNA repair pathways activated following exposure to DXO, we measured the expression of *Mgmt*, *Xrcc1*, *Polh*, and *Gadd45a* in purified GFP-positive cells 24h after exposure. Surprisingly, none of the 4 candidate DNA repair tested genes was different in DXO-exposed germ cells compared to controls. Interestingly, the *Mgmt* gene was the most expressed. In a rat spermatogonial cell line, we previously demonstrated that the *Mgmt* expression was the most activated, 24h after exposure to DXO (5 fold change) compare to the activation of *Xrcc1*, *Polh*, and *Gadd45a* expression (Beaud *et al.* 2017b). However, the *Mgmt* expression was the lowest (Beaud *et al.* 2017b). We hypothesize that the cell processing to obtain a GFP-positive cell suspension from testis trigger the activation of *Mgmt* expression in both control and treated cells samples. The low *MGMT* mRNA half-life (greater than 7h) (Fritz *et al.* 1991), supports the idea of *Mgmt* transcript accumulation during cell processing. Protein analysis by western blot in sorted cells and immunostaining on fixed testis will be necessary to confirm this hypothesis. Conversely, while in our previous *in vitro* study the *Gadd45a* gene expression was the most expressed (Beaud *et al.* 2017b), we measured *in vivo* a very low gene expression. *GADD45a* was shown to

be implicated in cell cycle arrest, apoptosis and DNA repair (Tamura *et al.* 2012). The differences of the DNA repair gene expression between our previous study *in vitro* (Beaud *et al.* 2017b), and the current *in vivo* model suggest three hypothesis: 1) DNA damage was not induced in sorted GFP-positive cells, 2) DNA damages were already repaired at the time of gene expression analysis 3) a DNA repair system failure occurs in the GFP-positive cells and 4) a sensitivity to DNA damage higher than the *in vitro* model. Establishment of the *in vivo* induction of DNA strand breaks after DXO treatment will determine if the dose and timing of treatment used in this model were optimal to measure DNA damage response. DNA breaks could be measured by COMET assay on GFP-positive cells or immunostaining of messenger of the DNA damage signaling as ATM and ATR (Turinetto & Giachino 2015). In the aim to determine if the DNA repair system failed in the GFP-positive cells, the DNA repair activity of strand break repair pathways could be measure using the extracts of undenatured proteins of sorted GFP-positive cells and specific probes coupled to a reporter gene (Datta *et al.* 2012, Kostyrko & Mermoud 2016).

The germline population sorted by flow cytometry with the GFP marker is enriched in SSC but has some degrees of heterogeneity. We isolated GFP-positive cells by flow cytometry with a purity of at least 91.7%, suggesting that somatic cells, such as Sertoli cells, could be sorted with the GFP-positive cells, and interfere in the DNA repair gene expression analysis. Moreover, although 90.0% of the germ cells express CD9 at the time of doxorubicin treatment, we did not measure the proportion of GFP- and CD9-positive cells at the time of the sorting. Physiologically, differentiated spermatogonia proliferates at this stage, leading to a decrease in the proportion of SSC in the testis. Therefore, SSC could represent less than 90% of the sorted cells. Finally, several sub-population constitute the SSC pool. Some SSC are thought to be quiescent, whereas others are proliferative active and promote the spermatogenesis (Nakagawa *et al.* 2007). In fact, Hermann *et al.* shown the heterogeneity of the SSC transcriptome with a single-cell transcriptomic analysis (Hermann *et al.* 2015). Using ID4 as a SSC marker, the expression of 122 genes was similar in SSC of 6 PND mouse whereas 50 genes shown a differential expression (Hermann *et al.* 2015). However, GC-6spg are a homogeneous cell population because they were derived from a clonal expansion (Van Pelt *et al.* 2002). Thus, in the heterogeneous population of the sorted cells, the expression of the *Mgmt*, *Xrcc1*, *Gadd45a* and *Polh* measured after exposure to DXO could be the global expression of SSC hiding the response of SSC subpopulation. Better characterization of the sorted cell population would be required to determine the nature and proportion of the other cells isolated by the GFP marker.

### **3.6 - Conclusion**

In the present study, we demonstrated that 5mg/kg of DXO in prepubertal rat did not affect steroidogenesis, but decreased the relative testis weight from 24h, and decreased the number of germ cells in part due to apoptosis in seminiferous cords 48h after the treatment. However, the expression of the 4 candidate genes involved in DNA repair in germ cells were not affected by treatment. This study established a model of prepubertal exposure to doxorubicin, where the response to the treatment can be analyzed on a cell suspension enriched in SSC. After an improvement in the characterization of the sorted cell population, this model could allow the proteins and genes expression analysis on a population enriched in SSC. Therefore, DNA repair gene expression and DNA repair pathway activity in response to DXO exposure could be evaluated.

### **3.7 - Acknowledgements**

The authors would like to thanks Morgane Perotte from the Pr Ramassamy lab for her help on the development of the ABTS assay.

## **PARTIE III : DISCUSSION**

Le taux de survie des cancers pédiatriques s'élevant en moyenne à plus de 80% s'associe à l'expansion de la population d'hommes survivants de cancer pédiatrique (Comité consultatif de la Société canadienne du cancer 2017). L'amélioration de la qualité de vie après rémission devient donc un enjeu majeur dans l'optimisation des traitements en oncologie (Ginsberg 2011). La possibilité d'infertilité masculine une fois à l'âge adulte est peu communiquée aux patients, mais fait partie des effets secondaires connus des chimiothérapies (Hohmann *et al.* 2011). En effet, deux études de larges cohortes ont rapporté une diminution du taux de natalité quand le père est un survivant de cancer pédiatrique, pour tous types de cancers confondus, comparé à la population générale (Green *et al.* 2003, Chow *et al.* 2016). Les causes d'infertilité peuvent être dues à une azoospermie, ou être associés à une perte de l'intégrité du génome des spermatozoïdes (Morris *et al.* 2002, Bungum *et al.* 2007, Romerius *et al.* 2011, Oleszczuk *et al.* 2016). L'effet à long terme de l'historique de cancer sur la qualité de la chromatine des spermatozoïdes de survivants diagnostiqués avant la puberté était peu documenté avant les travaux de cette thèse. D'autre part, peu de connaissances étaient acquises sur l'expression des gènes de réparation de l'ADN des cellules souches spermatogoniales (SSC ; *spermatogonial stem cells*), cellules cibles potentielles du testicule prépubère par les agents de chimiothérapies. Pourtant, l'impact des traitements de chimiothérapies sur les cellules germinales reste imprédictible, et aucun protocole médical ne permet à ce jour de préserver la fertilité des garçons diagnostiqués avant la puberté.

### **1. Effet à long terme de l'historique de cancer pédiatrique sur la fertilité**

Les survivants de cancers pédiatriques sont plus susceptibles d'avoir recours à la procréation médicalement assistée (Stensheim *et al.* 2013). En effet, il a été montré que la prévalence d'infertilité chez les survivants de cancer pédiatrique était de 46,0% contre 17,5% chez les membres de leur fratrie (Wasilewski-Masker *et al.* 2014). Après évaluation médicale des hommes infertiles, une azoo- ou oligozoospermie était diagnostiquée chez 65,1% des survivants contre 25% de leurs frères (Wasilewski-Masker *et al.* 2014). Cependant, 26,0% ne présentaient pas de problème de compte spermatique (Wasilewski-Masker *et al.* 2014), démontrant une grande proportion d'infertilité idiopathique parmi les survivants de cancers pédiatriques. L'analyse des paramètres spermatiques définis par l'OMS (compte spermatique, motilité et morphologie des spermatozoïdes) ne permet qu'une évaluation partielle de la qualité des spermatozoïdes (Delbes *et al.* 2010a). Dans les spermatozoïdes, des dommages dans l'ADN,

dont les cassures à l'ADN, peuvent être associés à des risques d'infertilité (Morris *et al.* 2002, Bungum *et al.* 2007, Oleszczuk *et al.* 2016). En effet, Bungum *et al.* ont montré que des anomalies de la chromatine des spermatozoïdes, mesurée par SCSA, sont associées à une diminution du nombre de grossesses et de naissances sur 998 cycles de procréation médicalement assistée (Bungum *et al.* 2007). Mesurées par test de SCSA et de COMET dans les spermatozoïdes, l'indice de fragmentation de l'ADN (%DFI) et le pourcentage d'ADN dans la queue de comète (%Tail DNA) respectivement, ont été corrélés avec des défauts de fécondation, de développement embryonnaire, et des risques de fausses couches (Morris *et al.* 2002, Bungum *et al.* 2007, Oleszczuk *et al.* 2016, Evenson 2017). Chez les rongeurs, l'exposition des mâles à des agents de chimiothérapies a induit des dommages à l'ADN des spermatozoïdes (Delbes *et al.* 2010b, Vendramini *et al.* 2012), et des défauts de développement embryonnaire, mesurés notamment par l'augmentation des pertes pré- et/ou post-implantatoires (Trasler *et al.* 1986, Seethalakshmi *et al.* 1992, Kato *et al.* 2001, Marchetti *et al.* 2001, Vaisheva *et al.* 2007, Marcon *et al.* 2008, Delbes *et al.* 2010b). Il pourrait donc exister un lien entre l'exposition aux agents de chimiothérapies et la persistance d'anomalies génétiques dans les spermatozoïdes. Ainsi, les cas d'infertilité idiopathique mesurés chez les survivants de cancers pédiatriques pourraient être dus à des anomalies de la chromatine ou de l'ADN des spermatozoïdes.

### **1.1 - Impact de l'âge au diagnostic du cancer sur les paramètres de fertilité à l'âge adulte**

Dans la littérature, les paramètres spermatiques ont été évalués chez les survivants de cancers pédiatriques. Dans ces études, les cancers pédiatriques ont été définis comme un diagnostic établi avant l'âge de la majorité civile (18 ans ou 21 ans selon les pays) (Green *et al.* 2010, Romerius *et al.* 2010). Pourtant, la puberté est un événement biologique critique dans la mise en place de la spermatogenèse chez les mammifères. Les cellules de Sertoli, les spermatogonies et une sous-population de SSC, sont en prolifération et en maturation (Paniagua & Nistal 1984, Cortes *et al.* 1987, Hermann *et al.* 2015). En effet, les cellules de Sertoli arrêtent leur prolifération qu'une fois la barrière hémato-testiculaire mise en place (Chemes 2001), et le profil transcriptomique des SSC chez la souris est hétérogène en période postnatale, suggérant que les SSC sont en maturation pour acquérir les propriétés nécessaires à la puberté pour établir une spermatogenèse complète (Hermann *et al.* 2015). Le nombre de cellules de Leydig augmente pendant la période postnatale, mais principalement dû à la maturation des cellules mésenchymales précurseur des cellules de Leydig (Hardy *et al.* 1989, Chamindrani Mendis-Handagama & Siril Ariyaratne 2001). Ainsi, les spermatogonies et les cellules de Sertoli en prolifération peuvent être la cible des

traitements de chimiothérapie avant la puberté (Meistrich 1986). Il était donc important de déterminer si une différence de sensibilité existe lorsqu'un cancer est traité avant ou après la puberté.

### **1.1.1 - la prévalence d'azoo- ou oligozoospermie selon l'âge au diagnostic**

Aucune différence de compte spermatique n'a été mesurée entre les différents groupes de notre cohorte. Toutefois, nous avons mis en évidence chez les survivants de cancers pédiatriques une grande prévalence d'azoo- ou oligozoospermie en comparaison de la population générale (chapitre 1). Dans notre cohorte, les hommes survivants de cancers pédiatriques, et particulièrement ceux diagnostiqués après la puberté, avaient un l'indice de masse corporelle (IMC) significativement plus élevé que les hommes témoins, révélant un diagnostic de surpoids sans obésité chez certains survivants (chapitre 1, tableau 1). L'azoo- ou oligozoospermie pourraient être induites indirectement par l'IMC (Bieniek *et al.* 2016, Luque *et al.* 2017). Toutefois, bien que l'impact négatif de l'obésité soit démontré sur les paramètres spermatiques, les études sont controversées sur l'effet d'un surpoids sur la concentration spermatique (Bieniek *et al.* 2016, Luque *et al.* 2017). Dans l'étude de Luque *et al.*, une large cohorte de 2493 hommes en surpoids ne présentait pas de différence de compte spermatique en comparaison d'hommes avec un IMC dans les normes (Luque *et al.* 2017).

Selon le type de cancer et de traitement reçu, différentes études ont rapporté que 18 à 53% des survivants de cancer pédiatrique sont azoospermiques (Wallace *et al.* 1991, Andreu *et al.* 2000, Thomson *et al.* 2002, Romerius *et al.* 2011), contre 0 à 34% des hommes diagnostiqués à l'âge adulte, et évalués dès un an après l'arrêt du traitement (Tal *et al.* 2000, Thomas *et al.* 2004, Howell & Shalet 2005, Stahl *et al.* 2009, O'Flaherty *et al.* 2010, Bujan *et al.* 2014, Paoli *et al.* 2016). Dans notre étude, 2 hommes sur 6 (33,3%) diagnostiqués avant la puberté, et 1 homme sur 7 (14,3%) diagnostiqués après la puberté sont azoospermiques (chapitre 1, figure 2). Il pourrait être suggéré que la grande prévalence d'azoospermie chez les survivants de cancer pédiatrique serait due à une plus grande sensibilité des cellules germinales avant la puberté. Toutefois, bien que notre étude cible les cancers hématologiques comme type de cancer pédiatrique, les pathologies et les traitements administrés sont hétérogènes entre les individus de notre cohorte (chapitre 1, tableau 2). Ainsi, la différence de prévalence d'azoo- et oligozoospermie pourrait être due à l'administration d'agent de chimiothérapies différent entre les individus. En effet, Garolla *et al.* ont montré que le compte spermatique de survivants de cancers pédiatriques ayant reçu comme agent alkylant du cyclophosphamide était significativement diminué comparé aux survivants ayant reçu de l'ifosfamide (Garolla *et al.* 2014). Le recrutement d'une cohorte homogène dans les agents de

chimiothérapies reçus permettrait de mieux définir le rôle de l'âge au diagnostic dans la sensibilité des cellules germinales aux traitements anti-cancéreux.

### 1.1.2 - l'intégrité du génome des spermatozoïdes selon l'âge au diagnostic

À ma connaissance, notre étude transversale est la première à analyser l'intégrité du génome des spermatozoïdes chez des survivants de cancers pédiatriques, en distinguant les hommes diagnostiqués avant ou après la puberté. Avant les travaux de cette thèse, deux études seulement s'étaient intéressées à l'intégrité de la chromatine ou de l'ADN des spermatozoïdes chez les survivants de cancers pédiatriques (Thomson *et al.* 2002, Romerius *et al.* 2010). Sans distinction de types de cancers pédiatriques et de traitements reçus, aucune des deux études n'avait mesuré de différence significative d'altération de la chromatine ou de l'ADN des spermatozoïdes par rapport au groupe témoin du même âge (Thomson *et al.* 2002, Romerius *et al.* 2010). De plus dans l'étude de Romerius *et al.*, des sous-cohortes ont été analysées en fonction du type de traitement (Romerius *et al.* 2010). La chimiothérapie, seule ou en combinaison avec de la radiothérapie, a induit une diminution significative du compte spermatique, mais sans affecter l'intégrité de la chromatine des spermatozoïdes (%DFI, mesuré par test de SCSA) (Romerius *et al.* 2010). Dans notre étude transversale, en accord avec les études précédentes de Romerius *et al.* et Thompson *et al.*, nous n'avons pas mesuré de différence significative du %DFI ou de cassures de l'ADN, respectivement, dans les spermatozoïdes entre les hommes témoins et l'ensemble des survivants de cancers pédiatriques (chapitre 1, figure 3). De plus, l'analyse du %DFI et du %Tail DNA dans les sous-cohortes d'hommes diagnostiqués avant ou après la puberté n'a pas montré de différence significative. La consommation de tabac a été associée à l'altération de l'ADN et de la chromatine des spermatozoïdes, mesurée par des tests de SCSA et de COMET chez le rat (Polyzos 2009). Dans notre cohorte, seulement 3 hommes survivants de cancers pédiatriques ont déclaré être des fumeurs, ne permettant pas d'établir si la consommation de tabac pourrait être à l'origine d'augmentation de %DFI ou %Tail DNA. Il est intéressant de noter que le %HDS est diminué chez les survivants diagnostiqués avant la puberté (chapitre 1, figure 3). Romerius *et al.* n'ont pas analysés ce paramètre (Romerius *et al.* 2010). Dans des cohortes d'hommes traités à l'âge adulte, le %HDS était significativement affecté chez les survivants de cancer des testicules deux ans après rémission, mais n'était pas différent des témoins chez les survivants de lymphome (O'Flaherty *et al.* 2012, Bujan *et al.* 2014). Ainsi, des études sur de plus grandes cohortes de survivants de cancer diagnostiqué avant ou après la puberté seraient nécessaires pour confirmer que l'âge au diagnostic n'induit pas de dommage significatif sur l'intégrité du génome des spermatozoïdes à l'âge adulte.

## 1.2 Effets des traitements sur l'intégrité du génome des cellules germinales

Nous avons cherché à déterminer si un lien pouvait être établi entre des agents spécifiques de chimiothérapie reçus pendant l'enfance et la prévalence d'azoo- ou oligozoospermie ou l'induction d'anomalies du génome des spermatozoïdes. L'azoo- ou oligozoospermie peut être induite par la déplétion totale ou partielle des cellules germinales, comme observé dans des biopsies testiculaires prélevées à la fin d'un traitement chez des garçons prépubères (Müller *et al.* 1988, Nurmio *et al.* 2009, Poganitsch-Korhonen *et al.* 2017). Cette déplétion pourrait en partie être due à l'induction de dommages à l'ADN des SSC par les agents de chimiothérapie, entraînant leur apoptose (Meistrich *et al.* 1982, Meistrich 1986). Il a été montré chez les rongeurs que les agents alkylants et les antibiotiques anti-cancéreux, comme la doxorubicine, pouvaient entraîner la formation de cassures de l'ADN dans les cellules germinales (Aguilar-Mahecha *et al.* 2005, Vendramini *et al.* 2012, Liu *et al.* 2014, Habas *et al.* 2016). De plus, la persistance d'anomalie dans les spermatozoïdes après un historique de cancer peut être soulignée par la transmission d'anomalies génétique à la descendance. En effet sur une large cohorte de 8670 naissances issues d'hommes survivants de cancer, Stahl *et al.* ont montré une augmentation faible, mais significative du risque relatif de développement d'anomalies congénitales par rapport à la population générale (RR = 1,12, p = 0,0183) et en particulier des anomalies congénitales majeures (RR = 1,17, p = 0,0043) (Stahl *et al.* 2011). Toutefois ces résultats sont controversés puisque d'autres études n'ont pas mesuré d'effet significatif (Stensheim *et al.* 2013, Seppanen *et al.* 2016, Tremblay *et al.* 2017). Chez le rat, les risques d'anomalies congénitales dans la descendance ont été principalement observés lors d'exposition chronique à de fortes doses d'agents alkylants (Trasler *et al.* 1985, Trasler *et al.* 1986, Seethalakshmi *et al.* 1992). Après la naissance, des modifications d'expression de gènes testiculaires et des mutations génétiques dans les spermatozoïdes ont pu être mesurées dans la descendance de mâles exposés aux agents alkylants (Maselli *et al.* 2013). D'autre part, les effets d'agents non alkylants, comme les antibiotiques anti-cancéreux, sur la descendance n'ont pas encore été étudiés, mais des défauts de développement embryonnaire ont été montrés après exposition du père à la doxorubicine ou la bléomycine (Marchetti *et al.* 2001, Vendramini *et al.* 2012). Il est intéressant de noter que des effets transgénérationnels ont également été montrés suite à l'exposition de rats mâles à un agent alkylant, le cyclophosphamide (Auroux *et al.* 1990). Une augmentation de la mortalité post-natale, et des troubles de l'apprentissage ont été mesurés jusqu'à la troisième génération (Auroux *et al.* 1990). Les effets inter- et transgénérationnels d'une exposition aux chimiothérapies chez le père ont été rapportés dans le cadre d'une revue de littérature (voir annexe I) (Tremblay *et al.* 2017). Les effets inter- et transgénérationnels

peuvent être le reflet d'anomalies du génome des spermatozoïdes, et seraient dépendants de la nature et de la dose des agents de chimiothérapie administrés. Ainsi, les troubles de la fertilité, tels que l'azoospermie ou oligozoospermie et une perte de l'intégrité génomique des spermatozoïdes, pourraient être associés à des agents et des doses spécifiques de chimiothérapie.

### **1.2.1 - agents alkylants et effets quantitatifs sur la spermatogenèse**

Les agents alkylants sont connus pour être toxiques pour les cellules germinales (Spitz 1948, Green *et al.* 2010). L'administration de forte dose permet de meilleures chances de survie au cancer, mais induit un risque plus élevé d'azoospermie due à la déplétion des cellules germinales (Pryzant *et al.* 1993, Sanders *et al.* 1996).

Dans notre étude transversale, nous avons montré qu'il existe une corrélation entre les agents alkylants reçus et la prévalence d'azoospermie ou oligozoospermie mesurée chez les survivants de cancers pédiatriques. Récemment, Green *et al.* ont développé une formule permettant de calculer la dose cumulée des agents alkylants par pondération des potentiels toxiques de chaque agent alkylant par rapport à la cyclophosphamide (CED ; *cumulative equivalent dose*) (Green *et al.* 2014). En utilisant cette formule, nous avons mis en évidence une corrélation négative significative entre la CED et le compte spermatique (chapitre 1, tableau 3). Dans notre cohorte, la CED est inférieure à 5250 mg/m<sup>2</sup>, et les hommes azoospermiques ou oligozoospermiques ont reçu une CED de 2250, 4286 ou 4800 mg/m<sup>2</sup>. Or, Chow *et al.* ont mis en évidence que l'infertilité des hommes survivants de cancers pédiatriques, mesurée par la capacité de la partenaire à être enceinte, est augmentée à chaque tranche de 5000mg/m<sup>2</sup> de CED (Chow *et al.* 2016). Dans l'étude de Green *et al.*, 89% des hommes survivants de cancer pédiatrique ayant reçu moins de 4000 mg/m<sup>2</sup> de CED étaient normospermiques, et le risque d'azoospermie ou oligozoospermie augmentait à chaque tranche de 1000mg/m<sup>2</sup> de CED (Green *et al.* 2014). Les faibles doses de CED observées dans notre cohorte suggèrent que d'autres facteurs pourraient avoir un effet combiné aux agents alkylants dans le diagnostic de stérilité.

### 1.2.2 - antibiotiques anti-cancéreux et effets sur la qualité des spermatozoïdes

La déplétion des cellules germinales pourrait en partie être causée par l'induction d'un grand nombre de dommages à l'ADN des SSC au moment du traitement. En effet de façon générale, lors de l'induction de dommage à l'ADN, les voies de signalisation déclenchées par la reconnaissance du site altéré entraînent l'arrêt du cycle cellulaire (figure 19) (Sancar *et al.* 2004). Lorsque les dommages sont nocifs pour la cellule, ou s'ils s'accumulent, la cellule entrera en apoptose. Dans le cas contraire, les altérations de l'ADN seront corrigées par les systèmes de réparation de l'ADN. La réparation pourra être efficace, incomplète, ou pourra induire des mutations dans l'ADN (figure 19) (Sancar *et al.* 2004).

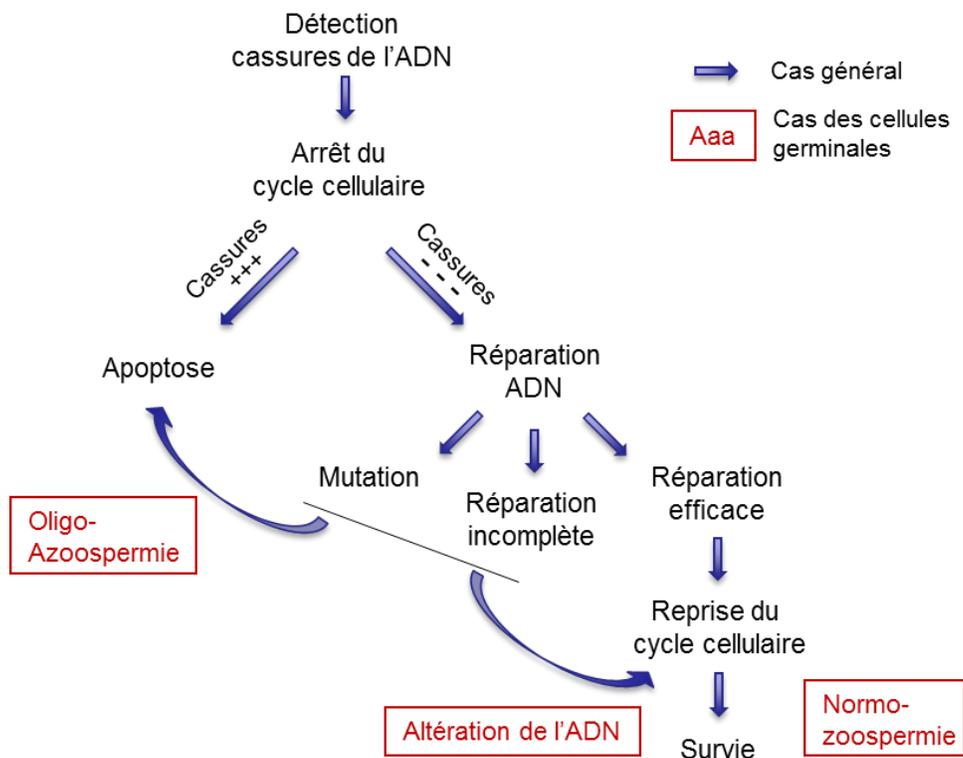


Figure 19 : Représentation schématique des mécanismes cellulaires généraux mis en place suite à la détection de cassures de l'ADN et conséquences possibles dans le cas des cellules germinales

Afin de déterminer s'il existe une corrélation entre un agent de chimiothérapie et l'accumulation de dommage à l'ADN des spermatozoïdes des survivants de cancers pédiatriques, nous avons réalisé des analyses de corrélation avec les doses cumulées de chaque agent de chimiothérapie reçu (chapitre 1,

tableau 3). Plus la dose cumulée d'antibiotique anti-cancéreux administrée, et particulièrement de doxorubicine, est importante, plus le %DFI mesuré par SCSA et le %Tail DNA mesuré par HT-COMET seraient élevés. En effet, une corrélation significative a été mesurée entre le %DFI et la dose cumulée d'antibiotique anti-cancéreux. Dans notre étude, cette classe d'agent de chimiothérapie est représentée par la bléomycine et la doxorubicine. De façon intéressante, la dose cumulée de doxorubicine, mais pas celle de bléomycine, corrèle avec le %DFI et le %Tail DNA avec un coefficient de corrélation élevé ( $r > 0,7$ ;  $p < 0,05$ ). La dose de bléomycine reçue est 1,5 à 3 fois moins élevée que la dose de doxorubicine (chapitre 1, tableau 2), mais son mécanisme d'action est proche de celui de la doxorubicine, puisqu'une liaison directe à l'ADN et l'induction de stress oxydatif sont impliquées dans l'induction de cassures de l'ADN (Hecht 2000). Ces résultats suggèrent que la doxorubicine, indépendamment de la bléomycine, aurait un rôle dans la production de spermatozoïdes altérés. L'altération à long terme de la chromatine et de l'ADN des spermatozoïdes de survivants de cancer pédiatrique pourrait, en partie, être issue de l'altération de la réparation des anomalies dans le génome des spermatogonies souches. Dans le chapitre 2, nous avons donc utilisé un modèle *in vitro* de SSC de rat (GC-6spg) pour caractériser la toxicité de la doxorubicine sur ces cellules, déterminer si la doxorubicine pouvait induire des dommages à l'ADN, et induire l'activation de gène de réparation de l'ADN.

### **1.2.3 - la doxorubicine et l'intégrité du génome des SSC**

La toxicité de la doxorubicine sur le testicule prépubère avait été caractérisée sur des modèles de rongeur (Revue de la littérature, tableau 5) (Lu & Meistrich 1979, Bechter *et al.* 1987, Hou *et al.* 2005, Vendramini *et al.* 2010, Vendramini *et al.* 2012) et, après le début de cette étude, sur un modèle *in vitro* de spermatogonie (Habas *et al.* 2016). En effet, une dose de doxorubicine (5 mg/kg) chez des rats prépubères de 30 jpp, équivalente à un cycle de chimiothérapie chez les enfants, a entraîné à long terme à l'âge adulte l'altération de la chromatine et une accumulation de cassures dans l'ADN dans les spermatozoïdes, mesurée par test de SCSA et de COMET respectivement (Vendramini *et al.* 2012). De plus, l'action préférentielle de la doxorubicine sur les SSC a été soulignée par l'étude de Meistrich *et al.*, où 6 agents testés (incluant des agents alkylants, des alcaloïdes et des antimétabolites), ont ciblé préférentiellement les spermatogonies, tandis que la doxorubicine a induit une cytotoxicité significative sur les SSC, 11 jours après un traitement de 3mg/kg chez la souris (Lu & Meistrich 1979). Dans un modèle *in vitro* de SSC de rat (GC-6spg), nous avons démontré que l'action immédiate de la doxorubicine induit une cytotoxicité

temps et dose dépendante dans les jours suivant l'exposition, *via* l'induction de cassures de l'ADN (chapitre 2, figure 1, 2, et 3). L'induction de cassures de l'ADN par la doxorubicine a également été confirmée *in vitro* sur des spermatogonies de souris (Habas *et al.* 2016). Dans notre étude et dans celle de Habas *et al.*, le test de COMET a été réalisé en condition alcaline permettant de révéler les cassures simples et doubles brins (Habas *et al.* 2016, Beaud *et al.* 2017b). Par la suite, un test de COMET en condition neutre permettrait de préciser les résultats en révélant uniquement les cassures doubles brins de l'ADN. La doxorubicine possède d'autres mécanismes de toxicité comme l'induction de stress oxydatif (Rochette *et al.* 2015). Dans notre étude *in vitro*, l'implication de l'induction de cassures de l'ADN est mise en évidence dans l'action de la doxorubicine sur les spermatogonies du testicule prépubère.

Une hypothèse a été formulée par Meistrich supportant que les dommages induits dans l'ADN des SSC seraient soit réparés, soit provoqueraient la mort de la cellule (Meistrich 2009). Un mécanisme de tout ou rien qui permettrait la conservation de l'intégrité du matériel génétique en empêchant l'accumulation de dommage dans les SSC et, de ce fait, préserverait la descendance d'anomalie génétique. Dans le chapitre 3, nous avons montré qu'une dose de 5 mg/kg de doxorubicine chez le rat prépubère induit une diminution significative du nombre de cellules germinales 48h après le traitement, associée à une augmentation du nombre de corps apoptotique dans les cordons séminifères (chapitre 3, figure 5 et 6). De plus, nous avons décrit des cas d'azoo- ou oligozoospermie dans la cohorte d'hommes survivants de cancer pédiatrique (chapitre 1, figure 2). Enfin, l'accumulation de dommage dans les cellules germinales est suggérée par la mise en évidence d'une corrélation entre l'altération de la chromatine ou l'induction de cassures de l'ADN, et la dose cumulée de doxorubicine (chapitre 1, tableau 3). Il n'est pas clair si l'accumulation de cassures de l'ADN dans les SSC pourrait être impliquée dans le développement de troubles de la fertilité chez les survivants de cancer pédiatrique. Toutefois, les SSC étant sensibles à l'action de la doxorubicine, il est important de déterminer si des mécanismes de défense sont en place dans les SSC pour maintenir l'intégrité du matériel génétique.

## **2. LES MÉCANISMES DE RÉPARATION DE L'ADN DANS LES SSC**

Les voies de réparation des cassures double brins de l'ADN, les voies BER et NER, ainsi que la voie de réparation des mésappariements ont été mises en évidence dans les spermatogonies (Jaroudi & SenGupta 2007). Toutefois, il a été montré que les mécanismes de réparation de l'ADN diffèrent d'un stade de maturation des cellules germinales à un autre (Jaroudi & SenGupta 2007). Peu d'études se sont intéressées aux mécanismes de réparation de l'ADN dans les SSC (partie I, tableau 6). Les voies de

réparation décrites dans les spermatogonies ne peuvent donc pas être transposées aux SSC. Dans ces précurseurs de la spermatogenèse, le rôle de MGMT a été suggéré dans la préservation des SSC puisque des souris traitées avec un inhibiteur chimique de MGMT (O<sup>6</sup>-benzylguanine) et un agent alkylant (le BCNU) n'ont pas rétabli la spermatogenèse après plus d'un cycle de spermatogenèse (42 jours) (Thompson *et al.* 2000). De plus, des acteurs de la réparation des cassures doubles brins (53BP1, ATM, BRCA1, H2AX, et DNA-PK) ont été mis en évidence dans les SSC principalement par co-immunomarquage avec le marqueur PLZF (Takubo *et al.* 2008, Rube *et al.* 2011, Fok *et al.* 2017). En effet, le manque de marqueur spécifique des SSC empêche leur purification pour réaliser des analyses transcriptomiques (Shinohara *et al.* 2000). Par des modèles murins knock-out pour le gène *Prkdc* (codant la protéine DNA-Pkcs) ou pour le gène *Atm*, deux études ont rapporté l'importance de la voie NHEJ dans la survie et le maintien de la fonction souche des SSC (Takubo *et al.* 2008, Rube *et al.* 2011). Toutefois, la voie NHEJ ne serait pas majoritaire, suggérant l'implication d'une voie DNA-PK indépendante dans le maintien de l'intégrité du génome des SSC (Rube *et al.* 2011).

Dans les chapitres 1 et 2, nous avons démontré que l'exposition à la doxorubicine est corrélée avec une augmentation des cassures de l'ADN mesurées dans les spermatozoïdes de survivants de cancers pédiatriques (tableau 3), et dans les spermatogonies de rat *in vitro* (figure 3). Ces résultats suggèrent que l'induction de cassures de l'ADN dans les SSC au moment du traitement serait responsable de la formation de spermatozoïdes à l'ADN altéré. Il peut être formulé comme hypothèse qu'un dysfonctionnement des systèmes de réparation de l'ADN pourrait induire la persistance de cassure ou à l'inverse, que l'induction de cassures par la doxorubicine pourrait affecter les systèmes de réparation de l'ADN. Au fil des cycles de la spermatogenèse, ces altérations dans les cellules souches pourraient affecter l'ensemble des stades de maturation des cellules germinales, et avoir un impact sur la qualité de l'ADN des spermatozoïdes. Par exemple, l'altération des systèmes de réparation de l'ADN dans les spermatides pourraient réduire l'efficacité de la réparation des cassures post-méiotique, indispensables à la compaction de l'ADN des spermatozoïdes.

Les relations de cause à effets ne peuvent pas être établies dans une cohorte de survivants de cancer pédiatrique puisque le nombre d'années séparant l'administration du traitement et l'évaluation de la qualité spermatique amplifient les risques de facteurs de comorbidité, tel que l'exposition environnementale à des agents gonadotoxiques connus comme les perturbateurs endocriniens (Foresta *et al.* 2017). Nous avons donc étudié la capacité des SSC à maintenir l'intégrité de leur génome par l'analyse des systèmes de réparation de l'ADN dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. Contrairement aux

études *in vivo* limitées par le manque de marqueur spécifique des SSC, un modèle *in vitro* nous a permis de cibler notre analyse sur les spermatogonies aux caractéristiques souches.

## 2.1. Activation de gène de réparation de l'ADN dans les GC-6spg

Plusieurs modèles de lignées cellulaires et de culture primaire de SSC étaient disponibles au début de mon doctorat (Hofmann *et al.* 1992, Van Pelt *et al.* 2002, Kubota *et al.* 2004, Hofmann *et al.* 2005, Marcon *et al.* 2010). Les lignées cellulaires sont plus rapide à mettre en place dans le laboratoire, et parmi les lignées cellulaires, la lignée GC-6spg, développée par Van Pelt *et al.*, était le modèle permettant de se rapprocher au mieux des propriétés de cellules souches des spermatogonies. Grâce à ce modèle *in vitro* de SSC, l'expression constitutive de 75 gènes impliqués dans la réparation de l'ADN a été mesurée (chapitre 2, tableau 2). Chaque dommage à l'ADN déclenche des mécanismes de réparation spécifique, et l'implication de nombreux acteurs (Genois *et al.* 2014). Le rôle des protéines codées par ces 75 gènes n'a pas encore été validé dans les SSC, mais l'expression constitutive de l'ensemble de ces gènes souligne un fort potentiel de réparation dans les GC-6spg. À ma connaissance, il s'agit de la première description d'une large liste de gènes de réparation de l'ADN exprimée dans des spermatogonies avec des caractéristiques souches. Afin de déterminer lesquels de ces acteurs pourraient être impliqués dans la réponse à l'induction de cassure de l'ADN, nous avons exposé les GC-6spg à une dose non cytotoxique de doxorubicine induisant des cassures de l'ADN. L'expression du gène *Ung* a été significativement diminuée, et l'expression de 7 gènes de réparation de l'ADN a été significativement augmentée (*Mgmt*, *Bard1*, *Gadd45α*, *Gadd45γ*, *Polh*, *Rev1* et *Xrcc1*) (chapitre 1, figure 5). Parallèlement, l'expression est également activée pour 8 gènes impliqués dans le processus de réparation de l'ADN par modulation du cycle cellulaire ou de l'apoptose (Beaud *et al.* 2017b).

L'uracil-DNA glycosylase (UNG), retrouvé dans les cellules germinales des rongeurs et chez l'homme (Olsen *et al.* 2001), intervient lors de l'incorporation de base uracile dans l'ADN, ou lors de la désamination de la base cytosine la transformant en uracile. Le changement de la base uracile par UNG suit les mécanismes de réparation de la voie BER (*Base Excision Repair*) (Olsen *et al.* 2001). La doxorubicine n'étant pas impliquée dans des mécanismes de désamination ou de mésappariement de base, il n'a pas été surprenant que l'expression du gène *Ung* ne soit pas activée.

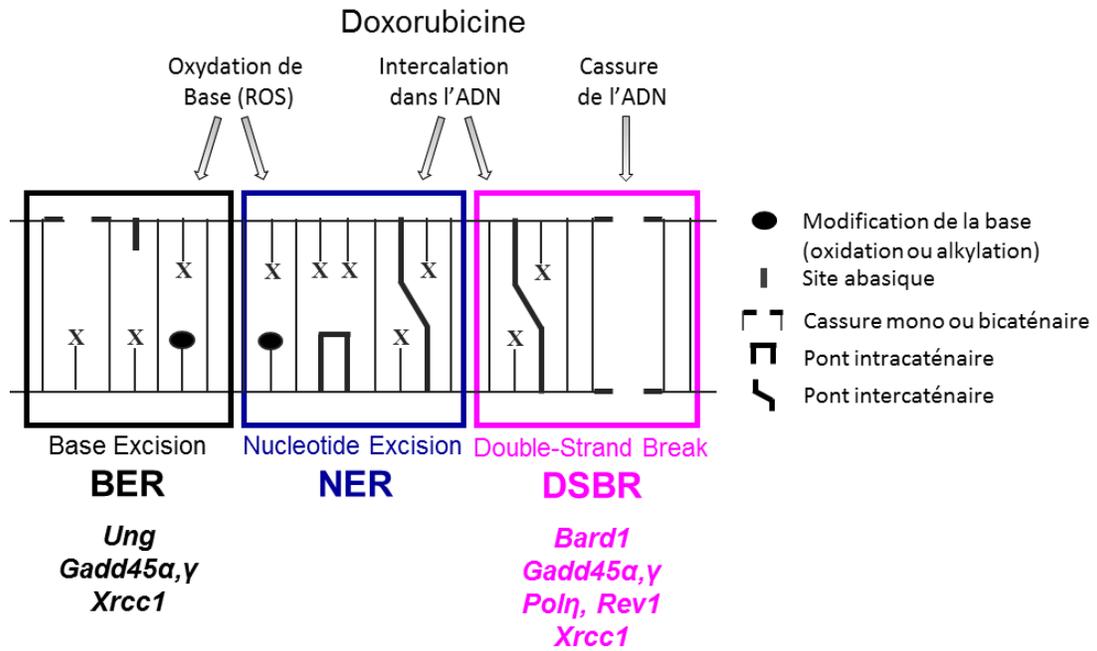
La protéine MGMT est une méthyltransférase intervenant dans la réparation de la base guanine (Tubbs *et al.* 2007). Un groupement alkyle ou aliphatique en position O<sup>6</sup> est éliminé par une réaction stœchiométrique de la molécule de MGMT. Cette intervention coûteuse en énergie pour la cellule est

efficace puisqu'aucun intermédiaire protéique n'est nécessaire, et le processus n'a pas de potentiel mutagène. Le rôle de MGMT dans la protection contre un agent alkylant, le BCNU, a été suggéré dans les SSC de souris (Thompson *et al.* 2000). La doxorubicine peut former une liaison covalente avec une guanosine par l'intermédiaire d'un formaldéhyde, issu du métabolisme de la doxorubicine (Taatjes *et al.* 1997), mais à ma connaissance, un mécanisme d'alkylation en position O<sup>6</sup> de la guanine par la doxorubicine n'a encore jamais été décrit. Il est donc surprenant qu'un traitement à la doxorubicine augmente l'expression de *Mgmt*. Dans notre modèle *in vitro* de rat, le gène *Mgmt* était le plus stimulé par le traitement à la doxorubicine (chapitre 2, figure 5). Nous avons donc cherché à confirmer l'augmentation des ARNm au niveau protéique par technique d'immunobuvardage de type Western blot, d'immunofluorescence, et par cytométrie en flux (données non montrées). Toutefois, par manque de spécificité des anticorps testés (Abcam ab63930 et ab112504, Novus NBP1-19712, Santa cruz 166528), l'augmentation de la quantité de MGMT n'a pas pu être mise en évidence au niveau protéique.

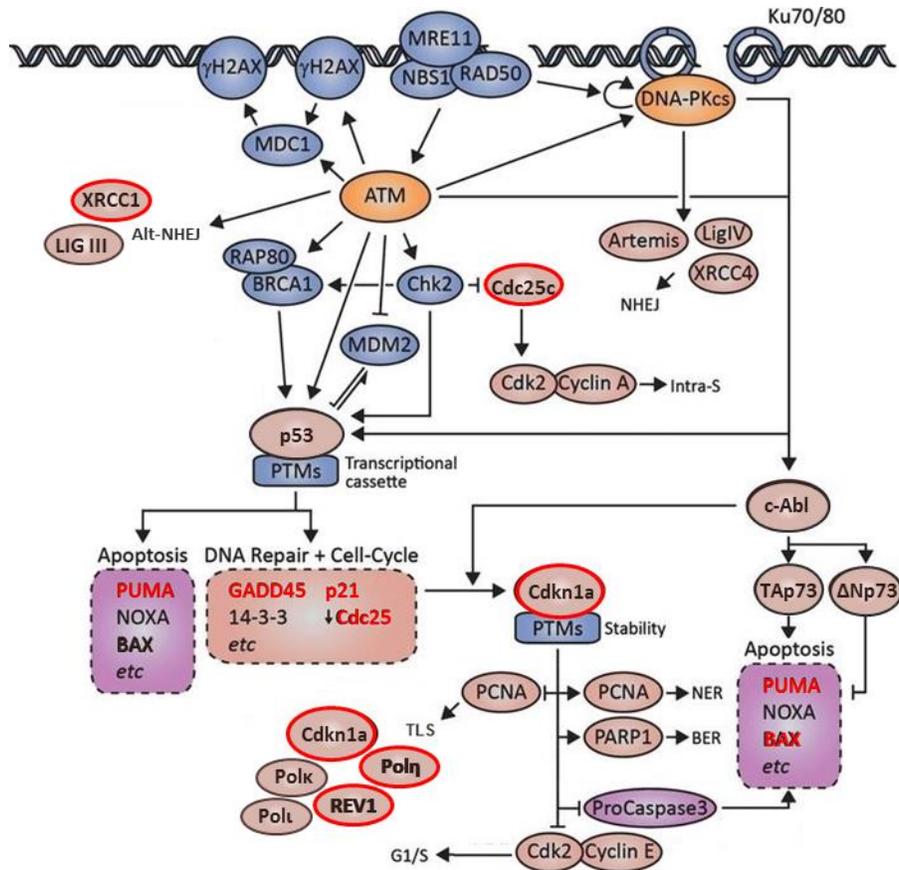
La protéine BARD1 a été mise en évidence dans la signalisation de la réparation des cassures double brins de l'ADN (Irminger-Finger *et al.* 2016). Elle forme un complexe avec BRCA1 pour être ensuite recrutée au site de coupure des brins d'ADN et être liée à la poly(ADP-ribose) (Li & Yu 2013). À son tour, le complexe BARD1-BRCA1 recrute d'autres acteurs de la réparation (Li & Yu 2013). Dans notre modèle *in vitro* de SSC, l'augmentation de l'expression du gène *Bard1* 24h après une exposition à la doxorubicine, suggère que des mécanismes de réparation peuvent être enclenchés suite à l'induction de cassure double brins.

Les protéines GADD45 $\alpha$  et GADD45 $\gamma$  font partie de la famille des protéines GADD45 (Tamura *et al.* 2012). Plusieurs rôles ont été attribués à ces protéines suite à un dommage à l'ADN. Leur induction rapide permettrait de moduler la balance entre l'arrêt du cycle cellulaire et l'activation de l'apoptose, et permettrait d'agir dans la médiation de la réparation de l'ADN (Tamura *et al.* 2012). Par interaction avec CDKN1A (également appelé p21), GADD45 $\alpha$  et GADD45 $\gamma$  activerait l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S ou G2/M (Kearsey *et al.* 1995, Fan *et al.* 1999). Dans notre modèle *in vitro*, le gène *Cdkn1a* est activé après traitement avec la doxorubicine (Beaud *et al.* 2017b). Les protéines GADD45 peuvent également activer la voie p38/JNK pour induire l'apoptose et ainsi moduler la balance entre la survie et la mort cellulaire (Takekawa & Saito 1998). Le rôle des protéines GADD45 dans la réparation de l'ADN n'est pas clair. Notamment, GADD45 $\alpha$  a été décrit pour agir dans la voie BER, ainsi que dans la voie NER (*Nucleotide Excision Repair*) (Jung *et al.* 2007). Ces deux mécanismes de réparation ont été démontrés être actifs dans les spermatogonies (Intano *et al.* 2002, Xu *et al.* 2005). L'intervention de la voie BER et NER après traitement à la doxorubicine pourrait s'expliquer par le fait que la doxorubicine peut induire l'oxydation

de base d'ADN (figure 20). De plus, la formation de pont intracaténaire fonctionnel par la liaison covalente de la doxorubicine avec la guanosine peut faire intervenir la voie NER (figure 20) (Huber 2004, Fu 2012). Enfin, les protéines Gadd45 peuvent intervenir dans la réparation des cassures double brins de l'ADN (figure 21) (Vairapandi *et al.* 2000, Strzalka & Ziemienowicz 2011). L'implication des protéines GADD45 dans plusieurs voies de réparation serait due à leurs interactions au site de dommage avec PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) (Smith *et al.* 1994, Vairapandi *et al.* 2000, Azam *et al.* 2001). En effet, plusieurs fonctions ont été décrites pour PCNA ; elle a un rôle de point d'ancrage pour améliorer la procession des ADN polymérase, et intervient dans le changement du type de polymérase utilisées en fonction du mécanisme de réparation activé (Strzalka & Ziemienowicz 2011). Entre autres, PCNA permet le recrutement de polymérase permissive de dommage à l'ADN (Chang & Cimprich 2009). Il a été démontré dans la levure que la persistance d'un dommage, empêchant la procession de la machinerie de réplication, peut entraîner un déséquilibre de la fourche de réplication et induire des cassures de l'ADN (Lambert *et al.* 2005). Certains dommages peuvent donc être tolérés par la cellule lorsque les voies canoniques de réparation sont inefficaces. Deux voies de réparation de l'ADN permettent cette tolérance pendant la phase S : la voie TS (Template switch) et la voie TLS (*Translesion synthesis*) (Branzei & Foiani 2008). La voie TS utilise comme brin d'ADN alternatif, le brin de la chromatine sœur pour poursuivre la réplication de façon non mutagène (Lovett 2017). Contrairement à la recombinaison homologue qui est une voie de réparation post-réplication, la voie TS utilise le brin en formation de la chromatine sœur. La voie TLS fait appel à des polymérase spécialisées de faible fidélité pour synthétiser l'ADN au travers du dommage, de façon mutagène ou non, afin de terminer la réplication (Chang & Cimprich 2009). Il a été proposé que la formation d'un complexe entre PCNA et CDKN1A soit nécessaire au changement d'ADN polymérase au site de réplication par dégradation de l'ADN polymérase en place (Soria & Gottifredi 2010) (figure 21). Les polymérase impliquées dans la voie TLS, de la famille Y (*Y-family DNA polymerases*), sont la polymérase  $\iota$  (POLI), la polymérase  $\kappa$  (POLK), la polymérase  $\eta$  (POLH) et REV1 (Cruet-Hennequart *et al.* 2010, Sale *et al.* 2012, Yoon *et al.* 2015). Le rôle de REV1 a été souligné *in vitro* dans une lignée cancéreuse humaine (HeLa), où l'inhibition partielle de *Rev1* par knock-down induit une plus grande sensibilité des cellules aux agents induisant des cassures double brins de l'ADN (Sharma *et al.* 2012). Ainsi dans notre modèle *in vitro* de SSC, suite à une exposition à la doxorubicine, la possibilité d'activation de voies permissives aux cassures double brins de l'ADN est soulignée par l'augmentation significative de l'expression de *Polh* et *Rev1*, et dans une moindre mesure *Gadd45 $\alpha$*  et *Gadd45 $\gamma$*  (chapitre 2, figure 5).



**Figure 20 : Voies de réparation de l'ADN pouvant être activées après exposition à la doxorubicine et correspondance avec les gènes activés dans les GC-6spg**  
D'après (Yang *et al.* 2014)



**Figure 21 : Voies de signalisation de cassure double brins de l'ADN**

Adapté de (Fielder *et al.* 2017), d'après (Chang & Cimprich 2009, Mladenov & Iliakis 2011, Strzalka & Ziemienowicz 2011). Le complexe MRN (MRE11/NBS1/RAD50) détecte le site de cassure et active ATM qui déclenche l'activation et le recrutement de médiateur de la réponse. Le cycle cellulaire et les mécanismes d'apoptose sont modulés pour permettre l'activation de voies de réparation de l'ADN telles que les voies NER, BER, NHEJ, Alt-NHEJ ou TLS. Dans notre modèle *in vitro*, le traitement à la doxorubicine a activé entre autres l'expression des gènes *Bbc3* (aussi appelé *Puma*), *Bax*, *Gadd45α* et *Gadd45γ*, *Cdc25c*, *Cdkn1a*, *Xrcc1*, *Polh* et *Rev1*, représenté en rouge sur le schéma (Beaud *et al.* 2017b).

Enfin, la protéine XRCC1 joue un rôle important dans la médiation de la réparation de dommage à l'ADN par la voie BER, notamment dans les cellules germinales (Intano *et al.* 2002). Comme discuté dans le chapitre 2, XRCC1 pourrait également être impliqué dans une voie alternative de réparation des cassures double brins de l'ADN, déjà décrite dans les spermatides rondes de souris (Ahmed *et al.* 2010). Brièvement, cette voie alternative de la NHEJ (Alt-NHEJ ; *Alternative Non homologous end-joining*) implique l'arrêt du cycle cellulaire par activation de CDKN1A et par l'activation de voies apoptotique *via* BBC3 (Bcl-2 binding component 3, aussi appelé PUMA), BAX (Bcl2-associated X), et p53 (Insinga *et al.* 2014). Une cascade de signalisation s'active également au site de coupure pour permettre la ligation des

extrémités de l'ADN par la Ligase III soutenue par XRCC1 (Audebert *et al.* 2004). Dans notre modèle *in vitro*, l'augmentation significative de l'expression de *Cdkn1a*, *Bbc3*, *Bax*, et *Xrcc1*, pourrait suggérer l'implication de la voie Alt-NHEJ dans les GC-6spg pour la réparation des cassures de l'ADN induite par la doxorubicine (Beaud *et al.* 2017b). Cette idée est supportée par les études de Rube *et al.* et Takubo *et al.* qui montrent l'importance d'une voie de réparation indépendante de DNA-PK mais impliquant l'activation de ATM (figure 21) (Takubo *et al.* 2008, Rube *et al.* 2011). La transfection d'ARN interférant dirigée contre ces gènes (knock-down) ou la mutation de ces gènes (knock-out) pourrait permettre de déterminer leur implication dans la réponse à la doxorubicine en mesurant l'accumulation de cassures de l'ADN par test de COMET.

Selon les voies de réparation de l'ADN connues, la distribution des sept gènes de réparation de l'ADN activés par la doxorubicine ne permet pas de mettre en évidence l'activation d'une voie spécifique de réparation. Ces résultats ne sont pas étonnants puisque plusieurs mécanismes d'action ont été décrits pour la doxorubicine, pouvant chacun déclencher une voie de réparation de l'ADN différente (figure 20) (Rochette *et al.* 2015). Toutefois, six de ces sept gènes codent pour des protéines pouvant être impliquées dans des mécanismes de réparation des cassures double brins de l'ADN (*Bard1*, *Gadd45a*, *Gadd45y*, *Polh*, *Rev1*, *Xrcc1*). De plus, parmi les 8 gènes de régulation du cycle cellulaire ou de l'apoptose activés par la doxorubicine, CDKN1A pourrait également être impliqué dans une voie alternative de réparation des cassures double brins de l'ADN (TLS) (Soria & Gottifredi 2010). Ces acteurs de la réparation pourraient être à l'origine de la réduction du nombre de cassures dans les GC-6spg, mesurée après arrêt du traitement à la doxorubicine (chapitre 2, figure 4). Toutefois, l'activation de voie non canonique mutagène soulève la question de l'intégrité de l'ADN dans les spermatogonies et, de ce fait, la capacité à éviter l'accumulation de cassures sans induire de mutation délétère pour la fonction cellulaire. Afin de déterminer si l'activation des gènes mis en évidence *in vitro* est similaire *in vivo*, nous avons développé un modèle d'exposition des SSC à la doxorubicine chez le rat où les cellules germinales peuvent être triées par cytométrie en flux pour une étude transcriptomique.

## **2.2. Absence d'activation de gène candidat à la réparation de l'ADN dans les cellules germinales *in vivo***

Les effets secondaires de la doxorubicine ont déjà été étudiés chez le rat prépubère (Bechter *et al.* 1987, Hou *et al.* 2005, Vendramini *et al.* 2010, Vendramini *et al.* 2012, Cabral *et al.* 2014, Cabral *et al.* 2018). Dans le groupe de recherche du Pre Miraglia, les traitements à la doxorubicine ont été réalisés chez des

rats de 30 jours, soit juste avant la puberté qui débute à 40 jours après la naissance (Vendramini *et al.* 2010, Vendramini *et al.* 2012, Cabral *et al.* 2014, Cabral *et al.* 2018). Dans le modèle de Bechter *et al.* et Hou *et al.*, le traitement a été administré à 6 jours après la naissance, âge à laquelle les cellules germinales sont majoritairement des SSC (Clermont & Perey 1957, Bechter *et al.* 1987, Hou *et al.* 2005). Une déplétion des spermatogonies et de l'apoptose (mesurée par TUNEL), ont été observées 2 à 3 jours après le traitement à la doxorubicine (Bechter *et al.* 1987, Hou *et al.* 2005). L'ensemble de ces études ont réalisé une injection unique intrapéritonéale de 3 ou 5 mg/kg doxorubicine (Bechter *et al.* 1987, Hou *et al.* 2005, Vendramini *et al.* 2010, Vendramini *et al.* 2012, Cabral *et al.* 2014, Cabral *et al.* 2018). En clinique, la doxorubicine est administrée en dose unique par cycle de traitement (Hempel *et al.* 2002). Le mode de traitement utilisé dans ces modèles d'études, ainsi que dans notre étude *in vitro* (chapitre 2) et *in vivo* (chapitre 3), suit aussi une exposition aiguë par administration d'une dose unique. Il est difficile de faire un parallèle entre la dose administrée *in vitro*, exposant directement les cellules GC-6spg à la quantité de doxorubicine incorporée dans le milieu, et la dose reçue en thérapeutique ou *in vivo*, puisque la distribution dans le testicule est inconnue. En effet, la concentration plasmatique ne serait pas représentative de la concentration intratesticulaire puisque des études de pharmacocinétique chez le rat adulte ont montré une accumulation de la doxorubicine dans le testicule par rapport à la circulation sanguine (Arakawa *et al.* 1991, Nwankwoala *et al.* 2008). Toutefois dans notre étude *in vivo*, des rats de 6 jours ont reçu une dose de 5 mg/kg, équivalent à 30 mg/m<sup>2</sup> chez l'humain (Nair & Jacob 2016) et correspondants à la dose administrée chez les enfants atteints de leucémie ou de lymphome non-hodgkinien (Hempel *et al.* 2002). Dans le modèle de Bechter *et al.* et Hou *et al.*, une dose plus faible de 3 mg/kg est utilisée (Bechter *et al.* 1987, Hou *et al.* 2005). Ainsi, la pertinence du modèle *in vivo* décrit dans le chapitre 3 nous permettrait de mieux comprendre les effets d'un cycle de traitement avec la doxorubicine sur les cellules germinales.

Dans ce modèle d'exposition à la doxorubicine de rat prépubère, la toxicité du traitement observée après 48h est mesurée par la diminution du poids relatif des testicules, la diminution du nombre de cellules germinales et l'augmentation du nombre de corps apoptotiques dans les cordons séminifères. Seulement 24h après le traitement, la toxicité de la doxorubicine n'affecte pas significativement le nombre de cellules germinales. Toutefois, aucune variation n'est mesurée dans l'expression des gènes testés, impliqués dans la réparation de l'ADN. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour cette contradiction entre l'absence de variation de l'expression des gènes *Mgmt*, *Xrcc1*, *Gadd45α*, et *Polh* *in vivo*, et leur stimulation mesurée *in vitro* dans les GC-6spg. En effet, chacun de ces modèles apporte ses avantages et ses inconvénients (Tableau 7).

**Tableau 7 : Comparaison du modèle *in vitro* des GC-6spg avec le modèle *in vivo* d'exposition à la doxorubicine de rat de 6 jours.**

<b>Avantage du modèle</b>	<b>Modèle <i>in vitro</i> (GC-6spg)</b>	<b>Modèle <i>in vivo</i></b>
<b>Ciblage de la dose</b>	Oui, une gamme a été testée	Non, une dose testée
<b>Étude de l'effet direct</b>	Oui	Non, impact de l'environnement testiculaire
<b>Proche du vivant</b>	Non, cellules transformées	Oui
<b>Étude spécifique aux SSC</b>	Cellules aux caractéristiques souches	Non, 90,0% des cellules germinales sont des SSC à 6 jpp
<b>Homogénéité des cellules étudiées</b>	Oui, prolifération de clone	Non, nature de la population GFP- positive triées à définir

1) Le modèle *in vitro* à l'avantage de pouvoir cribler plusieurs conditions d'expériences, sans devoir sacrifier d'animaux. Grâce à la lignée GC-6spg, plusieurs temps de traitement (24h, 48h, 72h) et plusieurs doses de doxorubicine (1nM-10µM) ont pu être testés pour trouver la condition non cytotoxique induisant des cassures de l'ADN. Pour le traitement *in vivo*, afin de limiter la quantité d'animaux sacrifiés, nous nous sommes basés sur la littérature et sur notre étude *in vitro*, pour ne tester qu'une dose de traitement (5 mg/kg).

2) Dans le modèle *in vitro* les cellules sont placées dans un contexte isolé, où seule la réponse directe des cellules germinales est mesurée. A contrario, l'intégration du système *in vivo* peut faire intervenir l'environnement cellulaire. Dans les tubes séminifères, alors qu'une déplétion en cellules germinales peut être observée un mois après une exposition à la doxorubicine, les cellules de Sertoli persistent (syndrome de *Sertoli-cells-only*) (Vendramini *et al.* 2010). Cette plus grande résistance des cellules de Sertoli pourrait être attribuée, en partie, à la présence de transporteur de la famille ABC (P-glycoprotéine), permettant de retirer activement la doxorubicine du compartiment intracellulaire (Melaine *et al.* 2002, Hoffmann & Kroemer 2004). Chez le rat et l'homme, la P-glycoprotéine est retrouvée dans les cellules de Leydig, les macrophages, les cellules péritubulaires et les cellules de Sertoli, mais pas dans les spermatogonies, les spermatocytes, ni les spermatides rondes (Melaine *et al.* 2002). Chez l'adulte, ce transporteur est retrouvé au niveau de la barrière hémato-testiculaire et sur le pôle apical des cellules de Sertoli (Su *et al.* 2011). La diffusion active de la doxorubicine en dehors des cellules de Sertoli pourrait augmenter la concentration

dans le compartiment séminifère, et de ce fait, être plus délétère pour les cellules germinales qui ne possèdent pas le transporteur (Melaine *et al.* 2002). Dans ce contexte, l'activation de l'apoptose plutôt que la réparation de l'ADN expliquerait l'absence de variation des gènes *Mgmt*, *Xrcc1*, *Gadd45α*, et *Polh* mesurée par qPCR (chapitre 3, figure 7). Cette hypothèse pourrait être testée par l'utilisation *in vivo* d'un inhibiteur chimique de la P-glycoprotéine, comme le SCH-66336 (lonafarnib), en co-traitement avec la doxorubicine (Wang & Johnson 2003).

3) La lignée GC-6spg est issue de l'immortalisation d'une population de spermatogonie A, à l'aide de l'antigène SV40 grand T inhibant p53 (Van Pelt *et al.* 2002). La transformation des propriétés des spermatogonies a permis la prolifération continue de ces cellules, s'éloignant ainsi du contexte tissulaire. Après traitement à la doxorubicine, nous avons mesuré une faible, mais significative, augmentation de l'expression de p53 (facteur 1,3,  $p < 0,01$ ). L'expression d'acteurs de la réponse à la doxorubicine reliés à p53 comme *Cdkn1a* et *Gadd45α/γ*, peut avoir été modulée par le traitement de la doxorubicine d'une façon non représentative du vivant. Un modèle *in vivo* ou de culture primaire permettrait de vérifier si la lignée GC-6spg répond à la doxorubicine de manière pertinente à la réalité du vivant.

4) La population de cellules germinales triées par cytométrie en flux avec le marqueur GFP est enrichie en SSC mais possède un certain degré d'hétérogénéité. Les cellules exprimant CD9, le marqueur de SSC, représentent 90% des cellules germinales (GFP-positives) au moment du traitement à la doxorubicine. Nous n'avons pas mesuré la proportion de cellules GFP- et CD9-positives au moment du tri. Toutefois, d'un point de vue physiologique, il s'agit d'une période où les spermatogonies différenciées se multiplient et donc où la proportion de SSC diminue dans le testicule, suggérant que les SSC représentent moins de 90% des cellules germinales triées. Une meilleure caractérisation de la population germinale par comptage des cellules CD9-positives sur coupes histologiques serait nécessaire afin de déterminer la nature et la proportion des autres cellules isolées par le marqueur GFP.

5) La précision de la nature des cellules triées est d'autant plus pertinente qu'une étude récente à l'échelle d'une cellule a démontré chez l'homme un profil transcriptomique et protéique hétérogène parmi les spermatogonies souches (Neuhaus *et al.* 2017). Pourtant, cette étude utilise un modèle de culture primaire de SSC où les cellules prolifèrent sous forme de colonies, et les cellules d'une même colonie sont considérées comme identiques (Kubota *et al.* 2004, Neuhaus *et al.* 2017). De plus, dans une seconde étude d'Hermann *et al.*, l'analyse transcriptomique à l'échelle d'une cellule est réalisée sur des SSC triées dans des testicules de souris de 6 jours avec le marqueur ID4. L'expression parmi les SSC est homogène pour 122 gènes sur 172 testés, tandis que les 50 autres gènes mettent en évidence l'hétérogénéité

transcriptomique de ces cellules (Hermann *et al.* 2015). L'hétérogénéité des cellules souches décrite dans la littérature supporte l'idée que les différences de profil transcriptomique permettraient à ces cellules de pouvoir répondre différemment à un même stimulus (Hermann *et al.* 2015). Ainsi, dans la population hétérogène des cellules GFP-positives, l'expression des gènes *Mgmt*, *Xrcc1*, *Gadd45a* et *Polh*, mesurée après une exposition à la doxorubicine, pourrait être le reflet d'une expression globale masquant la réponse de sous-population de SSC. Lors de la création de la lignée GC-6spg, une cellule spermatogoniale unique a permis d'établir la lignée après une expansion clonale (Van Pelt *et al.* 2002). Les GC-6spg correspondraient donc à la prolifération de clones. Ainsi, la détection de variation significative d'expression de gène suggère que l'homogénéité des GC-6spg permettrait d'améliorer la sensibilité de la mesure de modification d'expression de gène.

Dans l'étude de Hermann *et al.*, parmi les sous-populations de spermatogonies de souris de 6 jours, les différents profils transcriptomiques pourraient correspondre à ceux de spermatogonie progénitrice, de SSC, et de spermatogonie différenciée (Revue de la littérature, figure 6) (Hermann *et al.* 2015). Ils formulent l'hypothèse que l'ensemble de ces sous-populations de spermatogonies correspondraient à un processus de mise en place de la réserve de SSC adulte. Grâce à leurs diversités transcriptomiques, un raffinement des spermatogonies s'établirait dès le stade de gonocyte, où les cellules germinales capables de mieux maintenir l'intégrité du génome survivraient, tandis que les autres finiraient par être éliminées par apoptose (Hermann *et al.* 2015). De ce fait, la capacité globale de réparation de l'ADN dans les spermatogonies du testicule prépubère serait moindre que celle des spermatogonies dans le testicule mature. Cette idée serait en accord avec les travaux du chapitre 2 et 3. En effet dans le chapitre 2, les spermatogonies issues de rats post-pubères (GC-6spg) activent l'expression de gènes de réparation de l'ADN suite à une exposition à la doxorubicine (figure 5). Dans le chapitre 3, dans les cellules germinales de rat prépubère de 6 jpp, nous n'avons pas mesuré l'activation de quatre de ces gènes candidats suite à une exposition à la doxorubicine (figure 7). Selon l'hypothèse de Hermann *et al.*, les cellules germinales à 6 jpp débuteraient seulement la sélection des cellules germinales qui deviendront la réserve de SSC à l'âge adulte (Hermann *et al.* 2015). La maturation de la réserve de SSC entre la naissance et la puberté pourrait être à l'origine de la différence de réponse des mécanismes de réparation de l'ADN face à la doxorubicine. Il serait donc intéressant de reproduire la même cinétique de traitement, développée dans le chapitre 3, à différents âges jusqu'à l'âge adulte, afin de déterminer si l'expression des quatre gènes candidats testés à 6 jpp varie.

Afin de vérifier les hypothèses 1), 2), et 5), il est indispensable de déterminer dans un premier temps si la doxorubicine induit des cassures de l'ADN dans les spermatogonies *in vivo*, et déterminer selon quelle cinétique elles sont induites. Ceci permettrait de déterminer si la dose de doxorubicine administrée chez le rat (5 mg/kg) est pertinente pour l'étude des acteurs de la réparation de l'ADN 24h après le traitement. L'établissement de la cinétique d'induction des cassures de l'ADN pourrait être réalisé par test de COMET sur les cellules GFP triées ou par marquage immunologique de messenger des cassures de l'ADN comme ATM et ATR (Turinetta & Giachino 2015). Nous avons réalisé un marquage immunohistochimique du messenger  $\gamma$ H2AX afin de déterminer l'induction de cassures de l'ADN par la doxorubicine. Cependant, la sensibilité de la technique d'immunohistochimie n'a permis d'observer que du signal dans certains corps apoptotiques (données non montrées). Un marquage par immunofluorescence pourrait permettre de mieux apprécier le marquage en foci caractéristique de  $\gamma$ H2AX. Dans un deuxième temps, en complément de l'analyse de l'expression des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, il serait pertinent d'analyser l'activité des voies de réparation des cassures de l'ADN. La réparation de cassures de l'ADN dans les SSC par recombinaison homologue (HR; *homologous recombinaison*) et par NHEJ a été récemment suggérée par l'intermédiaire de l'utilisation de la technologie de CRISPR-Cas9 (Wu *et al.* 2015). Le complexe CRISPR-Cas9 induit une cassure double brins à l'ADN à un locus spécifique dans le gène cible et, par intervention de la voie HR ou NHEJ, le gène est édité par insertion ou délétion de nucléotide (Wu *et al.* 2015). Contrairement à la souris, la manipulation génétique chez les rats était encore récemment difficile (Huang *et al.* 2011). La transfection du système CRISPR-Cas9 dans des spermatogonies de rat, suivie de leur transplantation dans des tubes séminifères de rats receveur, a permis la production *in vivo* à long terme de cellules germinales génétiquement modifiées (Chapman *et al.* 2015). L'utilisation de la technique CRISPR-Cas9 sur les SSC de rat suggère donc une activité de la voie HR et NHEJ ou des voies alternatives TS, TLS, et Alt-NHEJ dans ces cellules (Chapman *et al.* 2015). Il serait pertinent de mesurer l'activité protéique de la voie NHEJ, et Alt-NHEJ dans nos modèles *in vitro* et *in vivo*. À partir des extraits protéiques non dénaturés des cellules GFP-positives triées, l'activité des voies de réparation de l'ADN pourrait être analysée par l'utilisation de vecteurs spécifiques couplés à un système rapporteur (Datta *et al.* 2012, Kostyrko & Mermoud 2016). Pour la présente étude, les vecteurs comporteraient des cassures doubles brins avec ou sans séquences d'homologie (2-25nt) aux abords de la cassure (Kostyrko & Mermoud 2016). En fonction de l'éloignement des séquences d'homologie (jusqu'à 300 bp) ces séquences peuvent déclencher les voies alternatives au NHEJ (Kostyrko & Mermoud 2016). Cette méthode d'évaluation permettrait de déterminer l'implication de ces deux voies de réparation de l'ADN dans la réponse des cellules germinales à la doxorubicine.

### 3. PRÉDICTION DES EFFETS SECONDAIRES DES CHIMIOTHÉRAPIES SUR LA FERTILITÉ

L'effet des traitements de chimiothérapies sur la fertilité masculine reste à l'heure actuelle imprédictible. Après la rémission du cancer, certains hommes survivants de cancers pédiatriques peuvent être stériles ou présenter des troubles de la fertilité (Romerius *et al.* 2011, Wasilewski-Masker *et al.* 2014). Les causes des troubles de la fertilité sont encore mal connues. Les agents de chimiothérapies peuvent induire des dommages à l'ADN des cellules germinales, qui pourraient être amplifiés par l'absence ou la défaillance des mécanismes de réparation de l'ADN (Goode *et al.* 2002). Il est supposé qu'un défaut de réparation de l'ADN dans les SSC pourrait conduire à la persistance des dommages, entraînant la déplétion partielle ou complète des cellules souches, ou la propagation des dommages au travers des cycles de spermatogenèse et affecter la qualité de l'ADN des spermatozoïdes. Ainsi, le développement d'outil prédictif d'un défaut de réparation de l'ADN pourrait permettre de mieux anticiper les effets des chimiothérapies sur la fertilité.

Dans un contexte où les agents de chimiothérapie sont administrés après un diagnostic de cancer, les personnes traitées pourraient être plus sensibles que la population générale aux effets secondaires des traitements de chimiothérapie. Les cancers ont des origines multifactorielles (hérédité, habitudes de vie, facteur et contaminant environnementaux) induisant *in fine* des mutations de gènes aboutissant au développement de tumeur (Wilson *et al.* 2002). Parmi les proto-oncogènes sensibles à ces facteurs cancérigènes se trouvent les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (Digweed 2003). Chez l'homme, des polymorphismes ont été décrits dans les voies de réparations BER et NER (*Ogg1*, *Xrcc1*, *Ercc1*, *Xpc*, *Xpd*, et *Xpf*), la voie de réparation directe (*Mgmt*), ainsi que dans les voies de réparation de cassures double brins (*Brca2* et *Xrcc3*) (Goode *et al.* 2002). Certaines de ces mutations de gènes de la réparation de l'ADN ont été associées avec une prévalence plus importante de divers cancers (Goode *et al.* 2002). Ainsi, les hommes diagnostiqués d'un cancer seraient plus susceptibles que la population générale d'avoir une altération des mécanismes de préservation de l'intégrité des cellules (Goode *et al.* 2002).

Depuis le séquençage complet de l'ADN du génome humain en 2001, de nombreuses études ont cherché des mutations dans les gènes de réparation de l'ADN (Wood *et al.* 2001, Goode *et al.* 2002). Toutefois, l'association entre ces polymorphismes de gènes et un impact sur la fertilité n'a pas toujours pu être établie (Goode *et al.* 2002, Ji *et al.* 2010). Dans le cas du gène *Xrcc1*, une augmentation des cassures de l'ADN dans les spermatozoïdes a été démontrée chez des hommes portant la mutation Arg399Gln et ayant été exposés à un hydrocarbure (Ji *et al.* 2010). Dans cette étude, l'exposition à un contaminant environnemental est un modèle d'amplification d'induction de cassure de l'ADN permettant l'analyse de

la sensibilité des cellules germinales aux dommages (Ji *et al.* 2010). *A contrario*, le polymorphisme Arg194Trp a été associé dans plusieurs études avec une réduction du risque de cancer, suggérant une efficacité améliorée de XRCC1 (Goode *et al.* 2002). Nous avons démontré que Xrcc1 pourrait jouer un rôle dans la réparation de l'ADN des spermatogonies en réponse à la doxorubicine (Beaud *et al.* 2017b). Il serait donc pertinent de déterminer l'implication de la mutation Arg194Trp dans les cellules germinales, qui pourrait être associée à un risque moindre d'infertilité après l'arrêt des traitements de chimiothérapie. Parmi les autres gènes mis en évidence dans l'étude *in vitro*, la mutation rs16906252 de *Mgmt* est décrite pour améliorer le pronostic vital des patients porteurs de la mutation, par l'induction de l'augmentation de la méthylation du promoteur de *Mgmt* et de ce fait la diminution de l'expression de *Mgmt* (Rapkins *et al.* 2015). Toutefois, la détection de la mutation rs16906252 chez les hommes en attente de traitement de chimiothérapies pourrait être associée à une plus grande prévalence d'azoo- ou oligozoospermie après rémission du cancer. Ainsi, l'ensemble des polymorphismes décrits pour augmenter ou diminuer la sensibilité des cellules cancéreuses aux agents de chimiothérapies sont des candidats potentiels dans la prédiction individuelle de la réponse à un stress génotoxique.

La caractérisation de l'implication de chaque polymorphisme dans la modulation de la réponse des cellules germinales face aux traitements de chimiothérapie permettrait d'anticiper l'impact du traitement de chimiothérapie avant son administration. Ainsi, la valeur prédictive de polymorphismes dans les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN sur l'atteinte à long terme de la fertilité masculine, pourrait permettre le développement de tests prédictifs d'un plus grand risque d'azoo- ou oligozoospermie. La prédiction de l'impact pourrait devenir en clinique une méthode efficace d'anticipation des effets secondaires et ainsi mieux informer les patients des risques des traitements de chimiothérapies pédiatriques sur la fertilité masculine. De plus, l'utilisation systématique de test génétique pourrait permettre de prévenir les effets secondaires en personnalisant les traitements en faveur de la rémission du cancer et de la préservation de la fertilité. Ainsi, une médecine personnalisée pourrait avoir un impact direct sur la fertilité des hommes survivants de cancer pédiatrique.

#### **4. PRÉVENTION DES EFFETS SECONDAIRES DES CHIMIOTHÉRAPIES SUR LA FERTILITÉ**

Dans le cas d'un diagnostic de cancer avant la puberté, aucun protocole médical efficace ne peut être proposé aux garçons pour préserver leur fertilité des effets secondaires des chimiothérapies (Struijk *et al.* 2013). Dans le cas d'un diagnostic de cancer après la puberté, la cryoconservation de sperme peut être

réalisée (Bunge & Sherman 1953, Hallak *et al.* 1999). Toutefois, du fait de l'action de la maladie et des techniques de cryoconservation sur la qualité des spermatozoïdes, des controverses persistent dans l'utilisation de ces échantillons de sperme (Vakalopoulos *et al.* 2015). La protection de la fertilité en amont des traitements de chimiothérapies permettrait de contourner ces problématiques et offrir de meilleure chance de fertilité après rémission du cancer. Dans le chapitre 1, dans le but de déterminer une origine potentielle de l'azoo- ou oligozoospermie chez les survivants de cancer pédiatrique, nous avons mesuré une corrélation positive significative entre le compte spermatique et la dose cumulée de prednisone reçue comme traitement anti-cancéreux ( $r=0,68$ ,  $p=0,03$ ) (Beaud *et al.* 2017a). Ainsi, la relation entre la prednisone et un bon compte spermatique ouvre de nouvelles pistes de recherche dans le développement de traitement pour la préservation de la fertilité. Dans cette partie de la discussion, les connaissances permettant de mieux comprendre la relation entre la prednisone et le maintien de la spermatogenèse sont décrites.

#### **4.1 Prévention de la réaction inflammatoire contre les spermatozoïdes**

La prednisone est un glucocorticoïde de synthèse (Frerichs & Tornatore 2004). L'impact des glucocorticoïdes sur la fertilité des hommes reste controversé (Sands *et al.* 2015, Larsen *et al.* 2018), et un nombre très limité d'études établit un parallèle entre la prednisone et la fertilité masculine (Simsek *et al.* 2017). Cependant, la prednisone semble être peu ou pas cytotoxique pour les cellules germinales mâles (Meistrich *et al.* 1982, Simsek *et al.* 2017). Par son action anti-inflammatoire et immunosupresseur, elle agit en inhibant la réponse leucocytaire, empêchant l'accumulation de leucocytes dans la région immunogène. La prednisone est donc prescrite contre de nombreuses pathologies impliquant le système immunitaire, dont les cancers hématologiques (Ruiter *et al.* 2012). Dans une étude de Pakyz *et al.*, l'effet bénéfique d'anti-inflammatoire comme la prednisone est évalué dans le cas de torsion testiculaire chez le rat (Pakyz *et al.* 1990). Une torsion testiculaire pourrait induire une réponse immunitaire qui serait à l'origine de dommage dans le testicule controlatéral et donc produisant une infertilité. L'utilisation de la prednisone améliore le nombre d'embryons par portée chez le rat (Pakyz *et al.* 1990). Il est suggéré que la modulation de la réponse immunitaire serait à l'origine de l'action de la prednisone dans la préservation de la fertilité (Pakyz *et al.* 1990). En effet, dans le cadre d'une inflammation des glandes sexuelles accessoires ou la production d'anticorps anti-spermatozoïde, un traitement de 5mg de prednisone par jour pendant un ou trois à six mois respectivement, permet une amélioration de la production de spermatozoïdes chez des hommes diagnostiqués oligozoospermiques

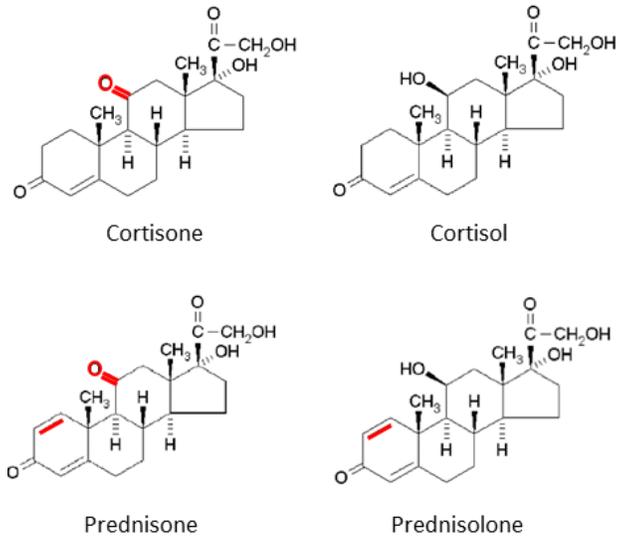
avant le traitement (Omu *et al.* 1996, Milardi *et al.* 2017). Particulièrement, dans l'étude de Omu *et al.*, le traitement de trois mois à la prednisone permet une augmentation du taux de naissance en comparaison des hommes produisant des anticorps anti-spermatozoïde et n'ayant pas reçu le traitement (Omu *et al.* 1996). Le but de ces études étant de trouver une médication simple et non onéreuse pour améliorer la fertilité de ces hommes, l'effet du traitement sur plusieurs années n'a pas été évalué. Cependant, il serait intéressant chez les hommes diagnostiqués après la puberté de déterminer la concentration en anticorps anti-spermatozoïdes pendant et après des traitements de chimiothérapie comportant de la prednisone. Une corrélation inverse entre la prise de prednisone et la production de ces anticorps pourrait être une piste explicative de la corrélation positive établie dans notre cohorte entre la prednisone et le compte spermatique.

#### **4.2 Prévention de la diminution de la concentration en testostérone**

La prednisone est un glucocorticoïde dérivé de la cortisone (figure 22) (Frerichs & Tornatore 2004). Toutes deux pourvues d'un groupement cétone sur le carbone 11, la prednisone et la cortisone ne sont pas biologiquement actives (figure 22) (Jenkins & Sampson 1967). Leur métabolisation produira la synthèse de la prednisolone et du cortisol respectivement, dont les structures moléculaires et les fonctions sont similaires (Jenkins & Sampson 1967). Ainsi, la corrélation mesurée entre la prednisone et avec le compte spermatique chez les survivants de cancers pédiatriques pourrait être associée à la fonction du cortisol. L'augmentation du taux sanguin de cortisol lors d'activité physique est responsable de l'inhibition de la sécrétion de testostérone. En effet, une corrélation négative est décrite entre le cortisol et la testostérone circulante, confirmée au repos par l'injection intraveineuse de cortisol induisant également une diminution de la concentration circulante en testostérone (Brownlee *et al.* 2005). Les glucocorticoïdes agissent également sur la concentration intratesticulaire en testostérone. Chez l'homme et chez le rat, un apport exogène de glucocorticoïde induit une inhibition directe de la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig (Bambino & Hsueh 1981, Cumming *et al.* 1983). Les glucocorticoïdes peuvent agir selon une voie génomique ou une voie non-génomique. La voie génomique fait intervenir les récepteurs cytoplasmiques aux glucocorticoïdes. La ligation du glucocorticoïde déclenche l'internalisation du complexe dans le noyau pour agir comme facteur de transcription (Landers & Spelsberg 1992, Schmid *et al.* 1995). Les cellules de Leydig possèdent des récepteurs aux glucocorticoïdes (Ortliip *et al.* 1981). La voie non génomique pourrait également être activée dans les cellules de Leydig. Chez la souris, seulement 30 minutes après un stress induisant l'augmentation de corticostérone (glucocorticoïde prédominant chez

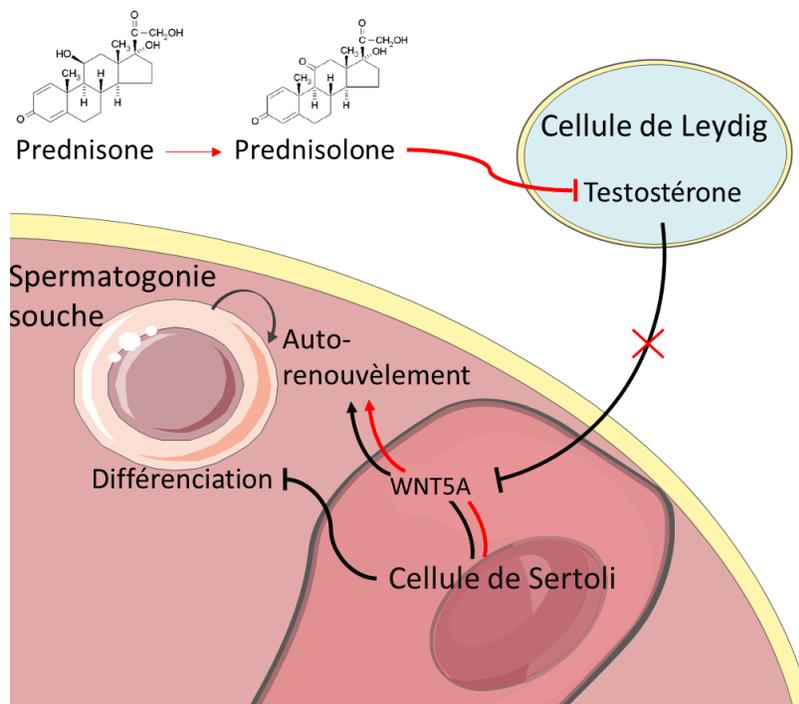
les rongeurs), la concentration intratesticulaire de testostérone est diminuée (Dong *et al.* 2004). L'action rapide du glucocorticoïde sur la concentration de testostérone suggère une inhibition directe de la synthèse de la testostérone plutôt qu'une diminution de l'expression des gènes codant les enzymes de la stéroïdogenèse (Dong *et al.* 2004). Ainsi, lors d'un traitement de chimiothérapie pendant l'enfance, la prednisone pourrait diminuer la concentration intratesticulaire en testostérone, favorisant l'autorenouveaulement des SSC, et ainsi maintenir une réserve de SSC pendant le traitement (figure 23). La concentration circulante de testostérone est faible chez les enfants à partir de 6 mois et jusqu'à la puberté, mais dans le testicule la concentration en testostérone, également diminuée, représente en moyenne 36 fois la concentration sanguine (Birlingmaier *et al.* 1983). Les récepteurs aux androgènes sont présents sur les cellules de Sertoli, les cellules de Leydig, et les cellules périvitubulaires (Walker 2011). La modulation de la concentration en testostérone a des effets controversés sur la préservation de la fertilité après un traitement cytotoxique. Notamment, la modulation de la concentration de testostérone ne modifierait pas la prolifération des spermatogonies (Meistrich 1998). A ce jour, le mécanisme par lequel la testostérone aurait une action de protection sur les spermatogonies est encore incertain. Une hypothèse soulevée par Meistrich (Meistrich 1998) avance que l'altération hormonale affecte l'environnement endocrine et paracrine du testicule pour être favorable à la protection des cellules germinales. En effet, la diminution de la testostérone induit entre autres la stimulation de la production de WNT5A, un facteur sécrété par les cellules de Sertoli, impliqué dans l'autorenouveaulement des cellules souches, et donc favoriserait l'autorenouveaulement aux dépens de la différenciation des SSC (figure 23) (Tanaka *et al.* 2016). Cette idée est en accord avec la théorie de Meistrich que les SSC ne recommenceraient pas à se différencier tant que leur population ne soit pas régénérée (Meistrich 2013). Ainsi lors de traitement de chimiothérapies, une plus grande activité d'autorenouveaulement des SSC augmenterait la chance de survie d'au moins quelques cellules souches, nécessaire au rétablissement de la spermatogenèse après rémission (Meistrich 1998).

La corrélation entre la prednisone et le compte spermatique (chapitre 1, tableau 3) suggère un fort potentiel dans la possibilité de développer un traitement de protection des cellules germinales au moment du traitement de chimiothérapies. Il serait intéressant de confirmer les liens possibles entre la prednisone et la protection des cellules germinales pour combler l'absence de littérature précise sur le sujet. Un traitement assurant le maintien de la réserve de SSC pendant le traitement, sans affecter le pronostic vital du patient, pourrait être inclus dans les protocoles de chimiothérapie afin d'offrir une solution de préservation de la fertilité aux garçons, et particulièrement ceux diagnostiqués avant la puberté.



**Figure 22: Structure moléculaire de la cortisone et de la prednisone, et de leurs métabolites respectifs, le cortisol, et la prednisolone**

Adapté de (Frerichs & Tornatore 2004). Les variations structurales par rapport à la molécule de cortisol sont indiquées en rouge.



**Figure 23: Représentation schématique d'un lien hypothétique entre l'administration de prednisone et la protection de la réserve de SSC**

D'après (Dong *et al.* 2004, Nakagawa *et al.* 2007, Tanaka *et al.* 2016).

## 5. CONTRIBUTION À L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES

Les résultats obtenus au cours de ce projet de doctorat apportent une contribution importante dans les connaissances sur la qualité de la chromatine des spermatozoïdes de survivants de cancers diagnostiqués avant la puberté, et sur les gènes de réparation de l'ADN exprimés dans les SSC.

Tout d'abord, l'étude transversale a permis d'évaluer la qualité de la chromatine des spermatozoïdes chez des survivants de cancer diagnostiqués avant la puberté. Le compte spermatique ne varie pas significativement entre le groupe témoin et les survivants de cancer. Toutefois, une grande prévalence d'azoo- ou oligozoospermie a été observée chez les hommes diagnostiqués avant la puberté, et une corrélation négative significative a été mesurée entre la dose cumulée d'agent alkylant et le compte spermatique. De plus, la qualité de la chromatine des spermatozoïdes ne varie pas entre les hommes témoins et les survivants de cancer pédiatrique. Ces résultats, en accord avec la littérature, apportent une dimension supplémentaire en précisant que l'intégrité de la chromatine des spermatozoïdes des survivants de cancer est similaire à celle des témoins, et ceci, quel que soit l'âge au diagnostic. Enfin, pour la première fois, nous avons mis en évidence une corrélation entre la doxorubicine et la perte de l'intégrité de la chromatine des spermatozoïdes.

Par l'utilisation d'un modèle *in vitro* de spermatogonies aux caractéristiques de cellules souches, l'étude toxicologique de la doxorubicine a mis en évidence une cytotoxicité temps et dose dépendante sur les SSC. La particularité de cette étude est la caractérisation de l'induction de cassure de l'ADN comme un des mécanismes de toxicité de la doxorubicine dans les spermatogonies. De plus, ce modèle *in vitro* a permis l'avancement des connaissances sur les gènes de réparation de l'ADN exprimés dans des spermatogonies. A notre connaissance, nous avons mis en évidence la plus grande liste de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et exprimés de façon constitutive dans des spermatogonies aux caractéristiques de cellules souches.

L'utilisation de la doxorubicine comme modèle d'induction de cassure de l'ADN dans les SSC, a permis de mesurer d'une part l'activation de huit gènes régulant le cycle cellulaire ou l'apoptose, et d'autre part, sept gènes impliqués dans la réparation de l'ADN ont été activés et un gène a été inhibé. Il est important de noter que le nombre de cassures de l'ADN induites par la doxorubicine, retrouve des valeurs similaires au témoin après arrêt du traitement, suggérant l'activité de mécanisme de réparation de l'ADN dans ce modèle. Ces résultats ont permis de proposer l'hypothèse de l'induction de voies non canoniques de réparation des cassures double brins de l'ADN suite à une exposition à la doxorubicine.

Finalement, notre étude a permis de mettre en place un modèle d'exposition de rat prépubère à la doxorubicine avec la particularité de pouvoir isoler facilement les cellules germinales enrichie en SSC. L'utilisation de ce modèle pourrait contribuer à approfondir les connaissances sur les capacités des SSC à maintenir l'intégrité de son génome après un traitement à la doxorubicine, et l'implication de l'âge dans ce processus.

Ensemble, ces travaux de doctorat ouvrent de nouvelles pistes de recherche dans le développement 1) d'outils de prédiction des effets des chimiothérapies sur la fertilité masculine, 2) de traitement de préservation de la fertilité masculine au moment du traitement de chimiothérapie, et 3) ouvrent de nouvelles pistes de recherche pour déterminer les mécanismes cruciaux au maintien de l'intégrité de l'ADN des SSC, les cellules fondatrices de la spermatogenèse.

## PARTIE IV : RÉFÉRENCES

- Achille MA, Rosberger Z, Robitaille R, Lebel S, Gouin JP, Bultz BD & Chan PT** 2006 Facilitators and obstacles to sperm banking in young men receiving gonadotoxic chemotherapy for cancer: the perspective of survivors and health care professionals. *Hum Reprod* **21** 3206-3216.
- Agarwal A, Mahfouz RZ, Sharma RK, Sarkar O, Mangrola D & Mathur PP** 2009 Potential biological role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in male gametes. *Reprod Biol Endocrinol* **7** 143.
- Aghaee F, Islamian JP, Baradaran B, Mesbahi A, Mohammadzadeh M & Jafarabadi MA** 2013 Enhancing the Effects of Low Dose Doxorubicin Treatment by the Radiation in T47D and SKBR3 Breast Cancer Cells. *Journal of Breast Cancer* **16** 164-170.
- Aguilar-Mahecha A, Hales BF & Robaire B** 2002 Chronic cyclophosphamide treatment alters the expression of stress response genes in rat male germ cells. *Biol Reprod* **66** 1024-1032.
- Aguilar-Mahecha A, Hales BF & Robaire B** 2005 Effects of Acute and Chronic Cyclophosphamide Treatment on Meiotic Progression and the Induction of DNA Double-Strand Breaks in Rat Spermatocytes1. *Biology of Reproduction* **72** 1297-1304.
- Ahmed EA, de Boer P, Philippens ME, Kal HB & de Rooij DG** 2010 Parp1-XRCC1 and the repair of DNA double strand breaks in mouse round spermatids. *Mutat Res* **683** 84-90.
- Ahmed EA, van der Vaart A, Barten A, Kal HB, Chen J, Lou Z, Minter-Dykhouse K, Bartkova J, Bartek J, de Boer P & de Rooij DG** 2007 Differences in DNA double strand breaks repair in male germ cell types: lessons learned from a differential expression of Mdc1 and 53BP1. *DNA Repair (Amst)* **6** 1243-1254.
- Akhtar M, Ali MA, Burgess A & Aur RJ** 1991 Fine-needle aspiration biopsy (FNAB) diagnosis of testicular involvement in acute lymphoblastic leukemia in children. *Diagn Cytopathol* **7** 504-507.
- Albert O, Reintsch WE, Chan P & Robaire B** 2016 HT-COMET: a novel automated approach for high throughput assessment of human sperm chromatin quality. *Hum Reprod* **31** 938-946.
- Alphen MMAv, Kant HJGvd & Rooij DGd** 1988 Depletion of the Spermatogonia from the Seminiferous Epithelium of the Rhesus Monkey after X Irradiation. *Radiation Research* **113** 473-486.
- Altman E, Yango P, Moustafa R, Smith JF, Klatsky PC & Tran ND** 2014 Characterization of human spermatogonial stem cell markers in fetal, pediatric, and adult testicular tissues. *Reproduction* **148** 417-427.
- Anderson D, Dobrzynska MM, Yu TW, Gandini L, Cordelli E & Spano M** 1997 DNA integrity in human sperm. *Teratog Carcinog Mutagen* **17** 97-102.
- Anderson RA, Weddell A, Spoudeas HA, Douglas C, Shalet SM, Levitt G & Wallace WH** 2008 Do doctors discuss fertility issues before they treat young patients with cancer? *Hum Reprod* **23** 2246-2251.
- Andersson AM, Toppari J, Haavisto AM, Petersen JH, Simell T, Simell O & Skakkebaek NE** 1998 Longitudinal reproductive hormone profiles in infants: peak of inhibin B levels in infant boys exceeds levels in adult men. *J Clin Endocrinol Metab* **83** 675-681.
- Andreu JAL, Fernandez PJ, Tortajada JFi, Navarro I, Rodriguez-Ineba A, Muro MD & Romeu A** 2000 Persistent altered spermatogenesis in long-term childhood cancer survivors. *Pediatric Hematology and Oncology* **17** 21-30.
- Arakawa H, Mueller KJ, Doubek WG, Stern JA, La Regina MC, Tolman KC, Coscia CJ & Johnson FE** 1991 Distribution and metabolism of doxorubicin in rats undergoing testicular circulatory isolation. *Am J Surg* **162** 572-575.
- Arnheim N & Shibata D** 1997 DNA mismatch repair in mammals: role in disease and meiosis. *Current opinion in genetics & development* **7** 364-370.

- Audebert M, Salles B & Calsou P** 2004 Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem* **279** 55117-55126.
- Auroux MR, Dulioust EM, Nawar NY, Yacoub SG, Kempf EH & Ebel AB** 1990 Cyclophosphamide in the male rat: cerebral biochemical changes in progeny. *Biomed Pharmacother* **44** 519-523.
- Azam N, Vairapandi M, Zhang W, Hoffman B & Liebermann DA** 2001 Interaction of CR6 (GADD45gamma) with proliferating cell nuclear antigen impedes negative growth control. *J Biol Chem* **276** 2766-2774.
- Baarends WM, van der Laan R & Grootegoed JA** 2001 DNA repair mechanisms and gametogenesis. *Reproduction* **121** 31-39.
- Bambino TH & Hsueh AJ** 1981 Direct inhibitory effect of glucocorticoids upon testicular luteinizing hormone receptor and steroidogenesis in vivo and in vitro. *Endocrinology* **108** 2142-2148.
- Barton TS, Robaire B & Hales BF** 2005 Epigenetic programming in the preimplantation rat embryo is disrupted by chronic paternal cyclophosphamide exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** 7865-7870.
- Baud F & Garnier R** 2017 Toxicologie clinique. *Lavoisier médecine sciences*.
- Beaud H, Albert O, Robaire B, Rousseau M-C, Chan P & Delbès G** 2017a Abstracts from the ASA 42nd Annual Meeting. *Andrology* **5** 78-79.
- Beaud H, van Pelt A & Delbes G** 2017b Doxorubicin and vincristine affect undifferentiated rat spermatogonia. *Reproduction* **153** 725-735.
- Bechter R, Haebler R, Ettlin RA, Haseman JK & Dixon RL** 1987 Differential susceptibility of immature rat testes to doxorubicin at critical stages of maturation. Biochemical and functional assessment. *Arch Toxicol* **60** 415-421.
- Bertolone KL, Landier W, Baggott C, Fochtman D, Foley GV & Patterson Kelly K** 2011 Nursing Care of Children and Adolescents with Cancer and Blood Disorders. *APHON* **25** 935-966.
- Beumer TL, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, van Buul PP, Gil-Gomez G, Rutgers DH & de Rooij DG** 1998 The role of the tumor suppressor p53 in spermatogenesis. *Cell Death Differ* **5** 669-677.
- Bidlingmaier F, Dorr HG, Eisenmenger W, Kuhnle U & Knorr D** 1983 Testosterone and androstenedione concentrations in human testis and epididymis during the first two years of life. *J Clin Endocrinol Metab* **57** 311-315.
- Bieber AM, Marcon L, Hales BF & Robaire B** 2006 Effects of chemotherapeutic agents for testicular cancer on the male rat reproductive system, spermatozoa, and fertility. *J Androl* **27** 189-200.
- Bieniek JM, Kashanian JA, Deibert CM, Grober ED, Lo KC, Brannigan RE, Sandlow JI & Jarvi KA** 2016 Influence of increasing body mass index on semen and reproductive hormonal parameters in a multi-institutional cohort of subfertile men. *Fertil Steril* **106** 1070-1075.
- Boissonneault G** 2002 Chromatin remodeling during spermiogenesis: a possible role for the transition proteins in DNA strand break repair. *FEBS Lett* **514** 111-114.
- Boulogne B, Olaso R, Levacher C, Durand P & Habert R** 1999 Apoptosis and mitosis in gonocytes of the rat testis during foetal and neonatal development. *Int J Androl* **22** 356-365.
- Bozzone DM** 2009 The biology of cancer: leukemia. *Chelsea house Publishers*.
- Branzei D & Foiani M** 2008 Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9** 297-308.
- Brilhante O, Okada FK, Sasso-Cerri E, Stumpp T & Miraglia SM** 2012 Late morphofunctional alterations of the Sertoli cell caused by doxorubicin administered to prepubertal rats. *Reproductive Biology and Endocrinology* **10**.
- Brinster RL & Avarbock MR** 1994 Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** 11303-11307.

- Brinster RL & Zimmermann JW** 1994 Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** 11298-11302.
- Brownlee KK, Moore AW & Hackney AC** 2005 Relationship Between Circulating Cortisol and Testosterone: Influence of Physical Exercise. *Journal of Sports Science & Medicine* **4** 76-83.
- Buffler PA, Kwan ML, Reynolds P & Urayama KY** 2005 Environmental and Genetic Risk Factors for Childhood Leukemia: Appraising the Evidence. *Cancer Investigation* **23** 60-75.
- Bujan L, Walschaerts M, Brugnon F, Daudin M, Berthaut I, Auger J, Saias J, Szerman E, Moinard N, Rives N & Hennebicq S** 2014 Impact of lymphoma treatments on spermatogenesis and sperm deoxyribonucleic acid: a multicenter prospective study from the CECOS network. *Fertil Steril* **102** 667-674 e663.
- Bujan L, Walschaerts M, Moinard N, Hennebicq S, Saias J, Brugnon F, Auger J, Berthaut I, Szerman E, Daudin M & Rives N** 2013 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* **100** 673-680.
- Bunge RG & Sherman JK** 1953 Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature* **172** 767-768.
- Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J & Giwercman A** 2007 Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* **22** 174-179.
- Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L & Giwercman A** 2004 The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod* **19** 1401-1408.
- Byrne J, Rasmussen SA, Steinhorn SC, Connelly RR, Myers MH, Lynch CF, Flannery J, Austin DF, Holmes FF, Holmes GE, Strong LC & Mulvihill JJ** 1998 Genetic disease in offspring of long-term survivors of childhood and adolescent cancer. *Am J Hum Genet* **62** 45-52.
- Cabral RE, Okada FK, Stumpp T, Vendramini V & Miraglia SM** 2014 Carnitine partially protects the rat testis against the late damage produced by doxorubicin administered during pre-puberty. *Andrology* **2** 931-942.
- Cabral REL, Mendes TB, Vendramini V & Miraglia SM** 2018 Carnitine partially improves oxidative stress, acrosome integrity, and reproductive competence in doxorubicin-treated rats. *Andrology* **6** 236-246.
- Chabner BA & Roberts Jr TG** 2005 Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer* **5** 65.
- Chamindrani Mendis-Handagama SML & Siril Ariyaratne HB** 2001 Differentiation of the Adult Leydig Cell Population in the Postnatal Testis. *Biology of Reproduction* **65** 660-671.
- Chan D, Delbes G, Landry M, Robaire B & Trasler JM** 2012 Epigenetic alterations in sperm DNA associated with testicular cancer treatment. *Toxicol Sci* **125** 532-543.
- Chan PTK** 2009 Fertility after cancer in men. *Canadian Urological Association Journal* **3** 223-224.
- Chang DJ & Cimprich KA** 2009 DNA Damage Tolerance: When It's OK to Make Mistakes. *Nature chemical biology* **5** 82-90.
- Chapman KM, Medrano GA, Jaichander P, Chaudhary J, Waits AE, Nobrega MA, Hotaling JM, Ober C & Hamra FK** 2015 Targeted Germline Modifications in Rats Using CRISPR/Cas9 and Spermatogonial Stem Cells. *Cell Rep* **10** 1828-1835.
- Chemes HE** 2001 Infancy is not a quiescent period of testicular development. *Int J Androl* **24** 2-7.
- Chen Y, Jungsuwadee P, Vore M, Butterfield DA & St Clair DK** 2007 Collateral damage in cancer chemotherapy: oxidative stress in nontargeted tissues. *Mol Interv* **7** 147-156.
- Cheng CY, Wong EW, Lie PP, Li MW, Mruk DD, Yan HH, Mok KW, Mannu J, Mathur PP, Lui WY, Lee WM, Bonanomi M & Silvestrini B** 2011 Regulation of blood-testis barrier dynamics by desmosome, gap junction, hemidesmosome and polarity proteins: An unexpected turn of events. *Spermatogenesis* **1** 105-115.

- Cheng NC, van de Vrugt HJ, van der Valk MA, Oostra AB, Krimpenfort P, de Vries Y, Joenje H, Berns A & Arwert F** 2000 Mice with a targeted disruption of the Fanconi anemia homolog Fanca. *Hum Mol Genet* **9** 1805-1811.
- Chow EJ, Stratton KL, Leisenring WM, Oeffinger KC, Sklar CA, Donaldson SS, Ginsberg JP, Kenney LB, Levine JM, Robison LL, Shnorhavorian M, Stovall M, Armstrong GT & Green DM** 2016 Pregnancy after chemotherapy in male and female survivors of childhood cancer treated between 1970 and 1999: a report from the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *Lancet Oncol* **17** 567-576.
- Clermont Y** 1969 Two classes of spermatogonial stem cells in the monkey (*Cercopithecus aethiops*). *American Journal of Anatomy* **126** 57-71.
- Clermont Y** 1972 Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* **52** 198-236.
- Clermont Y & Perey B** 1957 Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am J Anat* **100** 241-267.
- Clermont Y & Tang XM** 1985 Glycoprotein synthesis in the Golgi apparatus of spermatids during spermiogenesis of the rat. *Anat Rec* **213** 33-43.
- Clouthier DE, Avarbock MR, Maika SD, Hammer RE & Brinster RL** 1996 Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature* **381** 418-421.
- Codrington AM, Hales BF & Robaire B** 2007 Exposure of male rats to cyclophosphamide alters the chromatin structure and basic proteome in spermatozoa. *Hum Reprod* **22** 1431-1442.
- Comité consultatif de la Société canadienne du cancer** 2017 Statistiques canadiennes sur le cancer 2017. [cancer.ca/Canadian-Cancer-Statistics-2017-FR.pdf](http://cancer.ca/Canadian-Cancer-Statistics-2017-FR.pdf), consulté en juin 2017.
- Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT & Vogelsong KM** 2010 World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* **16** 231-245.
- Cortes D, Müller J & Skakkebaek NE** 1987 Proliferation of Sertoli cells during development of the human testis assessed by stereological methods. *International Journal of Andrology* **10** 589-596.
- Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, Orwig KE, Wolgemuth DJ & Pandolfi PP** 2004 Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet* **36** 653-659.
- Cronkhite JT, Norlander C, Furth JK, Levan G, Garbers DL & Hammer RE** 2005 Male and female germline specific expression of an EGFP reporter gene in a unique strain of transgenic rats. *Dev Biol* **284** 171-183.
- Cruet-Hennequart S, Gallagher K, Sokol AM, Villalan S, Prendergast AM & Carty MP** 2010 DNA polymerase eta, a key protein in translesion synthesis in human cells. *Subcell Biochem* **50** 189-209.
- Culty M** 2009 Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Birth Defects Res C Embryo Today* **87** 1-26.
- Cumming DC, Quigley ME & Yen SS** 1983 Acute suppression of circulating testosterone levels by cortisol in men. *J Clin Endocrinol Metab* **57** 671-673.
- Datta K, Purkayastha S, Neumann RD & Winters TA** 2012 An in vitro DNA double-strand break repair assay based on end-joining of defined duplex oligonucleotides. *Methods Mol Biol* **920** 485-500.
- De La Rochebrochard E** 1999 Les âges à la puberté des filles et des garçons en France. Mesures à partir d'une enquête sur la sexualité des adolescents. *Population* **54** 933-962.
- de Rooij DG & Griswold MD** 2012 Questions about spermatogonia posed and answered since 2000. *J Androl* **33** 1085-1095.
- de Rooij DG & Russell LD** 2000 All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* **21** 776-798.

- Delbes G, Chan D, Pakarinen P, Trasler JM, Hales BF & Robaire B** 2009 Impact of the chemotherapy cocktail used to treat testicular cancer on the gene expression profile of germ cells from male Brown-Norway rats. *Biol Reprod* **80** 320-327.
- Delbes G, Hales BF & Robaire B** 2007 Effects of the chemotherapy cocktail used to treat testicular cancer on sperm chromatin integrity. *J Androl* **28** 241-249; discussion 250-241.
- Delbes G, Hales BF & Robaire B** 2010a Toxicants and human sperm chromatin integrity. *Mol Hum Reprod* **16** 14-22.
- Delbes G, Herrero MB, Troeung ET & Chan PT** 2013 The use of complimentary assays to evaluate the enrichment of human sperm quality in asthenoteratozoospermic and teratozoospermic samples processed with Annexin-V magnetic activated cell sorting. *Andrology* **1** 698-706.
- Delbes G, Vaisheva F, Luu T, Marcon L, Hales BF & Robaire B** 2010b Reversibility of the effects of the chemotherapeutic regimen for non-Hodgkin lymphoma, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone, on the male rat reproductive system and progeny outcome. *Reprod Toxicol* **29** 332-338.
- Dhawan A, Bajpayee M & Parmar D** 2009 Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology* **25** 5-32.
- Digweed M** 2003 Response to environmental carcinogens in DNA-repair-deficient disorders. *Toxicology* **193** 111-124.
- Dobrinski I, Avarbock MR & Brinster RL** 2000 Germ cell transplantation from large domestic animals into mouse testes. *Mol Reprod Dev* **57** 270-279.
- Dong Q, Salva A, Sottas CM, Niu E, Holmes M & Hardy MP** 2004 Rapid glucocorticoid mediation of suppressed testosterone biosynthesis in male mice subjected to immobilization stress. *J Androl* **25** 973-981.
- Dovey SL, Valli H, Hermann BP, Sukhwani M, Donohue J, Castro CA, Chu T, Sanfilippo JS & Orwig KE** 2013 Eliminating malignant contamination from therapeutic human spermatogonial stem cells. *J Clin Invest* **123** 1833-1843.
- Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK & Ross DD** 1998 A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** 15665-15670.
- Drumond AL, Weng CC, Wang G, Chiarini-Garcia H, Eras-Garcia L & Meistrich ML** 2011 Effects of multiple doses of cyclophosphamide on mouse testes: accessing the germ cells lost, and the functional damage of stem cells. *Reprod Toxicol* **32** 395-406.
- Ebata KT, Zhang X & Nagano MC** 2005 Expression patterns of cell-surface molecules on male germ line stem cells during postnatal mouse development. *Mol Reprod Dev* **72** 171-181.
- Ehmcke J, Luetjens CM & Schlatt S** 2005 Clonal organization of proliferating spermatogonial stem cells in adult males of two species of non-human primates, *Macaca mulatta* and *Callithrix jacchus*. *Biol Reprod* **72** 293-300.
- Eildermann K, Gromoll J & Behr R** 2012 Misleading and reliable markers to differentiate between primate testis-derived multipotent stromal cells and spermatogonia in culture. *Hum Reprod* **27** 1754-1767.
- Evenson D & Wixon R** 2006 Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reprod Biomed Online* **12** 466-472.
- Evenson DP** 2017 Evaluation of sperm chromatin structure and DNA strand breaks is an important part of clinical male fertility assessment. *Transl Androl Urol* **6** S495-S500.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z & Melamed MR** 1980 Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* **210** 1131-1133.
- Fan W, Richter G, Cereseto A, Beadling C & Smith KA** 1999 Cytokine response gene 6 induces p21 and regulates both cell growth and arrest. *Oncogene* **18** 6573-6582.

- Farrell PB, Foote RH, McArdle MM, Trouern-Trend VL & Tardif AL** 1996 Media and Dilution Procedures Tested to Minimize Handling Effects on Human, Rabbit, and Bull Sperm for Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA). *Journal of Andrology* **17** 293-300.
- Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R & Alvarez JG** 2003 The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation. *Journal of Andrology* **24** 59-66.
- Fielder E, von Zglinicki T & Jurk D** 2017 The DNA Damage Response in Neurons: Die by Apoptosis or Survive in a Senescence-Like State? *J Alzheimers Dis* **60** S107-S131.
- Fok KL, Bose R, Sheng K, Chang CW, Katz-Egorov M, Culty M, Su S, Yang M, Ruan YC, Chan HC, Iavarone A, Lasorella A, Cencic R, Pelletier J, Nagano M, Xu W & Wing SS** 2017 Huwe1 Regulates the Establishment and Maintenance of Spermatogonia by Suppressing DNA Damage Response. *Endocrinology* **158** 4000-4016.
- Forand A & Bernardino-Sgherri J** 2009 A critical role of PUMA in maintenance of genomic integrity of murine spermatogonial stem cell precursors after genotoxic stress. *Cell Res* **19** 1018-1030.
- Forand A, Fouchet P, Lahaye J-B, Chicheportiche A, Habert R & Bernardino-Sgherri J** 2009 Similarities and Differences in the In Vivo Response of Mouse Neonatal Gonocytes and Spermatogonia to Genotoxic Stress1. *Biology of Reproduction* **80** 860-873.
- Foresta C, Tescari S & Di Nisio A** 2017 Impact of perfluorochemicals on human health and reproduction: a male's perspective. *J Endocrinol Invest*.
- Forrest RA, Swift LP, Rephaeli A, Nudelman A, Kimura K, Phillips DR & Cutts SM** 2012 Activation of DNA damage response pathways as a consequence of anthracycline-DNA adduct formation. *Biochem Pharmacol* **83** 1602-1612.
- Fossa SD, De Angelis P, Kraggerud SM, Evenson D, Theodorsen L & Clausen OP** 1997 Prediction of posttreatment spermatogenesis in patients with testicular cancer by flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Cytometry* **30** 192-196.
- Frerichs VA & Tornatore KM** 2004 Determination of the glucocorticoids prednisone, prednisolone, dexamethasone, and cortisol in human serum using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **802** 329-338.
- Fritz G, Tano K, Mitra S & Kaina B** 1991 Inducibility of the DNA repair gene encoding O6-methylguanine-DNA methyltransferase in mammalian cells by DNA-damaging treatments. *Mol Cell Biol* **11** 4660-4668.
- Fu D, Calvo JA & Samson LD** 2012 Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat Rev Cancer* **12** 104-120.
- Fujita K, Ohta H, Tsujimura A, Takao T, Miyagawa Y, Takada S, Matsumiya K, Wakayama T & Okuyama A** 2005 Transplantation of spermatogonial stem cells isolated from leukemic mice restores fertility without inducing leukemia. *J Clin Invest* **115** 1855-1861.
- Gandini L, Lombardo F, Salacone P, Paoli D, Anselmo AP, Culasso F, Dondero F & Lenzi A** 2003 Testicular cancer and Hodgkin's disease: evaluation of semen quality. *Hum Reprod* **18** 796-801.
- Garolla A, Cosci I, Menegazzo M, De Palo R, Ambrosini G, Sartini B, Pizzol D & Foresta C** 2014 Sperm selected by both birefringence and motile sperm organelle morphology examination have reduced deoxyribonucleic acid fragmentation. *Fertil Steril* **101** 647-652.
- Gat I, Maghen L, Filice M, Wyse B, Zohni K, Jarvi K, Lo KC, Gauthier Fisher A & Librach C** 2017 Optimal culture conditions are critical for efficient expansion of human testicular somatic and germ cells in vitro. *Fertil Steril* **107** 595-605 e597.
- Geens M, Goossens E & Tournaye H** 2011 Cell selection by selective matrix adhesion is not sufficiently efficient for complete malignant cell depletion from contaminated human testicular cell suspensions. *Fertility and Sterility* **95** 787-791.

- Geens M, Van de Velde H, De Block G, Goossens E, Van Steirteghem A & Tournaye H** 2007 The efficiency of magnetic-activated cell sorting and fluorescence-activated cell sorting in the decontamination of testicular cell suspensions in cancer patients. *Human Reproduction* **22** 733-742.
- Genois MM, Paquet ER, Laffitte MC, Maity R, Rodrigue A, Ouellette M & Masson JY** 2014 DNA repair pathways in trypanosomatids: from DNA repair to drug resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* **78** 40-73.
- Ginsberg JP** 2011 New advances in fertility preservation for pediatric cancer patients. *Curr Opin Pediatr* **23** 9-13.
- Glen CD & Dubrova YE** 2012 Exposure to anticancer drugs can result in transgenerational genomic instability in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109** 2984-2988.
- Goldschneider I, Gordon LK & Morris RJ** 1978 Demonstration of Thy-1 antigen on pluripotent hemopoietic stem cells in the rat. *J Exp Med* **148** 1351-1366.
- Goode EL, Ulrich CM & Potter JD** 2002 Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11** 1513-1530.
- Goossens E & Tournaye H** 2013 [Fertility preservation in boys: spermatogonial stem cell transplantation and testicular grafting]. *Gynecol Obstet Fertil* **41** 529-531.
- Goossens S & van Roy F** 2005 Cadherin-mediated cell-cell adhesion in the testis. *Front Biosci* **10** 398-419.
- Gordetsky J, van Wijngaarden E & O'Brien J** 2012 Redefining abnormal follicle-stimulating hormone in the male infertility population. *BJU Int* **110** 568-572.
- Green DM, Kawashima T, Stovall M, Leisenring W, Sklar CA, Mertens AC, Donaldson SS, Byrne J & Robison LL** 2010 Fertility of male survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol* **28** 332-339.
- Green DM, Liu W, Kutteh WH, Ke RW, Shelton KC, Sklar CA, Chemaitilly W, Pui CH, Klosky JL, Spunt SL, Metzger ML, Srivastava D, Ness KK, Robison LL & Hudson MM** 2014 Cumulative alkylating agent exposure and semen parameters in adult survivors of childhood cancer: a report from the St Jude Lifetime Cohort Study. *Lancet Oncol* **15** 1215-1223.
- Green DM, Whitton JA, Stovall M, Mertens AC, Donaldson SS, Ruymann FB, Pendergrass TW & Robison LL** 2003 Pregnancy outcome of partners of male survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol* **21** 716-721.
- Gregoire MC, Massonneau J, Simard O, Gouraud A, Brazeau MA, Arguin M, Leduc F & Boissonneault G** 2013 Male-driven de novo mutations in haploid germ cells. *Mol Hum Reprod* **19** 495-499.
- Grimes SR, Jr. & Smart PG** 1985 Changes in the structural organization of chromatin during spermatogenesis in the rat. *Biochim Biophys Acta* **824** 128-139.
- Gruppi CM, Zakeri ZF & Wolgemuth DJ** 1991 Stage and lineage-regulated expression of two HSP90 transcripts during mouse germ cell differentiation and embryogenesis. *Molecular Reproduction and Development* **28** 209-217.
- Habas K, Anderson D & Brinkworth MH** 2016 Germ Cell Responses to Doxorubicin Exposure in Vitro. *Toxicology letters*.
- Hadziselimovic F, Emmons LR & Buser MW** 2004 A diminished postnatal surge of Ad spermatogonia in cryptorchid infants is additional evidence for hypogonadotropic hypogonadism. *Swiss Med Wkly* **134** 381-384.
- Hallak J, Kolettis PN, Sekhon VS, Thomas AJ & Agarwal A** 1999 Sperm cryopreservation in patients with testicular cancer. *Urology* **54** 894-899.
- Hallak J, Mahran AM & Agarwal A** 2000 Characteristics of Cryopreserved Semen from Men with Lymphoma. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **17** 591-595.

- Hamer G, Roepers-Gajadien HL, van Duyn-Goedhart A, Gademan IS, Kal HB, van Buul PP, Ashley T & de Rooij DG** 2003 Function of DNA-protein kinase catalytic subunit during the early meiotic prophase without Ku70 and Ku86. *Biol Reprod* **68** 717-721.
- Hardy MP, Zirkin BR & Ewing LL** 1989 Kinetic Studies on the Development of the Adult Population of Leydig Cells in Testes of the Pubertal Rat\*. *Endocrinology* **124** 762-770.
- Harrison RG & Weiner JS** 1949 Vascular Patterns of the Mammalian Testis and their Functional Significance. *Journal of Experimental Biology* **26** 304-316.
- Hawkins MM, Draper GJ & Winter DL** 1995 Cancer in the offspring of survivors of childhood leukaemia and non-Hodgkin lymphoma†. *British Journal Of Cancer* **71** 1335.
- Hayden RP & Kashanian JA** 2017 Facing a cancer diagnosis: empowering parents to speak with adolescents about sperm banking. *Fertility and Sterility*.
- He Z, Kokkinaki M, Jiang J, Dobrinski I & Dym M** 2010 Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia. *Biol Reprod* **82** 363-372.
- Hecht SM** 2000 Bleomycin: new perspectives on the mechanism of action. *J Nat Prod* **63** 158-168.
- Hempel G, Flege S, Wurthwein G & Boos J** 2002 Peak plasma concentrations of doxorubicin in children with acute lymphoblastic leukemia or non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Chemother Pharmacol* **49** 133-141.
- Hermann BP, Mutoji KN, Velte EK, Ko D, Oatley JM, Geyer CB & McCarrey JR** 2015 Transcriptional and translational heterogeneity among neonatal mouse spermatogonia. *Biol Reprod* **92** 54.
- Hermann BP, Sukhwani M, Hansel MC & Orwig KE** 2010 Spermatogonial stem cells in higher primates: are there differences from those in rodents? *Reproduction* **139** 479-493.
- Hermann BP, Sukhwani M, Salati J, Sheng Y, Chu T & Orwig KE** 2011 Separating spermatogonia from cancer cells in contaminated prepubertal primate testis cell suspensions. *Hum Reprod* **26** 3222-3231.
- Hermann BP, Sukhwani M, Winkler F, Pascarella JN, Peters KA, Sheng Y, Valli H, Rodriguez M, Ezzelarab M, Dargo G, Peterson K, Masterson K, Ramsey C, Ward T, Lienesch M, Volk A, Cooper DK, Thomson AW, Kiss JE, Penedo MC, Schatten GP, Mitalipov S & Orwig KE** 2012 Spermatogonial stem cell transplantation into rhesus testes regenerates spermatogenesis producing functional sperm. *Cell Stem Cell* **11** 715-726.
- Hoffmann U & Kroemer HK** 2004 The ABC transporters MDR1 and MRP2: multiple functions in disposition of xenobiotics and drug resistance. *Drug Metab Rev* **36** 669-701.
- Hofmann M-C, Narisawa S, Hess RA & Millán JL** 1992 Immortalization of germ cells and somatic testicular cells using the SV40 large T antigen. *Experimental Cell Research* **201** 417-435.
- Hofmann MC, Braydich-Stolle L, Dettin L, Johnson E & Dym M** 2005 Immortalization of mouse germ line stem cells. *Stem Cells* **23** 200-210.
- Hohmann C, Borgmann-Staudt A, Rendtorff R, Reinmuth S, Holzhausen S, Willich SN, Henze G, Goldbeck L & Keil T** 2011 Patient counselling on the risk of infertility and its impact on childhood cancer survivors: results from a national survey. *J Psychosoc Oncol* **29** 274-285.
- Honaramooz A, Megee SO & Dobrinski I** 2002 Germ cell transplantation in pigs. *Biol Reprod* **66** 21-28.
- Hou J, Niu M, Liu L, Zhu Z, Wang X, Sun M, Yuan Q, Yang S, Zeng W, Liu Y, Li Z & He Z** 2015 Establishment and Characterization of Human Germline Stem Cell Line with Unlimited Proliferation Potentials and no Tumor Formation. *Sci Rep* **5** 16922.
- Hou M, Chrysis D, Nurmio M, Parvinen M, Eksborg S, Soder O & Jahnukainen K** 2005 Doxorubicin induces apoptosis in germ line stem cells in the immature rat testis and amifostine cannot protect against this cytotoxicity. *Cancer Res* **65** 9999-10005.
- Howell SJ & Shalet SM** 2005 Spermatogenesis after cancer treatment: damage and recovery. *J Natl Cancer Inst Monogr* **12-17**.

- Huang G, Tong C, Kumbhani DS, Ashton C, Yan H & Ying Q-L** 2011 Beyond knockout rats: New insights into finer genome manipulation in rats. *Cell Cycle* **10** 1059-1066.
- Huber A, Bai P, de Murcia JM & de Murcia G** 2004 PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development. *DNA Repair (Amst)* **3** 1103-1108.
- Huckins C** 1971 The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat Rec* **169** 533-557.
- Insinga A, Cicalese A & Pelicci PG** 2014 DNA damage response in adult stem cells. *Blood Cells Mol Dis* **52** 147-151.
- Intano GW, McMahan CA, McCarrey JR, Walter RB, McKenna AE, Matsumoto Y, MacInnes MA, Chen DJ & Walter CA** 2002 Base excision repair is limited by different proteins in male germ cell nuclear extracts prepared from young and old mice. *Mol Cell Biol* **22** 2410-2418.
- Irminger-Finger I, Ratajska M & Pilyugin M** 2016 New concepts on BARD1: Regulator of BRCA pathways and beyond. *Int J Biochem Cell Biol* **72** 1-17.
- Ismail N, Morales C & Clermont Y** 1990 Role of spermatogonia in the stage-synchronization of the seminiferous epithelium in vitamin-A-deficient rats. *Am J Anat* **188** 57-63.
- Izadyar F, Wong J, Maki C, Pacchiarotti J, Ramos T, Howerton K, Yuen C, Greilach S, Zhao HH, Chow M, Chow Y-C, Rao J, Barritt J, Bar-Chama N & Copperman A** 2011 Identification and characterization of repopulating spermatogonial stem cells from the adult human testis. *Human Reproduction* **26** 1296-1306.
- Jacobsen R, Bostofte E, Engholm G, Hansen J, Olsen JH, Skakkebaek NE & Møller H** 2000 Risk of testicular cancer in men with abnormal semen characteristics: cohort study. *BMJ* **321** 789-792.
- Jaffe N, Sullivan MP, Ried H, Boren H, Marshall R, Meistrich M, Maor M & Cunha MD** 1988 Male reproductive function in long-term survivors of childhood cancer. *Medical and Pediatric Oncology* **16** 241-247.
- Jahnukainen K, Heikkinen R, Henriksson M, Cooper TG, Puukko-Viertomies LR & Makitie O** 2011 Semen quality and fertility in adult long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Fertil Steril* **96** 837-842.
- Jahnukainen K, Hou M, Petersen C, Setchell B & Soder O** 2001 Intratesticular transplantation of testicular cells from leukemic rats causes transmission of leukemia. *Cancer Res* **61** 706-710.
- Jaroudi S & SenGupta S** 2007 DNA repair in mammalian embryos. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **635** 53-77.
- Jenkins JS & Sampson PA** 1967 Conversion of cortisone to cortisol and prednisone to prednisolone. *British Medical Journal* **2** 205-207.
- Ji BT, Shu XO, Linet MS, Zheng W, Wacholder S, Gao YT, Ying DM & Jin F** 1997 Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J Natl Cancer Inst* **89** 238-244.
- Ji G, Gu A, Zhu P, Xia Y, Zhou Y, Hu F, Song L, Wang S & Wang X** 2010 Joint effects of XRCC1 polymorphisms and polycyclic aromatic hydrocarbons exposure on sperm DNA damage and male infertility. *Toxicol Sci* **116** 92-98.
- Jordan MA & Wilson L** 2004 Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* **4** 253-265.
- Jost A, Vigier B, Prepin J & Perchellet JP** 1973 Studies on sex differentiation in mammals. *Recent Prog Horm Res* **29** 1-41.
- Jung HJ, Kim EH, Mun JY, Park S, Smith ML, Han SS & Seo YR** 2007 Base excision DNA repair defect in Gadd45a-deficient cells. *Oncogene* **26** 7517-7525.
- Jungsuwadee P, Cole MP, Sultana R, Joshi G, Tangpong J, Butterfield DA, St Clair DK & Vore M** 2006 Increase in Mrp1 expression and 4-hydroxy-2-nonenal adduction in heart tissue of Adriamycin-treated C57BL/6 mice. *Mol Cancer Ther* **5** 2851-2860.
- Kaatsch P** 2010 Epidemiology of childhood cancer. *Cancer Treat Rev* **36** 277-285.

- Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Ogonuki N, Morimoto H, Ogura A & Shinohara T** 2011a Serum- and feeder-free culture of mouse germline stem cells. *Biol Reprod* **84** 97-105.
- Kanatsu-Shinohara M, Mori Y & Shinohara T** 2013 Enrichment of mouse spermatogonial stem cells based on aldehyde dehydrogenase activity. *Biol Reprod* **89** 140.
- Kanatsu-Shinohara M, Morimoto H & Shinohara T** 2012 Enrichment of Mouse Spermatogonial Stem Cells by Melanoma Cell Adhesion Molecule Expression. *Biology of Reproduction* **87** 139, 131-110-139, 131-110.
- Kanatsu-Shinohara M, Takashima S, Ishii K & Shinohara T** 2011b Dynamic changes in EPCAM expression during spermatogonial stem cell differentiation in the mouse testis. *PLoS One* **6** e23663.
- Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S & Shinohara T** 2004 CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells. *Biol Reprod* **70** 70-75.
- Kato M, Makino S, Kimura H, Ota T, Furuhashi T & Nagamura Y** 2001 Sperm motion analysis in rats treated with adriamycin and its applicability to male reproductive toxicity studies. *J Toxicol Sci* **26** 51-59.
- Kaushansky K, Lichtman MA, Prchal JT, Levi MM, Press OW, Burns LJ & Caligiuri MA** 2016 Williams Hematology. *Mc Graw Hill Education* 1493-1803.
- Kearsey JM, Coates PJ, Prescott AR, Warbrick E & Hall PA** 1995 Gadd45 is a nuclear cell cycle regulated protein which interacts with p21Cip1. *Oncogene* **11** 1675-1683.
- Kelnar CJ, McKinnell C, Walker M, Morris KD, Wallace WH, Saunders PT, Fraser HM & Sharpe RM** 2002a Testicular changes during infantile 'quiescence' in the marmoset and their gonadotrophin dependence: a model for investigating susceptibility of the prepubertal human testis to cancer therapy? *Hum Reprod* **17** 1367-1378.
- Kelnar CJH, McKinnell C, Walker M, Morris KD, Wallace WHB, Saunders PTK, Fraser HM & Sharpe RM** 2002b Testicular changes during infantile 'quiescence' in the marmoset and their gonadotrophin dependence: a model for investigating susceptibility of the prepubertal human testis to cancer therapy? *Human Reproduction* **17** 1367-1378.
- Kierszenbaum AL** 2001 Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed. *Mol Reprod Dev* **58** 357-358.
- Klaver R, Sanchez V, Damm OS, Redmann K, Lahrman E, Sandhowe-Klaverkamp R, Rohde C, Wistuba J, Ehmcke J, Schlatt S & Gromoll J** 2015 Direct but no transgenerational effects of decitabine and vorinostat on male fertility. *PLoS One* **10** e0117839.
- Kostyrko K & Mermod N** 2016 Assays for DNA double-strand break repair by microhomology-based end-joining repair mechanisms. *Nucleic Acids Res* **44** e56.
- Kryukov GV, Bielski CM, Samocha K, Fromer M, Seepo S, Gentry C, Neale B, Garraway LA, Sweeney CJ, Taplin ME & Van Allen EM** 2016 Genetic Effect of Chemotherapy Exposure in Children of Testicular Cancer Survivors. *Clin Cancer Res* **22** 2183-2189.
- Kubota H, Avarbock MR & Brinster RL** 2003 Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** 6487-6492.
- Kubota H, Avarbock MR & Brinster RL** 2004 Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biol Reprod* **71** 722-731.
- Kubota H & Brinster RL** 2006 Technology Insight: in vitro culture of spermatogonial stem cells and their potential therapeutic uses. *Nature clinical practice. Endocrinology & metabolism* **2** 99-108.
- Kumar K, Lewis S, Vinci S, Riera-Escamilla A, Fino MG, Tamburrino L, Muratori M, Larsen P & Krausz C** 2018 Evaluation of sperm DNA quality in men presenting with testicular cancer and lymphoma using alkaline and neutral Comet assays. *Andrology* **6** 230-235.

- Kurkure P, Prasad M, Dhamankar V & Bakshi G** 2015 Very small embryonic-like stem cells (VSELs) detected in azoospermic testicular biopsies of adult survivors of childhood cancer. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E* **13** 122.
- Laberge RM & Boissonneault G** 2005 On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biol Reprod* **73** 289-296.
- Lambert S, Watson A, Sheedy DM, Martin B & Carr AM** 2005 Gross chromosomal rearrangements and elevated recombination at an inducible site-specific replication fork barrier. *Cell* **121** 689-702.
- Lampe H, Horwich A, Norman A, Nicholls J & Dearnaley DP** 1997 Fertility after chemotherapy for testicular germ cell cancers. *J Clin Oncol* **15** 239-245.
- Landers JP & Spelsberg TC** 1992 New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes, and the cascade model for steroid regulation of gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **2** 19-63.
- Larsen L, Scheike T, Jensen TK, Bonde JP, Ernst E, Hjollund NH, Zhou Y, Skakkebaek NE, Giwercman A & The Danish First Pregnancy Planner Study T** 2000 Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. *Human Reproduction* **15** 1562-1567.
- Larsen MD, Friedman S, Magnussen B & Norgard BM** 2018 Birth Outcome of Children Fathered by Men Treated with Systemic Corticosteroids during the Conception Period - A Cohort Study based on Nationwide Data. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **122** 133-138.
- Lassonde G, Nasuhoglu D, Pan JF, Gaye B, yargeau V & Delbes G** 2015 Ozone treatment prevents the toxicity of an environmental mixture of estrogens on rat fetal testicular development. . *Reproductive Toxicology*.
- Lavin MF** 2007 ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks. *Oncogene* **26** 7749-7758.
- Leduc F, Nkoma GB & Boissonneault G** 2008 Spermiogenesis and DNA repair: a possible etiology of human infertility and genetic disorders. *Syst Biol Reprod Med* **54** 3-10.
- Lee JY, Lee ES, Kim SP, Lee MS, Phi JH, Kim SK, Hwang YI & Wang KC** 2017 Neurosphere formation potential resides not in the caudal cell mass, but in the secondary neural tube. *Int J Dev Biol* **61** 545-550.
- Levine H, Jorgensen N, Martino-Andrade A, Mendiola J, Weksler-Derri D, Mindlis I, Pinotti R & Swan SH** 2017 Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Hum Reprod Update* **23** 646-659.
- Li M & Yu X** 2013 Function of BRCA1 in the DNA damage response is mediated by ADP-ribosylation. *Cancer Cell* **23** 693-704.
- Lipshultz SE, Colan SD, Gelber RD, Perez-Atayde AR, Sallan SE & Sanders SP** 1991 Late Cardiac Effects of Doxorubicin Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia in Childhood. *New England Journal of Medicine* **324** 808-815.
- Little GH, Saw A, Bai Y, Dow J, Marjoram P, Simkhovich B, Leeka J, Kedes L, Kloner RA & Poizat C** 2009 Critical Role of Nuclear Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II $\delta$ B in Cardiomyocyte Survival in Cardiomyopathy. *Journal of Biological Chemistry* **284** 24857-24868.
- Liu M, Hales BF & Robaire B** 2014 Effects of four chemotherapeutic agents, bleomycin, etoposide, cisplatin, and cyclophosphamide, on DNA damage and telomeres in a mouse spermatogonial cell line. *Biol Reprod* **90** 72.
- Liu WR & Shipp MA** 2017 Signaling pathways and immune evasion mechanisms in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* **130** 2265-2270.
- Lopes F, Smith R, Nash S, Mitchell RT & Spears N** 2016 Irinotecan metabolite SN38 results in germ cell loss in the testis but not in the ovary of prepubertal mice. *Mol Hum Reprod* **22** 745-755.

- Lovett ST** 2017 Template-switching during replication fork repair in bacteria. *DNA Repair (Amst)* **56** 118-128.
- Lu CC & Meistrich ML** 1979 Cytotoxic effects of chemotherapeutic drugs on mouse testis cells. *Cancer Res* **39** 3575-3582.
- Luque EM, Tissera A, Gaggino MP, Molina RI, Mangeaud A, Vincenti LM, Beltramone F, Larcher JS, Estofan D, Fiol de Cuneo M & Martini AC** 2017 Body mass index and human sperm quality: neither one extreme nor the other. *Reprod Fertil Dev* **29** 731-739.
- Magre S & Jost A** 1980 The initial phases of testicular organogenesis in the rat. An electron microscopy study. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* **69** 297-318.
- Marchetti F, Bishop JB, Lowe X, Generoso WM, Hozier J & Wyrobek AJ** 2001 Etoposide induces heritable chromosomal aberrations and aneuploidy during male meiosis in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98** 3952-3957.
- Marcon L, Hales BF & Robaire B** 2008 Reversibility of the effects of subchronic exposure to the cancer chemotherapeutics bleomycin, etoposide, and cisplatin on spermatogenesis, fertility, and progeny outcome in the male rat. *J Androl* **29** 408-417.
- Marcon L, Zhang X, Hales BF, Nagano MC & Robaire B** 2010 Development of a short-term fluorescence-based assay to assess the toxicity of anticancer drugs on rat stem/progenitor spermatogonia in vitro. *Biol Reprod* **83** 228-237.
- Marcon L, Zhang X, Hales BF, Robaire B & Nagano MC** 2011 Effects of chemotherapeutic agents for testicular cancer on rat spermatogonial stem/progenitor cells. *J Androl* **32** 432-443.
- Marmor D, Elefant E, Dauchez C & Roux C** 1986 Semen analysis in Hodgkin's disease before the onset of treatment. *Cancer* **57** 1986-1987.
- Martinez G, Walschaerts M, Le Mitouard M, Borye R, Thomas C, Auger J, Berthaut I, Brugnon F, Daudin M, Moinard N, Ravel C, Saias J, Szerman E, Rives N, Hennebicq S & Bujan L** 2017 Impact of Hodgkin or non-Hodgkin lymphoma and their treatments on sperm aneuploidy: a prospective study by the French CECOS network. *Fertil Steril* **107** 341-350 e345.
- Martini F, Timmons M & Tallitsch R** 2012 Human Anatomy. *San Francisco: Pearson Benjamin Cummings*.
- Maselli J, Hales BF, Chan P & Robaire B** 2012 Exposure to bleomycin, etoposide, and cis-platinum alters rat sperm chromatin integrity and sperm head protein profile. *Biol Reprod* **86** 166, 161-110.
- Maselli J, Hales BF & Robaire B** 2013 The effects of chemotherapy with bleomycin, etoposide, and cis-platinum (BEP) on rat sperm chromatin remodeling, fecundity and testicular gene expression in the progeny. *Biol Reprod* **89** 85.
- McGuinness MP & Orth JM** 1992 Reinitiation of gonocyte mitosis and movement of gonocytes to the basement membrane in testes of newborn rats in vivo and in vitro. *Anat Rec* **233** 527-537.
- Meistrich ML** 1986 Relationship between spermatogonial stem cell survival and testis function after cytotoxic therapy. *Br J Cancer Suppl* **7** 89-101.
- Meistrich ML** 1998 Hormonal stimulation of the recovery of spermatogenesis following chemo- or radiotherapy. Review article. *APMIS* **106** 37-45; discussion 45-36.
- Meistrich ML** 2009 Male gonadal toxicity. *Pediatr Blood Cancer* **53** 261-266.
- Meistrich ML** 2013 Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis in humans. *Fertil Steril* **100** 1180-1186.
- Meistrich ML, Finch M, da Cunha MF, Hacker U & Au WW** 1982 Damaging Effects of Fourteen Chemotherapeutic Drugs on Mouse Testis Cells. *Cancer Research* **42** 122-131.
- Melaine N, Liénard M-O, Dorval I, Le Goascogne C, Lejeune H & Jégou B** 2002 Multidrug Resistance Genes and P-Glycoprotein in the Testis of the Rat, Mouse, Guinea Pig, and Human1. *Biology of Reproduction* **67** 1699-1707.
- Meseguer M, Santiso R, Garrido N & Fernandez JL** 2008 The effect of cancer on sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril* **90** 225-227.

- Metayer C, Lynch CF, Clarke EA, Glimelius B, Storm H, Pukkala E, Joensuu T, Leeuwen FEv, Veer MBvt, Curtis RE, Holowaty EJ, Andersson M, Wiklund T, Gospodarowicz M & Travis LB** 2000 Second Cancers Among Long-Term Survivors of Hodgkin's Disease Diagnosed in Childhood and Adolescence. *Journal of Clinical Oncology* **18** 2435-2443.
- Milardi D, Luca G, Grande G, Ghezzi M, Caretta N, Brusco G, De Filipo G, Marana R, Pontecorvi A, Calafiore R, Foresta C & Garolla A** 2017 Prednisone treatment in infertile patients with oligozoospermia and accessory gland inflammatory alterations. *Andrology* **5** 268-273.
- Mitchell RT, Cowan G, Morris KD, Anderson RA, Fraser HM, McKenzie KJ, Wallace WHB, Kelnar CJH, Saunders PTK & Sharpe RM** 2008 Germ cell differentiation in the marmoset (*Callithrix jacchus*) during fetal and neonatal life closely parallels that in the human. *Human Reproduction* **23** 2755-2765.
- Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B & Reed JC** 1994 Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* **9** 1799-1805.
- Mladenov E & Iliakis G** 2011 Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutat Res* **711** 61-72.
- Momparler RL, Karon M, Siegel SE & Avila F** 1976 Effect of Adriamycin on DNA, RNA, and Protein Synthesis in Cell-free Systems and Intact Cells. *Cancer Research* **36** 2891-2895.
- Moncrief JW & Lipscomb WN** 1965 Structures of leurocristine (vincristine) and vincalkebostine. X-ray analysis of leurocristine methiodide. *J Am Chem Soc* **87** 4963-4964.
- Morère J, Mornex F & Soulières D** 2011 Thérapeutique du cancer. *Springer Science & Business Media* 729.
- Morris ID, Iltott S, Dixon L & Brison DR** 2002 The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod* **17** 990-998.
- Mougou-Zerelli S, Brahem S, Kammoun M, Jerbi M, Elghezal H, Ajina M & Saad A** 2011 Detection of aneuploidy rate for chromosomes X, Y and 8 by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from patients with severe non-obstructive oligozoospermia. *J Assist Reprod Genet* **28** 971-977.
- Müller J, Hertz H & Skakkebaek NE** 1988 Development of the Seminiferous Epithelium During and After Treatment for Acute Lymphoblastic Leukemia in Childhood. *Hormone Research* 115-120.
- Nagano MC** 2003 Homing efficiency and proliferation kinetics of male germ line stem cells following transplantation in mice. *Biol Reprod* **69** 701-707.
- Nagano MC** 2011 Techniques for Culturing Spermatogonial Stem Cells Continue to Improve. *Biology of Reproduction* **84** 5-6.
- Nair AB & Jacob S** 2016 A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy* **7** 27-31.
- Nakagawa T, Nabeshima Y & Yoshida S** 2007 Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Dev Cell* **12** 195-206.
- Nakagawa T, Sharma M, Nabeshima Y, Braun RE & Yoshida S** 2010 Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenic stem cell compartment. *Science* **328** 62-67.
- Neuhaus N, Yoon J, Terwort N, Kliesch S, Seggewiss J, Hüge A, Voss R, Schlatt S, Grindberg RV & Scholer HR** 2017 Single-cell gene expression analysis reveals diversity among human spermatogonia. *Mol Hum Reprod* **23** 79-90.
- Niederberger BA, Busada JT & Geyer CB** 2015 Marker expression reveals heterogeneity of spermatogonia in the neonatal mouse testis. *Reproduction* **149** 329-338.

- Nurmio M, Keros V, Lahteenmaki P, Salmi T, Kallajoki M & Jahnukainen K** 2009 Effect of childhood acute lymphoblastic leukemia therapy on spermatogonia populations and future fertility. *J Clin Endocrinol Metab* **94** 2119-2122.
- Nwankwoala R, Georgewill O & Georgewill U** 2008 Pharmacokinetics Of Adriamycin After Intravenous Administration In Rat. *The Internet Journal of Oncology* **6** 1-4.
- O'Flaherty C, Hales BF, Chan P & Robaire B** 2010 Impact of chemotherapeutics and advanced testicular cancer or Hodgkin lymphoma on sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril* **94** 1374-1379.
- O'Flaherty C, Vaisheva F, Hales BF, Chan P & Robaire B** 2008 Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy. *Hum Reprod* **23** 1044-1052.
- O'Flaherty CM, Chan PT, Hales BF & Robaire B** 2012 Sperm chromatin structure components are differentially repaired in cancer survivors. *J Androl* **33** 629-636.
- Oakberg EF** 1971 Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. *Anat Rec* **169** 515-531.
- Oatley JM & Brinster RL** 2012 The germline stem cell niche unit in mammalian testes. *Physiol Rev* **92** 577-595.
- Oblette A, Rives N, Dumont L, Rives A, Verhaeghe F, Jumeau F & Rondanino C** 2017 Assessment of sperm nuclear quality after in vitro maturation of fresh or frozen/thawed mouse pre-pubertal testes. *Mol Hum Reprod* **23** 674-684.
- Ohsako S, Bunick D & Hayashi Y** 1995 Immunocytochemical observation of the 90 KD heat shock protein (HSP90): high expression in primordial and pre-meiotic germ cells of male and female rat gonads. *J Histochem Cytochem* **43** 67-76.
- Olaso R & Habert R** 2000 Genetic and cellular analysis of male germ cell development. *J Androl* **21** 497-511.
- Oleszczuk K, Giwercman A & Bungum M** 2016 Sperm chromatin structure assay in prediction of in vitro fertilization outcome. *Andrology* **4** 290-296.
- Oliva R** 2006 Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* **12** 417-435.
- Olive PL, Vikse CM & Banath JP** 1996 Use of the comet assay to identify cells sensitive to tirapazamine in multicell spheroids and tumors in mice. *Cancer Res* **56** 4460-4463.
- Olsen A-K, Bjørtuft H, Wiger R, Holme J, Seeberg E, Bjørås M & Brunborg G** 2001 Highly efficient base excision repair (BER) in human and rat male germ cells. *Nucleic Acids Research* **29** 1781-1790.
- Olson RD, Gambliel HA, Vestal RE, Shadle SE, Charlier HA, Jr. & Cusack BJ** 2005 Doxorubicin cardiac dysfunction: effects on calcium regulatory proteins, sarcoplasmic reticulum, and triiodothyronine. *Cardiovasc Toxicol* **5** 269-283.
- Omu AE, Al-Qattan F & Hamada BA** 1996 Effect of low dose continuous corticosteroid therapy in men with antisperm antibodies on spermatozoal quality and conception rate. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* **69** 129-134.
- Orth JM, Qiu J, Jester WF, Jr. & Pilder S** 1997 Expression of the c-kit gene is critical for migration of neonatal rat gonocytes in vitro. *Biol Reprod* **57** 676-683.
- Ortlip SA, Li SA & Li JJ** 1981 Characterization of specific glucocorticoid receptor in the Syrian hamster testis. *Endocrinology* **109** 1331-1338.
- Ott G** 2017 Aggressive B-cell lymphomas in the update of the 4th edition of the World Health Organization classification of haematopoietic and lymphatic tissues: refinements of the classification, new entities and genetic findings. *Br J Haematol* **178** 871-887.
- Ottaviani D, LeCain M & Sheer D** 2014 The role of microhomology in genomic structural variation. *Trends Genet* **30** 85-94.
- Ozturk S & Demir N** 2011 DNA repair mechanisms in mammalian germ cells. *Histol Histopathol* **26** 505-517.

- Pakyz RE, Heindel RM, Kallish M & Cosentino MJ** 1990 Spermatic cord torsion: effects of cyclosporine and prednisone on fertility and the contralateral testis in the rat. *J Androl* **11** 401-408.
- Palmert MR, Dunkel L & Feldman Witchel S** 2014 Chapter 17 - Puberty and Its Disorders in the Male. *Sperling MA, editor. Pediatric endocrinology* 697-733.
- Paniagua R & Nistal M** 1984 Morphological and histometric study of human spermatogonia from birth to the onset of puberty. *Journal of Anatomy* **139** 535-552.
- Paoli D, Gallo M, Rizzo F, Spanò M, Leter G, Lombardo F, Lenzi A & Gandini L** 2015 Testicular cancer and sperm DNA damage: short- and long-term effects of antineoplastic treatment. *Andrology* **3** 122-128.
- Paoli D, Rizzo F, Fiore G, Pallotti F, Pulsoni A, Annechini G, Lombardo F, Lenzi A & Gandini L** 2016 Spermatogenesis in Hodgkin's lymphoma patients: a retrospective study of semen quality before and after different chemotherapy regimens. *Hum Reprod* **31** 263-272.
- Paul C, Melton DW & Saunders PT** 2008 Do heat stress and deficits in DNA repair pathways have a negative impact on male fertility? *Mol Hum Reprod* **14** 1-8.
- Paul C, Nagano M & Robaire B** 2013 Aging results in molecular changes in an enriched population of undifferentiated rat spermatogonia. *Biol Reprod* **89** 147.
- Perrard MH, Sereni N, Schluth-Bolard C, Blondet A, SG DE, Plotton I, Morel-Journel N, Lejeune H, David L & Durand P** 2016 Complete Human and Rat Ex Vivo Spermatogenesis from Fresh or Frozen Testicular Tissue. *Biol Reprod* **95** 89.
- Perreault SD, Aitken RJ, Baker HW, Evenson DP, Huszar G, Irvine DS, Morris ID, Morris RA, Robbins WA, Sakkas D, Spano M & Wyrobek AJ** 2003 Integrating new tests of sperm genetic integrity into semen analysis: breakout group discussion. *Adv Exp Med Biol* **518** 253-268.
- Pesce M, Wang X, Wolgemuth DJ & Scholer H** 1998 Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech Dev* **71** 89-98.
- Pienkowski C & Grandjean S** 2017 La puberté avant l'âge, nouveaux aspects. <https://documentslide.org/la-puberte-avant-l-age-nouveaux-aspects>.
- Pietzak EJ, 3rd, Tasian GE, Tasian SK, Brinster RL, Carlson C, Ginsberg JP & Kolon TF** 2015 Histology of Testicular Biopsies Obtained for Experimental Fertility Preservation Protocol in Boys with Cancer. *J Urol* **194** 1420-1424.
- Poganitsch-Korhonen M, Masliukaite I, Nurmio M, Lahteenmaki P, van Wely M, van Pelt AM, Jahnuainen K & Stukenborg JB** 2017 Decreased spermatogonial quantity in prepubertal boys with leukaemia treated with alkylating agents. *Leukemia*.
- Poplack DG** 1989 Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Magrath I. (eds) *New Directions in Cancer Treatment*. UICC International Union Against Cancer. *Springer*.
- Prahalathan C, Selvakumar E & Varalakshmi P** 2006 Lipoic acid modulates adriamycin-induced testicular toxicity. *Reprod Toxicol* **21** 54-59.
- Pryzant RM, Meistrich ML, Wilson G, Brown B & McLaughlin P** 1993 Long-term reduction in sperm count after chemotherapy with and without radiation therapy for non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol* **11** 239-247.
- Quaas A & Dokras A** 2008 Diagnosis and Treatment of Unexplained Infertility. *Reviews in Obstetrics and Gynecology* **1** 69-76.
- Rapkins RW, Wang F, Nguyen HN, Cloughesy TF, Lai A, Ha W, Nowak AK, Hitchins MP & McDonald KL** 2015 The MGMT promoter SNP rs16906252 is a risk factor for MGMT methylation in glioblastoma and is predictive of response to temozolomide. *Neuro Oncol* **17** 1589-1598.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M & Rice-Evans C** 1999 Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* **26** 1231-1237.

- Reinmuth S, Liebeskind AK, Wickmann L, Bockelbrink A, Keil T, Henze G & Borgmann A** 2008 Having children after surviving cancer in childhood or adolescence - results of a Berlin survey. *Klin Padiatr* **220** 159-165.
- Rey RA, Campo SM, Bedecarras P, Nagle CA & Chemes HE** 1993 Is infancy a quiescent period of testicular development? Histological, morphometric, and functional study of the seminiferous tubules of the Cebus monkey from birth to the end of puberty. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **76** 1325-1331.
- Richardson LL, Pedigo C & Ann Handel M** 2000 Expression of deoxyribonucleic acid repair enzymes during spermatogenesis in mice. *Biol Reprod* **62** 789-796.
- Rives N, Milazzo JP, Arkoun B, Travers A, Perdrix A, Bironneau A & Mace B** 2012 [Male gamete...spermatozoon or spermatid?]. *Gynecol Obstet Fertil* **40** 671-674.
- Robaire B & Hinton B** 2002 The epididymis: from molecules to clinical practice. *Springer US*.
- Rochette L, Guenancia C, Gudjoncik A, Hachet O, Zeller M, Cottin Y & Vergely C** 2015 Anthracyclines/trastuzumab: new aspects of cardiotoxicity and molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* **36** 326-348.
- Romerius P, Ståhl O, Moëll C, Relander T, Cavallin-Ståhl E, Gustafsson H, Thapper KL, Jepson K, Spanò M, Wiebe T, Giwercman YL & Giwercman A** 2010 Sperm DNA integrity in men treated for childhood cancer. *Clinical Cancer Research* **16** 3843-3850.
- Romerius P, Stahl O, Moell C, Relander T, Cavallin-Stahl E, Wiebe T, Giwercman YL & Giwercman A** 2011 High risk of azoospermia in men treated for childhood cancer. *Int J Androl* **34** 69-76.
- Rothkamm K, Kruger I, Thompson LH & Lobrich M** 2003 Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* **23** 5706-5715.
- Ruan Y, Dong C, Patel J, Duan C, Wang X, Wu X, Cao Y, Pu L, Lu D, Shen T & Li J** 2015 SIRT1 suppresses doxorubicin-induced cardiotoxicity by regulating the oxidative stress and p38MAPK pathways. *Cell Physiol Biochem* **35** 1116-1124.
- Rube CE, Zhang S, Miebach N, Fricke A & Rube C** 2011 Protecting the heritable genome: DNA damage response mechanisms in spermatogonial stem cells. *DNA Repair (Amst)* **10** 159-168.
- Rubio C, Gil-Salom M, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Minguez Y, Remohi J & Pellicer A** 2001 Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod* **16** 2084-2092.
- Rueffer U, Breuer K, Josting A, Lathan B, Sieber M, Manzke O, Grotenhermen FJ, Tesch H, Bredenfeld H, Koch P, Nisters-Backes H, Wolf J, Engert A & Diehl V** 2001 Male gonadal dysfunction in patients with Hodgkin's disease prior to treatment. *Ann Oncol* **12** 1307-1311.
- Ruiter AF, Teeninga N, Nauta J, Endert E & Ackermans MT** 2012 Determination of unbound prednisolone, prednisone and cortisol in human serum and saliva by on-line solid-phase extraction liquid chromatography tandem mass spectrometry and potential implications for drug monitoring of prednisolone and prednisone in saliva. *Biomed Chromatogr* **26** 789-796.
- Russell WMS & Burch RL** 1959 The Principles of Humane Experimental Technique. *Special Edition publ. by Universities Federation for Animal Welfare, 1992*.
- Rwigemera A, Joao F & Delbes G** 2017 Fetal testis organ culture reproduces the dynamics of epigenetic reprogramming in rat gonocytes. *Epigenetics Chromatin* **10** 19.
- Ryu BY, Orwig KE, Kubota H, Avarbock MR & Brinster RL** 2004 Phenotypic and functional characteristics of spermatogonial stem cells in rats. *Dev Biol* **274** 158-170.
- Sadri-Ardekani H, Akhondi MA, van der Veen F, Repping S & van Pelt AM** 2011 In vitro propagation of human prepubertal spermatogonial stem cells. *JAMA* **305** 2416-2418.
- Sadri-Ardekani H & Atala A** 2014 Testicular tissue cryopreservation and spermatogonial stem cell transplantation to restore fertility: from bench to bedside. *Stem Cell Res Ther* **5** 68.

- Sadri-Ardekani H, Homburg CH, van Capel TM, van den Berg H, van der Veen F, van der Schoot CE, van Pelt AM & Repping S** 2014 Eliminating acute lymphoblastic leukemia cells from human testicular cell cultures: a pilot study. *Fertil Steril* **101** 1072-1078 e1071.
- Saitou M & Yamaji M** 2012 Primordial germ cells in mice. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**.
- Sale JE, Lehmann AR & Woodgate R** 2012 Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13** 141-152.
- Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, El-Tonsy MH, Alvarez JG, Thomas AJ, Jr. & Sharma RK** 2002 Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertil Steril* **78** 313-318.
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K & Linn S** 2004 Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* **73** 39-85.
- Sanders J, Hawley J, Levy W, Gooley T, Buckner C, Deeg H, Doney K, Storb R, Sullivan K, Witherspoon R & Appelbaum F** 1996 Pregnancies following high-dose cyclophosphamide with or without high-dose busulfan or total-body irradiation and bone marrow transplantation. *Blood* **87** 3045-3052.
- Sands K, Jansen R, Zaslau S & Greenwald D** 2015 Review article: the safety of therapeutic drugs in male inflammatory bowel disease patients wishing to conceive. *Aliment Pharmacol Ther* **41** 821-834.
- Schilsky RL, Lewis BJ, Sherins RJ & Young RC** 1980 Gonadal dysfunction in patients receiving chemotherapy for cancer. *Ann Intern Med* **93** 109-114.
- Schlatt S, Rosiepen G, Weinbauer GF, Rolf C, Brook PF & Nieschlag E** 1999 Germ cell transfer into rat, bovine, monkey and human testes. *Hum Reprod* **14** 144-150.
- Schmahl J, Eicher EM, Washburn LL & Capel B** 2000 Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development* **127** 65-73.
- Schmid I & Jamieson BD** 2004 Assessment of telomere length, phenotype, and DNA content. *Curr Protoc Cytom* **Chapter 7** Unit 7 26.
- Schmid W, Cole TJ, Blendy JA & Schutz G** 1995 Molecular genetic analysis of glucocorticoid signalling in development. *J Steroid Biochem Mol Biol* **53** 33-35.
- Schnurstein A & Braunbeck T** 2001 Tail moment versus tail length--application of an in vitro version of the comet assay in biomonitoring for genotoxicity in native surface waters using primary hepatocytes and gill cells from zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol Environ Saf* **49** 187-196.
- Schover LR** 2009 Patient attitudes toward fertility preservation. *Pediatric Blood & Cancer* **53** 281-284.
- Schover LR, Brey K, Lichtin A, Lipshultz LI & Jeha S** 2002a Knowledge and experience regarding cancer, infertility, and sperm banking in younger male survivors. *J Clin Oncol* **20** 1880-1889.
- Schover LR, Brey K, Lichtin A, Lipshultz LI & Jeha S** 2002b Oncologists' attitudes and practices regarding banking sperm before cancer treatment. *J Clin Oncol* **20** 1890-1897.
- Seethalakshmi L, Flores C, Kinkead T, Carboni AA, Malhotra RK & Menon M** 1992 Effects of Subchronic Treatment with Cis-Platinum on Testicular Function, Fertility, Pregnancy Outcome, and Progeny. *Journal of Andrology* **13** 65-74.
- Seppanen VI, Artama MS, Malila NK, Pitkaniemi JM, Rantanen ME, Ritvanen AK & Madanat-Harjuoja LM** 2016 Risk for congenital anomalies in offspring of childhood, adolescent and young adult cancer survivors. *Int J Cancer* **139** 1721-1730.
- Shannon M, Lamerdin JE, Richardson L, McCutchen-Maloney SL, Hwang MH, Handel MA, Stubbs L & Thelen MP** 1999 Characterization of the mouse Xpf DNA repair gene and differential expression during spermatogenesis. *Genomics* **62** 427-435.
- Sharma S, Hicks JK, Chute CL, Brennan JR, Ahn JY, Glover TW & Canman CE** 2012 REV1 and polymerase zeta facilitate homologous recombination repair. *Nucleic Acids Res* **40** 682-691.
- Shinohara T, Avarbock MR & Brinster RL** 1999 beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** 5504-5509.

- Shinohara T, Inoue K, Ogonuki N, Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Nakata K, Kurome M, Nagashima H, Toyokuni S, Kogishi K, Honjo T & Ogura A** 2002 Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and in-vitro microinsemination. *Hum Reprod* **17** 3039-3045.
- Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR & Brinster RL** 2000 Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** 8346-8351.
- Shnorhavorian M, Schwartz SM, Stansfeld B, Sadler-Riggleman I, Beck D & Skinner MK** 2017 Differential DNA Methylation Regions in Adult Human Sperm following Adolescent Chemotherapy: Potential for Epigenetic Inheritance. *PLoS One* **12** e0170085.
- Sieniawski M, Reineke T, Josting A, Nogova L, Behringer K, Halbsguth T, Fuchs M, Diehl V & Engert A** 2008 Assessment of male fertility in patients with Hodgkin's lymphoma treated in the German Hodgkin Study Group (GHSg) clinical trials. *Ann Oncol* **19** 1795-1801.
- Siklenka K, Erkek S, Godmann M, Lambrot R, McGraw S, Lafleur C, Cohen T, Xia J, Suderman M, Hallett M, Trasler J, Peters AH & Kimmins S** 2015 Disruption of histone methylation in developing sperm impairs offspring health transgenerationally. *Science* **350** aab2006.
- Simsek M, Lambalk CB, Wilschut JA, Mulder CJJ & de Boer NKH** 2017 The associations of thiopurines with male fertility and paternally exposed offspring: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 1-15.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR & Schneider EL** 1988 A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* **175** 184-191.
- Skovsgaard T & Nissen NI** 1982 Membrane transport of anthracyclines. *Pharmacol Ther* **18** 293-311.
- Smit M, van Casteren NJ, Wildhagen MF, Romijn JC & Dohle GR** 2010 Sperm DNA integrity in cancer patients before and after cytotoxic treatment. *Hum Reprod* **25** 1877-1883.
- Smith ML, Chen IT, Zhan Q, Bae I, Chen CY, Gilmer TM, Kastan MB, O'Connor PM & Fornace AJ, Jr.** 1994 Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* **266** 1376-1380.
- Soler C, Yeung CH & Cooper TG** 1994 Development of sperm motility patterns in the murine epididymis. *Int J Androl* **17** 271-278.
- Soria G & Gottifredi V** 2010 PCNA-coupled p21 degradation after DNA damage: the exception that confirms the rule? *DNA repair* **9** 358-364.
- Sotomayor RE & Sega GA** 2000 Unscheduled DNA synthesis assay in mammalian spermatogenic cells: an update. *Environ Mol Mutagen* **36** 255-265.
- Spitz S** 1948 The histological effects of nitrogen mustards on human tumors and tissues. *Cancer* **1** 383-398.
- Stahl O, Boyd HA, Giwercman A, Lindholm M, Jensen A, Kjaer SK, Anderson H, Cavallin-Stahl E & Rylander L** 2011 Risk of birth abnormalities in the offspring of men with a history of cancer: a cohort study using Danish and Swedish national registries. *J Natl Cancer Inst* **103** 398-406.
- Stahl O, Eberhard J, Cavallin-Stahl E, Jepson K, Friberg B, Tingsmark C, Spano M & Giwercman A** 2009 Sperm DNA integrity in cancer patients: the effect of disease and treatment. *Int J Androl* **32** 695-703.
- Steliarova-Foucher E, Colombet M, Ries LAG, Moreno F, Dolya A, Bray F, Hesselting P, Shin HY & Stiller CA** 2017 International incidence of childhood cancer, 2001-10: a population-based registry study. *Lancet Oncol* **18** 719-731.
- Stensheim H, Klungsoyr K, Skjaerven R, Grotmol T & Fossa SD** 2013 Birth outcomes among offspring of adult cancer survivors: a population-based study. *Int J Cancer* **133** 2696-2705.
- Struijk RB, Mulder CL, van der Veen F, van Pelt AM & Repping S** 2013 Restoring fertility in sterile childhood cancer survivors by autotransplanting spermatogonial stem cells: are we there yet? *Biomed Res Int* **2013** 903142.

- Strzalka W & Ziemienowicz A** 2011 Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Annals of Botany* **107** 1127-1140.
- Su L, Mruk DD & Cheng CY** 2011 Drug transporters, the blood–testis barrier, and spermatogenesis. *The Journal of endocrinology* **208** 207-223.
- Sun F, Xu Q, Zhao D & Degui Chen C** 2015 Id4 Marks Spermatogonial Stem Cells in the Mouse Testis. *Scientific Reports* **5** 17594.
- Swerdlow AJ, Barber JA, Hudson GV, Cunningham D, Gupta RK, Hancock BW, Horwich A, Lister TA & Linch DC** 2000 Risk of Second Malignancy After Hodgkin’s Disease in a Collaborative British Cohort: The Relation to Age at Treatment. *Journal of Clinical Oncology* **18** 498-498.
- Swift LP, Rephaeli A, Nudelman A, Phillips DR & Cutts SM** 2006 Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. *Cancer Res* **66** 4863-4871.
- Taatjes DJ, Gaudio G, Resing K & Koch TH** 1997 Redox pathway leading to the alkylation of DNA by the anthracycline, antitumor drugs adriamycin and daunomycin. *J Med Chem* **40** 1276-1286.
- Taddeo D & Girard M** 2007 Croissance et développement pubertaire du garçon. *Le Médecin du Québec* **42** 29-36.
- Takashima S, Kanatsu-Shinohara M, Tanaka T, Takehashi M, Morimoto H & Shinohara T** 2011 Rac mediates mouse spermatogonial stem cell homing to germline niches by regulating transmigration through the blood-testis barrier. *Cell Stem Cell* **9** 463-475.
- Takekawa M & Saito H** 1998 A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell* **95** 521-530.
- Takubo K, Ohmura M, Azuma M, Nagamatsu G, Yamada W, Arai F, Hirao A & Suda T** 2008 Stem cell defects in ATM-deficient undifferentiated spermatogonia through DNA damage-induced cell-cycle arrest. *Cell Stem Cell* **2** 170-182.
- Tal R, Botchan A, Hauser R, Yogev L, Paz G & Yavetz H** 2000 Follow-up of sperm concentration and motility in patients with lymphoma. *Hum Reprod* **15** 1985-1988.
- Tamura RE, de Vasconcellos JF, Sarkar D, Libermann TA, Fisher PB & Zerbini LF** 2012 GADD45 proteins: central players in tumorigenesis. *Current molecular medicine* **12** 634-651.
- Tanaka T, Kanatsu-Shinohara M, Lei Z, Rao CV & Shinohara T** 2016 The Luteinizing Hormone-Testosterone Pathway Regulates Mouse Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal by Suppressing WNT5A Expression in Sertoli Cells. *Stem Cell Reports* **7** 279-291.
- Tegelenbosch RA & de Rooij DG** 1993 A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res* **290** 193-200.
- Tempest HG, Ko E, Chan P, Robaire B, Rademaker A & Martin RH** 2008 Sperm aneuploidy frequencies analysed before and after chemotherapy in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients. *Hum Reprod* **23** 251-258.
- Thibault C & Levasseur M-C** 2001 La reproduction chez les mammifères et l'homme. *Quae*.
- Thomas C, Cans C, Pelletier R, De Robertis C, Hazzouri M, Sele B, Rousseaux S & Hennebicq S** 2004 No Long-Term Increase in Sperm Aneuploidy Rates after Anticancer Therapy. *Sperm Fluorescence In situ Hybridization Analysis in 26 Patients Treated for Testicular Cancer or Lymphoma* **10** 6535-6543.
- Thompson MJ, Abdul-Rahman S, Baker TG, Rafferty JA, Margison GP & Bibby MC** 2000 Role of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in the resistance of mouse spermatogenic cells to O6-alkylating agents. *J Reprod Fertil* **119** 339-346.
- Thomson AB, Campbell AJ, Irvine DS, Anderson RA, Kelnar CJH & Wallace WHB** 2002 Semen quality and spermatozoal DNA integrity in survivors of childhood cancer: A case-control study. *Lancet* **360** 361-367.

- Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Iuliis GN, Zieschang JA & Clark AM** 2009 Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Hum Reprod* **24** 2061-2070.
- Tokuda M, Kadokawa Y, Kurahashi H & Marunouchi T** 2007 CDH1 is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes. *Biol Reprod* **76** 130-141.
- Trama A, Botta L, Foschi R, Ferrari A, Stiller C, Desandes E, Maule MM, Merletti F & Gatta G** 2016 Survival of European adolescents and young adults diagnosed with cancer in 2000-07: population-based data from EURO CARE-5. *Lancet Oncol* **17** 896-906.
- Trasler JM, Hales BF & Robaire B** 1985 Paternal cyclophosphamide treatment of rats causes fetal loss and malformations without affecting male fertility. *Nature* **316** 144-146.
- Trasler JM, Hales BF & Robaire B** 1986 Chronic low dose cyclophosphamide treatment of adult male rats: effect on fertility, pregnancy outcome and progeny. *Biol Reprod* **34** 275-283.
- Tremblay A, Beaud H & Delbes G** 2017 [Transgenerational impact of chemotherapy: Would the father exposure impact the health of future progeny?]. *Gynecol Obstet Fertil Senol* **45** 609-618.
- Tubbs JL, Pegg AE & Tainer JA** 2007 DNA binding, nucleotide flipping, and the helix-turn-helix motif in base repair by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and its implications for cancer chemotherapy. *DNA Repair (Amst)* **6** 1100-1115.
- Turinetto V & Giachino C** 2015 Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions. *Nucleic Acids Research* **43** 2489-2498.
- Vairapandi M, Azam N, Balliet AG, Hoffman B & Liebermann DA** 2000 Characterization of MyD118, Gadd45, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) interacting domains. PCNA impedes MyD118 AND Gadd45-mediated negative growth control. *J Biol Chem* **275** 16810-16819.
- Vaisheva F, Delbes G, Hales BF & Robaire B** 2007 Effects of the chemotherapeutic agents for non-Hodgkin lymphoma, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP), on the male rat reproductive system and progeny outcome. *J Androl* **28** 578-587.
- Vakalopoulos I, Dimou P, Anagnostou I & Zeginiadou T** 2015 Impact of cancer and cancer treatment on male fertility. *Hormones (Athens)* **14** 579-589.
- van Casteren NJ, van der Linden GH, Hakvoort-Cammel FG, Hahlen K, Dohle GR & van den Heuvel-Eibrink MM** 2009 Effect of childhood cancer treatment on fertility markers in adult male long-term survivors. *Pediatr Blood Cancer* **52** 108-112.
- van der Kaaij MA, Heutte N, Le Stang N, Raemaekers JM, Simons AH, Carde P, Noordijk EM, Ferme C, Thomas J, Eghbali H, Kluin-Nelemans HC & Henry-Amar M** 2007 Gonadal function in males after chemotherapy for early-stage Hodgkin's lymphoma treated in four subsequent trials by the European Organisation for Research and Treatment of Cancer: EORTC Lymphoma Group and the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* **25** 2825-2832.
- Van Pelt AM & De Rooij DG** 1990 The origin of the synchronization of the seminiferous epithelium in vitamin A-deficient rats after vitamin A replacement. *Biol Reprod* **42** 677-682.
- Van Pelt AMM, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, Creemers LB, De Rooij DG & Van Dissel-Emiliani FMF** 2002 Establishment of cell lines with rat spermatogonial stem cell characteristics. *Endocrinology* **143** 1845-1850.
- Velic D, Couturier AM, Ferreira MT, Rodrigue A, Poirier GG, Fleury F & Masson JY** 2015 DNA Damage Signalling and Repair Inhibitors: The Long-Sought-After Achilles' Heel of Cancer. *Biomolecules* **5** 3204-3259.
- Vendramini V, Robaire B & Miraglia SM** 2012 Amifostine-doxorubicin association causes long-term prepubertal spermatogonia DNA damage and early developmental arrest. *Hum Reprod* **27** 2457-2466.

- Vendramini V, Sasso-Cerri E & Miraglia SM** 2010 Amifostine reduces the seminiferous epithelium damage in doxorubicin-treated prepubertal rats without improving the fertility status. *Reprod Biol Endocrinol* **8** 3.
- Virro MR, Larson-Cook KL & Evenson DP** 2004 Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* **81** 1289-1295.
- Viviani S, Santoro A, Ragni G, Bonfante V, Bestetti O & Bonadonna G** 1985 Gonadal toxicity after combination chemotherapy for Hodgkin's disease. Comparative results of MOPP vs ABVD. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* **21** 601-605.
- Walker WH** 2011 Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis. *Spermatogenesis* **1** 116-120.
- Wallace WH, Anderson RA & Meirow D** 2011. The effect of chemotherapy and radiotherapy on the human reproductive system. In *Principles and Practice of Fertility Preservation*, pp. 11-22.
- Wallace WH, Shalet SM, Lendon M & Morris-Jones PH** 1991 Male fertility in long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Int J Androl* **14** 312-319.
- Wang Ej & Johnson WW** 2003 The Farnesyl Protein Transferase Inhibitor Lonafarnib (SCH66336) Is an Inhibitor of Multidrug Resistance Proteins 1 and 2. *Chemotherapy* **49** 303-308.
- Wang H, Paczulla A & Lengerke C** 2015 Evaluation of stem cell properties in human ovarian carcinoma cells using multi and single cell-based spheres assays. *J Vis Expe* 52259.
- Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B & Jemal A** 2014 Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* **64** 83-103.
- Wasilewski-Masker K, Seidel KD, Leisenring W, Mertens AC, Shnorhavorian M, Ritenour CW, Stovall M, Green DM, Sklar CA, Armstrong GT, Robison LL & Meacham LR** 2014 Male infertility in long-term survivors of pediatric cancer: a report from the childhood cancer survivor study. *J Cancer Surviv* **8** 437-447.
- Whitehead E, Shalet SM, Jones PH, Beardwell CG & Deakin DP** 1982 Gonadal function after combination chemotherapy for Hodgkin's disease in childhood. *Archives of Disease in Childhood* **57** 287-291.
- Williams DH** 2010 Sperm banking and the cancer patient. *Ther Adv Urol* **2** 19-34.
- Wilson S, Jones L, Couseens C & et al. e** 2002 Cancer and the Environment: Gene-Environment Interaction. *Washington (DC): National Academies Press (US)* **3**, **The Links Between Environmental Factors, Genetics, and the Development of Cancer.**
- Winther JF, Boice JD, Jr., Mulvihill JJ, Stovall M, Frederiksen K, Tawn EJ & Olsen JH** 2004 Chromosomal Abnormalities among Offspring of Childhood-Cancer Survivors in Denmark: A Population-Based Study. *The American Journal of Human Genetics* **74** 1282-1285.
- Wood RD, Mitchell M, Sgouros J & Lindahl T** 2001 Human DNA repair genes. *Science* **291** 1284-1289.
- Wu H, Hauser R, Krawetz SA & Pilsner JR** 2015 Environmental Susceptibility of the Sperm Epigenome During Windows of Male Germ Cell Development. *Curr Environ Health Rep* **2** 356-366.
- Xu GG, Spivak G, Mitchell DL, Mori T, McCarrey JR, McMahan CA, Walter RB, Hanawalt PC & Walter CA** 2005 Nucleotide excision repair activity varies among murine spermatogenic cell types. *Biology of Reproduction* **73** 123-130.
- Yang F, Teves SS, Kemp CJ & Henikoff S** 2014 Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1845** 84-89.
- Yeh JR, Zhang X & Nagano MC** 2007 Establishment of a short-term in vitro assay for mouse spermatogonial stem cells. *Biol Reprod* **77** 897-904.
- Yoon J-H, Park J, Conde J, Wakamiya M, Prakash L & Prakash S** 2015 Rev1 promotes replication through UV lesions in conjunction with DNA polymerases  $\eta$ ,  $\iota$ , and  $\kappa$  but not DNA polymerase  $\zeta$ . *Genes & Development* **29** 2588-2602.

- Zhang XY, Li WG, Wu YJ & Gao MT** 2005 Amelioration of doxorubicin-induced myocardial oxidative stress and immunosuppression by grape seed proanthocyanidins in tumour-bearing mice. *J Pharm Pharmacol* **57** 1043-1052.
- Zhang Y, Su H, Luo F, Wu S, Liu L, Liu T, Yu B & Wu Y** 2011 E-cadherin can be expressed by a small population of rat undifferentiated spermatogonia in vivo and in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **47** 593-600.
- Zohni K, Zhang X, Tan SL, Chan P & Nagano M** 2012a CD9 is expressed on human male germ cells that have a long-term repopulation potential after transplantation into mouse testes. *Biol Reprod* **87** 27.
- Zohni K, Zhang X, Tan SL, Chan P & Nagano MC** 2012b The efficiency of male fertility restoration is dependent on the recovery kinetics of spermatogonial stem cells after cytotoxic treatment with busulfan in mice. *Hum Reprod* **27** 44-53.

## **PARTIE V : Annexe I**

### **EFFETS TRANSGÉNÉRATIONNELS DES CHIMIOTHÉRAPIES : L'EXPOSITION DU PÈRE INFLUENCE-T-ELLE LA SANTÉ DES GÉNÉRATIONS FUTURES ?**

**Titre en anglais :** Transgenerational impact of chemotherapy: Would the father exposure impact the health of future progeny?

**Auteurs :** Amélie TREMBLAY<sup>1</sup>, Hermance BEAUD<sup>1</sup>, Géraldine DELBES<sup>1</sup>.

**Affiliations :** <sup>1</sup>INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, (Québec) Canada.

**Titre du journal :** Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie, 2017 Nov;45(11):609-618. doi: 10.1016/j.gofs.2017.09.004. Epub 2017 Oct 27.

#### **Contributions des différents auteurs :**

AT : Rédaction de la partie « données expérimentales », et création du schéma de synthèse

HB : Rédaction de la partie « données épidémiologiques »

GD : Rédaction de l'introduction et de la conclusion, et correction de la revue.

#### **Résumé en français :**

Le nombre de survivants de cancer augmente et leur qualité de vie devient un enjeu majeur de santé publique. Les traitements de cancer diminuent la fonction de reproduction des hommes en ciblant la spermatogenèse. En fin de compte, l'ADN, la chromatine et l'épigénome des spermatozoïdes peuvent être altérés chez les survivants de cancer. Savoir si l'historique de cancer et les traitements reçus peuvent avoir des conséquences sur la santé de leur descendance est donc une question fondamentale pour ces patients. Cette revue de la littérature regroupe les évidences expérimentales et épidémiologiques des effets observés sur les descendants directs et sur plusieurs générations, et dresse l'état des connaissances sur les mécanismes potentiellement impliqués. Les données expérimentales décrivent des effets inter- et transgénérationnels d'une exposition paternelle en fonction du type de traitement, de la dose et du temps d'exposition. Dans la population humaine, l'analyse des effets spécifiquement dus aux chimiothérapies est encore limitée, car elles sont souvent combinées à des traitements d'irradiations. Toutefois, il apparaît que les agents de chimiothérapies affectent le taux de natalité, mais n'ont pas de conséquences significatives sur la santé des enfants nés. Cependant, la démonstration de modifications de l'épigénome des spermatozoïdes des survivants de cancer même après une période de rémission ainsi que chez les

descendants dans des modèles animaux suggèrent une possible transmission transgénérationnelle qui reste à étudier dans la population humaine.

### **Résumé en anglais :**

The number of cancer survivors is increasing and their quality of life is becoming a major public health issue. Cancer treatments reduce men's reproductive health by targeting spermatogenesis. Ultimately, DNA, chromatin and the epigenome of spermatozoa can be altered in cancer survivors. Knowing whether the history of cancer and the treatments received can have consequences on the health of their offspring is therefore a fundamental question for these patients. This review gathers the experimental and epidemiological evidences of the effects observed on the direct descendants and on several generations, and draws up the state of knowledge on the mechanisms potentially involved. Experimental data describe inter- and transgenerational effects of paternal exposure depending on the type of treatment, dose and time of exposure. In the human population, the analysis of the effects specifically due to chemotherapy is still limited because they are often combined with irradiation treatments. However, it appears that chemotherapy agents affect the birth rate but do not have a significant impact on the health of the children born. Nevertheless, the demonstration of modifications of the sperm epigenome in cancer survivors, even after a period of remission, as well as changes in the sperm of the progeny in animal models, suggests a possible transgenerational transmission that remains to be studied in the human population.

### **1 - Introduction**

Grâce aux progrès dans la prise en charge médicale du cancer, incluant le diagnostic précoce et le développement de traitements par combinaison de chimiothérapies, les taux de survie ont augmenté de manière significative [1,2]. Le nombre de survivants du cancer est donc en augmentation constante et leur qualité de vie devient un enjeu majeur de santé publique. De nombreux effets secondaires d'un diagnostic de cancer et des traitements associés ont été décrits [3,4]. Un impact négatif sur la santé de reproduction fait partie de ces effets à long terme et peut affecter les jeunes survivants de cancer en âge d'avoir une famille. Chez l'homme en particulier, les agents de chimiothérapie ciblent la spermatogenèse [5] et les survivants de cancer ont plus de difficulté à devenir père [6–8]. Par exemple, les données épidémiologiques sur plus de 11 000 participants masculins dans la cohorte du *Childhood Cancer Survivor Study* (CCSS) ont montré que 53,6 % des survivants d'un cancer pédiatrique avaient été évalués pour des problèmes de fertilité par rapport à seulement 21,4 % de leurs frères non traités [9]. De plus, des études

sur la fertilité de survivants de cancer montrent une augmentation significative de l'utilisation des techniques de procréation assistée, quel que soit l'âge au diagnostic [10,11]. Ces effets négatifs sur la fertilité masculine dépendent largement du type de cancer, de la dose ou de la catégorie de chimiothérapie reçue et probablement de facteurs génétiques [5,7,12,13]. La fertilité est donc une préoccupation importante pour les jeunes survivants du cancer, d'autant plus que 80 % de ces patients sans enfants souhaitent avoir des enfants génétiquement apparentés et croient que leur expérience du cancer les rendront meilleurs parents [14]. Savoir si l'historique de cancer et des traitements reçus peuvent avoir des conséquences sur la santé de leur descendance est une question fondamentale pour bien informer ces patients. En effet, il a été montré que l'exposition paternelle à des agents génotoxiques ou des perturbateurs endocriniens peut induire des mutations génétiques ou épigénétiques dans les gamètes, qui se traduisent par des effets sur la santé de la descendance sur plusieurs générations [15–17]. Les agents de chimiothérapies ciblent l'ADN des cellules germinales mâles en division, induisant des anomalies chromosomiques, des cassures de l'ADN mais aussi des altérations de la structure de la chromatine et de l'épigénome dans les spermatozoïdes matures [18]. Ces changements pourraient avoir des conséquences sur la santé des générations futures. Pourtant, les tests précliniques nécessaires pour l'approbation d'un agent anticancéreux n'incluent pas d'analyse systématique des effets sur les cellules germinales [19,20]. Pour cette revue, nous avons fait le bilan des données expérimentales et épidémiologiques des dix dernières années sur l'impact des chimiothérapies sur la descendance d'hommes diagnostiqués avec le cancer. Pour chaque type d'étude, nous présentons les effets intergénérationnels, sur les descendants de première génération (F1), qui sont issus de cellules germinales directement exposées aux chimiothérapies. Puis, nous discutons des conséquences observées à partir de la deuxième génération (F2). Ces effets dits transgénérationnels ne sont pas issus d'une exposition directe aux chimiothérapies, mais plutôt d'un héritage acquis dans la lignée germinale, capable de perdurer entre les générations [15–17]. Finalement, nous avons analysé les mécanismes qui pourraient être impliqués dans la transmission de ces effets via la lignée germinale.

## **2 - Les données expérimentales**

### **2.1 - Les effets intergénérationnels**

Les données expérimentales sur l'impact des chimiothérapies chez le mâle et sur sa descendance directe sont nombreuses. Quelques-unes, obtenues principalement chez le rat, sont listées dans le Tableau 1.

L'une des études pionnières a démontré une augmentation significative des pertes embryonnaires, des anomalies congénitales et un retard de croissance chez les descendants de mâles exposés pendant au moins trois semaines au cyclophosphamide (CPA) [21]. Il est cependant intéressant de noter que les auteurs n'observaient que très peu d'effets sur les paramètres de fertilité des pères (réserve spermatique, poids de la prostate ou des épидидymes, taux hormonaux en LH, FSH et testostérone). Ceci suggère que les paramètres de fertilité utilisés classiquement ne prédisent pas nécessairement les impacts négatifs observés sur la descendance F1. Depuis, la majorité des études ont aussi rapporté une augmentation des pertes pré- et/ou post-implantatoires dans les portées issues de mâles exposés à différents agents de chimiothérapies seuls ou en combinaison (Tableau 1) [22–29]. Parmi ceux-ci, l'effet du cisplatine reste toutefois controversé puisque deux études ne démontrent pas d'effet sur les pertes embryonnaires, que ce soit après une exposition aiguë à cet agent seul [30], ou chronique en combinaison avec la bléomycine et l'étoposide (BEP) [31]. Au contraire, l'étude de Marcon *et al.*, rapporte une augmentation des pertes pré-implantatoires après une exposition chronique au BEP [24]. La différence de résultat entre ces études du BEP est possiblement due aux différences de mode d'exposition, suggérant que l'exposition par voie intra-péritonéale du cisplatine est plus toxique pour la descendance qu'une exposition par voie orale [24,31]. En plus de l'augmentation des pertes embryonnaires, certaines études démontrent une augmentation de la mortalité post-natale dans les portées issues de mâles exposés de manière chronique à des agents alkylants utilisés seuls ou en combinaison [29,31–33]. Par contre, les effets d'une exposition à des agents non alkylants restent à déterminer, mais les traitements de souris mâles à la décitabine ou au vorinostat ne semblent pas induire d'effet majeur sur la descendance [34]. En opposition à l'augmentation des pertes embryonnaires et du taux de mortalité après la naissance, les descendants présentent rarement des anomalies congénitales. Les seules évidences d'augmentation d'anomalies congénitales prénatales relèvent d'expositions chroniques de rats à de fortes doses cumulées de composés alkylants tels que le cisplatine ou le CPA [21,25,29]. Toutefois, des expositions chroniques similaires au CPA chez la souris n'ont pas d'effet [23]. De plus, une exposition chronique de rats à des doses cumulées plus faibles de ces agents ne semble pas induire d'anomalies congénitales [35]. Chez les rongeurs, les risques d'anomalies congénitales induites par les traitements de chimiothérapies sont donc faibles, sauf pour de fortes doses d'agents alkylants. Finalement, d'autres effets plus subtils ont été observés dans la génération F1. Par exemple, Auroux *et al.* ont observé une baisse de la capacité d'apprentissage suite à une exposition paternelle au CPA [32]. D'autre part, après une exposition de rats au cisplatine, des impacts à long terme sont visibles chez les descendantes femelles, dont une baisse du nombre de cellules germinales dans les ovaires fœtaux, une altération des cycles ovariens et une

diminution des niveaux de FSH circulants à l'âge adulte [36]. Parallèlement, chez les descendants mâles, Favareto *et al.* ont décrit un délai de la descente testiculaire et une histologie testiculaire anormale à l'âge adulte [35]. De plus, des mutations génétiques dans les spermatozoïdes de souris F1 [37], des altérations d'expression des gènes testiculaires après la naissance et une augmentation d'expression du variant testiculaire de l'histone H2B1A dans les spermatozoïdes [38] sont visibles chez les mâles issus de pères exposés à divers agents alkylants seuls ou en mixture. Finalement, une exposition à d'autres classes de chimiothérapies comme la décitabine, un analogue de la cytosine, ou le vorinostat, un inhibiteur des histones désacétylases, peut aussi avoir des impacts à long terme, tel qu'une hypométhylation du gène activator of basal transcription 1 (Abt1) dans les spermatozoïdes de souris F1 [34]. Les effets observés sur les modèles animaux suggèrent donc que les traitements de chimiothérapie peuvent avoir des conséquences sur les descendants directs de survivants de cancer. Afin d'extrapoler les données obtenues dans ces modèles expérimentaux chez l'humain, l'une des considérations importantes est la dose cumulée reçue et la cinétique de traitement. Expérimentalement, la durée du traitement et le temps entre la fin du traitement et les accouplements ne reflètent pas forcément la situation chez l'humain, puisque le temps de spermatogenèse est différent et qu'une période de rémission est conseillée aux patients. Par exemple, les données expérimentales sur le CPA ont permis de mettre en évidence que l'impact sur la descendance est plus important si l'exposition a affecté les spermatocytes et les spermatides, mais ces effets sont observés sur des portées issues d'accouplements réalisés directement après le traitement [21,23,26,31]. Seulement quelques résultats ont été obtenus d'accouplements réalisés plus d'un cycle de spermatogenèse après la fin du traitement, démontrant ainsi parfois une rémission [22,39] ou une persistance des effets négatifs [24,33] en fonction du type de traitement. Une autre limite de ces études de toxicologie de la reproduction *in vivo* est l'utilisation de rongeurs adultes au moment du traitement de chimiothérapie, ce qui ne permet pas de distinguer la différence d'effets dus à des expositions du mâle avant ou après la puberté. Toutefois, la plupart des données expérimentales citées ici sont les résultats d'exposition à des doses pertinentes en clinique, appuyant un possible effet chez l'homme [22,24,26,31,35–38]. De plus, l'observation de modifications dans les gonades et les gamètes de la génération F1 laissent penser qu'il pourrait y avoir des conséquences sur les générations subséquentes.

**Tableau 1. Effets intergénérationnels des traitements de chimiothérapies dans les modèles animaux.**

Référence	Modèle	Composé(s) de chimiothérapie	Durée de traitement (nombre de semaines)	Rémission (nombre de semaines)	Perte implantatoire	Mortalité Post-natale	Anomalie congénitale	Autres effets
38	Rat	BEP	Chronique (9)	Oui (9)	n.d.	n.d.	n.d.	Changement d'expression génique dans le testicule pré-pubère, altération de variants histones dans les spz
24	Rat	BEP	Chronique (9)	Oui (3, 6, 9)	Pré-implantatoire	n.d.	Non	n.d.
31	Rat	BEP	Chronique (6, 9)	Non	Non	Oui	Non	n.d.
36	Rat	Cisplatine	Chronique (3)	Non	n.d.	n.d.	n.d.	Baisse de cellules germinales ovariennes fœtales, baisse de poids corporel avant la puberté. altération du cycle ovarien, baisse de FSH circulante chez l'adulte
35	Rat	Cisplatine	Chronique (3)	Oui (10)	n.d.	n.d.	Non	Poids augmentés jusqu'au sevrage, délai de descente testiculaire, histologie des tubules séminifères adultes anormale
30	Rat	Cisplatine	Aigu	Non	Non	n.d.	Non	n.d.
29	Rat	Cisplatine	Chronique (9)	Non	Pré- et post-implantatoire	Oui	Oui	Baisse de poids des fœtus
22	Rat	CHOP	Chronique (11)	Oui (3, 6, 9)	Post-implantatoire	n.d.	Non	n.d.
26	Rat	CHOP	Chronique (10)	Non	Pré- et post-implantatoire	n.d.	Non	n.d.
23	Souris	Cyclophosphamide	Chronique (5)	Non	Post-implantatoire	n.d.	Non	n.d.
40	Rat	Cyclophosphamide	Chronique (4, 18)	Non	n.d.	n.d.	Non	Baisse de taille des portées F2
33	Rat	Cyclophosphamide	Sub-chronique (2)	Oui (8, 5, 14)	n.d.	Oui	Non	Baisse de capacité d'apprentissage chez le mâle adulte
32	Rat	Cyclophosphamide	Sub-chronique (2)	Oui (8, 5)	n.d.	Oui	Non	Baisse de capacité d'apprentissage chez le mâle adulte
25	Rat	Cyclophosphamide	Chronique (1-9)	Non	Pré- et post-implantatoire	n.d.	Oui	n.d.
21	Rat	Cyclophosphamide	Chronique (1-9)	Non	Pré- et post-implantatoire	n.d.	Oui	Retard de croissance des fœtus

37	Souris	Cyclophosphamide ou mitomycine C ou procarbazine	Aigu	Oui (8)	n.d.	n.d.	n.d.	Mutations génétiques somatiques et dans les spz
34	Souris	Décitabine ou vorinostat	Chronique (7)	Non	n.d.	Non	Non	Altérations mineures du testicule adulte, hypométhylation du gene <i>Abt1</i> dans les spz
27	Souris	Décitabine	Chronique (7)	Non	Pré- implantatoire	n.d.	n.d.	n.d.
28	Rat	Doxorubicine	Chronique (4)	Oui (1)	Pré- et post- implantatoire	n.d.	n.d.	n.d.
39	Souris	Melphalan	Aigu	Oui (1, 3, 5, 7)	n.d.	n.d.	n.d.	Anomalies structurales chromosomiques au stade zygote

La liste des références a été établie par une recherche Pubmed, Scopus et Web of science de la littérature avec les paramètres « Search (transgenerational[All Fields] OR progeny[All Fields] OR offspring[All Fields] OR ("wills"[MeSH Terms] OR "wills"[All Fields] OR "inheritance"[All Fields])) AND (chemiotherapy[All Fields] OR "chemotherapy"[All Fields] OR "chemotherapy"[All Fields])) Filters: published in the last 10 years ». Les articles de plus de 10 ans cités dans le texte ont été ajoutés à la liste. BEP : bléomycine, étoposide, cisplatine; CHOP : cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prednisone; n.d. : non-déterminé; spz : spermatozoïdes. Les pertes implantatoires sont précisées comme pré- ou post-implantatoires dans les portées de F1 issues de pères F0 traités aux chimiothérapies. La mortalité a été calculée chez les descendants F1 en post-natal. Les anomalies congénitales correspondent à des anomalies majeures internes et/ou externes chez les descendants F1.

## 2.2 - Les effets transgénérationnels

Au cours des 10 dernières années, nous n'avons listé que deux articles qui étudient les effets transgénérationnels des chimiothérapies médiés par le mâle chez les rongeurs [34,36], en plus de trois articles moins récents [32,33,40] (Tableau 2). Il est intéressant de noter que malgré les effets observés sur le système reproducteur des descendants F1 (listés plus hauts), leur fertilité déterminée par le taux de gestation ne semble pas être affectée, que ce soit chez le mâle [32,34,35] ou la femelle [36]. Les études pionnières sur la génération F2 ont permis de montrer des effets transgénérationnels d'une exposition chronique au CPA lorsqu'un mâle et une femelle F1 issus de pères exposés sont accouplés [32,33,40]. Ainsi, Hales *et al.*, ont montré une augmentation des pertes post-implantatoires, une diminution du poids fœtal en fin de gestation et une augmentation significative du nombre de malformations dans la génération F2 [40]. De plus, Auroux *et al.* ont montré une augmentation du taux de mortalité post-natale et une baisse de capacité d'apprentissage dans la génération F2 [32]. L'étude de la génération F3 ayant un parent F2 dont le grand-père a été exposé a aussi révélé une augmentation du taux de mortalité post-natale, une baisse de capacité d'apprentissage et, de l'obésité chez les mâles adultes F3 [33]. Ces études ont donc mis en évidence la possibilité d'effets transgénérationnels après une exposition aux agents alkylants, mais ne permettent pas de savoir si ceux-ci sont transmis par le père, la mère, ou les deux parents. Plus récemment, Silva *et al.* ont étudié les effets transgénérationnels d'une exposition chronique de rats mâles au cisplatine [36]. Dans cette étude, contrairement aux précédentes, des femelles F1 issues de pères exposés sont accouplées avec un mâle sans historique familial d'exposition. Aucun effet n'est observé sur les pertes pré- ou post-implantatoires, la taille des portées ou le sex-ratio [36]. Cependant, aucune donnée sur les animaux F2 à l'âge adulte n'est disponible dans cette étude. Finalement, il a été montré que des composés de chimiothérapies ciblant des mécanismes épigénétiques comme la décitabine ou le vorinostat ont des effets sur plusieurs générations lorsqu'utilisés à des doses pertinentes en clinique [34]. Notamment, dans leur étude de transmission par la lignée germinale mâle (utilisation de femelles témoins à chaque génération), Klaver *et al.* ont observé une augmentation du poids testiculaire et quelques changements histologiques dans les testicules F2 pour le vorinostat ainsi qu'une baisse de la viabilité des spermatozoïdes chez les mâles F3 pour les deux composés [34]. De plus, l'étude ciblée du niveau de méthylation des gènes par pyroséquençage a montré une hypométhylation du gène *octamer-binding transcription factor 4* (Oct4) dans les spermatozoïdes de souris F3 en réponse à la décitabine ou au vorinostat [34]. Finalement, l'analyse du génome entier par *reduced representation bisulfite sequencing* (RRBS) en réponse à la décitabine a identifié 50 sites CpG méthylés différemment (17

hypométhylés et 33 hyperméthylés) dans les spermatozoïdes des souris F3 [34]. Contrairement à la génération F1, le nombre d'articles expérimentaux et les paramètres étudiés sur les générations F2 et F3 sont moins nombreux. Toutefois, ils mettent en évidence la possibilité de transmission transgénérationnelle due à l'exposition du grand-père ou de l'arrière-grand-père à des chimiothérapies alkylantes ou non. L'altération de l'épigénome (méthylation de l'ADN et modification post-traductionnelle des histones) des spermatozoïdes de la F1 à la F3 pourrait expliquer cette transmission.

**Tableau 2. Effets transgénérationnels des traitements de chimiothérapies dans les modèles animaux.**

Référence	Génération	Modèle	Composé(s) de chimiothérapie	Durée de traitement (nombre de semaines)	Rémission (nombre de semaines)	Perte implantatoire	Mortalité Post-natale	Anomalie congénitale	Autres effets
36	F2	Rat	Cisplatine	Chronique (3)	Non	Non	Non	n.d.	n.d.
34	F2	Souris	Décitabine ou vorinostat	Chronique (7)	Non	n.d.	n.d.	n.d.	Changements de méthylation des gènes des spermatozoïdes, altérations mineures du testicule adulte
	F3					n.d.	n.d.	n.d.	Changements de méthylation des gènes et baisse de viabilité des spermatozoïdes
40	F2	Rat	Cyclophosphamide	Chronique (4, 18)	Non	Post-implantatoire	n.d.	Oui	Baisse de poids des fœtus
33	F2	Rat	Cyclophosphamide	Sub-chronique (2)	Oui (8, 5, 14)	n.d.	Oui	Non	Baisse taille des portées F3 pour les femelles
	F3					n.d.	Oui	n.d.	Obésité et baisse capacité d'apprentissage chez le mâle adulte
32	F2	Rat	Cyclophosphamide	Sub-chronique (2)	Oui (8, 5)	n.d.	Oui	Non	Baisse capacité d'apprentissage chez le mâle adulte

n.d.: non-déterminé. Les pertes implantatoires sont précisées comme pré- ou post-implantatoires dans les portées de F2 ou F3 issues de grands-pères ou arrière-grands-pères F0 traitées aux chimiothérapies. La mortalité en post-natal et les anomalies congénitales (anomalies majeures internes et/ou externes) sont mesurées chez les descendants F2 ou F3.

### 3 - Les données épidémiologiques

#### 3.1 - Les effets intergénérationnels

Il existe plusieurs études épidémiologiques rapportant la santé de la descendance de survivants de cancer (Tableau 3). Trois études de larges cohortes rapportent une diminution du taux de natalité quand le père est un survivant de cancer, pour tous types de cancers confondus, comparé à la population générale [7,12,41]. Ceci est en accord avec les données expérimentales et ces effets dépendent du type de traitement et de la dose reçue. En effet, l'étude récente de Chow *et al.* analyse les effets de plusieurs agents de chimiothérapies, indépendamment d'un traitement d'irradiation pelvienne ou crânienne [12]. Les auteurs démontrent ainsi que les chances de grossesses et de naissances vivantes pour les hommes survivants de cancers pédiatriques sont significativement corrélées à la dose d'exposition au CPA, au cisplatine, à l'ifosfamide ou à la procarbazine [12]. Parallèlement, la possibilité que le diagnostic de cancer et les traitements reçus résultent en la transmission de mutations à la descendance reste encore controversées. L'étude des anomalies congénitales à la naissance peut donner une première indication de ce risque. Il est toutefois impossible d'isoler l'effet des chimiothérapies puisque pour avoir un fort pouvoir statistique, les études de cohortes regroupent des survivants de cancer avec divers types de cancers et de traitements confondus, ce qui inclue des irradiations. Ainsi, une étude regroupant 8670 naissances issues d'hommes ayant un historique de cancer au Danemark et en Suède a mis en évidence une augmentation faible mais significative du risque relatif de développement d'anomalies congénitales par rapport à la population générale (RR = 1,12, IC 95 % = 1,02–0,24, p = 0,0183) et en particulier des anomalies congénitales majeures (RR = 1,17, IC 95 % = 1,05–1,31, p = 0,0043) [10]. Par contre, l'étude de 2087 naissances issues de pères traités pour un cancer en Norvège, qui n'inclue que des anomalies congénitales majeures, n'a pas observé d'augmentation [11]. Récemment, l'étude très détaillée d'une large cohorte établie en Finlande a démontré que la prévalence d'anomalies congénitales chez les enfants de parents survivants de cancers (3,2 %) est effectivement légèrement augmentée, mais non significativement différente de celle d'enfants issus de la fratrie sans historique de cancer (2,7 %) [42]. Par contre, ce risque est plus élevé quand c'est le père (3,5 %) plutôt que la mère (3,0 %) qui a un historique de cancer. Parallèlement, les auteurs ont observé une légère augmentation significative des anomalies congénitales dans une sous cohorte d'hommes traités dans les années 1955 à 1964 (PR 2,77, IC 95 % =

1,26–6,11), ce qui pourrait être dû à des traitements alors plus génotoxiques [42]. En effet, il a récemment été montré que les survivants de cancer ont moins de cancers secondaires s'ils ont été traités dans les années 1990 plutôt que dans les années 1970 [43]. Ceci suggère que l'évolution des traitements, et en particulier la diminution des irradiations, permettrait de diminuer les effets secondaires. Cette diminution des effets néfastes reste à confirmer sur la fertilité masculine et sur la santé des descendants, mais aucune différence du risque d'anomalies congénitales n'a été détectée chez les enfants de parents diagnostiqués et traités pour un cancer au cours des dernières décennies [42]. Il est aussi important de noter que toutes ces études n'ont pas vu de différence de risque pour les enfants nés de procréation médicalement assistée [10,11]. La variation du sex-ratio peut aussi être utilisée comme sentinelle de mutations génétiques. En effet, certains ont émis l'hypothèse que des agents génotoxiques pourraient induire une mutation dominante létale sur le chromosome X créant un déséquilibre en faveur des garçons dans la descendance. Cependant, plusieurs études de la descendance d'hommes survivants de cancers pédiatriques montrent que ni l'irradiation, ni les chimiothérapies n'affectent le sex-ratio [41,44–48]. De plus, il semblerait que le risque de mutations de novo, d'anomalies chromosomiques ou de cancers chez les enfants d'hommes survivants de cancer ne soit pas plus élevé que dans la population générale, après correction des facteurs d'hérédité familiale [44,45,49–53]. Ces données suggèrent donc qu'il n'y a pas de transmission de mutations génétiques. Le séquençage du génome entier permettrait de répondre plus précisément à cette question, en quantifiant les mutations de novo dans la descendance. À notre connaissance, une seule étude de ce type existe, sur les familles de deux survivants de cancer du testicule, ne démontrant aucun impact génétique transmissible dû au traitement [49]. Finalement, il ne semble pas y avoir d'augmentation significative de la fréquence de mortalité post-natale chez les enfants d'hommes avec un historique de cancer [7,18,44]. De plus, il a été montré que les taux d'hospitalisation des enfants de survivants jusqu'à l'âge de quinze ans n'est pas plus élevé que dans la population générale une fois les facteurs d'hérédité écartés [50]. L'étude de 126 696 individus nés en Suède d'hommes ayant un historique de cancer n'a pas mis en évidence un taux de mortalité plus élevé dans cette population, quel que soit le moment de leur naissance par rapport au diagnostic de cancer, du type de cancer ou de l'âge du diagnostic de leur père [7]. Toutefois, à notre connaissance, il n'existe pas de données assurant un suivi détaillé des paramètres de santé chez les descendants de survivants de cancer, et aucune donnée n'est disponible sur leur fonction de reproduction ou la qualité des gamètes. Les données expérimentales suggérant que certains paramètres sont affectés dans la génération F1, comme la quantité ou l'épigénome des gamètes, il serait nécessaire de poursuivre ces études de cohorte et d'évaluer ces risques, particulièrement en fonction du traitement reçu.

**Tableau 3. Données épidémiologiques des effets intergénérationnels médiés par les hommes ayant été traités pour un cancer.**

Référence	Âge au traitement (ans)	Type de cancer	Cohorte	Mortalité périnatale (%)	Anomalies congénitales (%)	Autre
12	<21	Tous types	Nés d'H survivants : 1694 Issue de la fratrie : 1066	269/1694 (15,9) 105/1066 (9,8)		
42	<35	Tous types	Nés d'H&F survivants : 6862 Issue de la fratrie : 35690		220/6862 (3,2) 951/35690 (2,7)	
7	0-70	Tous types	Nés d'H survivants : 8051 Nés de témoins : 3580813	23% moins susceptibles d'avoir un enfant		Mortalité à long terme : 73/8051 (0,9) Mortalité à long terme : 43863/3580813 (1,23)
49	30 et 35	Testicule	Nés d'H survivants : 3		0/3 (0)	Taux mutation <i>de novo</i> , insertion /délétion, fréquence de recombinaison et réarrangement : non significatif
11	16-45	Tous types	Nés d'H survivants nullipare Nés d'H survivants primipare Nés de témoins nullipares Nés de témoins primipares	9/1378 (0,7) 4/709 (0,6) 544/54021 (1,0) 328 /43991 (0,7)	38/1378 (2,8) 18/709 (2,5) 1357/54021 (2,5) 981/42991 (0,7)	
52	<20	Tous types	Nés d'H&F survivants : 1037	16/1037 (1,5)	159/1037 (15,3)	Anomalies chromosomique: 6/1037 (0,6)
10	-	Tous types	Nés d'H survivants : 8670 Nés de témoins : 1769095		420/8670 (4,8) 77844/1769095 (4,4)	
50	<20	Tous types	Nés d'H&F survivants : 1920 Issue de la fratrie : 6394 Nés de témoins : 9594			6 fois plus de risque d'être hospitalisés pour une tumeur maligne mais largement expliqué par la susceptibilité familiale Sex ratio 1.09 Sex ratio 1.18 si diagnostic entre 10-14ans
46	<20	Tous types	Nés d'H survivants : 470 Nés de témoins : 4150			
8	9-24	Osteosarcome	Nés d'H&F survivants : 29		0/29	Sex ratio 1.02
47	<18	Tous types	Nés d'H survivants : 4056			Sex ratio: 50,6% garçons. Anomalie chromosomique 0/2630 (0) Proportion d'anomalies chromosomique non significative après exclusion des cas d'hérédité et ajustement
51	<20	Tous types	Nés d'H&F survivants : 2630			Sex ratio : 52,3% garçons Sex ratio 0.99
48	<20	Tous types	Issue de la fratrie : 5504 Nés d'H survivants : 1056 Nés de témoins : 1986351			
41	<21	Tous types	Nés d'H survivants : 2323 Issue de la fratrie : 1139	609/2323 (26,2) 255/1139 (22,4)		Sex ratio 1.00 (1.24)
45	<20	Tous types	Nés d'H survivants : 916 Nés de témoins : 2043			Sex ratio 1.05 (1.00) Maladie génétique : 3,4% (3,1% chez les témoins)
53	<15	Leucémie, LNH	Nés d'H survivants : 157			Sex ratio 0.99 Pas d'augmentation du risque de tumeurs

La liste des références a été établie par une recherche Pubmed, Scopus et Web of science de la littérature avec les paramètres "Search (transgenerational[All Fields] OR progeny[All Fields] OR offspring[All Fields] OR ("wills"[MeSH Terms] OR "wills"[All Fields] OR "inheritance"[All Fields])) AND (chemiotherapy[All Fields] OR "chemotherapy"[All Fields] OR "chemotherapy"[All Fields])) Filters: published in the last 10 years". Les articles de plus de 10 ans cités dans le texte ont été ajoutés à la liste. H : hommes, H&F : hommes et femmes, LNH : Lymphome non Hodgkiniens.

### **3.2 - Les effets transgénérationnels**

Les chimiothérapies étant utilisées en clinique depuis les années 1950, il serait possible aujourd'hui d'étudier les effets de ces composés sur trois générations. Cependant, à notre connaissance, il n'existe aucune étude épidémiologique sur les effets transgénérationnels des traitements contre le cancer.

### **4 - Mécanismes impliqués et enjeux cliniques**

À travers cette revue de la littérature, on constate que les traitements de chimiothérapie peuvent avoir une incidence sur la descendance de pères exposés (Fig. 1). Les données expérimentales mettent en évidence des effets sur la santé des descendants directs et permettent de penser qu'il y a des effets transmis de manière transgénérationnelle. Mais, ceux-ci n'ont pas encore été étudiés dans la population humaine. Chez l'homme, avant même d'atteindre la santé de la descendance, l'effet le plus important connu reste la difficulté à concevoir. Comprendre les mécanismes d'action sous-jacents des chimiothérapies sur la spermatogenèse pourrait aider les cliniciens à prendre des décisions éclairées pour ajuster les traitements, réduire les effets secondaires et mieux conseiller les patients dans leur projet familial. Nous avons dressé l'état des connaissances actuelles sur les mécanismes par lesquels les chimiothérapies peuvent affecter la production de spermatozoïdes et engendrer des conséquences sur la descendance.

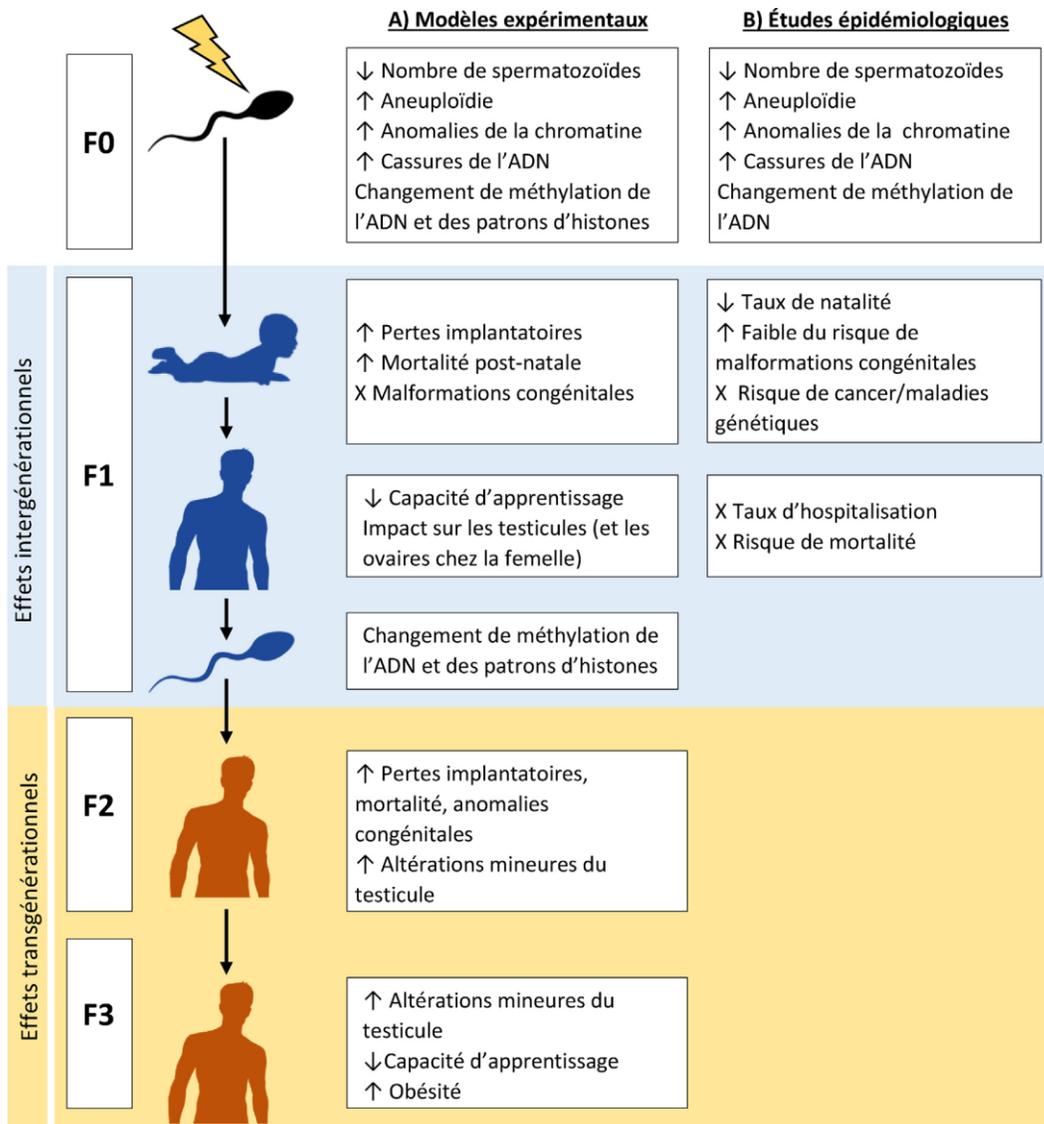


Fig. 1. Représentation schématique des effets inter- et transgénérationnels des chimiothérapies médiés par l'exposition du père. La mise en évidence d'effets de chimiothérapie est possible grâce aux modèles animaux démontrant des effets sur les spermatozoïdes produits par la génération exposée (F0), sur ses descendants directs (F1), mais aussi jusqu'aux générations F2 et F3 issues de spermatozoïdes non exposés. Il est à noter que certains des effets mentionnés pour la génération F2 sont transmis par le père F1 uniquement, alors que d'autres s'expriment quand les deux parents F1 ont été exposés. Les données épidémiologiques sont limitées et correspondent souvent à des effets combinés de chimiothérapies et d'irradiations. Aucune donnée des effets transgénérationnels n'est disponible.

#### **4.1 - Diminution du compte spermatique**

La cause la plus fréquente de l'infertilité chez les survivants de cancer est une diminution ou absence de spermatozoïdes (oligozoospermie ou azoospermie) à long terme [9,18]. Cet effet est observé aussi bien après un cancer diagnostiqué dans l'enfance, qu'après la puberté. Ceci est probablement dû à la cytotoxicité des chimiothérapies sur les cellules souches spermatogoniales (SSC) présentes dès la naissance dans le testicule [54]. Cette toxicité a été démontrée pour les agents alkylants (CPA, cisplatine), ainsi que pour les antibiotiques anticancéreux (doxorubicine, bléomycine) et les alcaloïdes (vincristine), grâce à des modèles animaux in vivo et in vitro [18,26,31,55–60]. Des données récentes montrant une diminution du nombre de spermatogonies dans les biopsies testiculaires chez les garçons prépubères traités pour la leucémie appuient un tel mécanisme [54]. Puisque les SSC alimentent la production continue de spermatozoïdes, une réduction de l'activité de régénération des SSC ou leur perte entraînerait une diminution ou une absence de spermatozoïdes pouvant expliquer la difficulté à concevoir. La spermatogenèse peut se rétablir chez certains patients au fil du temps en fonction du type, de la dose et de la durée du traitement reçu, mais la récupération ne peut être prédite et les dommages restent permanents dans une proportion significative de survivants [9,18,61–65]. Il est donc conseillé de cryoconserver des spermatozoïdes avant le traitement [63]. Dans le cas de cancer pédiatrique, si le garçon ne produit pas encore de sperme, la cryoconservation du tissu testiculaire peut être une alternative [66].

#### **4.2 - Anomalies des spermatozoïdes**

Il a été montré que les caractéristiques spermatiques sont altérées chez les hommes atteints du cancer même avant le traitement, incluant une baisse de vitalité et des altérations de l'intégrité et de la compaction de l'ADN [62,67]. De plus, plusieurs études prospectives sur des jeunes adultes traités pour un cancer ont démontré que, malgré la récupération quantitative de la spermatogenèse dans l'année qui suit la fin du traitement, on peut observer une incidence accrue d'aneuploïdie dans les spermatozoïdes [68–72] et des défauts de la structure et de la compaction de la chromatine même deux ans après la chimiothérapie [62,65,73–76]. Les données expérimentales s'accordent avec ces observations, démontrant une persistance de cassures de l'ADN dans les spermatozoïdes matures malgré un temps de rémission [22,77]. Il a aussi été montré chez le rat que les spermatozoïdes produits après une exposition de neuf semaines au BEP présentent des changements dans le profil de méthylation de l'ADN [78] et les patrons de distribution des histones [38,79,80]. Chez l'humain, deux études récentes ont examiné des

marqueurs épigénétiques dans les spermatozoïdes après un traitement de chimiothérapie. D'une part, une étude de cas démontre une perte progressive de 10 % de la méthylation du gène à empreinte paternelle H19 jusqu'à 5 mois après traitement au témozolomide [72]. D'autre part, une analyse par immunoprécipitation de l'ADN méthylé suivi d'un séquençage à haut débit a mis en évidence plusieurs régions différemment méthylées dans les spermatozoïdes de survivants de cancers pédiatriques ayant reçu un traitement à base de cisplatine, par rapport à des spermatozoïdes témoins [81]. L'ensemble de ces données montrent que le cancer et les chimiothérapies affectent l'ADN, la chromatine et l'épigénome contenu dans les spermatozoïdes de survivants, et ce même après un temps de rémission. Le fait que les cellules germinales cryoconservées avant les traitements présentent aussi des anomalies moléculaires suggère que leur utilisation n'est pas forcément une meilleure alternative pour limiter les risques de transmission d'anomalies génétiques ou épigénétiques dues au traitement. Les conséquences de ces altérations moléculaires sur la fertilité ou la transmission d'anomalies à la descendance restent encore controversées, mais beaucoup s'accordent pour corréliser ces paramètres à des effets inter- et transgénérationnels [16,17]. Selon les données listées dans cette revue, il ne semble pas y avoir de transmission accrue de mutation génétique à la descendance après un traitement contre le cancer. Par contre, les données expérimentales suggèrent une transmission de changement de l'épigénome (méthylation de l'ADN et modification post-traductionnelle d'histone) dans les spermatozoïdes jusqu'à la 3e génération [34]. L'étude de la transmission transgénérationnelle épigénétique chez l'humain reste à faire et ne devrait pas se limiter à l'étude de la méthylation de l'ADN. En effet, cela pourrait avoir des conséquences sur la santé de reproduction des individus mais aussi sur la santé de la descendance à long terme [82].

#### **4.3 - Anomalies de développement embryonnaire**

La structure et la compaction de la chromatine ainsi que les patrons d'histones et de méthylation de l'ADN sont des éléments structurels clés dans les spermatozoïdes matures, qui participent au développement embryonnaire [16,17]. Il a été montré que les embryons de rat, issus de mâles exposés au CPA pendant 4 semaines, présentent des anomalies de développement (altérations des cinétiques de fusion des deux génomes et de division cellulaire), une augmentation des cassures bicaténares de l'ADN et des altérations dans la mise en place des marques épigénétiques chez le zygote [83]. Une exposition aiguë de mâles à l'étoposide, un agent non alkylant, peut aussi induire des anomalies structurales chromosomiques dans le zygote [84]. La baisse du taux de natalité chez les survivants de cancer pourrait être due à ces défauts de

développement embryonnaire. Par contre, chez l'humain, bien que les données soient limitées, on peut penser que si le développement embryonnaire se produit avec succès, les descendants n'héritent pas de plus de mutations génétiques ou de problèmes de santé à long terme que la population générale.

## **5 - Conclusions et perspectives**

Pour un homme, au-delà de la difficulté à concevoir, l'historique de cancer ne semble pas avoir de conséquences significatives sur la santé de ses enfants (Fig. 1). Certaines évidences montrent une légère augmentation des risques d'anomalies congénitales [10,42], mais ce risque reste proche de la population générale et semble s'améliorer avec l'évolution des traitements contre le cancer [42]. Ainsi, le comité d'éthique de la société américaine de médecine de la reproduction (ASRM) considère que pour les patients qui font face à des traitements gonadotoxiques, les préoccupations concernant le bien-être des descendants ne sont pas des raisons suffisantes pour leur refuser une aide à la reproduction [85]. L'étendue des données épidémiologiques reste toutefois limitée dans les paramètres de santé mesurés, en plus d'être restreinte à la première génération. Afin de savoir s'il y a des effets transgénérationnels dans la population humaine, il serait nécessaire de poursuivre des études de cohorte sur plusieurs générations. En effet, la mise en évidence de changements épigénétiques dans les spermatozoïdes des pères traités pourrait constituer un mécanisme de transmission transgénérationnel [72,81]. Les données expérimentales sont nombreuses et décrivent des effets inter- et transgénérationnels potentiels d'une exposition paternelle (Fig. 1). Ces études permettent d'isoler l'impact des chimiothérapies et démontrent que les effets les plus délétères sur la spermatogenèse et la descendance sont issus d'exposition à des agents alkylants. Aujourd'hui, les protocoles de chimiothérapie incluent certaines restrictions pour réduire la toxicité et limiter les effets secondaires. En outre, les protocoles actuels favorisent les mélanges de plusieurs agents thérapeutiques à des doses plus faibles, et lorsque cela est possible, l'utilisation de composés alkylants est réduite [86,87]. Pourtant, les études *in vitro* ont montré que la combinaison de médicaments, même sans agents alkylants, peuvent induire la mort des spermatogonies avec une toxicité plus élevée que chaque composé seul [55,56]. Par contre, ces données de toxicité ne sont pas disponibles pour chaque agent de chimiothérapie et l'impact de nouveaux composés ou cocktails de chimiothérapie sur la lignée germinale ou sur la descendance demeure largement inconnu. Avec l'essor des traitements de cancer ciblant des mécanismes épigénétiques, on peut s'interroger sur les risques de modifications de l'information épigénétique dans la lignée germinale sur la santé des générations futures.

## 6 - Remerciements

Ce travail a été financé par la subvention de transition de la Fondation Cole. Amélie Tremblay a reçu une bourse de formation des Instituts de la recherche en Santé du Canada (IRSC) et des Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRQS). Les auteurs souhaitent remercier Michel Courcelles (INRS) pour toute son aide dans la recherche bibliographique.

## 7 - Références

- [1] Kaatsch P. Epidemiology of childhood cancer. *Cancer Treat Rev* 2010;36:277– 85. [2] Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global cancer incidence and mortality rates and trends – an update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2016;25:16– 27.
- [3] Diller L, Chow EJ, Gurney JG, Hudson MM, Kadin-Lottick NS, Kawashima TI, et al. Chronic disease in the childhood cancer survivor study cohort: a review of published findings. *J Clin Oncol* 2009;27:2339–55.
- [4] Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016;66:271–89.
- [5] Ragheb AM, Sabanegh Jr ES. Male fertility-implications of anticancer treatment and strategies to mitigate gonadotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem* 2010;10:92–102.
- [6] Hohmann C, Borgmann-Staudt A, Rendtorff R, Reinmuth S, Holzhausen S, Willich SN, et al. Patient counselling on the risk of infertility and its impact on childhood cancer survivors: results from a national survey. *J Psychosoc Oncol* 2011;29:274–85.
- [7] Tang SW, Liu J, Juay L, Czene K, Miao H, Salim A, et al. Birth rates among male cancer survivors and mortality rates among their offspring: a populationbased study from Sweden. *BMC Cancer* 2016;16:196.
- [8] Yonemoto T, Ishii T, Takeuchi Y, Hagiwara Y, Iwata S, Tatezaki S. Recently intensified chemotherapy for high-grade osteosarcoma may affect fertility in long-term male survivors. *Anticancer Res* 2009;29:763–7.
- [9] Wasilewski-Masker K, Seidel KD, Leisenring W, Mertens AC, Shnorhavorian M, Ritenour CW, et al. Male infertility in long-term survivors of pediatric cancer: a report from the childhood cancer survivor study. *J Cancer Survivorship Res Pract* 2014;8:437–47.

- [10] Stahl O, Boyd HA, Giwercman A, Lindholm M, Jensen A, Kjaer SK, et al. Risk of birth abnormalities in the offspring of men with a history of cancer: a cohort study using Danish and Swedish national registries. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:398–406.
- [11] Stensheim H, Klungsoyr K, Skjaerven R, Grotmol T, Fossa SD. Birth outcomes among offspring of adult cancer survivors: a population-based study. *Int J Cancer* 2013;133:2696–705.
- [12] Chow EJ, Stratton KL, Leisenring WM, Oeffinger KC, Sklar CA, Donaldson SS, et al. Pregnancy after chemotherapy in male and female survivors of childhood cancer treated between 1970 and 1999: a report from the childhood cancer survivor study cohort. *Lancet Oncol* 2016;17:567–76.
- [13] Garolla A, Pizzato C, Ferlin A, Carli MO, Selice R, Foresta C. Progress in the development of childhood cancer therapy. *Reprod Toxicol* 2006;22:126–32.
- [14] Reinmuth S, Liebeskind AK, Wickmann L, Bockelbrink A, Keil T, Henze G, et al. Having children after surviving cancer in childhood or adolescence – results of a Berlin survey. *Klin Padiatr* 2008;220:159–65.
- [15] Danchin E, Charmantier A, Champagne FA, Mesoudi A, Pujol B, Blanchet S. Beyond DNA: integrating inclusive inheritance into an extended theory of evolution. *Nat Rev Genet* 2011;12:475–86.
- [16] van Otterdijk SD, Michels KB. Transgenerational epigenetic inheritance in mammals: how good is the evidence? *FASEB journal* 2016;30:2457–65.
- [17] Xin F, Susiarjo M, Bartolomei MS. Multigenerational and transgenerational effects of endocrine disrupting chemicals: a role for altered epigenetic regulation? *Semin Cell Dev Biol* 2015;43:66–75.
- [18] Dere E, Anderson LM, Hwang K, Boekelheide K. Biomarkers of chemotherapy-induced testicular damage. *Fertil Steril* 2013;100:1192–202.
- [19] DeGeorge JJ, Ahn CH, Andrews PA, Brower ME, Giorgio DW, Goheer MA, et al. Regulatory considerations for preclinical development of anticancer drugs. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998;41:173–85.
- [20] Health Canada. Health Canada – drugs and health products-S9: nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals-adoption of international conference on harmonisation of technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use (ICH) guidance document. Canada: Ottawa Ministre, Travaux publics et services gouvernementaux; 2016.
- [21] Trasler JM, Hales BF, Robaire B. Paternal cyclophosphamide treatment of rats causes fetal loss and malformations without affecting male fertility. *Nature* 1985;316:144–6.

- [22] Delbes G, Vaisheva F, Luu T, Marcon L, Hales BF, Robaire B. Reversibility of the effects of the chemotherapeutic regimen for non-Hodgkin lymphoma, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone, on the male rat reproductive system and progeny outcome. *Reprod Toxicol* 2010;29:332–8.
- [23] Kanno TYN, Sensiate LA, De Paula NA, Salles MJS. Toxic effects of different doses of cyclophosphamide on the reproductive parameters of male mice. *Braz J Pharm Sci* 2009;45:313–9.
- [24] Marcon L, Hales BF, Robaire B. Reversibility of the effects of subchronic exposure to the cancer chemotherapeutics bleomycin, etoposide, and cisplatin on spermatogenesis, fertility, and progeny outcome in the male rat. *J Androl* 2008;29:408–17.
- [25] Trasler JM, Hales BF, Robaire B. Chronic low dose cyclophosphamide treatment of adult male rats: effect on fertility, pregnancy outcome and progeny. *Biol Reprod* 1986;34:275–83.
- [26] Vaisheva F, Delbes G, Hales BF, Robaire B. Effects of the chemotherapeutic agents for non-Hodgkin lymphoma, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP), on the male rat reproductive system and progeny outcome. *J Androl* 2007;28:578–87.
- [27] Kelly TL, Li E, Trasler JM. 5-aza-2'-deoxycytidine induces alterations in murine spermatogenesis and pregnancy outcome. *J Androl* 2003;24:822–30.
- [28] Kato M, Makino S, Kimura H, Ota T, Furuhashi T, Nagamura Y. Sperm motion analysis in rats treated with adriamycin and its applicability to male reproductive toxicity studies. *J Toxicol Sci* 2001;26:51–9.
- [29] Seethalakshmi L, Flores C, Kinkead T, Carboni AA, Malhotra RK, Menon M. Effects of subchronic treatment with cis-platinum on testicular function, fertility, pregnancy outcome, and progeny. *J Androl* 1992;13:65–74.
- [30] Hooser SB, van Dijk-Knijnenburg WC, Waalkens-Berendsen ID, Smits-van Prooijje AE, Snoeij NJ, Baan RA, et al. Cisplatin-DNA adduct formation in rat spermatozoa and its effect on fetal development. *Cancer Lett* 2000;151:71–80.
- [31] Bieber AM, Marcon L, Hales BF, Robaire B. Effects of chemotherapeutic agents for testicular cancer on the male rat reproductive system, spermatozoa, and fertility. *J Androl* 2006;27:189–200.
- [32] Auroux MR, Dulioust EJ, Nawar NN, Yacoub SG, Mayaux MJ, Schwartz D, et al. Antimitotic drugs in the male rat. Behavioral abnormalities in the second generation. *J Androl* 1988;9:153–9.
- [33] Auroux MR, Dulioust EM, Nawar NY, Yacoub SG, Kempf EH, Ebel AB. Cyclophosphamide in the male rat: cerebral biochemical changes in progeny. *Biomed Pharmacother* 1990;44:519–23.

- [34] Klaver R, Sanchez V, Damm OS, Redmann K, Lahrman E, Sandhowe-Klaverkamp R, et al. Direct but no transgenerational effects of decitabine and vorinostat on male fertility. *PloS One* 2015;10:e0117839.
- [35] Favareto APA, de Toledo FC, Kempinas WD. Paternal treatment with cisplatin impairs reproduction of adult male offspring in rats. *Reprod Toxicol* 2011;32:425–33.
- [36] Silva PVE, da Silva RF, Borges CD, Cavariani MM, Francia C, Barbosa F, et al. Sexual differentiation and reproductive development of female rat offspring after paternal exposure to the anti-tumor pharmaceutical cisplatin. *Reprod Toxicol* 2016;60:112–22.
- [37] Glen CD, Dubrova YE. Exposure to anticancer drugs can result in transgenerational genomic instability in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:2984–8.
- [38] Maselli J, Hales BF, Robaire B. The effects of chemotherapy with bleomycin, etoposide, and cisplatin (BEP) on rat sperm chromatin remodeling, fecundity and testicular gene expression in the progeny. *Biol Reprod* 2013;89:85.
- [39] Marchetti F, Bishop J, Gingerich J, Wyrobek AJ. Meiotic interstrand DNA damage escapes paternal repair and causes chromosomal aberrations in the zygote by maternal misrepair. *Sci Rep* 2015;5:7689.
- [40] Hales BF, Crosman K, Robaire B. Increased postimplantation loss and malformations among the F2 progeny of male rats chronically treated with cyclophosphamide. *Teratology* 1992;45:671–8.
- [41] Green DM, Whitton JA, Stovall M, Mertens AC, Donaldson SS, Ruymann FB, et al. Pregnancy outcome of partners of male survivors of childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study. *J Clin Oncol* 2003;21:716–21.
- [42] Seppanen VI, Artama MS, Malila NK, Pitkaniemi JM, Rantanen ME, Ritvanen AK, et al. Risk for congenital anomalies in offspring of childhood, adolescent and young adult cancer survivors. *Int J Cancer* 2016;139:1721–30.
- [43] Turcotte LM, Liu Q, Yasui Y, Arnold MA, Hammond S, Howell RM, et al. Temporal trends in treatment and subsequent neoplasm risk among 5-year survivors of childhood cancer, 1970–2015. *J Am Med Assoc* 2017;317:814–24.
- [44] Dufour C, Oberlin O, De Vathaire F. [Offspring of childhood cancer survivors]. *Arch Pediatr* 2010;17:926–7.
- [45] Byrne J, Rasmussen SA, Steinhorn SC, Connelly RR, Myers MH, Lynch CF, et al. Genetic disease in offspring of long-term survivors of childhood and adolescent cancer. *Am J Hum Genet* 1998;62:45–52.

- [46] Chow EJ, Kamineni A, Daling JR, Fraser A, Wiggins CL, Mineau GP, et al. Reproductive outcomes in male childhood cancer survivors: a linked cancer-birth registry analysis. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2009;163:887–94.
- [47] Reulen RC, Zeegers MP, Lancashire ER, Winter DL, Hawkins MM. Offspring sex ratio and gonadal irradiation in the British childhood cancer survivor study. *Br J Cancer* 2007;96:1439–41.
- [48] Winther JF, Boice Jr JD, Thomsen BL, Schull WJ, Stovall M, Olsen JH. Sex ratio among offspring of childhood cancer survivors treated with radiotherapy. *Br J Cancer* 2003;88:382–7.
- [49] Kryukov GV, Bielski CM, Samocha K, Fromer M, Seepo S, Gentry C, et al. Genetic effect of chemotherapy exposure in children of testicular cancer survivors. *Clin Cancer Res* 2016;22:2183–9.
- [50] Winther JF, Boice Jr JD, Christensen J, Frederiksen K, Mulvihill JJ, Stovall M, et al. Hospitalizations among children of survivors of childhood and adolescent cancer: a population-based cohort study. *Int J Cancer* 2010;127:2879–87.
- [51] Winther JF, Boice Jr JD, Mulvihill JJ, Stovall M, Frederiksen K, Tawn EJ, et al. Chromosomal abnormalities among offspring of childhood-cancer survivors in Denmark: a population-based study. *Am J Hum Genet* 2004;74:1282–5.
- [52] Winther JF, Olsen JH, Wu H, Shyr Y, Mulvihill JJ, Stovall M, et al. Genetic disease in the children of Danish survivors of childhood and adolescent cancer. *J Clin Oncol* 2012;30:27–33.
- [53] Hawkins MM, Draper GJ, Winter DL. Cancer in the offspring of survivors of childhood leukaemia and non-Hodgkin lymphomas. *Br J Cancer* 1995;71: 1335–9.
- [54] Poganitsch-Korhonen M, Masliukaite I, Nurmio M, Lahteenmaki P, van Wely M, van Pelt AM, et al. Decreased spermatogonial quantity in prepubertal boys with leukaemia treated with alkylating agents. *Leukemia* 2017;31:1460–3.
- [55] Beaud H, van Pelt AM, Delbes G. Doxorubicin and vincristine affect undifferentiated rat spermatogonia. *Reproduction* 2017;153:725–35.
- [56] Marcon L, Zhang X, Hales BF, Nagano MC, Robaire B. Development of a short term fluorescence-based assay to assess the toxicity of anticancer drugs on rat stem/progenitor spermatogonia in vitro. *Biol Reprod* 2010;83:228–37.
- [57] Marcon L, Zhang X, Hales BF, Robaire B, Nagano MC. Effects of chemotherapeutic agents for testicular cancer on rat spermatogonial stem/progenitor cells. *J Androl* 2011;32:432–43.

- [58] Meistrich ML. Relationship between spermatogonial stem cell survival and testis function after cytotoxic therapy. *Br J Cancer Suppl* 1986;7:89–101.
- [59] Meistrich ML, Finch M, da Cunha MF, Hacker U, Au WW. Damaging effects of fourteen chemotherapeutic drugs on mouse testis cells. *Cancer Res* 1982;42:122–31.
- [60] Liu M, Hales BF, Robaire B. Effects of four chemotherapeutic agents, bleomycin, etoposide, cisplatin, and cyclophosphamide, on DNA damage and telomeres in a mouse spermatogonial cell line. *Biol Reprod* 2014;90:72.
- [61] Green DM, Kawashima T, Stovall M, Leisenring W, Sklar CA, Mertens AC, et al. Fertility of male survivors of childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study. *J Clin Oncol* 2010;28:332–9.
- [62] Bujan L, Walschaerts M, Brugnon F, Daudin M, Berthaut I, Auger J, et al. Impact of lymphoma treatments on spermatogenesis and sperm deoxyribonucleic acid: a multicenter prospective study from the CECOS network. *Fertil Steril* 2014;102:667–674000.
- [63] Berthaut I, Ravel C, Frapsauce C, Elloumi H, Levy L, De Larouziere V, et al. Cancer and procreation in men. *Med Ther Med Reprod Gynecol Endocrinol* 2008;10:255–64.
- [64] Kort JD, Eisenberg ML, Millheiser LS, Westphal LM. Fertility issues in cancer survivorship. *CA Cancer J Clin* 2014;64:118–34.
- [65] O’Flaherty C, Hales BF, Chan P, Robaire B. Impact of chemotherapeutics and advanced testicular cancer or Hodgkin lymphoma on sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril* 2010;94:1374–9.
- [66] Jahnukainen K, Mitchell RT, Stukenborg JB. Testicular function and fertility preservation after treatment for haematological cancer. *Curr Opin Endocrinol Diab Obes* 2015;22:217–23.
- [67] O’Flaherty C, Vaisheva F, Hales BF, Chan P, Robaire B. Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin’s lymphoma patients prior to chemotherapy. *Hum Reprod* 2008;23:1044–52.
- [68] Burrello N, Vicari E, La Vignera S, Romeo G, Campagna C, Magro E, et al. Effects of anti-neoplastic treatment on sperm aneuploidy rate in patients with testicular tumor: a longitudinal study. *J Endocrinol Investig* 2011;34:e121–5.

- [69] Martinez G, Walschaerts M, Le Mitouard M, Borye R, Thomas C, Auger J, et al. Impact of Hodgkin or non-Hodgkin lymphoma and their treatments on sperm aneuploidy: a prospective study by the French CECOS network. *Fertil Steril* 2017;107:341–35000000.
- [70] Rives N, Walschaerts M, Setif V, Hennebicq S, Saias J, Brugnon F, et al. Sperm aneuploidy after testicular cancer treatment: data from a prospective multicenter study performed within the French Centre d'étude et de conservation des oeufs et du sperme network. *Fertil Steril* 2017;107:580–5880.
- [71] Tempest HG, Ko E, Chan P, Robaire B, Rademaker A, Martin RH. Sperm aneuploidy frequencies analysed before and after chemotherapy in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients. *Hum Reprod* 2008;23:251–8.
- [72] Berthaut I, Montjean D, Dessolle L, Morcel K, Deluen F, Poirot C, et al. Effect of temozolomide on male gametes: an epigenetic risk to the offspring? *J Assist Reprod Genet* 2013;30:827–33.
- [73] O'Flaherty CM, Chan PT, Hales BF, Robaire B. Sperm chromatin structure components are differentially repaired in cancer survivors. *J Androl* 2012;33:629–36.
- [74] Smit M, van Casteren NJ, Wildhagen MF, Romijn JC, Dohle GR. Sperm DNA integrity in cancer patients before and after cytotoxic treatment. *Hum Reprod* 2010;25:1877–83.
- [75] Stahl O, Eberhard J, Cavallin-Stahl E, Jepson K, Friberg B, Tingsmark C, et al. Sperm DNA integrity in cancer patients: the effect of disease and treatment. *Int J Androl* 2009;32:695–703.
- [76] Romerius P, Stahl O, Moell C, Relander T, Cavallin-Stahl E, Gustafsson H, et al. Sperm DNA integrity in men treated for childhood cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:3843–50.
- [77] Vendramini V, Robaire B, Miraglia SM. Amifostine-doxorubicin association causes long-term prepubertal spermatogonia DNA damage and early developmental arrest. *Hum Reprod* 2012;27:2457–66.
- [78] Chan D, Delbes G, Landry M, Robaire B, Trasler JM. Epigenetic alterations in sperm DNA associated with testicular cancer treatment. *Toxicol Sci* 2012;125:532–43.
- [79] Bagheri-Sereshki N, Hales BF, Robaire B. The effects of chemotherapeutic agents, bleomycin, etoposide, and cisplatin, on chromatin remodeling in male rat germ cells. *Biol Reprod* 2016;94:81.
- [80] Maselli J, Hales BF, Chan P, Robaire B. Exposure to bleomycin, etoposide, and cis-platinum alters rat sperm chromatin integrity and sperm head protein profile. *Biol Reprod* 2012;86(166):1–10.

- [81] Shnorhavorian M, Schwartz SM, Stansfeld B, Sadler-Riggleman I, Beck D, Skinner MK. Differential DNA methylation regions in adult human sperm following adolescent chemotherapy: potential for epigenetic inheritance. *PloS One* 2017;12:e0170085.
- [82] Stuppia L, Franzago M, Ballerini P, Gatta V, Antonucci I. Epigenetics and male reproduction: the consequences of paternal lifestyle on fertility, embryo development, and children lifetime health. *Clin Epigenetics* 2015;7:120.
- [83] Hales BF, Grenier L, Lalancette C, Robaire B. Epigenetic programming: from gametes to blastocyst. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2011;91:652–65.
- [84] Marchetti F, Bishop JB, Lowe X, Generoso WM, Hozier J, Wyrobek AJ. Etoposide induces heritable chromosomal aberrations and aneuploidy during male meiosis in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:3952–7.
- [85] NTP monograph: developmental effects and pregnancy outcomes associated with cancer chemotherapy use during pregnancy. *NTP Monograph*; 2013 [i-214].
- [86] Pinto AC, Moreira JN, Simões S. Combination chemotherapy in cancer: principles, evaluation and drug delivery strategies. *INTECH Open Access Publisher*;2011.
- [87] Pritchard-Jones K, Pieters R, Reaman GH, Hjorth L, Downie P, Calaminus G, et al. Sustaining innovation and improvement in the treatment of childhood cancer: lessons from high-income countries. *Lancet Oncol* 2013;14:e95–103.