

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

**ÉTUDE IN VITRO DE L'INDUCTION DE STRESS OXYDATIF PAR LA
DOXORUBICINE DANS LES CELLULES DE SERTOLI IMMATURES ET
LES SPERMATOGONIES**

Par
Amélie Tremblay

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Charles Ramassamy
INRS – Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Robert Viger
Département d'obstétrique et gynécologie
Centre hospitalier de l'Université Laval

Directrice de recherche

Géraldine Delbès
INRS - Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

Les traitements de chimiothérapie peuvent affecter la fertilité masculine à long terme, même lorsqu’administrés avant la puberté. En effet, le testicule pré-pubère contient des spermatogonies et des cellules de Sertoli immatures, qui sont des cibles connues des chimiothérapies. Malheureusement, aucune solution de préservation de la fertilité n'est disponible pour les garçons pré-pubères. Des études suggèrent que la doxorubicine, un agent de chimiothérapie utilisé à large échelle en oncologie pédiatrique, induit un stress oxydatif dans le testicule. Cependant, les types cellulaires ciblés par ce stress restent inconnus. Le but de cette étude était de déterminer si la doxorubicine induit un stress oxydatif dans les spermatogonies et les cellules de Sertoli du testicule immature, puis d'évaluer leur protection par des antioxydants. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle *in vitro* de lignées de spermatogonies (GC-6Spg) et de cellules de Sertoli immatures (Ser-W3) de rat. D’abord, nous avons montré que la doxorubicine induit une cytotoxicité temps- et dose-dépendante dans les deux lignées cellulaires. Cependant, lors de l'évaluation du stress oxydatif, les espèces réactives de l'oxygène et le 8-oxo-désoxyguanosine nucléaire ont augmenté seulement dans les Ser-W3. De plus, les niveaux de glutathion réduit intracellulaire ont diminué dans les Ser-W3. Ces résultats montrent que la doxorubicine induit un stress oxydatif dans la lignée cellulaire Ser-W3. Par contre, bien qu’une supplémentation du glutathion intracellulaire offre une diminution faible mais significative de la cytotoxicité de la doxorubicine sur les Ser-W3, une déplétion du glutathion n'affecte pas leur survie. Ceci laisse supposer que le système d’antioxydant du glutathion n'est pas essentiel pour la défense des Ser-W3 contre la doxorubicine. De plus, parmi quatre antioxydants sélectionnés dans la littérature, aucun n’a été en mesure de réduire la cytotoxicité de la doxorubicine dans les GC-6Spg et les Ser-W3. Dans l’ensemble, nos données suggèrent que le stress oxydatif n’est probablement pas une voie majeure de toxicité de la doxorubicine dans les GC-6Spg et les Ser-W3. Ainsi, ce projet de recherche aide à mettre en évidence les mécanismes de toxicité des chimiothérapies sur le testicule pré-pubère, avec pour but à long terme d’améliorer la qualité de vie des survivants de cancers pédiatriques.

Mots-clés : antioxydants, doxorubicine, stress oxydatif, spermatogonie, cellule de Sertoli, testicule

Amélie Tremblay
Étudiante

Pre Géraldine Delbès
Directrice de recherche

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier Géraldine Delbès, ma directrice de recherche, pour m'avoir donné la chance de réaliser mon dernier stage de baccalauréat ainsi que ma maîtrise dans son laboratoire. Je suis très reconnaissante du temps qu'elle a investi et des opportunités qu'elle m'a offertes pour m'initier à toutes les facettes de la recherche académique, que ce soit dans l'apprentissage technique, dans la participation à des congrès locaux et internationaux, dans la supervision de stagiaires, dans la rédaction d'une revue de littérature et d'un article scientifique, et j'en passe. Les connaissances acquises lors de mon passage dans son équipe de recherche sont au-delà de mes attentes pour une maîtrise.

Je remercie également les membres de mon jury d'évaluation, les Professeurs Charles Ramassamy et Robert Viger, pour avoir accepté de réviser ce mémoire.

Je tiens aussi à remercier les membres du laboratoire qui m'ont accompagné pendant la totalité ou une partie de ma formation, soit Hermance Beaud, Arlette Rwigemera, Fabien Joao, Bintou Gaye et Guylaine Lasonde, pour leurs conseils techniques et leur soutien à tous les niveaux. Je remercie particulièrement ma collègue et amie Hermance Beaud pour m'avoir pratiquement tout appris au niveau technique pour mener à terme mon projet, et d'avoir toujours été disponible pour mes innombrables «Hermance, j'ai une question...». J'ai aussi une pensée pour Enora Lecadre et Sarah Tardif, nos stagiaires d'été, pour leur curiosité et l'ambiance apportée au laboratoire.

Bien sûr, j'aimerais aussi remercier les organismes subventionnaires qui ont rendu possible la réalisation de mes études dans le laboratoire de Géraldine Delbès, soit les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) et les Fonds de recherche en santé du Québec (FRQS).

Pour finir, je remercie mes parents et mes soeurs pour m'avoir appuyé tout au long de mes études, ainsi qu'Alex pour avoir respecté mes nombreuses périodes d'indisponibilité ou de questionnements. J'aimerais également souligner la contribution de deux personnes qui m'ont initiée au monde de la recherche en toxicologie de la reproduction lors de mon premier stage de baccalauréat, Marie-Eve Tremblay et Clotilde Maurice, sans qui je n'aurais probablement pas réalisé cette maîtrise.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIII
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE	3
1. L'ONCOLOGIE PEDIATRIQUE	3
1.1 <i>Les cancers pédiatriques</i>	3
1.2 <i>Les traitements de chimiothérapies pédiatriques</i>	5
1.3 <i>La qualité de vie après un cancer pédiatrique</i>	6
2. LES CHIMIOTHEAPIES PEDIATRIQUES ET L'INFERTILITE MASCULINE	7
2.1 <i>Les données épidémiologiques</i>	7
2.2 <i>Les mécanismes de toxicité des chimiothérapies sur le testicule</i>	8
2.2.1 <i>Le testicule et la spermatogenèse</i>	8
2.2.2 <i>Les données épidémiologiques</i>	11
2.2.3 <i>Les données expérimentales</i>	13
2.2.4 <i>Les modèles d'étude sélectionnés</i>	14
2.3 <i>La préservation de la fertilité</i>	15
3. LA DOXORUBICINE (DXO) : UN MODELE D'ETUDE	21
3.1 <i>Les utilisations en clinique</i>	21
3.2 <i>La toxicocinétique</i>	22
3.2.1 <i>L'absorption, la distribution et l'élimination</i>	22
3.2.2 <i>Le métabolisme</i>	23
3.3 <i>Les mécanismes d'action</i>	25
3.3.1 <i>Le blocage de la synthèse et les dommages à l'ADN</i>	26
3.3.2 <i>L'induction de stress oxydatif</i>	26
3.4 <i>La doxorubicine et l'infertilité masculine</i>	27
4. LE STRESS OXYDATIF ET LA FERTILITE MASCULINE	31
4.1 <i>Le stress oxydatif</i>	31
4.1.1 <i>Les espèces réactives de l'oxygène</i>	31
4.1.2 <i>Les conséquences cellulaires</i>	33
4.2 <i>Les systèmes de défense contre les EROs</i>	34
4.3 <i>Le stress oxydatif en lien avec l'infertilité masculine</i>	36
4.4 <i>L'utilisation des antioxydants comme protecteurs de la fertilité</i>	36
4.4.1 <i>Les antioxydants et l'infertilité masculine</i>	37

4.4.2 Les antioxydants non-enzymatiques.....	38
4.4.3 L'impact des antioxydants sur la gonadotoxicité de la doxorubicine	39
4.4.4 Les composés antioxydants sélectionnés.....	45
5. LA PROBLEMATIQUE	49
6. L'HYPOTHESE ET LES OBJECTIFS	49
CHAPITRE 2 : IN VITRO STUDY OF DOXORUBICIN-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN SPERMATOGONIA AND IMMATURE SERTOLI CELLS	51
CONTRIBUTION DES AUTEURS	51
RESUME DE L'ARTICLE EN FRANÇAIS.....	51
ARTICLE SOUMIS.....	53
<i>Abstract</i>	54
<i>Introduction</i>	55
<i>Material and methods</i>	57
<i>Results</i>	60
<i>Discussion</i>	62
<i>Declaration of interest</i>	68
<i>Funding</i>	68
<i>Acknowledgements</i>	68
<i>References</i>	69
<i>Tables</i>	75
<i>Figures</i>	77
<i>Supplementals</i>	83
CHAPITRE 3 : DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES	87
LES RESULTATS	87
LIMITES DE L'ETUDE	89
PERSPECTIVES TECHNIQUES.....	91
RECOMMANDATIONS.....	93
LES APPLICATIONS EN CLINIQUE.....	94
CONCLUSION	95
RÉFÉRENCES.....	97
ANNEXE : EFFETS TRANSGENERATIONNELS DES CHIMIOETHERAPIES : L'EXPOSITION DU PERE INFLUENCE-T-ELLE LA SANTE DES GENERATIONS FUTURES ?.....	113

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

<i>Tableau 1. Effets de la DXO dans le testicule pré-pubère de rongeur et impact de prétraitements avec des composés antioxydants.</i>	29
<i>Tableau 2. Paramètres de stress oxydatif induits par la DXO dans le testicule adulte de rongeur et impact de pré/post-traitements avec des composés antioxydants.</i>	41
<i>Tableau 3. Antioxydants non-enzymatiques sélectionnés pour diminuer la gonadotoxicité de la DXO in vitro.</i>	47

CHAPITRE 2 : IN VITRO STUDY OF DOXORUBICIN-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN SPERMATOGONIA AND IMMATURE SERTOLI CELLS

Table 1. <i>Calculated EC₅₀ (μM) of DXO-induced cytotoxicity after a 24h exposure in GC-6Spg and Ser-W3 using three different assays.</i>	75
Table 2. <i>List of selected compounds and their known mechanism of action according to the literature.</i>	76
Supplementary Table 1. <i>Stock solutions and final concentrations of antioxidants and BSO for cell treatments.</i>	83

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

Figure 1. Distribution des nouveaux cas de cancer chez les moins de 14 ans au Canada.....	4
Figure 2. Représentation schématique d'une coupe transversale d'une portion de tube séminifère du testicule de mammifère adulte.....	9
Figure 3. Les solutions expérimentales pour préserver la fertilité des garçons pré-pubères.....	18
Figure 4. Structure chimique de la doxorubicine.	21
Figure 5. Principaux métabolites et mécanismes d'action de la doxorubicine.	25
Figure 6. Les acteurs de l'équilibre intracellulaire pro-oxydants et antioxydants.	32
Figure 7. Le système d'antioxydant du glutathion.	35

CHAPITRE 2 : IN VITRO STUDY OF DOXORUBICIN-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN SPERMATOGONIA AND IMMATURE SERTOLI CELLS

Figure 1. DXO-induced cytotoxicity in GC-6Spg and Ser-W3.....	77
Figure 2. DXO-induced ROS and oxidative DNA damage in GC-6Spg.	78
Figure 3. DXO-induced ROS, oxidative DNA damage and GSH levels in Ser-W3.	79
Figure 4. Effect of depletion or supplementation of intracellular GSH on DXO-induced cytotoxicity in Ser-W3.....	80
Figure 5. Effect of four antioxidants on DXO-induced cytotoxicity in Ser-W3.	81
Figure 6. ROS inhibition by antioxidants in Ser-W3 exposed to TBHP.....	82
Supplementary Figure 1. Positive controls for cytotoxicity, ROS, oxidative DNA damage and GSH levels measurements in GC-6Spg and Ser-W3.....	84
Supplementary Figure 2. Effect of four antioxidants on DXO-induced cytotoxicity in GC-6Spg.	85

LISTE DES ABRÉVIATIONS

8-oxoDG	8-oxo-désoxyguanosine
AEP	<i>Anion exchange protein</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALL	Leucémie lymphoblastique aiguë
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BHT	Barrière hémato-testiculaire
CAT	Catalase
CCSS	<i>Childhood Cancer Survivor Study</i>
CNS	Système nerveux central
CP	Cisplatine
CPA	Cyclophosphamide
CuZn-SOD	Superoxyde dismutase, forme couplée au cuivre et au zinc
CYP450	Cytochrome P450
DCF-DA	Dichlorofluorescéine-diacétate
DOXol	Doxorubicinol
DXO	Doxorubicine
ERAs	Espèces réactives de l'azote
EROs	Espèces réactives de l'oxygène
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FSH	Hormone folliculo-stimulante
GLUT	<i>Glucose transporter</i>

GPx	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
GST	Glutathion s-transférase
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
Hsp90	<i>Heat shock protein 90</i>
ICSI	Injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde
I.P.	Injection intrapéritonéale
ItgA6	<i>Integrin subunit alpha 6</i>
ItgB1	<i>Integrin subunit beta 1</i>
I.V.	Injection intraveineuse
Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
KO	Knock-out
LH	Hormone lutéinisante
LOOH	Hydroperoxyde de lipide
mCB	Monochlorobimane
MAGE-4A	<i>Melanoma antigen family 4A</i>
MDA	Malondialdéhyde
Mn-SOD	Superoxyde dismutase, forme couplée au manganèse
NAC	N-Acétylcystéine
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
Nb	Nombre
n.d.	Donnée non-disponible

NO	Oxyde nitrique
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
Oct4	<i>Octamer-binding protein 4</i>
OCTN	<i>Organic cation/carnitine transporter</i>
Ogg1	<i>8-Oxoguanine DNA glycosylase</i>
Pgp	P-glycoprotéine
PHGPx	Glutathion peroxydase spécifique aux hydroperoxydes de phospholipides
Plzf	<i>Promyelocytic leukaemia zinc finger</i>
PNC	Système nerveux périphérique
SOD	Superoxyde dismutase
Spz	Spermatozoïdes
SSCs	Cellules souches spermatogoniales
SVCT	<i>Sodium/vitamin C co-transporter</i>
TOPII	Topoisomérase II
VCR	Vincristine
VitC	Vitamine C
VitE	Vitamine E

INTRODUCTION

Les taux de survie des cancers pédiatriques ont augmenté dans les dernières décennies (Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics, 2017). Il y a donc une population grandissante de survivants de cancers pédiatriques dans notre société. Malheureusement, les traitements anticancer reçus pendant l'enfance peuvent avoir des effets négatifs sur leur qualité de vie à long terme (Chao *et al.*, 2016). Entre autres, il est connu que les traitements de chimiothérapie pédiatriques peuvent affecter la fertilité masculine à long terme, même lorsqu'administrés avant la puberté (Chow *et al.*, 2016).

Le testicule pré-pubère n'est pas quiescent. Il contient déjà les cellules souches spermatogoniales (SSCs), soit les cellules germinales qui assurent la production de spermatozoïdes via la spermatogenèse après la puberté. Il contient aussi les cellules de Sertoli, offrant un soutien physique et métabolique aux cellules germinales (Chemes, 2001). Plusieurs études épidémiologiques et expérimentales ont montré une toxicité des chimiothérapies sur les SSCs et les cellules de Sertoli immatures (Bordallo *et al.*, 2004; Marcon *et al.*, 2010; Nambu *et al.*, 1995; Nurmio *et al.*, 2009a), toutes deux essentielles à la fonction reproductrice masculine. Or, il n'existe aucune solution pour préserver la fertilité des garçons pré-pubères. En effet, la cryoconservation de spermatozoïdes avant les traitements anticancer n'est faisable que chez les patients pubères (Chan & Robaire, 2011). Il est donc primordial de mieux comprendre les mécanismes d'action des chimiothérapies sur le testicule immature pour proposer des solutions alternatives.

Dans ce travail de recherche, la doxorubicine (DXO), un inhibiteur de topoisomérase II utilisé dans le traitement des cancers pédiatriques, sert de composé de chimiothérapie modèle. Des études expérimentales ont montré le potentiel gonadotoxique de la DXO administrée avant la puberté (Cabral *et al.*, 2014; Vendramini *et al.*, 2012). De plus, ces études suggèrent que la DXO induit un stress oxydatif testiculaire, mais les types cellulaires ciblés sont inconnus (Cabral *et al.*, 2018).

L'utilisation d'antioxydants a été proposée comme solution *in situ* pour diminuer la toxicité testiculaire des chimiothérapies comme la DXO. Plusieurs résultats chez les rongeurs pré-pubères se sont montrés encourageants (Cabral *et al.*, 2014; Cabral *et al.*, 2018; Lirdi *et al.*, 2008), mais l'effet bénéfique des antioxydants reste controversé et nécessite une meilleure description des mécanismes impliqués dans le testicule immature. Afin d'améliorer la qualité de vie des hommes survivants de cancers pédiatriques, il est important d'évaluer les antioxydants comme solution potentielle pour diminuer l'impact des chimiothérapies sur le testicule pré-pubère. Dans

ce projet, un modèle *in vitro* de cellules testiculaires immatures est utilisé pour mettre en évidence les mécanismes de gonadotoxicité de la DXO et l'impact potentiel des antioxydants.

CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

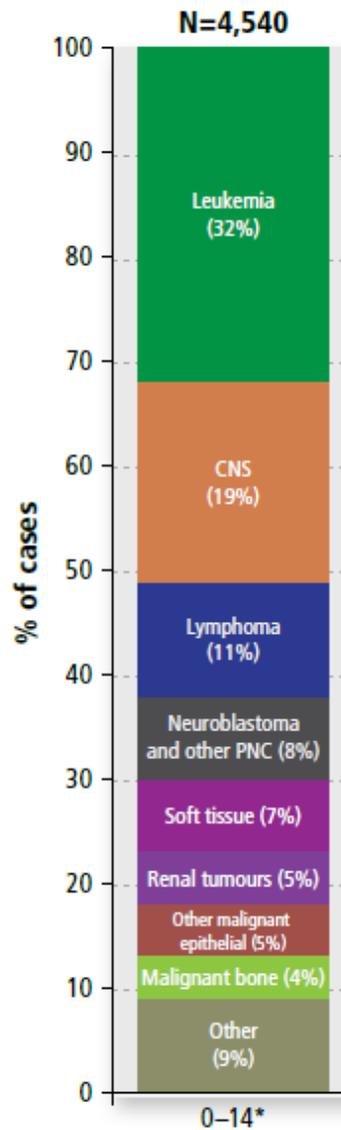
1. L'oncologie pédiatrique

Le cancer est un enjeu majeur de santé publique; Il est estimé qu'un canadien sur deux développera un cancer au cours de sa vie (Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics, 2017). La majorité des cancers se manifestent après 50 ans alors que moins de 1% se manifestent chez les enfants et adolescents, ce qui correspond à environ 1500 nouveaux cas projetés en 2017 au Canada (Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics, 2017). Bien qu'ils ne représentent qu'un faible pourcentage de tous les cancers, les conséquences sont majeures sur la vie des jeunes patients et de leur famille. L'oncologie pédiatrique regroupe plusieurs aspects de la prise en charge de ces cas de cancers pendant l'enfance, tels que la prévention, le diagnostic, le traitement, la qualité de vie après cancer, ainsi que la recherche médicale associée.

1.1 Les cancers pédiatriques

Selon la Société Canadienne du cancer, les cancers pédiatriques sont définis comme des cancers touchants des jeunes de 0 à 14 ans (Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics, 2017). Au Canada, entre 2009 et 2013, les cancers pédiatriques ayant les plus hautes incidences étaient les leucémies (32% des cas), les cancers du système nerveux central et périphérique (27%) et les lymphomes (11%) (Figure 1). D'autres types de cancers comptent pour une plus faible proportion des cas: cancer des tissus mous, tumeurs rénales, cancer des os, etc (Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics, 2017).

Figure 1. Distribution des nouveaux cas de cancer chez les moins de 14 ans au Canada.



Le pourcentage de nouveaux cas associé à chaque type de cancer pédiatrique entre 2006 et 2010 est représenté du plus important au moins important. CNS : système nerveux central; PNC : système nerveux périphérique (Adapté de Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics, 2017).

Près de la moitié des cancers chez les moins de 14 ans au Canada sont des cancers liquides, ce qui regroupe les leucémies et les lymphomes (Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics, 2017) (Figure 1). La leucémie est un cancer qui affecte les cellules du sang. Elle est divisée en plusieurs sous-types selon l'origine des cellules cancéreuses. Par exemple, la leucémie lymphoblastique aiguë (ALL) représente 75% des cas de leucémies pédiatriques et touche les cellules précurseurs de la lignée lymphoïde à l'origine des lymphocytes T et B du système immunitaire (PDQ® Pediatric Treatment Editorial Board, 2017). Les lymphomes, quant

à eux, touchent les lymphocytes B et T qui circulent dans le système lymphatique (The American Cancer Society medical and editorial content team, 2017a). Les deux principaux types, retrouvés en proportions similaires chez les moins de 14 ans, sont les lymphomes de Hodgkin et les lymphomes non-Hodgkiniens (Kaatsch, 2010), qui diffèrent par les caractéristiques des cellules cancéreuses retrouvées chez les patients (The American Cancer Society medical and editorial content team, 2017a).

Les taux de survie associés aux cancers pédiatriques ont grandement augmenté au cours des dernières décennies (American Cancer Society, 2017; Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics, 2017). De manière globale, le taux de survie sur 5 ans est d'un peu plus de 80% au Canada (Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics, 2017) et aux États-Unis (American Cancer Society, 2017). Par contre, le taux de survie est variable selon le type de cancer. Au Canada, chez les moins de 14 ans, on parle d'environ 70% pour les tumeurs des os, alors que les taux atteignent 98% pour le lymphome de Hodgkin, 88% pour le lymphome non-Hodgkinien et 91% pour l'ALL. Les avancées dans la détection précoce du cancer et son traitement efficace sont des facteurs majeurs dans l'augmentation des taux de survie des cancers pédiatriques (Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics, 2017).

1.2 Les traitements de chimiothérapies pédiatriques

Les traitements utilisés en clinique sont variables selon le type de cancer ciblé. Pour les cancers du système nerveux central et périphérique, la chirurgie occupe une place importante pour éliminer la tumeur, et cette dernière peut être combinée à des chimiothérapies et de la radiothérapie (Société canadienne du cancer, 2018d). Cependant, pour les cancers liquides, la chirurgie ne peut s'appliquer. La chimiothérapie devient donc le premier moyen de traitement chez ces patients. La radiothérapie est aussi utilisée de manière courante, mais on recommande généralement de limiter son utilisation lorsque possible à cause de ses effets secondaires majeurs (Société canadienne du cancer, 2018c).

La chimiothérapie se définit par l'utilisation d'un ou plusieurs composés cytotoxiques afin de tuer les cellules cancéreuses. Les traitements de chimiothérapie contre les cancers pédiatriques comme les leucémies ou les lymphomes sont souvent divisés en trois phases : l'induction, d'une durée de 1-2 mois, dont le but est de détruire la majorité des cellules cancéreuses et d'induire la rémission ; la consolidation, d'une durée de 1-6 mois et d'intensité plus forte afin de détruire les cellules cancéreuses résiduelles ; la maintenance, d'une durée de 2-3 ans et d'intensité plus faible

afin de maintenir la rémission à long terme (Lilleyman, 1999; Société canadienne du cancer, 2018c; Société canadienne du cancer, 2018e; Société canadienne du cancer, 2018f). Chacune de ces phases implique généralement des combinaisons d'agents de chimiothérapie issus de différentes classes de composés (Frei & Eder, 2003). Les quatre principales classes utilisées contre l'ALL sont les agents alkylants, les antimétabolites, les antibiotiques et les corticostéroïdes (Lilleyman, 1999; Société canadienne du cancer, 2018a). Les agents alkylants tels la cyclophosphamide (CPA) ou le cisplatine (CP) créent des liens covalents avec les macromolécules comme l'ADN (Colvin, 2003). Les antimétabolites comme le méthotrexate, la mercaptopurine ou la cytarabine compétitionnent avec le substrat de certaines enzymes et les inhibent, ce qui crée des déficiences en métabolites essentiels dans les cellules cancéreuses (Lilleyman, 1999). Les antibiotiques tels la doxorubicine (DXO), la daunorubicine ou la bléomycine sont dérivés de microorganismes et possèdent divers mécanismes d'action selon leur structure, comme l'intercalation dans l'ADN (Lilleyman, 1999). Les corticostéroïdes, qui incluent la dexaméthasone et la prednisone, induisent l'apoptose dans les lymphocytes cancéreux (Lilleyman, 1999).

1.3 La qualité de vie après un cancer pédiatrique

L'augmentation des taux de survie grâce à l'amélioration des combinaisons de chimiothérapies mène à une présence grandissante de survivants de cancers pédiatriques dans notre population. Dans les pays à revenus élevés, il est estimé qu'une personne sur 1000 est un survivant de cancer pédiatrique (Pritchard-Jones *et al.*, 2013). Auparavant, le seul but des traitements anticancer était d'assurer la survie des patients, mais la réduction des effets secondaires à long terme est maintenant une considération majeure en soins de santé (Pritchard-Jones *et al.*, 2013). En effet, les traitements contre le cancer ne sont pas spécifiques aux cellules cancéreuses et peuvent atteindre des cellules saines, menant à des effets secondaires même plusieurs années après la fin du traitement (Harake *et al.*, 2012). Une étude Américaine sur 652 survivant(e)s de cancer pédiatrique a montré une augmentation du risque de mortalité, de cancers secondaires, de perte de vision, de maladies cardiaques, d'insuffisance rénale, de désordres thyroïdiens et d'hypogonadisme ou d'infertilité plus de 5 ans après l'arrêt des traitements, en comparaison avec des sujets sans historique de cancer (Chao *et al.*, 2016). De plus, Essig *et al.* ont mis en évidence un risque plus élevé de maladies chroniques et de baisse du statut de santé pour des survivants d'ALL pédiatrique de risque standard, n'ayant reçu que des chimiothérapies sans radiothérapie (Essig *et al.*, 2014).

2. Les chimiothérapies pédiatriques et l'infertilité masculine

L'infertilité masculine est un effet secondaire possible des traitements contre le cancer et reste un problème majeur concernant les conséquences à long terme des cancers pédiatriques (Howell & Shalet, 2005; Skinner *et al.*, 2017; Vassilakopoulou *et al.*, 2016). Dans mon projet de maîtrise, nous nous intéressons spécifiquement à l'impact des composés de chimiothérapie sur la fertilité masculine, puisque les chimiothérapies sont le traitement principal utilisé pour les cancers liquides les plus communs chez les enfants (Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics, 2017; Société canadienne du cancer, 2018c).

2.1 Les données épidémiologiques

Les survivants de cancers pédiatriques sont particulièrement touchés par les impacts des traitements de cancer sur leur fertilité puisqu'ils atteindront éventuellement l'âge et le désir de fonder une famille. Plusieurs études épidémiologiques sur la fertilité masculine ont été réalisées sur la cohorte de la *Childhood Cancer Survivor Study* (CCSS) (Chow *et al.*, 2016; Green *et al.*, 2010; Wasilewski-Masker *et al.*, 2014), soit la plus grande cohorte de survivants de cancers pédiatriques aux États-Unis. Dans cette cohorte, une diminution de 50% des chances d'engendrer une grossesse naturelle a été mise en évidence pour les hommes survivants de cancers pédiatriques comparés à leurs frères en santé (Green *et al.*, 2010). Une autre étude de la CCSS a montré une prévalence d'infertilité de 46% pour les survivants contre 17,5% pour leurs frères sans historique de cancer (Wasilewski-Masker *et al.*, 2014). Grâce à ces études, ce risque d'infertilité a été principalement associé à une baisse des comptes et de la motilité spermatique (Wasilewski-Masker *et al.*, 2014). De plus, quelques facteurs de risque ont été mis en avant comme la dose reçue d'agents alkylants, la dose de radiations et l'exposition à la bléomycine (Green *et al.*, 2010; Wasilewski-Masker *et al.*, 2014). Par contre, dans ces études, il est difficile de séparer les effets des radiations et des chimiothérapies car elles sont souvent utilisées en combinaison. Dernièrement, Chow *et al.* ont étudié la fertilité de plus de 5 600 participants masculins de la CCSS n'ayant pas reçu de radiations au cerveau, pelviennes ou sur tout le corps, permettant de mettre en évidence l'impact des chimiothérapies. Encore une fois, les chances d'engendrer une grossesse pour les hommes survivants d'un cancer pédiatrique étaient diminuées par rapport à leurs frères en santé, peu importe si exposés à des agents alkylants ou non (Chow *et al.*, 2016). Malheureusement, il reste encore difficile, voir impossible, de prédire quels patients seront touchés par des problèmes de fertilité à long terme.

2.2 Les mécanismes de toxicité des chimiothérapies sur le testicule

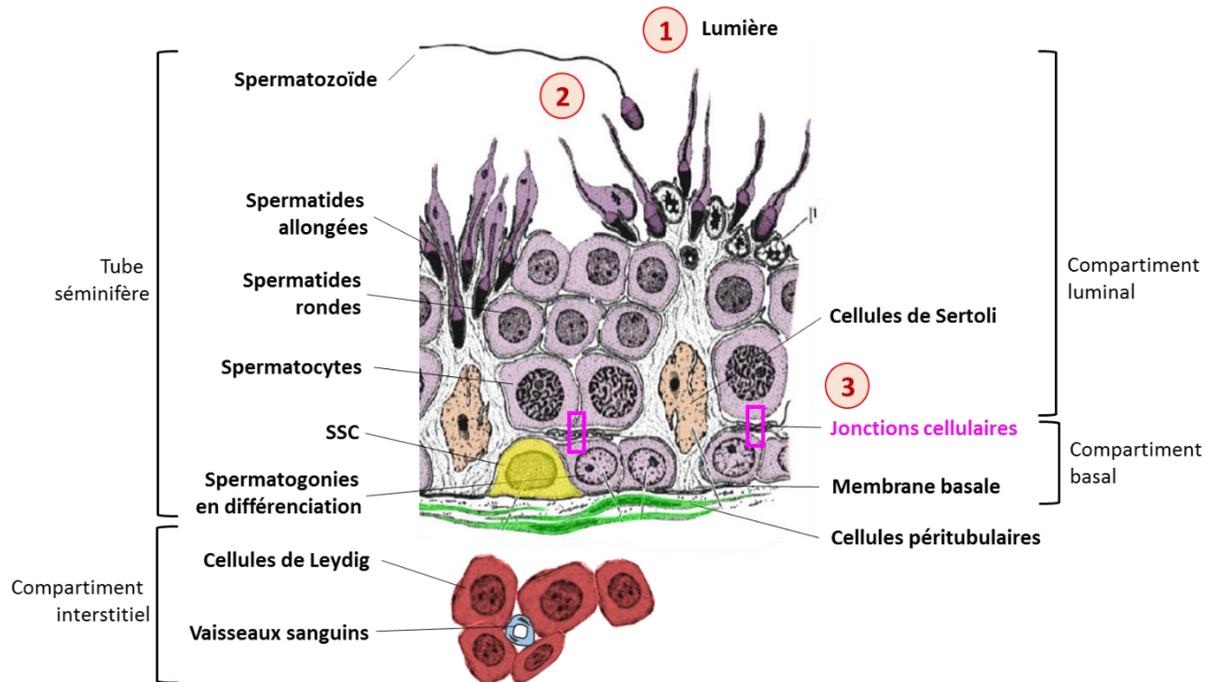
Il est primordial de comprendre comment agissent les chimiothérapies sur l'un des organes clés du système reproducteur masculin, soit le testicule, et ce même avant la puberté. Ceci permettra entre autre de mieux décrire les facteurs de risque pour prévoir quels patients seront touchés, et de mettre en place des solutions de préservation de la fertilité adaptées à la réalité des jeunes garçons. Ces informations serviront aux oncologues, qui à leur tour, seront en mesure de mieux informer les patients qui recevront des traitements pour un cancer pédiatrique au sujet des options qui s'offrent à eux.

2.2.1 Le testicule et la spermatogenèse

Le testicule est un organe du système reproducteur masculin ayant deux fonctions principales, soit la production des gamètes mâles et la production de l'hormone masculinisante testostérone (Mawhinney & Mariotti, 2013). Un impact des chimiothérapies sur cet organe a donc le potentiel d'induire des conséquences significatives sur la fonction reproductrice masculine.

Chez le mammifère adulte, le testicule se divise en deux compartiments principaux (Figure 2) (Yauk *et al.*, 2015). Le compartiment interstitiel contient les cellules de Leydig, qui assurent la production de testostérone par le processus de la stéroïdogénèse (Mawhinner M 2013). La région interstitielle contient aussi des macrophages, des vaisseaux sanguins et des vaisseaux lymphatiques (Smith & Walker, 2014). Le second compartiment se compose de tubes séminifères, soit le lieu de la production des gamètes mâles, les spermatozoïdes, par le processus de la spermatogenèse (Leblond & Clermont, 1952). Les tubes séminifères contiennent les cellules germinales à l'origine des spermatozoïdes et les cellules épithéliales de Sertoli, qui agissent comme support physique et métabolique aux cellules germinales pendant la spermatogenèse (Sharpe *et al.*, 2003). Les cellules de Sertoli sont attachées à une membrane basale qui entoure les tubes séminifères. Cette membrane est également en contact avec les cellules périvitubulaires myoïdes, ayant un rôle paracrine sur les cellules de Sertoli et un rôle contractile (Mayerhofer, 2013).

Figure 2. Représentation schématique d'une coupe transversale d'une portion de tube séminifère du testicule de mammifère adulte.



Le compartiment interstitiel du testicule contient des amas de cellules de Leydig (rouge) et des vaisseaux sanguins (bleu). Le compartiment du tube séminifère est délimité par une membrane basale et des cellules péritubulaires (vert). Dans le tube, les cellules de Sertoli adjacentes (orange) forment la barrière hémato-testiculaire (BHT, rose), qui sous-divise le tube en compartiments basal et luminal. Les cellules germinales incluent les SSCs (jaune) et spermatogonies à la membrane basale, les spermatocytes, les spermatides et les spermatozoïdes près de la lumière. Les trois principales différences avec le testicule pré-pubère sont indiquées par les cercles rouges : 1- présence de cordons séminifères sans lumière, 2- absence de spermatogenèse, 3- présence de cellules indifférenciées/immatures, comme les cellules de Sertoli qui ne forment pas encore la BHT. Données tirées de Yauk *et al.*, 2015; adaptation de l'image de Gilbert Scott F (Scott F, 2006).

Chez le mammifère adulte, dans le compartiment des tubes séminifères, les cellules germinales diploïdes subissent la spermatogenèse et deviennent des spermatozoïdes haploïdes (Leblond & Clermont, 1952). Ce processus se déroule en trois phases. D'abord, la phase mitotique consiste à amplifier le nombre de cellules germinales à partir de cellules souches (Clermont & Bustos-Obregon, 1968; Clermont & Leblond, 1953). Lors de cette phase, les cellules germinales se nomment les spermatogonies, ce qui fait référence à plusieurs sous-populations de cellules peu différenciées incluant les cellules souches spermatogoniales (SSCs). Grâce à leur division par mitose, les SSCs assurent l'auto-renouvellement de la réserve de cellules souches ainsi que l'approvisionnement en cellules germinales pour la spermatogenèse (De Rooij & Grootegoed, 1998). Les SSCs sont contenues dans une niche au niveau de la membrane basale des tubes

séminifères, entourées de cellules de Sertoli (Valli *et al.*, 2014). Chez le rat, l'entrée en mitose des SSCs lors de la première phase de la spermatogenèse mène à leur amplification en spermatogonies A, suivit de leur différenciation en spermatogonies B puis en spermatocytes (Leblond & Clermont, 1952). Lors de la deuxième phase de la spermatogenèse, soit la phase méiotique, les spermatocytes subissent la méiose pour devenir des spermatides haploïdes (Leblond & Clermont, 1952). Finalement, la phase de spermiogenèse permet la différenciation des spermatides en spermatozoïdes (Leblond & Clermont, 1952), qui termineront leur maturation finale en dehors du testicule (Mawhinney & Mariotti, 2013). Afin d'assurer le bon déroulement de la spermatogenèse, les tubes séminifères chez l'adulte sont sous-divisés en deux compartiments séparés par la barrière hémato-testiculaire (BHT) (Figure 2). Le compartiment basal, près de la membrane basale des tubes, contient les SSCs et spermatogonies, et le compartiment luminal, vers le centre du tube, contient les cellules germinales plus différenciées (Yauk *et al.*, 2015). Pendant la spermatogenèse, les cellules germinales traversent graduellement la BHT du compartiment basal vers le luminal (Smith & Walker, 2014), jusqu'à être relarguées dans la lumière du tube sous forme de spermatozoïde (Leblond & Clermont, 1952). La BHT se constitue de jonctions serrées (Aoki & Fawcett, 1975) et permet de créer un environnement favorable à la spermatogenèse dans les tubes séminifères, en empêchant entre autres l'attaque des cellules germinales haploïdes par le système immunitaire (Stanton, 2016). Ce sont les cellules de Sertoli qui forment la BHT (Aoki & Fawcett, 1975) et coordonnent l'entrée en spermatogenèse des cellules germinales, sous l'action de l'hormone gonadotrophine FSH et de la testostérone (O'Shaughnessy, 2014; Stanton, 2016). Les cellules de Sertoli seraient aussi en partie responsables de fournir l'acide rétinoïque dérivée du rétinol, qui est essentielle pour la différenciation des spermatogonies indifférenciées puis pour leur entrée en méiose (Hogarth & Griswold, 2010; Morales & Griswold, 1987). La spermatogenèse fait également intervenir d'autres types cellulaires du testicule, comme les cellules de Leydig et leurs sécrétions telle la testostérone, sous l'action de l'hormone gonadotropine LH (Mawhinney & Mariotti, 2013).

Le testicule pré-pubère comporte les mêmes types cellulaires et la même organisation globale que le testicule adulte (O'Shaughnessy, 2014). Il possède cependant trois caractéristiques principales distinctes du testicule adulte qui pourraient moduler sa réponse aux chimiothérapies, soit la présence de cordons séminifères, la présence de types cellulaires indifférenciés/immatures et l'absence de spermatogenèse (Figure 2). D'abord, les tubes séminifères n'ont pas encore de lumière centrale dans les stades pré-pubères, ce pourquoi on les appelle cordons séminifères (Clermont & Perey, 1957). Ensuite, certains types cellulaires sont indifférenciés ou immatures, comme les cellules de Leydig qui doivent subir une différenciation (O'Shaughnessy, 2014) ou les

cellules de Sertoli qui doivent subir une maturation lors de la puberté (Sharpe *et al.*, 2003). En effet, les cellules de Sertoli immatures jouent différents rôles, dont certains sont conservés ou modifiés à la puberté. Par exemple, chez le rat, dès les stades néonataux et jusqu'à l'âge adulte, les cellules de Sertoli sécrètent de l'inhibine B assurant un rétrocontrôle sur les niveaux de FSH circulants (Sharpe *et al.*, 1999) ainsi que de la transferrine, importante pour délivrer le fer aux cellules germinales (Griswold *et al.*, 1986). Au contraire, la sécrétion du fluide tubulaire par les cellules de Sertoli est initiée à la puberté et permet de créer la lumière des tubes séminifères (Chemes, 2001; Russell *et al.*, 1989). De plus, les cellules de Sertoli immatures humaines possèdent deux phases majeures de prolifération : la première après la naissance jusqu'au début de l'enfance et la deuxième juste avant la puberté, vers 10-13 ans (Sharpe *et al.*, 2003). Chez le rat, ces deux phases sont combinées, donc les cellules de Sertoli prolifèrent de la naissance jusqu'au 15^e jour après la naissance environ (Clermont & Perey, 1957; O'Shaughnessy, 2014; Sharpe *et al.*, 2003). Au cours de la puberté, les cellules de Sertoli arrêtent de proliférer et subissent une maturation fonctionnelle, qui leur permettra de former la BHT (Chemes, 2001; Sharpe *et al.*, 2003) vers 16-19 jours après la naissance chez le rat (Bergmann & Dierichs, 1983). Conséquemment à sa mise en place, les cellules germinales pourront entrer en méiose (O'Shaughnessy, 2014). En effet, la troisième différence majeure entre le testicule pré-pubère et adulte est l'absence de spermatogenèse. Les principales cellules germinales présentes dans les cordons séminifères du testicule immature sont les spermatogonies, avec absence de cellules germinales aux stades plus différenciés (spermatocytes, spermatides, spermatozoïdes) (Clermont & Perey, 1957). Plus l'individu est jeune, plus le testicule contiendra un haut pourcentage de SSCs dans sa population de spermatogonies (Valli *et al.*, 2014). Les stades plus différenciés apparaîtront graduellement au fil de la maturation sexuelle (Clermont & Perey, 1957). Avant la puberté, le nombre global de cellules germinales augmente lentement pendant l'enfance, ce qui est suivi d'une phase de prolifération exponentielle au début de la puberté, associée à la mise en place de la spermatogenèse (Chemes, 2001; Mitchell *et al.*, 2009).

2.2.2 Les données épidémiologiques

L'absence de spermatogenèse avant la puberté peut laisser croire que le testicule immature est quiescent (Chemes, 2001). Cependant, la présence de cellules de Sertoli et de spermatogonies en prolifération et en maturation rend ces cellules des cibles potentielles des traitements de chimiothérapies chez les jeunes garçons. Malheureusement, ces deux types cellulaires sont essentiels pour l'établissement de la future spermatogenèse. La cause la plus commune

d'infertilité chez les survivants de cancers pédiatriques est effectivement une altération de la spermatogenèse, ce qui résulte en oligospermie (peu de spermatozoïdes dans l'éjaculat) ou en azoospermie (absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat) à l'âge adulte (Romerius *et al.*, 2011; Skinner *et al.*, 2017; Wasilewski-Masker *et al.*, 2014).

Contrairement à la fonction de spermatogenèse, la fonction de stéroïdogénèse du testicule est généralement préservée suite à des traitements de chimiothérapie pédiatrique. En effet, la plupart des survivants de cancers pédiatriques montrent une progression vers la puberté et des niveaux de testostérone plasmatique normaux, dans les mois ou années suivant les traitements (Bramswig *et al.*, 1990; Thomson *et al.*, 2002). Dans une étude réalisée en Finlande sur 109 survivants de cancers pédiatriques traités par des chimiothérapies avec ou sans radiothérapie, 80% ont montré une progression normale vers la puberté, alors que moins de 20% avaient des comptes spermatiques normaux une fois adultes (Siimes *et al.*, 1995). Ceci indique que les cellules de Leydig du testicule immature sont moins sensibles aux traitements de chimiothérapie. Les cellules de Sertoli immatures et les spermatogonies seront donc les types cellulaires d'intérêt dans notre étude.

Quelques études chez l'humain ont montré la sensibilité des spermatogonies aux chimiothérapies, visible par une diminution du nombre de spermatogonies dans les biopsies testiculaires de survivants de cancers pédiatriques après traitement avec des agents alkylants (Poganitsch-Korhonen *et al.*, 2017). Or, dans les études épidémiologiques comme cette dernière, il n'est généralement pas possible de distinguer les SSCs du reste de la population spermatogonies. Tout de même, dans des biopsies testiculaires de patients pédiatriques Finlandais atteints d'ALL, une réduction des spermatogonies *Melanoma antigen family 4A* (MAGE-4A) positives (spermatogonies en différenciation) a été observée après les traitements de risque standard et de haut risque (Nurmio *et al.*, 2009a). Une réduction des spermatogonies *Octamer-binding protein 4* (Oct-4) et antigène CD9 positives (spermatogonies à caractère souche) n'était visible qu'après une thérapie de haut risque (Nurmio *et al.*, 2009a).

Moins de données sont disponibles pour les cellules de Sertoli immatures exposées aux chimiothérapies chez l'humain, mais certaines évidences appuient un impact des traitements anticancer sur ces cellules. Une étude de cas d'un patient traité à 13 ans pour un lymphome non-Hodgkinien avec de la vincristine (VCR), du méthotrexate, de la CPA et de la DXO a montré la présence de cellules de Sertoli immatures dans une biopsie du testicule une fois adulte, suggérant une altération de leur maturation (Bar-Shira Maymon *et al.*, 2004). En effet, le testicule adulte de ce patient contenait des cellules de Sertoli exprimant la cytokératine 18, un marqueur de cellules

de Sertoli immatures (Bar-Shira Maymon *et al.*, 2004). Une altération fonctionnelle subtile dans le ratio sanguin d'inhibine B et de FSH a également été vue chez des patients pédiatriques traités pour un lymphome de Hodgkin, plus de trois ans après la fin du traitement (Bordallo *et al.*, 2004).

2.2.3 Les données expérimentales

En plus des études dans la population humaine, les modèles d'exposition de rats pré-pubères ont aussi montré que les chimiothérapies peuvent être toxiques pour les spermatogonies et cellules de Sertoli immatures. Par exemple, le CP ou la DXO peuvent induire l'apoptose des spermatogonies chez le rat pré-pubère (Hou *et al.*, 2005; Lirdi *et al.*, 2008). L'étoposide, un inhibiteur de topoisomérase II (TOPII), induit également de l'apoptose dans les spermatogonies différenciées du testicule immature de rat (Stumpp *et al.*, 2004). En ce qui concerne les cellules de Sertoli immatures, une induction d'apoptose dans ces cellules a été mesurée via un modèle d'exposition de rats pré-pubères âgés de 30 jours à l'agent alkylant CP (Lirdi *et al.*, 2008). Par contre, l'exposition de rats pré-pubères de 25 jours à l'agent non-alkylant étoposide n'a pas diminué le nombre de cellules de Sertoli chez l'adulte (Stumpp *et al.*, 2004). De manière intéressante, chez des rats de 6 jours exposés à la DXO, Hou *et al.* ont observé une réduction du nombre de cellules de Sertoli dès 24h après traitement, alors qu'il n'y avait pas d'effet si le traitement était fait à 16 ou 24 jours (Hou *et al.*, 2005). De plus, une dose cumulée plus grande de DXO a diminué la sécrétion de transferrine et altéré la morphologie des cellules de Sertoli de rats âgés de 15 jours (Brilhante *et al.*, 2012). Globalement, les données sur les cellules de Sertoli immatures suggèrent donc qu'il existe différentes phases de sensibilité de ces cellules aux chimiothérapies, ainsi qu'une sensibilité qui est probablement dose-dépendante.

Ensemble, les études épidémiologiques et *in vivo* confirment que les spermatogonies et les cellules de Sertoli immatures sont des cibles potentielles des composés de chimiothérapie. Il faut par contre noter que ces études se font dans un contexte où il y a des interactions entre les différentes cellules du testicule immature. Ceci rend donc impossible de déterminer si l'impact des chimiothérapies est direct et quels sont les mécanismes d'action spécifiques dans les spermatogonies et cellules de Sertoli immatures. Il est donc avantageux d'utiliser des modèles *in vitro* pour étudier spécifiquement ces deux types cellulaires.

Dans la littérature, par l'utilisation de lignées immortalisées de spermatogonies aux caractéristiques souches ou de cultures primaires de SSCs de rongeurs, il a déjà été montré que le CP, la CPA, la DXO, la bléomycine ou l'étoposide peuvent induire de la cytotoxicité dans ces cellules (Beaud *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2014; Marcon *et al.*, 2010). Il faut cependant noter que le

modèle de co-culture de SSCs sur des cellules nourricières utilisé dans l'étude de Marcon *et al.* ne permet pas de conclure à des effets directs des composés de chimiothérapie (Marcon *et al.*, 2010). Toutefois, l'ensemble des résultats de ces études *in vitro* combiné à l'inhibition de la spermatogenèse observée chez les survivants de cancers pédiatriques (Wasilewski-Masker *et al.*, 2014) suggèrent qu'une des causes d'infertilité à long terme est la toxicité des chimiothérapies sur les SSCs.

En ce qui concerne l'étude *in vitro* des chimiothérapies sur les cellules de Sertoli, l'utilisation d'une culture primaire isolée de rats pré-pubères a montré la toxicité du CP, notamment par une perte d'activité mitochondriale, une augmentation de la production de lactate indicatrice de dommages cellulaires et une baisse de production d'inhibine B (Monsees *et al.*, 2000). Lors de traitements à la DXO ou au CP, une altération de la production de transferrine a également été notée via un modèle similaire de culture primaire (Nambu *et al.*, 1995; Yamaguchi *et al.*, 2008), ainsi qu'une réduction de leur prolifération dans des testicules de rats en culture organotypique (Nurmio *et al.*, 2009b). Finalement, un utilisant une lignée de cellules de Sertoli immatures de souris, les TM4, Wang *et al.* ont mis en évidence une baisse de formation de colonies lors d'une exposition transitoire au CP (Wang *et al.*, 2015). Ces données appuient le fait qu'un impact des chimiothérapies sur les cellules de Sertoli immatures pourrait participer à l'altération de la fonction reproductrice masculine.

2.2.4 Les modèles d'étude sélectionnés

Afin d'évaluer spécifiquement l'impact des chimiothérapies sur les types cellulaires d'intérêt du testicule immature, nous utilisons pour notre étude deux lignées immortalisées de rat : une de spermatogonies aux caractéristiques souches, les GC-6Spg (Van Pelt *et al.*, 2002), et une de cellules de Sertoli immatures, les Ser-W3 (Pognan *et al.*, 1997). Il existe d'autres lignées cellulaires de spermatogonies, comme les GC-1Spg correspondant à des spermatogonies B de souris (Hofmann *et al.*, 1992) ou les C18-4 correspondant plutôt à des spermatogonies A de souris et exprimant quelques gènes associés aux SSCs (Hofmann *et al.*, 2005). Pour les cellules de Sertoli immatures, la lignée TM4 de souris pré-pubères est souvent utilisée dans les études *in vitro* (Matfier, 1980). Dans notre étude, l'utilisation de lignées de rats est privilégiée puisque ce rongeur a été le principal utilisé pour l'étude *in vivo* de l'impact des chimiothérapies sur le système reproducteur masculin (Cabral *et al.*, 2018; Das *et al.*, 2012; Stumpp *et al.*, 2004; Vendramini *et al.*, 2012), ce qui en fait un modèle mieux caractérisé d'un point de vue toxicologique.

La lignée de spermatogonies GC-6Spg utilisée dans notre étude a été isolée de rats adultes dont les tubes séminifères ne contiennent que des spermatogonies aux stades indifférenciés dû à une déficience en vitamine A (Van Pelt *et al.*, 2002). La transfection de ces cellules germinales isolées avec l'antigène Grand T du virus SV40 a permis d'obtenir une lignée qui exprime la *Heat shock protein 90* (Hsp90), un marqueur de cellules germinales, ainsi que *Oct4* et *Promyelocytic leukaemia zinc finger* (Plzf), des marqueurs de spermatogonies indifférenciées (Carlomagno *et al.*, 2010; Van Pelt *et al.*, 2002). Les protéines *Integrin subunit alpha 6* et *beta 1* (ItgA6 et ItgB1) prédominantes dans les SSCs sont également exprimées (Carlomagno *et al.*, 2010). De plus, le marqueur de spermatogonies différenciées c-Kit est absent (Van Pelt *et al.*, 2002), mais son expression et la différenciation des cellules peut être induite en conditions de culture adéquates (Carlomagno *et al.*, 2010). Finalement, lorsque transplantées dans un testicule de souris immunodéficientes dont la spermatogenèse a été supprimée, les GC-6Spg se comportent comme les SSCs et migrent à la membrane basale pour coloniser les tubules. Cependant, il n'y a pas reprise de la spermatogenèse chez les souris receveuses, ce qui est une condition essentielle pour être considérées comme de véritables SSCs (Van Pelt *et al.*, 2002). Lors d'études toxicologiques, cette lignée cellulaire a déjà été utilisée pour évaluer la toxicité de la capsaïcine présente dans les piments forts, mettant en évidence une induction d'apoptose par cette molécule chez les spermatogonies à caractère souche (Mizrak *et al.*, 2008). De plus, l'induction de cassures dans l'ADN par l'agent de chimiothérapie DXO a déjà été démontré en utilisant cette lignée (Beaud *et al.*, 2017)

La lignée Ser-W3, quant à elle, a été isolée de rats pré-pubères âgés de 17 jours (Pognan *et al.*, 1997). L'immortalisation d'une culture primaire de cellules de Sertoli avec l'Antigène Grand T du virus SV40 a permis d'obtenir une lignée d'aspect épithélial et sécrétant de la transferrine. Cette lignée forme également des jonctions serrées quand cultivée sur du matrigel (Pognan *et al.*, 1997) et exprime des marqueurs structuraux et de jonctions en culture conventionnelle, comme la N-cadhérine, la vimentine, la connexine 43 (Qiu *et al.*, 2016) et l'occludine (Fiorini *et al.*, 2004). Elle a déjà été utilisée pour évaluer la reprotoxicité de composés antiviraux (Qiu *et al.*, 2016), de chimiothérapies comme le CP ou de perturbateurs endocriniens (Fiorini *et al.*, 2004) sur les cellules de Sertoli immatures.

2.3 La préservation de la fertilité

En dépit du fait que les conséquences des traitements des cancers pédiatriques sur la fertilité masculine ont été décrites depuis plusieurs années, il n'y a toujours pas de méthode approuvée

en clinique pour préserver la fertilité des garçons pré-pubères. Or, la fertilité est un facteur déterminant de la qualité de vie des survivants de cancers pédiatriques (Schover, 2009). En effet, trois survivants de cancers pédiatriques n'ayant pas encore d'enfants sur quatre aimeraient en avoir dans le futur et pensent que l'expérience du cancer en fera un meilleur parent (Schover *et al.*, 1999). De plus, une étude a montré que les survivants de cancers pédiatriques ont plus d'inquiétudes sur leur fertilité par rapport à des participants sans historique de cancer (Langeveld *et al.*, 2004). Malheureusement, moins de la moitié des survivants questionnés par Cherven *et al.* rapportent avoir été éduqués sur ce sujet lors de leur diagnostic ou à la fin des traitements (Cherven *et al.*, 2015). Le regret de ne pas avoir adéquatement été informé des risques potentiels des traitements anticancer sur la fertilité a aussi été soulevé de façon prédominante dans une étude basée sur des groupes de discussion avec des survivants masculins et leurs parents (Stein *et al.*, 2014). Ainsi, un impact des chimiothérapies sur la fertilité peut être associé à des conséquences psychologiques et une peur d'être rejeté au niveau des relations, du mariage ou au moment de fonder une famille (Stein *et al.*, 2014; Yi *et al.*, 2016). La situation peut être d'autant plus délicate dans les pays où le mariage requiert l'approbation par la famille et où l'adoption est perçue négativement (Yi *et al.*, 2016).

Actuellement, la cryopréservation de spermatozoïdes avant les traitements anticancer est la seule option disponible pour les hommes atteints d'un cancer (Wallace *et al.*, 2005). Jahnukainen *et al.* suggèrent que tous les patients qui recevront des traitements contre une leucémie ou un lymphome et qui sont en mesure de produire un échantillon de sperme avant le début des traitements devraient se faire offrir la possibilité de participer à une banque de sperme (Jahnukainen *et al.*, 2015). Par contre, cette option ne s'applique qu'aux patients pubères dont la production de spermatozoïdes est entamée dans le testicule et qui sont capables de fournir un échantillon de sperme par masturbation (Chan & Robaire, 2011). De plus, même les jeunes garçons nouvellement pubères (14-19ans) ne peuvent pas toujours donner d'échantillon de sperme, et lorsqu'ils le peuvent, le sperme est souvent de mauvaise qualité en termes de concentration, volume ou motilité des spermatozoïdes (Postovsky *et al.*, 2003).

Pour les patients de cancers pédiatriques, il incombe donc de mettre en place de nouvelles stratégies de préservation de la fertilité. Les solutions expérimentales proposées ont été revues plusieurs fois dans la littérature au cours de la dernière décennie, soulignant que la cryopréservation de biopsies de parenchyme testiculaire est l'option la plus étudiée (Anderson *et al.*, 2015; Chan & Robaire, 2011; Goossens & Tournaye, 2013; Jahnukainen *et al.*, 2015; Mitchell *et al.*, 2009; Raffoul *et al.*, 2016; Struijk *et al.*, 2013; Wallace *et al.*, 2005) (Figure 3). Dans cette

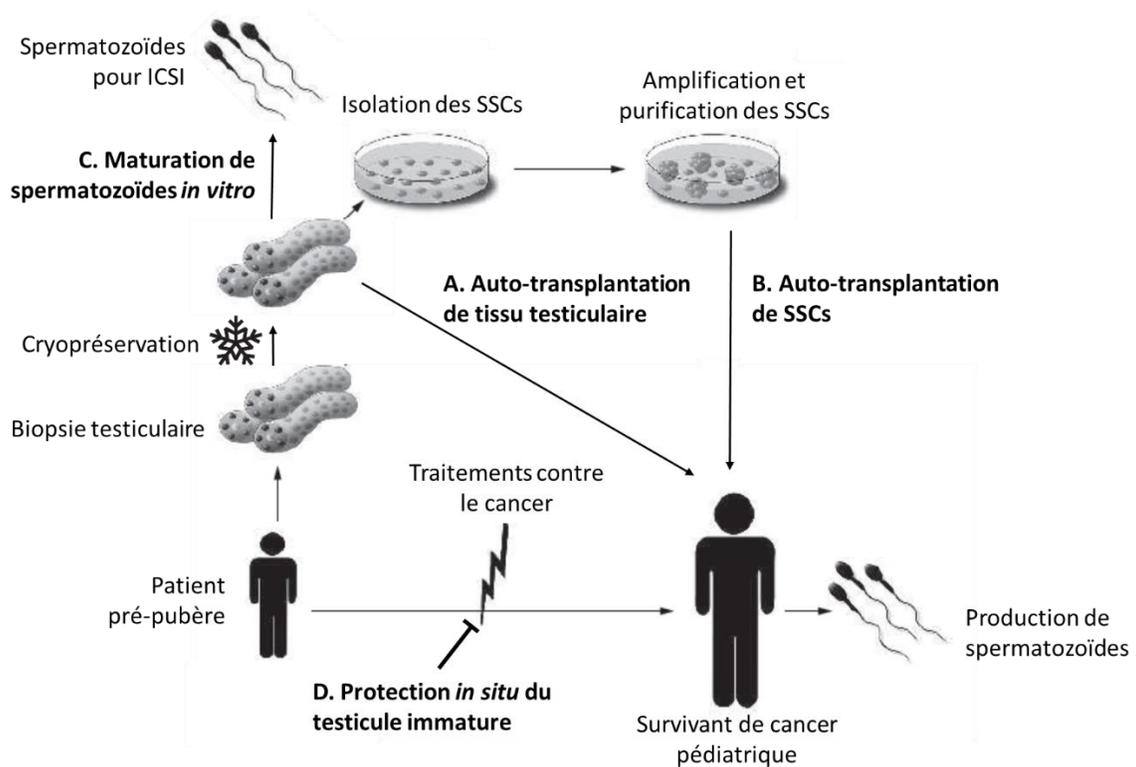
option, le prélèvement de tissu testiculaire consiste en une opération relativement mineure, mais reste invasif et requiert une anesthésie générale (Gupta *et al.*, 2016; Raffoul *et al.*, 2016). La biopsie est ensuite congelée afin d'être utilisée plus tard dans la vie du patient. Des protocoles de congélation se sont avérés prometteurs chez l'humain (Keros *et al.*, 2007), mais nécessitent une meilleure caractérisation de la fonctionnalité des cellules souches après décongélation (Anderson *et al.*, 2015). Éventuellement, à partir du tissu testiculaire décongelé, trois principaux protocoles sont proposés, bien qu'aucun ne soit actuellement approuvé chez l'homme. Des programmes de biopsies testiculaires pour les patients pédiatriques existent tout de même déjà, en perspective des futurs développements dans ce domaine (Sadri-Ardekani *et al.*, 2016). Les trois options proposées à partir des biopsies sont :

1- L'auto-transplantation de tissu testiculaire une fois le patient adulte, afin de permettre au tissu immature de produire des spermatozoïdes et de restaurer la fertilité (Chan & Robaire, 2011; Mitchell *et al.*, 2009). Cette technique est efficace chez la souris, mais reste à prouver chez l'humain (Anderson *et al.*, 2015). De plus, les biopsies comportent un risque de contamination par des cellules cancéreuses, surtout dans les cas de cancers liquides, et donc de réintroduction du cancer chez les survivants (Jahnukainen *et al.*, 2015).

2- L'auto-transplantation de SSCs isolées du parenchyme testiculaire, amplifiées *in vitro* et purifiées (Struijk *et al.*, 2013), dans le but qu'elles colonisent les tubes séminifères et initient la spermatogenèse chez le patient adulte (Struijk *et al.*, 2013). Encore une fois, il existe plusieurs limitations techniques telles que la décontamination efficace des SSCs pour éviter la réintroduction de cellules cancéreuses (Goossens & Tournaye, 2013; Jahnukainen *et al.*, 2015; Struijk *et al.*, 2013).

3- La maturation de spermatozoïdes *in vitro* à partir des SSCs contenues dans le parenchyme testiculaire immature, dans le but de les utiliser pour des techniques de reproduction assistées (Jahnukainen *et al.*, 2015). En 2016, Perrard *et al.* ont réussi à produire des cellules similaires à des spermatozoïdes à partir de biopsies fraîches ou congelées d'hommes dont la spermatogenèse était inhibée par des traitements hormonaux de ré-assignement de sexe (Perrard *et al.*, 2016). Bien que cette option pallie à la problématique de réintroduction de cancer, elle n'a encore pas été testée avec des tissus pré-pubères humains.

Figure 3. Les solutions expérimentales pour préserver la fertilité des garçons pré-pubères.



À partir d'une biopsie testiculaire cryoconservée du patient pré-pubère, les options expérimentales proposées sont : A. l'auto-transplantation du tissu testiculaire, B. l'auto-transplantation de cellules souches spermatogoniales (SSCs) ou C. la maturation de spermatozoïdes *in vitro* en vue de les utiliser pour l'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde (ICSI). La protection *in situ* du testicule immature (D.) est une option qui ne requiert pas de biopsie testiculaire. Adapté de (Kubota & Brinster, 2006).

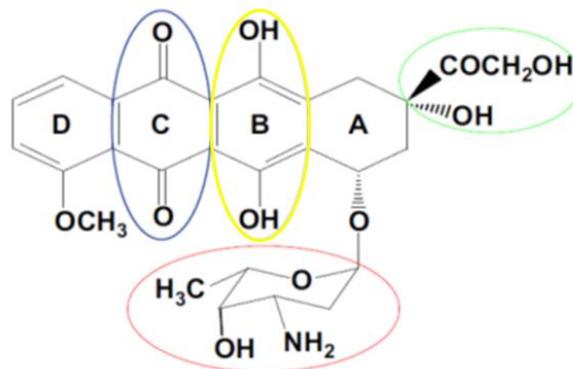
En parallèle, la protection *in situ* du testicule immature a été proposée comme une solution alternative et non-invasive pour diminuer la gonadotoxicité des chimiothérapies (Figure 3). Les principales techniques de protection ayant été suggérées sont 1- la suppression hormonale pour inhiber la spermatogenèse pendant le traitement (Jahnukainen *et al.*, 2015), une option qui n'est malheureusement pas efficace chez l'humain (Loren *et al.*, 2013), 2- la modification des combinaisons de chimiothérapies pour en diminuer la gonadotoxicité (Anderson *et al.*, 2015), ou 3- l'utilisation de composés protecteurs en pré- ou co-traitement avec les chimiothérapies (Cabral *et al.*, 2014; Cabral *et al.*, 2018; Lirdi *et al.*, 2008). Pour ce projet de recherche, nous nous intéressons aux composés protecteurs, qui pourraient être utilisés parallèlement à la modification des combinaisons de chimiothérapies, mais également quand les combinaisons ne peuvent être facilement modifiées comme lors de rechute du patient. Il est nécessaire de comprendre comment

agissent les composés de chimiothérapie sur les SSCs et cellules de Sertoli du testicule immature pour évaluer le potentiel des composés protecteurs comme solution alternative.

3. La doxorubicine (DXO) : un modèle d'étude

Pour évaluer l'impact des composés de chimiothérapies sur le testicule immature, nous utilisons la DXO comme composé modèle. Aussi connue sous le nom d'adriamycine, la DXO appartient à la famille des antibiotiques anthracyclines et est considérée parmi les composés de chimiothérapie les plus efficaces de nos jours (Granados-Principal *et al.*, 2010). De manière similaire aux autres anthracyclines, la structure chimique de la DXO comporte un groupement tétracycline de quatre cycles (Kalyanaraman, 2013) (Figure 4). Les groupements fonctionnels importants pour son action sont la quinone, l'hydroquinone, la chaîne latérale acyclique et le sucre daunosamine (Minotti *et al.*, 2000; Minotti *et al.*, 2004), responsable de l'hydrosolubilité de la DXO (Meredith & Dass, 2016). La forme utilisée en clinique est le chlorhydrate de DXO, un sel rouge hydrosoluble produit par la bactérie *Streptomyces peucetius* (Meredith & Dass, 2016).

Figure 4. Structure chimique de la doxorubicine.



Le groupement tétracycline de la doxorubicine est composé des quatre cycles A-D. Les principaux groupements fonctionnels qui y sont rattachés sont : la quinone sur le cycle C (bleu), l'hydroquinone sur le cycle B (jaune), la chaîne latérale acyclique (vert) et le sucre daunosamine (rouge) sur le cycle A (Adapté de Kalyanaraman, 2013).

3.1 Les utilisations en clinique

La DXO est utilisée contre une vaste variété de cancers pédiatriques et de cancers chez l'adulte (Pfizer Canada Inc, 2012), notamment dans le traitement des cancers liquides les plus représentés au niveau pédiatrique (Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics, 2017). Selon la Société Américaine du Cancer (ACS) et la Société Canadienne du cancer, la DXO est utilisée pour traiter les LLA, les lymphomes non-Hodgkiniens ainsi que les

lymphomes de Hodgkin (Société canadienne du cancer, 2018a; Société canadienne du cancer, 2018b; Société canadienne du cancer, 2018c; Société canadienne du cancer, 2018f; The American Cancer Society medical and editorial content team, 2017b; The American Cancer Society medical and editorial content team, 2017c). Elle est utilisée principalement dans les phases d'induction et de consolidation du traitement de ces cancers, ainsi que dans les cas de rechute. La DXO est généralement combinée avec d'autres composés de chimiothérapies de classes différentes. Par exemple, les régimes CHOP (CPA, DXO, VCR et prednisone) et ABVD (DXO, bléomycine, vinblastine, dacarbazine) sont souvent utilisés contre les lymphomes, alors que la combinaison DXO, VCR, dexaméthasone/prednisone et L-asparaginase l'est contre les leucémies pédiatriques (Pfizer Canada Inc, 2012; Société canadienne du cancer, 2018b; The American Cancer Society medical and editorial content team, 2017c).

3.2 La toxicocinétique

3.2.1 L'absorption, la distribution et l'élimination

Lors des traitements de chimiothérapie chez l'humain, la DXO est administrée par voie intraveineuse et parfois par voie intravésicale dans les cas de cancers de la vessie (Pfizer Canada Inc, 2012), qui concernent principalement les personnes âgées (Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics, 2017). Pour les études *in vivo* réalisées chez les rongeurs, elle est plutôt administrée par voie intraveineuse ou intrapéritonéale (Ahmed *et al.*, 2013; Attia *et al.*, 2010). Les injections classiques chez les patients de moins de 18 ans varient entre 25min et 24h pour une dose entre 10 et 60mg/m² (Krischke *et al.*, 2016). Une fois dans le sang, 60-70% de la DXO se retrouve liée à diverses protéines plasmatiques (Accord Healthcare Limited, 2017). Il a été montré chez les rongeurs qu'après injection, la DXO est rapidement éliminée du sang et distribuée vers les tissus comme le foie, les poumons ou le cœur (Pfizer Canada Inc, 2012). L'élimination de la DXO de la circulation sanguine est également rapide chez l'humain, suggérant une cinétique similaire aux rongeurs (Pfizer Canada Inc, 2012). Une fois dans les organes cibles, la DXO traverse rapidement vers le cytoplasme des cellules saines ou cancéreuses par diffusion simple (Pfizer Canada Inc, 2012), puis migre à l'intérieur du noyau en liant la sous-unité 20S du protéasome (Granados-Principal *et al.*, 2010). De plus, la DXO est un substrat du transporteur P-glycoprotéine (Pgp) (Hoffmann & Kroemer, 2004), impliqué dans la résistance de certains cancers aux agents de chimiothérapies. En effet, Pgp est responsable d'excréter la DXO et plusieurs autres chimiothérapies hors des cellules, ce qui peut moduler leur

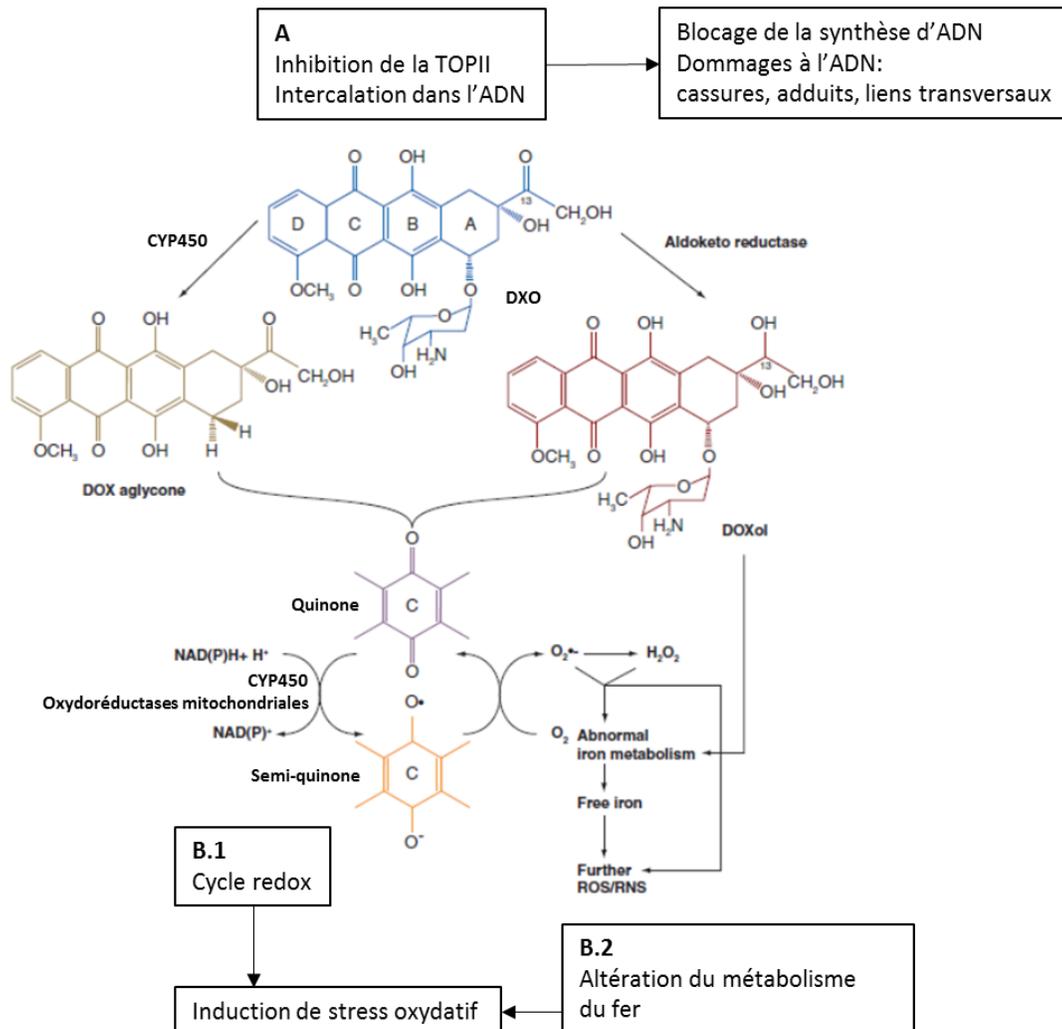
sensibilité à certains composés (Hoffmann & Kroemer, 2004). En ce qui concerne le système reproducteur masculin, une étude réalisée chez le rat adulte a montré que, suite à une injection intraveineuse, la DXO s'accumule dans le testicule avec une demi-vie supérieure à celle dans le cœur et le plasma (demi-vies de 34,35h, 9,65h et 5,73h dans les 12h suivant l'injection, respectivement) (Nwankwoala *et al.*, 2008). Dans cet article, l'hypothèse proposée quant à l'accumulation de la DXO au niveau testiculaire impliquerait une faible capacité de cet organe à excréter la DXO (Nwankwoala *et al.*, 2008; Weiss & Manthei, 1983). Pour finir, environ 40-50% de la dose de DXO administrée est éliminée par le foie dans la bile ou les selles en une semaine (Pfizer Canada Inc, 2012), dont la moitié sous forme intacte et le reste sous forme de différents métabolites. De plus, 5 à 15% de la dose de DXO administrée est éliminée dans l'urine. Il n'y pas beaucoup de données sur la toxicocinétique de la DXO spécifiquement chez les enfants comparés aux adultes, mais une étude sur des patients provenant de quatre pays développés a montré qu'un âge plus jeune était associé à une clairance de la DXO inférieure (Krischke *et al.*, 2016). En effet, la clairance était de 21,1L/h/m² pour les garçons de moins de 3 ans alors qu'elle était de 26,6L/h/m² pour ceux âgés entre 3 et 18 ans, suggérant une plus grande exposition potentielle chez les plus jeunes (Krischke *et al.*, 2016).

3.2.2 Le métabolisme

Après son administration, la DXO subit un métabolisme rapide dans le foie (Accord Healthcare Limited, 2017; Riddick *et al.*, 2005). Les aldokéto reductases cytoplasmiques sont responsables de la réduction de la DXO en doxorubicinol (DOXol), qui est son principal métabolite (Heibein *et al.*, 2012; Riddick *et al.*, 2005) (Figure 5). Le DOXol est lui aussi actif sur le plan pharmacologique (Accord Healthcare Limited, 2017). Certaines études suggèrent que sa toxicité pourrait être inférieure à celle de la DXO dans les cellules cancéreuses (Heibein *et al.*, 2012; Olson *et al.*, 1988), alors qu'il serait plus toxique pour les cellules cardiaques (Olson *et al.*, 1988). Les autres métabolites de la DXO incluent des formes aglycones, pouvant être produites sous l'action du cytochrome P450 (CYP450) (Riddick *et al.*, 2005), et des conjugués glucoronides et sulfates (Pfizer Canada Inc, 2012; Riddick *et al.*, 2005). De plus, la DXO peut être métabolisée par CYP450 (Riddick *et al.*, 2005) ou par des oxydoréductases mitochondriales résultant en la réduction du groupement quinone en semi-quinone (Licata *et al.*, 2000). D'autre part, la DXO peut être métabolisée ailleurs que dans le foie. Le métabolisme cardiaque de la DXO a été largement étudié, puisque que son principal effet secondaire chez les enfants et les adultes est la cardiomyopathie (Pfizer Canada Inc, 2012). Par exemple, le cytosol cardiaque humain est capable

d'induire la formation du DOXol en quantité prédominante, mais aussi des formes aglycones (Licata *et al.*, 2000; Minotti *et al.*, 2000). En ce qui concerne le testicule, très peu d'informations sont disponibles, voire inexistantes pour le testicule pré-pubère. À ma connaissance, il n'y a pas de données sur les concentrations et les métabolites de la DXO dans les différents types cellulaires du testicule adulte ou immature. La seule étude s'étant intéressée aux métabolites testiculaires de la DXO suite à une injection intraveineuse chez le rat adulte a mesuré la présence de DXO testiculaire, mais pas de DOXol ou de doxorubicine aglycone testiculaire au-dessus du seuil de détection (Arakawa *et al.*, 1991).

Figure 5. Principaux métabolites et mécanismes d'action de la doxorubicine.



Les principaux métabolites de la doxorubicine (DXO, bleu) sont le doxorubicinol (DOXol, rouge), formé par les aldokéto réductases, les formes aglycones (DOX aglycone, brun) formées par le cytochrome P450 (CYP450) et la forme semi-quinone (orange), produite par les CYP450 et les oxydoréductases mitochondriales. Les dommages à l'ADN et le blocage de synthèse de l'ADN sont principalement associés à la forme DXO qui inhibe la topoisomérase II (TOPII) et s'intercale dans l'ADN (A). L'induction de stress oxydatif est associée au cycle redox entre la forme DXO quinone (mauve) et semi-quinone (orange) (B.1). L'altération du métabolisme du fer (B.2) ainsi que les métabolites de la DXO participent aussi à l'induction de stress oxydatif. Adapté de (Chen *et al.*, 2007).

3.3 Les mécanismes d'action

La DXO possède deux principaux mécanismes d'action (Figure 5). L'action anticancer est surtout associée au blocage de la synthèse et à l'induction de dommages à l'ADN, et les effets secondaires comme la cardiotoxicité sont principalement associés à l'induction de stress oxydatif (Kalyanaraman, 2013).

3.3.1 Le blocage de la synthèse et les dommages à l'ADN

Le blocage de la synthèse et les dommages à l'ADN sont causés par la capacité de la DXO à bloquer la TOPII et s'intercaler dans l'ADN (Minotti *et al.*, 2004; Perez-Arnaiz *et al.*, 2014), ce qui inhibe les ADN et ARN polymérase (Meredith & Dass, 2016) (Figure 5A). Les dommages à l'ADN induits par la DXO incluent des cassures double-brin (Rochette *et al.*, 2015), des adduits à l'ADN (Yang *et al.*, 2014; Zeman *et al.*, 1998) et des liens transversaux dans l'ADN (Forrest *et al.*, 2012). D'abord, les cassures dans l'ADN sont principalement liées à l'activité inhibitrice de la TOPII. En effet, la DXO lie cette enzyme essentielle pour la réplication de l'ADN et crée un complexe covalent DXO-ADN-TOPII. Ceci stabilise la réaction intermédiaire où l'ADN est clivé double-brin et lié aux tyrosines de l'enzyme (Granados-Principal *et al.*, 2010), bloquant la synthèse de l'ADN (Rochette *et al.*, 2015). Ensuite, l'induction de liens transversaux dans l'ADN implique la formation de complexes entre la DXO et le formaldéhyde par une réaction avec les NADPH oxydoréductases et les métaux de transition (Granados-Principal *et al.*, 2010), ce qui forme un adduit à l'ADN (Forrest *et al.*, 2012). Cela crée des liens covalents avec l'ADN qui agissent comme des liens transversaux, empêchant les hélicases de séparer les brins d'ADN au moment de la réplication (Quiles *et al.*, 2002). Globalement, ces effets au niveau de l'ADN mènent à l'activation de p53, puis à l'apoptose des cellules (Forrest *et al.*, 2012). Toutefois, l'apoptose n'est pas la seule conséquence biologique possible en réponse aux dommages à l'ADN par la DXO. Selon la dose reçue, la durée d'exposition et le type cellulaire, l'apoptose, la nécrose, la sénescence ou l'autophagie peuvent être induites (Meredith & Dass, 2016). De plus, il est important de noter que la DXO est tout de même cytotoxique pour les cellules déficientes en p53 (Forrest *et al.*, 2012). En effet, ces cellules expriment davantage la TOPII associée à la phase S de la réplication de l'ADN (Granados-Principal *et al.*, 2010), et la DXO est généralement plus efficace dans les cellules ayant de plus hauts niveaux de TOPII (Fry *et al.*, 1991).

3.3.2 L'induction de stress oxydatif

En plus de ses actions au niveau de l'ADN, la DXO est capable d'induire du stress oxydatif dans ses cellules cibles par différents mécanismes (Granados-Principal *et al.*, 2010; Kalyanaraman, 2013; Quiles *et al.*, 2002; Rochette *et al.*, 2015). La voie principale commence par la réduction de la forme quinone de la DXO, via les oxydoréductases NADPH- ou NADH-dépendantes comme le complexe I de la chaîne de transport des électrons (Turrens, 2003) ou le CYP450 (Minotti *et al.*, 2004) (Figure 5B.1). La DXO prend alors sa forme semi-quinone radicale qui peut à son tour réduire l'oxygène en anion superoxyde, suivi du retour de la DXO sous sa forme quinone initiale

(Riddick *et al.*, 2005). Ce processus s'appelle un cycle redox, et peut se produire tant qu'il y a de l'oxygène et du NADPH réduit dans la cellule cible (Granados-Principal *et al.*, 2010). L'excès d'anion superoxyde peut alors générer de grandes quantités d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) et de l'azote (ERAs) à partir d'une seule molécule de DXO (Granados-Principal *et al.*, 2010). D'autres mécanismes de production d'EROs par la DXO ont été décrits, le plus souvent au niveau cardiaque. Par exemple, un mécanisme non-enzymatique possible implique que la DXO ou le DOXol provoquent le relargage de Fer (II) associé à la ferritine et à l'aconitase cytoplasmique (Minotti *et al.*, 2000) (Figure 5B.2). Le fer peut ensuite alimenter la réaction de Fenton et produire des hydroxyles radicaux (voir section 4.1.1) (Minotti *et al.*, 2004). Finalement, il ne faut pas négliger le fait que le métabolisme de la DXO peut affecter ses propriétés et donc impliquer d'autres voies de production de stress oxydatif. Par exemple, la formation de doxorubicine aglycone plus lipophile lui permet de diffuser dans la membrane mitochondriale et de s'y accumuler, ce qui crée plus d'EROs à partir de la chaîne respiratoire mitochondriale (Granados-Principal *et al.*, 2010). Au final, peu importe leur mécanisme de production, l'accumulation d'EROs intracellulaires est généralement suivie de la mort cellulaire par apoptose (Meredith & Dass, 2016; Rochette *et al.*, 2015).

Il est important de noter que les mécanismes d'induction de dommages à l'ADN et de stress oxydatif de la DXO ne sont pas complètement indépendants l'un de l'autre. Par exemple, la production de radicaux libres hautement réactifs comme l'hydroxyle radical peut mener à des cassures dans l'ADN (Accord Healthcare Limited, 2017). De plus, la formation d'adduits à l'ADN passe en grande partie par les EROs, qui peuvent réagir avec les désoxyguanosines, désoxyadénosines et désoxycytidines de l'ADN (voir section 4.1.2) (Granados-Principal *et al.*, 2010).

3.4 La doxorubicine et l'infertilité masculine

En dépit de son utilisation extensive dans le traitement des cancers pédiatriques, le lien entre l'exposition pédiatrique à la DXO et une atteinte de la fertilité masculine une fois adulte est difficile à faire chez l'humain. En effet, son utilisation en combinaison avec d'autres chimiothérapies rend difficile d'isoler les effets de la DXO. De plus, la plupart des études de cohorte se sont plutôt intéressées à la fertilité en corrélation avec les doses d'agents alkylants reçues pendant l'enfance, puisque ces derniers sont considérés comme plus dommageables sur la fertilité masculine (Chow *et al.*, 2016; Green *et al.*, 2010). Or, l'amélioration des combinaisons de chimiothérapies et le désir de réduire les effets secondaires à long terme mènent vers une réduction de l'utilisation des

agents alkylants (Institute of Medicine (US) and National Research Council (US) National Cancer Policy Board, 2003; Martinez *et al.*, 2017; Viviani *et al.*, 1985). Il est donc pertinent d'investiguer plus en détails les effets d'autres classes de composés de chimiothérapies, comme les anthracyclines, sur le système reproducteur masculin pré-pubère.

Récemment, notre laboratoire a montré une corrélation négative entre l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes et la dose de DXO reçue chez des survivants traités pour un lymphome ou une leucémie pédiatrique (Beaud *et al.*, Soumis). Les modèles animaux ont également mis en évidence un impact de la DXO sur le testicule pré-pubère (Tableau 1). Hou *et al.* ont montré que le testicule immature de rats de 6 jours était plus sensible que celui de 16 ou 24 jours à une injection intrapéritonéale de DXO. En effet, les testicules plus jeunes montrent une augmentation de l'apoptose des cellules germinales et une altération de la morphologie des cellules de Sertoli dès les deux jours suivant le traitement (Hou *et al.*, 2005). Les auteurs ont émis l'hypothèse que cette différence de sensibilité pourrait être due à une toxicocinétique testiculaire de la DXO différente selon l'âge ou encore à un gain de résistance des spermatogonies souches avec la maturation du testicule (Hou *et al.*, 2005). De manière intéressante, quatre études ont ensuite observé un impact persistant d'une seule injection de DXO faite avant la puberté (à 30 jours après la naissance) sur le testicule jusqu'à l'âge adulte (Cabral *et al.*, 2014; Cabral *et al.*, 2018; Vendramini *et al.*, 2012; Vendramini *et al.*, 2010). Deux mois après la fin du traitement, de l'apoptose dans les cellules germinales, une diminution des comptes spermatiques, une diminution de la motilité des spermatozoïdes, une réduction du taux d'implantation, une réduction du nombre de fœtus lors d'accouplements avec des femelles contrôles et une diminution de l'index de fertilité ont été observés (Cabral *et al.*, 2014; Cabral *et al.*, 2018; Vendramini *et al.*, 2010). De plus, une baisse persistante de l'intégrité de la chromatine et une augmentation des cassures dans l'ADN des spermatozoïdes étaient associées à cet impact négatif sur la fertilité masculine (Cabral *et al.*, 2014; Cabral *et al.*, 2018; Vendramini *et al.*, 2012).

Tableau 1. Effets de la DXO dans le testicule pré-pubère de rongeur et impact de prétraitements avec des composés antioxydants.

Réf	Modèle	Traitement de DXO	Effet de la DXO	Traitement d'antioxydant	Effet de l'antioxydant	Effet de la combinaison
Cabral et al. (2014)	Rats (30 jours)	5mg/kg I.P. (1)	Après 1 et 2 mois: Altération histologie testicule, déplétion et apoptose germinales Après 1 mois: ↓ Poids testicule Après 2 mois: ↓ Production spz, altération morphologie et ↑ cassures dans l'ADN des spz	L-carnitine Prétraitement 250mg/kg 1h avant la DXO I.P.	Après 1 mois : ↑ volume testiculaire et diamètre des tubes séminifères	<u>Renversement partiel</u> : Altération histologie, plus de germinales, poids du testicule, ↓ apoptose germinales après 1 mois seulement, morphologie spz et cassures dans l'ADN des spz <u>Renversement total</u> : Production spz <u>Aucun effet</u> : Apoptose germinales après 2 mois
Cabral et al. (2018)	Rats (30 jours)	5mg/kg I.P. (1)	Après 2 mois : ↑ MDA, NO ↓ intégrité chromatine spz, fertilité, taux implantation ↑ résorptions, pertes post-implantatoires	L-carnitine Prétraitement 250mg/kg 1h avant la DXO I.P.	Aucun effet noté	<u>Renversement partiel</u> : MDA <u>Renversement total</u> : NO, intégrité de la chromatine spz, fertilité, résorptions, taux implantation
Jahnukainen et al. (2001)	Rats (6 jours)	3mg/kg I.P. (1)	Après 2 mois : ↓ poids testicule Altération histologie testicule	Amifostine Prétraitement 50mg/kg 15min avant la DXO I.P.	Aucun effet noté	<u>Renversement partiel</u> : Poids testicule <u>Aucun effet</u> : Altération histologie testicule
Hou et al. (2005)	Rats (6-16-24 jours)	3mg/kg I.P. (1)	Traitement à 6 jours : Après 24h et 48h : Altérations morphologiques des Sertoli Après 48h : ↑ Apoptose des germinales incluant spermatogonies ↓ Nb germinales ↓ Nb Sertoli Traitement à 16 et 24 jours: aucun effet noté	Amifostine Prétraitement 200mg/kg 15min avant la DXO I.P.	n.d.	<u>Aucun effet</u> : Apoptose des germinales Altération histologie du testicule en général

Vendramini et al. (2010)	Rats (30 jours)	5mg/kg I.P. (1)	<u>Après 15 jours, 1 et 2 mois :</u> Altération histologie testicule ↓ Croissance tube séminifère entre 15 jours et 1 mois <u>Après 2 mois :</u> ↓ Concentration, motilité spz ↑ Altération morphologie des spz ↓ Fertilité	Amifostine Prétraitement 400mg/kg 15min avant la DXO I.P.	<u>Après 15 jours, 1 et 2 mois:</u> Altération histologie testicule ↓ Croissance tube séminifère entre 1 et 2 mois	<u>Renversement partiel :</u> Altération histologie testicule Concentration et motilité spz Altération morphologie spz <u>Renversement total :</u> Croissance tube séminifère entre 15 jours et 1 mois (mais pas entre 1 et 2 mois) <u>Aggrave :</u> Fertilité
Vendramini et al. (2012)	Rats (30 jours)	5mg/kg I.P. (1)	<u>Après 2 mois :</u> Altération histologie testicule ↑ Cassures dans l'ADN spz ↓ Intégrité chromatine spz ↑ Nb embryons arrêtés à 4,5 jours, fragmentation des embryons de 2,5 et 4,5 jours ↓ Taux d'implantation	Amifostine Prétraitement 400mg/kg 15min avant la DXO I.P.	<u>Après 2 mois :</u> ↑ poids épидидyme, ↑ cassures dans l'ADN des spz Altère développement et fragmentation des embryons de 2,5 et 4,5 jours	<u>Renversement partiel :</u> Altération histologie testicule Embryons fragmentés à 2,5 jours <u>Aucun effet :</u> Intégrité chromatine spz Taux d'implantation <u>Aggrave :</u> Cassures dans l'ADN spz Embryons arrêtés à 2,5 et 4,5 jours Embryons fragmentés à 4,5 jours

Légende

Modèle : les paramètres de stress oxydatif ont été mesurés dans des lysats de testicule entier de rat. Les valeurs entre parenthèses indiquent l'âge à laquelle les animaux ont été traités.

Traitement de DXO : le chiffre entre parenthèses indique le nombre d'injections de DXO reçues au total.

Effet de la DXO : la période soulignée indique le temps écoulé entre la fin du traitement et l'évaluation des paramètres de toxicité dans le testicule.

Effet de l'antioxydant : indique, s'il y a lieu, les effets associés au traitement avec l'antioxydant seul.

Effet de la combinaison : indique l'effet de l'antioxydant sur les paramètres affectés par la DXO. Les effets sont classés (soulignés) selon l'absence d'effet (pas de différences significatives avec les contrôles n'ayant reçu que de la DXO), un effet partiel (différences significatives avec les contrôles n'ayant reçu aucun traitement et ceux n'ayant reçu que de la DXO) ou total (pas de différences significatives avec les contrôles n'ayant reçu aucun traitement).

DXO : doxorubicine; I.P. : intrapéritonéal; MDA : malondialdéhyde; Nb : nombre; n.d.: donnée non-disponible; NO : oxyde nitrique; spz : spermatozoïdes; ↑ augmentation des niveaux; ↓ diminution des niveaux.

4. Le stress oxydatif et la fertilité masculine

Le stress oxydatif est un mécanisme connu d'induction d'effets secondaires par la DXO (Kalyanaraman, 2013). L'impact négatif de la DXO sur la fertilité masculine pourrait donc lui aussi être lié à une induction de stress oxydatif dans le testicule pré-pubère.

4.1 Le stress oxydatif

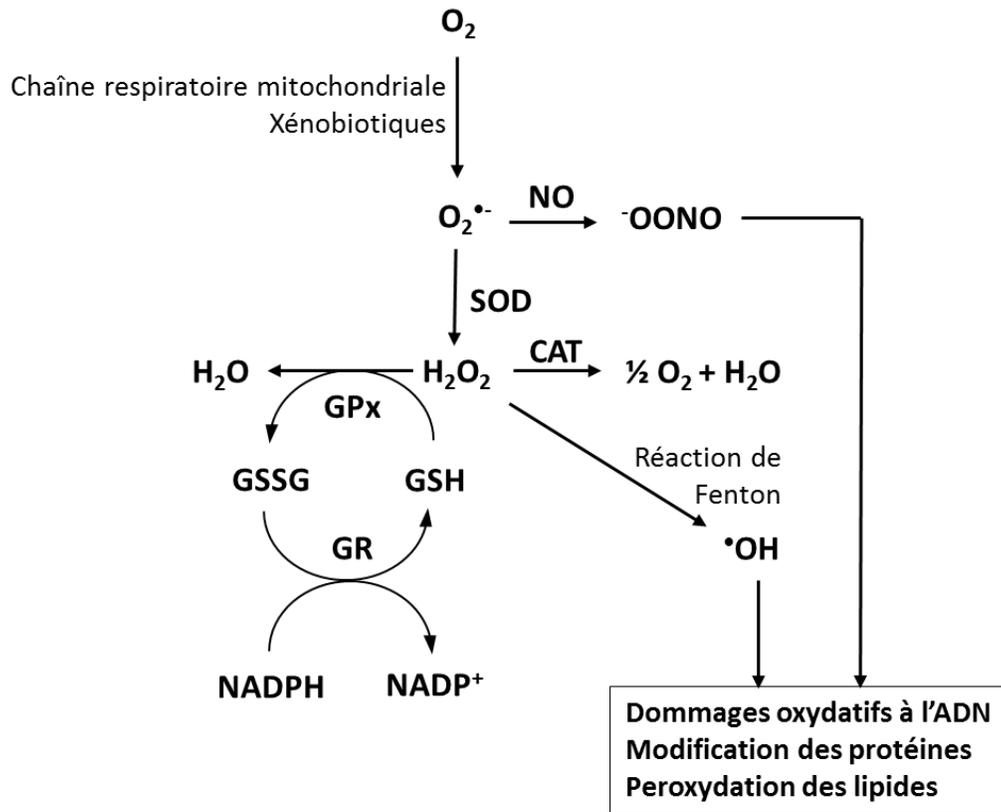
Le stress oxydatif se définit par un déséquilibre entre les niveaux d'antioxydants et de pro-oxydants cellulaires (Luczaj *et al.*, 2017). Les pro-oxydants incluent les EROs et ERAs, qui sont des composés hautement réactifs dérivés de l'oxygène et de l'azote (Turrens, 2003). Malgré leur potentiel inducteur de dommages cellulaires, les EROs sont continuellement produits par le métabolisme cellulaire aérobie en conditions normales (Pham-Huy *et al.*, 2008), et sont essentiels à plusieurs processus comme la transduction de signaux, la mort cellulaire et la régulation du cycle cellulaire (Wojtala *et al.*, 2014). Dans une cellule saine, les défenses antioxydantes permettent de contrôler les niveaux d'EROs intracellulaires. Un stress oxydatif peut donc provenir d'un excès d'EROs et/ou d'une diminution des défenses antioxydantes (Pisoschi & Pop, 2015; Poprac *et al.*, 2017).

4.1.1 Les espèces réactives de l'oxygène

La famille des EROs et ERAs inclut l'anion superoxyde et l'hydroxyle radical, deux radicaux libres possédant un électron non-pairé réactif (Boonstra & Post, 2004). Elle inclut aussi le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxyde d'azote même s'ils n'ont pas d'électron libre, car ils peuvent facilement générer des radicaux libres (Pham-Huy *et al.*, 2008). Les EROs sont formés par réduction de l'oxygène en anion superoxyde (Turrens, 2003) (Figure 6). En conditions physiologiques, cette réduction se fait via le CYP450 dans le réticulum endoplasmique et par des oxydoréductases dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Wojtala *et al.*, 2014). Dans les cellules saines, l'anion superoxyde est détoxifié en H_2O_2 par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD). L' H_2O_2 est à son tour réduit en eau par l'enzyme catalase (CAT) quand il est en concentrations faibles, ou encore via la glutathion peroxydase (GPx) quand les concentrations augmentent (Poprac *et al.*, 2017). Par contre, l' H_2O_2 peut être partiellement réduit en hydroxyle radical, soit l'un des plus puissants EROs, par une réaction avec le fer (Ayala *et al.*, 2014). Cette réaction se nomme la réaction de Fenton et prend place quand les enzymes ne parviennent pas

à détoxifier l' H_2O_2 en excès (Kalyanaraman, 2013; Pham-Huy *et al.*, 2008). D'un autre côté, la réaction de l'anion superoxyde en excès avec l'oxyde nitrique produit du peroxyde nitrique, un ERA fortement oxydant (Turrens, 2003) (Figure 6).

Figure 6. Les acteurs de l'équilibre intracellulaire pro-oxydants et antioxydants.



Les EROs sont formés par réduction de l'oxygène (O_2) en anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) via la chaîne respiratoire mitochondriale. L' $\text{O}_2^{\cdot-}$ est détoxifié par la superoxyde dismutase (SOD) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui lui est dégradé par la catalase (CAT) ou le système du glutathion. La glutathion peroxydase (GPx) dégrade l' H_2O_2 en consommant du glutathion réduit (GSH) qui devient oxydé (GSSG). Le GSSG est recyclé via la glutathion réductase (GR) NADPH-dépendante. Des xénobiotiques peuvent produire de grandes quantités d'anion superoxyde. Lorsqu'en excès, l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ réagit avec l'oxyde nitrique (NO) pour donner le peroxyde nitrique ($\cdot\text{OONO}$). L'excès d' H_2O_2 peut produire de l'hydroxyle radical ($\cdot\text{OH}$) par la réaction de Fenton. Le peroxyde nitrique et l'hydroxyle radical sont les principaux responsables des dommages oxydatifs cellulaires (Données tirées de Kalyanaraman, 2013).

Des xénobiotiques peuvent augmenter la production d'EROs intracellulaires (Ayala *et al.*, 2014; Dizdaroglu & Jaruga, 2012). Par exemple, plusieurs xénobiotiques comportant des cycles aromatiques et/ou des liaisons conjuguées, comme la DXO, interagissent avec la chaîne respiratoire mitochondriale et augmentent la production d'anion superoxyde via un cycle redox (voir section 3.3.2) (Gharagozloo & Aitken, 2011; Turrens, 2003) (Figure 6). Pour les études toxicologiques, plusieurs réactifs avec des sélectivités différentes sont disponibles sur le marché

pour mesurer la production d'EROs/ERAs dans des cellules en culture ou échantillons biologiques exposés à des toxiques. Pour notre étude, nous utilisons la sonde CellROX DeepRed (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), qui devient fluorescente par réaction avec l'anion superoxyde, l'hydroxyle radical, l' H_2O_2 et le peroxydite, permettant de quantifier les EROs/ERAs globaux en fonction des niveaux de fluorescence mesurés.

4.1.2 Les conséquences cellulaires

L'électron des radicaux libres est très instable et peut réagir avec l'ADN, les protéines et les lipides (Agnéz-Lima *et al.*, 2012; Pham-Huy *et al.*, 2008), causant ce qu'on appelle des dommages oxydatifs (Kalyanaraman, 2013) (Figure 6). Les dommages oxydatifs à l'ADN sont principalement induits par l'hydroxyle radical et le peroxydite (Kalyanaraman, 2013). La base de l'ADN la plus ciblée est la guanine, car elle est la plus facilement oxydée (Dizdaroglu & Jaruga, 2012). Pour notre étude *in vitro*, nous avons évalué le 8-oxo-désoxyguanosine (8-oxoDG). Cette forme oxydée de la guanine est le marqueur de dommages oxydatifs à l'ADN le plus étudié *in vivo* et *in vitro*, surtout à cause de son haut pouvoir mutagène (Dizdaroglu & Jaruga, 2012). Heureusement, les bases oxydées de l'ADN peuvent être remplacées par la voie de réparation par excision de base (Agnéz-Lima *et al.*, 2012). Spécifiquement pour le 8-oxoDG, la *8-Oxoguanine DNA glycosylase* (Ogg1) est responsable d'exciser le nucléotide oxydé, puis laisse un site abasique réparable par cette voie (Agnéz-Lima *et al.*, 2012). Il est important de noter que les dommages oxydatifs à l'ADN peuvent initier d'autres types de dommages à l'ADN. Par exemple, le sucre des nucléosides de l'ADN peut être attaqué par l'hydroxyle radical, ce qui forme des cassures simple brin (Dizdaroglu & Jaruga, 2012).

De plus, la réaction des EROs/ERAs avec les protéines peut causer la formation de groupements carbonyles et nitrates (Kalyanaraman, 2013), l'oxydation des méthionines et des cystéines, la fragmentation des chaînes peptidiques (Noori, 2012) ou la création de liens transversaux entre les protéines (Boonstra & Post, 2004). Cela peut modifier, activer ou inhiber l'activité des protéines touchées, et donc perturber les processus cellulaires reliés. Le marqueur de dommages oxydatifs aux protéines le plus commun est la mesure des groupements carbonylés *in vitro* (Noori, 2012).

Finalement, l'hydroxyle radical et le peroxydite en excès peuvent endommager les membranes cellulaires par la peroxydation des lipides, un processus de réaction en chaîne lors duquel les lipides radicaux oxydés oxydent d'autres lipides (Niki, 2009). Cette réaction peut se propager en continu jusqu'à la terminaison par un antioxydant comme la vitamine E, ce qui libère des hydroperoxydes de lipides (LOOH) (Kalyanaraman, 2013). Par contre, en présence de fer, les

LOOH se décomposent rapidement en aldéhydes toxiques (Kalyanaraman, 2013). Vu l'instabilité des LOOH, la détection de la peroxydation des lipides membranaires lors d'études toxicologiques se fait en quantifiant certains de ces aldéhydes, les plus populaires étant le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonanal (Niki, 2009; Poprac *et al.*, 2017).

En plus de causer des dommages oxydatifs pouvant mener à la mort cellulaire (Ayala *et al.*, 2014), une augmentation d'EROs au niveau mitochondrial peut directement activer la voie intrinsèque de l'apoptose, en augmentant la perméabilité membranaire mitochondriale et en causant le relargage subséquent du cytochrome C (Turrens, 2003). L'apoptose agit comme dernière voie de défense contre le stress oxydatif, en éliminant de manière contrôlée les cellules dont les dommages sont trop grands pour être réparés (Boonstra & Post, 2004). La nécrose peut aussi être induite par un stress oxydatif d'une très forte intensité (Boonstra & Post, 2004).

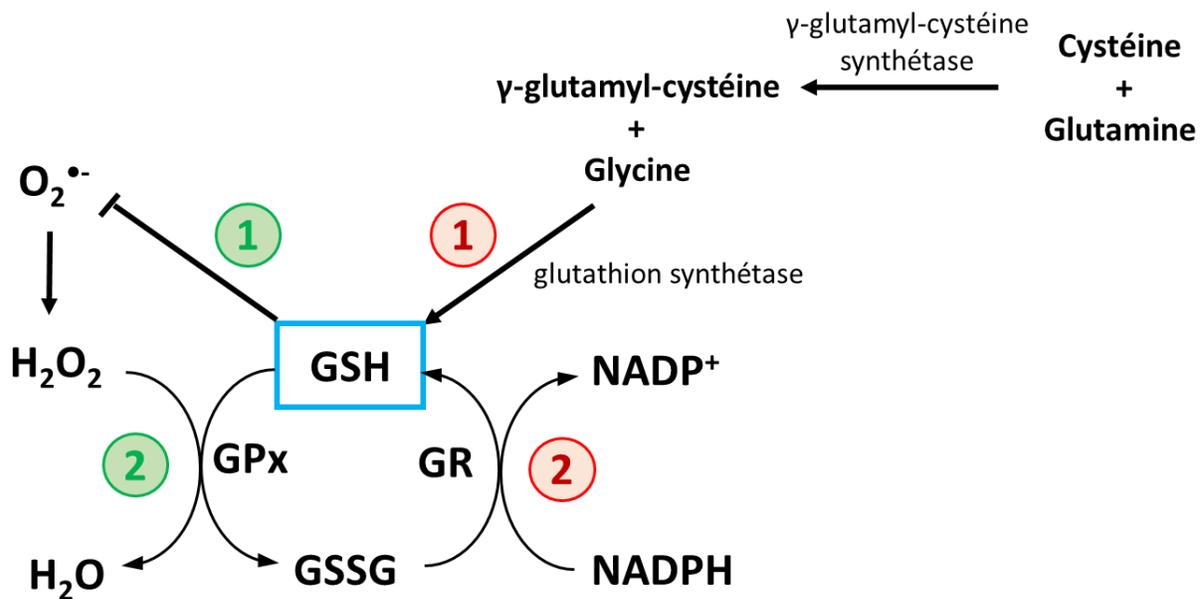
4.2 Les systèmes de défense contre les EROs

Afin de maintenir des niveaux optimaux d'EROs, le système de défense des cellules fait intervenir différents acteurs : les enzymes antioxydantes, les antioxydants non-enzymatiques et les facteurs de transcription régulant la balance oxydative. Les enzymes antioxydantes participent à la détoxification des EROs/ERAs. On y compte par exemple la SOD, une enzyme de la matrice mitochondriale (forme couplée au manganèse; Mn-SOD) ou cytoplasmique (forme couplée au cuivre et zinc; CuZn-SOD) (Kalyanaraman, 2013) et la CAT, présente dans les peroxysomes (Boonstra & Post, 2004) (Figure 6). Les antioxydants non-enzymatiques incluent des protéines comme la transferrine (Pisoschi & Pop, 2015) et de petites molécules comme le coenzyme Q, la vitamine E (Turrens, 2003) et la vitamine C (Pan *et al.*, 2009) (voir section 4.4.2). Finalement, certains facteurs de transcription permettent l'expression de gènes de défense antioxydante. Par exemple, l'augmentation modérée des EROs intracellulaires active la voie de signalisation de Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*)-Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), lors de laquelle Nrf2 transloque au noyau et lie les éléments de la réponse antioxydante (*Antioxidant Response Elements*) sur l'ADN, ce qui permet la transcription de gènes comme la SOD et la CAT (Luczaj *et al.*, 2017).

Le système du GSH est un acteur important dans la défense antioxydante des cellules. Il fait intervenir des enzymes et des antioxydants non-enzymatiques dont l'expression est régulée par le facteur de transcription Nrf2 (Luczaj *et al.*, 2017). Le GSH est un tri-peptide composé de glutamine, cystéine et glycine. Deux systèmes permettent de maintenir des niveaux de GSH adéquats (Figure 7). D'abord, il peut être synthétisé *de novo* en deux étapes enzymatiques ATP-

dépendantes (Dalto & Matte, 2017; Kaneko *et al.*, 2002). L'étape limitante de cette synthèse est catalysée par l'enzyme γ -glutamyl-cystéine synthétase et produit la γ -glutamyl-cystéine à partir de glutamine et cystéine. Ensuite, la glutathion synthétase ajoute la glycine pour former le GSH (Dalto & Matte, 2017). Les niveaux cellulaires de cystéine et l'activité de la γ -glutamyl-cystéine synthétase, dont l'expression est régulée par le facteur Nrf2, déterminent la synthèse du GSH (Elbini Dhouib *et al.*, 2016). Le deuxième système implique une réduction du GSH à partir de sa forme oxydée (GSSG) par l'enzyme glutathion réductase (GR) qui consomme du NADPH (Luczaj *et al.*, 2017).

Figure 7. Le système d'antioxydant du glutathion.



Les niveaux de glutathion réduit (GSH) sont maintenus par deux voies indiquées par les cercles rouges : 1- la voie de synthèse de novo à partir d'acides aminés et 2- le recyclage du glutathion oxydé (GSSG) via la glutathion réductase (GR) NADPH-dépendante. L'activité antioxydante du GSH implique deux principaux mécanismes indiqués par les cercles verts : 1- la capture des radicaux libres comme l'anion superoxyde (O₂^{•-}) et 2- la détoxification du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par l'enzyme glutathion peroxydase (GPx) (Données tirées de Kalyanaraman, 2013).

Le GSH a deux fonctions principales, soit le contrôle du stress oxydatif (Dalto & Matte, 2017) et la détoxification de diverses molécules (Kaneko *et al.*, 2002). Le GSH est considéré comme un antioxydant non-enzymatique car il peut directement piéger les radicaux libres (Sebastia *et al.*, 2003) (Figure 7). De plus, il agit comme un donneur d'électrons pour la séléno-enzyme GPx, qui détoxifie l'H₂O₂ (Kaneko *et al.*, 2002). Lors de ce processus, le GSH passe de sa forme réduite à oxydée, en donnant son électron au peroxyde qui devient alors de l'eau (Kalyanaraman, 2013).

La GPx peut aussi détoxifier les LOOH (Luczaj *et al.*, 2017) et régénérer les réserves d'antioxydants non-enzymatiques comme la vitamine C (Kalyanaraman, 2013). Pour ce qui est de sa fonction de détoxification, la glutathion s-transférase (GST) est responsable de conjuguer le GSH aux xénobiotiques (Kaneko *et al.*, 2002) ou à des sous-produits du métabolisme comme le 4-hydroxynonanal (Zimniak, 2011). La conjugaison du GSH par la GST peut être exploitée pour évaluer les niveaux intracellulaires de GSH ou de glutathion total lors d'études *in vitro* de stress oxydatif. La sonde monochlorobimane (mCB) utilisée dans notre étude devient fluorescente après conjugaison au GSH, et permet donc d'en évaluer les niveaux dans des cellules vivantes (Sebastia *et al.*, 2003).

4.3 Le stress oxydatif en lien avec l'infertilité masculine

En niveaux contrôlés, les EROs sont essentiels au système reproducteur masculin, en participant par exemple à l'auto-renouvellement des SSCs ou à la maturation des spermatozoïdes (Conrad *et al.*, 2015). En parallèle, le stress oxydatif a été de maintes fois montré comme délétère pour la fonction spermatique, avec le potentiel de compromettre la fertilité masculine (Majzoub & Agarwal, 2017; Tremellen, 2008). Il a été montré que les hommes adultes souffrant d'infertilité ont des niveaux d'EROs plus élevés (Agarwal *et al.*, 2006) ou encore des défenses antioxydantes diminuées dans le liquide séminal ou les spermatozoïdes par rapport à des hommes fertiles (Garrido *et al.*, 2004). Par exemple, l'activité de la GPx4 dans le sperme d'hommes infertiles est significativement réduite par rapport à des hommes contrôles fertiles (Garrido *et al.*, 2004). Un excès d'EROs peut causer de l'infertilité chez l'homme en induisant des dommages à l'ADN comme des cassures simple et double brin, des sites abasiques et des liens transversaux, ainsi que des dommages aux membranes plasmiques et mitochondriales des spermatozoïdes (Gharagozloo & Aitken, 2011). Dans le testicule, un stress oxydatif peut être induit par des conditions pathologiques comme le diabète ou l'obésité (Tremellen, 2008), mais aussi par l'exposition du testicule adulte ou immature à des polluants environnementaux (Sedha *et al.*, 2015; Shono & Taguchi, 2014) ou des agents de chimiothérapie (Cabral *et al.*, 2018).

4.4 L'utilisation des antioxydants comme protecteurs de la fertilité

En raison de l'implication du stress oxydatif dans l'infertilité masculine, deux applications cliniques principales ont été proposées dans la littérature quant à l'utilisation des antioxydants oraux : 1- pour améliorer la fertilité des hommes adultes souffrant d'infertilité et 2- pour prévenir d'éventuels

problèmes de fertilité reliés à une exposition à des composés gonadotoxiques. Chacune de ses applications est décrite brièvement dans la section ci-dessous.

4.4.1 Les antioxydants et l'infertilité masculine

Dans la dernière décennie, plusieurs revues ont fait le point sur la première application des antioxydants, soit le traitement oral d'antioxydants non-enzymatiques pour améliorer la fertilité d'hommes adultes infertiles. Une douzaine d'antioxydants ont déjà été évalués en clinique, seuls ou en combinaison (Gharagozloo & Aitken, 2011), incluant les vitamines E et C, la carnitine, le N-acétylcystéine (NAC), ainsi que les cofacteurs d'enzymes antioxydantes sélénium et zinc (Majzoub & Agarwal, 2017). Une revue de Cochrane a montré qu'une supplémentation orale en antioxydants améliore significativement le taux de grossesse engendrées par des hommes adultes avec des problèmes de fertilité (Showell *et al.*, 2014). Cette même revue a décrit une diminution de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, mais une forte hétérogénéité en ce qui concerne la motilité et la concentration spermatique en réponse aux antioxydants oraux (Showell *et al.*, 2014). Deux autres revues ont sélectionné respectivement 20 et 17 études cliniques sur l'impact des d'antioxydants oraux chez des hommes infertiles (Gharagozloo & Aitken, 2011; Ross *et al.*, 2010). Dans ces revues, plus de 75% des études montrent une amélioration significative d'au moins un paramètre spermatique (stress oxydatif, fragmentation de l'ADN, motilité, concentration ou morphologie) et 60% montrent une amélioration du taux de fécondation ou de grossesse (Gharagozloo & Aitken, 2011; Ross *et al.*, 2010). Des effets bénéfiques similaires sont observables dans les études sur les rongeurs adultes. Par exemple, le traitement oral avec une mixture d'antioxydants est bénéfique sur les niveaux de 8-oxoDG dans l'ADN des spermatozoïdes de rats KO pour la GPx5 (Gharagozloo *et al.*, 2016). De plus, des rats sous-fertiles dû à un stress oxydatif causé par un choc thermique scrotal ont vu leurs taux de grossesse significativement améliorés par ce même traitement d'antioxydants (Gharagozloo *et al.*, 2016).

En parallèle à ces études s'est développée la deuxième application des antioxydants, soit l'idée de les utiliser pour protéger le testicule contre des toxiques et d'ainsi prévenir d'éventuels problèmes de fertilité. Il y a une soixantaine d'années, les premiers articles expérimentaux ont montré une amélioration de l'histologie et du poids du testicule de rongeurs exposés à des métaux lourds comme le cadmium par un pré- ou un co-traitement avec du zinc, du sélénium ou de la cystéine (Gunn *et al.*, 1968; Parizek, 1957). À l'époque, les mécanismes de protection impliqués n'étaient pas connus (Gunn *et al.*, 1968). Ce n'est que plus tard que l'implication d'une activité antioxydante de la vitamine C et de la vitamine E contre le stress oxydatif testiculaire induit par le

cadmium a été mieux décrite (Sen Gupta *et al.*, 2004). En ce qui concerne les chimiothérapies, les premières études utilisant des antioxydants pour protéger le testicule de rongeur contre des composés comme la CPA et la DXO remontent au début des années 2000 (Das *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2002). Depuis, des dizaines d'études ont été réalisées avec une très grande variété de composés antioxydants, en majorité sur le testicule adulte. Cette deuxième application des antioxydants est donc celle d'intérêt pour notre étude des solutions de préservation de la fertilité masculine en cas de cancer pédiatrique.

4.4.2 Les antioxydants non-enzymatiques

Le type d'antioxydant ayant été testé expérimentalement pour protéger le testicule contre les chimiothérapies est les antioxydants non-enzymatiques, qui regroupent une vaste sélection de composés aux origines et aux propriétés variées. Ils peuvent être d'origine endogène, synthétisés de manière intracellulaire, ou exogène, acquis via les aliments et les suppléments alimentaires (Pisoschi & Pop, 2015). Par exemple, les vitamines C et E, les carotènes et les ubiquinol peuvent être synthétisés de manière endogène (Noori, 2012), mais pourraient aussi être acquis par des suppléments. Les composés antioxydants d'origine exogènes sont souvent retrouvés dans les plantes (composés phytochimiques) et sont classés selon leur structure chimique en différents groupes comme les flavonoïdes, les anthocyanines et les catéchines (Noori, 2012). Il existe aussi des antioxydants exogènes pharmaceutiques comme l'amifostine ou la doxycycline (Injac & Strukelj, 2008).

L'efficacité des antioxydants dans des conditions données dépend de plusieurs paramètres : leur potentiel d'oxydoréduction, leur solubilité, leur stabilité en fonction du pH et de la température (Noori, 2012). En effet, les mécanismes d'action des antioxydants dépendent de leur localisation cellulaire, qui elle dépend entre autres de leur solubilité. Par exemple, la vitamine E lipophile agit en neutralisant les LOOH pendant le processus de peroxydation des lipides membranaires (Kalyanaraman, 2013). Au contraire, la vitamine C hydrosoluble va réagir avec les EROs comme l'hydroxyle radical ou l'anion superoxyde au niveau cytoplasmique (Kalyanaraman, 2013). De plus, les antioxydants ont différents modes d'action en fonction de leur structure chimique. Certains agissent en limitant la formation d'EROs, comme c'est le cas pour le zinc et le sélénium qui agissent comme cofacteurs d'enzymes antioxydantes (Pisoschi & Pop, 2015), ce qui augmente la défense antioxydante des cellules. La transferrine est une protéine qui, quant à elle, peut prévenir la formation d'EROs en chélatant le fer responsable de la réaction de Fenton

(Pisoschi & Pop, 2015). D'autres antioxydants agissent plutôt une fois que les EROs sont formés, en tant que piègeurs de radicaux libres, comme la vitamine C (Huang *et al.*, 2005).

4.4.3 L'impact des antioxydants sur la gonadotoxicité de la doxorubicine

La DXO est le composé de chimiothérapie qui a été le plus étudié pour l'induction de stress oxydatif testiculaire et la protection par des antioxydants *in vivo*. Bien sûr, la DXO n'est pas le seul composé de chimiothérapie capable d'induire du stress oxydatif, que ce soit de manière générale (Chen *et al.*, 2007) ou spécifiquement au niveau testiculaire. En effet, l'agent alkylant CPA (Oyagbemi *et al.*, 2016) ou une combinaison de CP-étoposide-bléomycine (Madhu *et al.*, 2016) ont été associés avec un stress oxydatif dans le testicule de rat mâle adulte. Par contre, la diminution de l'utilisation des agents alkylants pour traiter les cancers comme la leucémie pédiatrique (Institute of Medicine (US) and National Research Council (US) National Cancer Policy Board, 2003; Martinez *et al.*, 2017; Viviani *et al.*, 1985) au profit de l'utilisation d'autres classes de chimiothérapie font de la DXO un modèle d'étude pertinent pour le stress oxydatif testiculaire et la protection par des antioxydants.

Le Tableau 2 montre une liste non-exhaustive des études de stress oxydatif dans le testicule de rongeur adulte, principalement le rat, suite à un traitement intraveineux ou intrapéritonéal de DXO. En analysant les lysats de testicules entiers des animaux traités, il a été montré que la DXO en exposition sub-chronique (Das *et al.*, 2012) ou chronique (Pahalathan *et al.*, 2006b) augmente les niveaux d'EROs testiculaires. Elle cause aussi la peroxydation des lipides, qui est le dommage oxydatif le plus étudié en réponse à la DXO, visible par les niveaux de MDA testiculaire augmentés après une exposition chronique (Ceribasi *et al.*, 2012; Mohamed *et al.*, 2015; Trivedi *et al.*, 2010) sub-chronique (Das *et al.*, 2012; Georgy & Maher, 2017; Yeh *et al.*, 2007) ou aiguë (Ahmed *et al.*, 2013; Atessahin *et al.*, 2006; Attia *et al.*, 2010; Saalu *et al.*, 2010; Uyeturk *et al.*, 2014). De plus, la DXO augmente les dommages oxydatifs à l'ADN, comme le 8-oxoDG (Pahalathan *et al.*, 2006a), et les dommages aux protéines (Pahalathan *et al.*, 2006a; Pahalathan *et al.*, 2006b). D'autre part, une diminution des défenses antioxydantes testiculaires a été observée en réponse à la DXO. D'abord, les défenses enzymatiques sont affectées, notamment par une diminution de l'activité de la CAT, la SOD, la GR, la GPx et la GST (Ceribasi *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2012; Mohamed *et al.*, 2015; Saalu *et al.*, 2010; Uyeturk *et al.*, 2014; Yeh *et al.*, 2007). De plus, l'expression de certaines enzymes antioxydantes est diminuée dans le testicule, comme la GPx spécifique aux hydroperoxydes de phospholipides (PHGPx) (Pahalathan *et al.*, 2006b) et la CuZn-SOD (Yeh *et al.*, 2007). Les niveaux d'antioxydants non-enzymatiques testiculaires sont

également diminués, comme c'est le cas pour le GSH (Ahmed *et al.*, 2013; Atessahin *et al.*, 2006; Attia *et al.*, 2010; Georgy & Maher, 2017; Saalu *et al.*, 2010; Trivedi *et al.*, 2010) ainsi que le ratio GSH/GSSG (Das *et al.*, 2012). Une seule étude rapporte, au contraire, une augmentation du GSH (Ceribasi *et al.*, 2012) qui pourrait être due à une adaptation par augmentation des défenses antioxydantes testiculaires suite à une exposition chronique de 8 semaines à la DXO, comparé à moins de 5 semaines pour les autres études. Pour finir, une étude s'est intéressée spécifiquement à la fraction mitochondriale du testicule, et montre une augmentation d'H₂O₂ et de MDA, une diminution de l'activité de la SOD, GPx et GR ainsi que des niveaux de GSH, vitamine C et E (Pralalathan *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent une importance de la mitochondrie dans le stress oxydatif et les conséquences testiculaires de la DXO.

Tableau 2. Paramètres de stress oxydatif induits par la DXO dans le testicule adulte de rongeur et impact de pré/post-traitements avec des composés antioxydants.

Réf	Modèle	Traitement de DXO	Effet de la DXO	Traitement d'antioxydant	Effet de la combinaison
Ahmed <i>et al.</i> (2013)	Rat	10mg/kg I.V. (1)	↑ MDA ↓ GSH	Écorce de <i>F. racemosa</i> Prétraitement 500mg/kg, 1X/jour, total 9 jours Gavage (9)	<u>Renversement total</u> : MDA, GSH
Attia <i>et al.</i> (2010)	Souris	12mg/kg I.P. (1)	↑ MDA ↓ GSH	Proanthocyanidines, Pré- et post-traitement 100mg/kg, 1X/jour, total 7 jours en pré- et 7 jours en post-traitement Gavage (14)	<u>Renversement partiel</u> : MDA, GSH
Atessahin <i>et al.</i> (2006)	Rat	10mg/kg I.P. (1)	↑ MDA ↓ GSH	Lycopène Prétraitement 4mg/kg, 1X/jour, total 10 jours Gavage (10)	<u>Renversement total</u> : MDA <u>Renversement partiel</u> : GSH
Ceribasi <i>et al.</i> (2012)	Rat	2mg/kg [16mg/kg] 1X/semaine, total 8 semaines I.P. (8)	↑ MDA ↑ GSH ↑ CAT	Acide ellagique Post-traitement sur 8 semaines 2mg/kg 1X/jour, 6X/semaine, total 8 semaines Gavage (48)	<u>Renversement total</u> : MDA <u>Aucun effet</u> : GSH <u>Autres effets</u> : ↑ GPx, CAT
Das <i>et al.</i> (2012)	Rat	3mg/kg [9mg/kg] 1X aux deux jours I.P. (3)	↑ EROs, MDA ↓ GSH, GSH/GSSG ↓ SOD, CAT, GST, GPx, GR	Taurine Prétraitement 150mg/kg, 1X/jour 1 jour avant DXO Gavage (3)	<u>Renversement total</u> : Tous les paramètres
Georgy and Maher (2017)	Rat	5mg/kg [20mg/kg] 1X aux trois jours I.P. (4)	↑ MDA ↓ GSH	Acide ellagique 10mg/kg et/ou Acide rosmarinique 75mg/kg Pré- et post-traitement 1X/jour, total 2 semaines Gavage (14)	Acide ellagique, rosmarinique ou la combinaison des deux : <u>Renversement total</u> : MDA, GSH

Prahalathan <i>et al.</i> (2005)	Rat (Fraction mitochondriale du testicule)	1mg/kg [10mg/kg] 1X/semaine, total 10 semaines I.V. (10)	↑ MDA, H ₂ O ₂ ↓ GSH, VitC, VitE ↓ SOD, GPx, GR	Acide lipoïque Prétraitement 35mg/kg, 1X/jour, 1 jour avant DXO I.P. (10)	<u>Renversement total</u> : MDA GSH, VitC, VitE SOD, GPx, GR <u>Renversement partiel</u> : H ₂ O ₂
Prahalathan <i>et al.</i> (2006a)	Rat	1mg/kg [10mg/kg] 1X/semaine, total 10 semaines I.V. (10)	↑ 8-oxoDG ↑ protéines carbonylées	Acide lipoïque Prétraitement 35mg/kg, 1X/jour, 1 jour avant DXO I.P. (10)	<u>Renversement total</u> : Protéines carbonylées <u>Renversement partiel</u> : 8-oxoDG
Prahalathan <i>et al.</i> (2006b)	Rat	1mg/kg [10mg/kg] 1X/semaine, total 10 semaines I.V. (10)	↑ EROs ↓ Thiols et Thiols non-protéiques ↓ expression PHGPx	Acide lipoïque Prétraitement 35mg/kg, 1X/jour, 1 jour avant DXO I.P. (10)	<u>Renversement total</u> : Tous les paramètres
Uyeturk <i>et al.</i> (2014)	Rat	10mg/kg I.P. (1)	↑ MDA ↓ GPx	Acide rosmarinique Pré- et post-traitement 50mg/kg, 1X/jour, total 7 jours en pré-traitement et 3 jours en post-traitement Gavage (10)	<u>Renversement partiel</u> : MDA, GPx
Yeh <i>et al.</i> (2007)	Souris	3mg/kg [9mg/kg] 1X aux deux jours I.P. (3)	↑ MDA ↓ SOD, GPx ↓ expression CuZn-SOD	Doxycycline Prétraitement 2,5mg/Kg, 1X/jour, 1 jour avant DXO I.P. (3)	<u>Renversement total</u> : MDA, SOD, expression Cu/Zn SOD <u>Aucun effet</u> : GPx
Mohamed <i>et al.</i> (2015)	Rat	2mg/kg [16mg/kg] 1X/semaine, total 8 semaines I.P. (8)	↑ MDA ↓ SOD, CAT, GPx	n.d.	n.d.

Saalu et al. (2010)	Rat	10mg/kg I.P. (1)	↑ MDA ↓ GSH ↓ SOD, CAT, GPx	n.d.	n.d.
Trivedi et al. (2010)	Rat	1,25 - 2,5 - 5mg/kg [6,65 – 12,5 – 25mg/kg] 1X/semaine, total 5 semaines I.P. (5)	2,5 et 5mg/kg: ↑ MDA 5mg/kg: ↓ GSH	n.d.	n.d.

Légende :

Modèle : sauf si spécifié autrement, les paramètres de stress oxydatif ont été mesurés dans des lysats de testicules entiers de rats ou de souris.
 Traitement de DXO : les valeurs entre crochets indiquent la dose cumulée de DXO reçue. Le chiffre entre parenthèses indique le nombre d'injections de DXO reçues au total.

Traitement d'antioxydant : Le chiffre entre parenthèses indique le nombre de doses d'antioxydants reçues au total.

Effet de la combinaison : indique l'effet de l'antioxydant sur les paramètres affectés par la DXO.

8-oxoDG : 8-oxo-désoxyguanosine; CAT : catalase; CuZn-SOD : Superoxyde dismutase, forme couplée au cuivre et zinc; DXO : doxorubicine; EROs : espèces réactives de l'oxygène; GPx : glutathion peroxydase; GR : glutathion réductase; GSH : glutathion réduit; GSSG : glutathion oxydé; GST : glutathion s-transférase; H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène; I.P. : injection intrapéritonéale; I.V. : injection intraveineuse; MDA : malondialdéhyde; n.d. : donnée non-disponible; PHGPx : glutathion peroxydase pour les hydroperoxydes de phospholipides; SOD : superoxyde dismutase; spz : spermatozoïdes; VitC : vitamine C; VitE : vitamine E; X : nombre de traitements reçus pour une période donnée; ↑ augmentation des niveaux (marqueurs) ou de l'activité (enzymes, sauf si spécifié); ↓ diminution des niveaux (marqueurs) ou de l'activité (enzymes, sauf si spécifié).

Vu le déséquilibre entre les pro-oxydants et les antioxydants induit par la DXO, plusieurs études du Tableau 2 ont testé l'impact de composés antioxydants sur la toxicité de la DXO sur le testicule adulte. Dans ces études, les antioxydants ont été administrés par voie orale ou intrapéritonéale, en prétraitement (Ahmed *et al.*, 2013; Atessahin *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2012; Pahalathan *et al.*, 2005; Pahalathan *et al.*, 2006a; Pahalathan *et al.*, 2006b; Yeh *et al.*, 2007) et/ou post-traitement (Attia *et al.*, 2010; Ceribasi *et al.*, 2012; Uyeturk *et al.*, 2014) par rapport à la DXO. De manière globale, les antioxydants ont rétabli totalement ou partiellement les niveaux d'au moins un des paramètres de stress oxydatif étudiés, comme le MDA, le GSH (Ahmed *et al.*, 2013; Atessahin *et al.*, 2006; Attia *et al.*, 2010; Georgy & Maher, 2017; Uyeturk *et al.*, 2014), le 8-oxoDG (Pahalathan *et al.*, 2006a) et l'activité d'enzymes antioxydantes (Das *et al.*, 2012; Pahalathan *et al.*, 2005; Uyeturk *et al.*, 2014). Quelques paramètres n'étaient pas améliorés par les antioxydants dans certains cas, comme le GSH par l'acide ellagique (Ceribasi *et al.*, 2012) ou l'activité de la GPx par la doxycycline (Yeh *et al.*, 2007). Malheureusement, aucune étude présentée dans le Tableau 2 n'a étudié l'impact de cette réduction du stress oxydatif sur la fertilité des mâles exposés à la DXO, qui aurait pu être mesurée en réalisant des accouplements avec des femelles contrôles. En se basant sur ce tableau uniquement, il n'est pas possible de déterminer quels antioxydants et quels protocoles sont les plus prometteurs, à cause de la grande variabilité dans les choix de composés et les cinétiques de traitement à la DXO et aux antioxydants. Une revue exhaustive de la littérature serait nécessaire pour tirer de telles conclusions.

En ce qui concerne l'exposition du testicule pré-pubère à la DXO, une seule étude a évalué le stress oxydatif (Tableau 1). Cabral *et al.* ont traité des rats pré-pubères de 30 jours à une dose de DXO par injection intrapéritonéale, ce qui a induit une augmentation des niveaux de MDA et d'oxyde nitrique dans le testicule entier une fois les rongeurs adultes (Cabral *et al.*, 2018). Ce stress oxydatif était accompagné d'une baisse d'intégrité de la chromatine des spermatozoïdes et d'une baisse de fertilité lors d'accouplements avec des femelles non-traitées. Cependant, cette étude, comme pour celles du Tableau 2, ne permet pas de savoir dans quels types cellulaires du testicule adulte ou immature les paramètres de stress oxydatif sont affectés.

Le Tableau 1 montre les effets des deux seuls antioxydants testés contre une exposition pré-pubère de rongeurs à la DXO, soit la carnitine et l'amifostine. Tous deux ont été administrés par voie intrapéritonéale en prétraitement de 15min (amifostine) ou de 1h (carnitine) avant la DXO. Chez des rats de 6 jours, l'amifostine, un composé pharmaceutique, n'a pas diminué la toxicité testiculaire dans les 24h à 48h après traitement à la DXO (Hou *et al.*, 2005). Cependant,

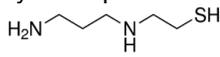
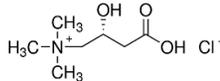
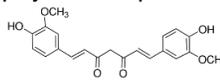
l'amifostine a permis de renverser la perte de poids du testicule 2 mois après le traitement, sans toutefois améliorer son histologie en général (Jahnukainen *et al.*, 2001). Lors de traitements de rats de 30 jours, l'amifostine a amélioré l'histologie testiculaire, la concentration, la motilité et la morphologie des spermatozoïdes 2 mois après traitement de DXO (Vendramini *et al.*, 2012; Vendramini *et al.*, 2010). Ces différences dans l'amélioration de l'histologie testiculaire par l'amifostine pourraient être liées à une sensibilité à la DXO plus forte des rats plus jeunes, ou encore à l'utilisation de doses différentes d'amifostine (200mg/kg et 400mg/kg respectivement) (Jahnukainen *et al.*, 2001; Vendramini *et al.*, 2010). Dans les études de Vendramini, certains effets négatifs de la DXO ont par contre été aggravés par l'amifostine même 2 mois après traitement, comme les cassures dans l'ADN des spermatozoïdes, la fertilité et la perturbation du développement embryonnaire précoce (Vendramini *et al.*, 2012; Vendramini *et al.*, 2010). Au contraire, lors de prétraitements avec la carnitine, un antioxydant endogène, la majorité des paramètres de toxicité de la DXO ont été totalement ou partiellement améliorés, comme l'histologie du testicule, les cassures dans l'ADN des spermatozoïdes, la production de spermatozoïdes ainsi que la fertilité des mâles une fois adultes (Cabral *et al.*, 2014; Cabral *et al.*, 2018). Ceci était associé à une réduction des marqueurs de stress oxydatif testiculaires (MDA, oxyde nitrique), ce qui met en évidence le potentiel protecteur des antioxydants. Par contre, comme suggéré par les différences d'efficacité entre l'amifostine et la carnitine, les effets de protection du testicule pré-pubère semblent dépendre du composé antioxydant sélectionné. De plus, vu les effets de protection partiels souvent observés en présence des antioxydants (Cabral *et al.*, 2014; Cabral *et al.*, 2018; Yeh *et al.*, 2007), il reste difficile de déterminer si les antioxydants représentent vraiment une voie prometteuse de préservation *in situ* de la fertilité masculine lors de traitements de chimiothérapies pédiatriques.

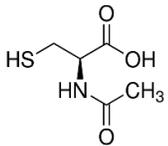
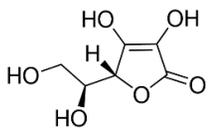
4.4.4 Les composés antioxydants sélectionnés

Dans le but d'évaluer l'impact d'antioxydants sur la gonadotoxicité de la DXO *in vitro*, nous avons utilisé pour cette étude cinq composés antioxydants non-enzymatiques: l'amifostine, la carnitine, le curcumin, le NAC et la vitamine C. La structure, les propriétés générales ainsi que des exemples d'études de protection *in vitro* et *in vivo* contre un stress oxydatif pour chacun de ces composés sont listés dans le Tableau 3. Très brièvement, les composés ont été sélectionnés pour les raisons suivantes. D'abord, l'amifostine est l'un des deux seuls composés antioxydants à avoir été testé *in vivo* pour une protection du testicule pré-pubère contre la DXO (Hou *et al.*, 2005; Jahnukainen *et al.*, 2001; Vendramini *et al.*, 2012; Vendramini *et al.*, 2010). Il s'agit du seul composé

synthétique testé dans notre étude et il a été approuvé pour utilisation en clinique par l'US Food and Drug Administration (FDA) en tant que protecteur contre les effets secondaires de certains régimes de traitements anticancer spécifiques (Hensley *et al.*, 2009). De plus, l'amifostine a été décrite comme protecteur spécifique des tissus normaux et non des tissus cancéreux (Lee *et al.*, 2003). La carnitine est le second composé ayant été testé *in vivo* contre la DXO dans le testicule pré-pubère de rat (Cabral *et al.*, 2014; Cabral *et al.*, 2018). De plus, la carnitine possède un rôle important dans le système reproducteur masculin. En effet, elle est hautement concentrée dans l'épididyme et une supplémentation orale chez des hommes souffrant d'infertilité idiopathique améliore la motilité spermatique (Mongioi *et al.*, 2016). Le curcumin, quant à lui, est un composé phytochimique avec une forte activité antioxydante, qui a montré un potentiel protecteur contre la DXO *in vivo* au niveau du cœur de rat (Swamy *et al.*, 2012). Le NAC a été sélectionné pour sa capacité à supplémenter les GSH intracellulaires *in vitro* suite à l'exposition de cellules en culture à des oxydants, comme c'est le cas des neurones et astrocytes de rats exposés au méthylmercure (Kaur *et al.*, 2006). Le NAC permet ainsi d'étudier spécifiquement l'importance du système d'antioxydant du GSH en réponse à un toxique comme la DXO. Finalement, la vitamine C est un antioxydant puissant, présent en fortes concentrations dans le liquide séminal et avec des effets bénéfiques sur la reproduction masculine, comme l'augmentation de la concentration de spermatozoïdes dans l'épididyme (Angulo *et al.*, 2011). De plus, la vitamine C favorise la prolifération et diminue la production d'EROs dans une culture primaire de SSCs de chèvre (Wang *et al.*, 2014). En résumé, cette sélection spécifique de composés permet d'évaluer des antioxydants d'origines différentes, avec des modes d'actions potentiels différents.

Tableau 3. Antioxydants non-enzymatiques sélectionnés pour diminuer la gonadotoxicité de la DXO *in vitro*.

Nom	Origine et structure	Métabolisme	Transporteurs	Essais de protection <i>in vitro</i>	Essais de protection <i>in vivo</i>
Amifostine	<p>Polyamine synthétique</p>  <p>(Sigma-Aldrich, 2018e)</p>	<p>Le groupement phosphate de la forme inactive (WR-2721) doit être clivé par les phosphatases alcalines en composé actif (WR-1065) (Calabro-Jones <i>et al.</i>, 1988)</p>	<p>Transport passif de la forme WR-1065 non-chargée à travers les membranes (Calabro-Jones <i>et al.</i>, 1988)</p>	<p>Protection de cardiomyocytes de rats néonataux en culture primaire contre la DXO (Dorr <i>et al.</i>, 1996)</p> <p>Protection des lignées MCF7 et 3T3 contre l'H₂O₂ (North <i>et al.</i>, 2000)</p> <p>Pas de protection de lignées cancéreuses de neuroblastome IMR-5 et CHP-100 contre la DXO, VCR, l'étoposide, le CP, la CPA et l'isofosfamide (Fulda <i>et al.</i>, 1997)</p>	<p>Protection du testicule pré-pubère contre le CP (Lirdi <i>et al.</i>, 2008)</p> <p>Effet controversé sur le testicule pré-pubère contre la DXO (Vendramini <i>et al.</i>, 2012; Vendramini <i>et al.</i>, 2010)</p>
Carnitine	<p>Acide aminé endogène et acquis via l'alimentation</p>  <p>(Sigma-Aldrich, 2018c)</p>	<p>Pas de métabolisme nécessaire</p>	<p>Transporteurs membranaires OCTN (Tamai, 2013)</p>	<p>Protection de cardiomyocytes de rats adultes (Andrieu-Abadie <i>et al.</i>, 1999; Mijares & Lopez, 2001) et néonataux (Chao <i>et al.</i>, 2011) en culture primaire contre la DXO</p>	<p>Protection du testicule pré-pubère de rat contre l'étoposide (Okada <i>et al.</i>, 2009) et la DXO (Cabral <i>et al.</i>, 2014; Cabral <i>et al.</i>, 2018)</p>
Curcumin	<p>Polyphénol phytochimique</p>  <p>(Sigma-Aldrich, 2018a)</p>	<p>Pas de métabolisme nécessaire</p>	<p>Molécule hautement lipophile capable de traverser les membranes (Ramassamy, 2006)</p>	<p>Protection d'une lignée de neuroblastome humain SK-N-SH contre le stress oxydatif induit par la DXO (Doggui <i>et al.</i>, 2013)</p> <p>Pas de protection de cardiomyocytes de la lignée H9c2 contre la DXO (Hosseinzadeh <i>et al.</i>, 2011)</p>	<p>Protection du cœur de rat adulte contre la DXO (Swamy <i>et al.</i>, 2012)</p>

N-acétylcystéine (NAC)	<p>Dérivé de la cystéine endogène et acquis via l'alimentation</p>  <p>(Sigma-Aldrich, 2018d)</p>	<p>Pas de métabolisme nécessaire pour l'inhibition d'EROs. Hydrolysé en cystéine dans les cellules, puis incorporé dans la synthèse du GSH (Majzoub & Agarwal, 2017)</p>	<p>Transporteurs membranaires AEP (Raftos <i>et al.</i>, 2007)</p>	<p>Protection de cardiomyocytes de la lignée H9c2 contre la DXO (Wattanapitayakul <i>et al.</i>, 2005)</p> <p>Protection de neurones de rats en culture primaire et de cellules de gliome de rat C6 contre l'apomorphine (Dos Santos El-Bacha <i>et al.</i>, 2001)</p>	<p>Protection du foie de rat adulte contre la DXO (Kockar <i>et al.</i>, 2010)</p>
Vitamine C	<p>Vitamine endogène et acquise via l'alimentation</p>  <p>(Sigma-Aldrich, 2018b)</p>	<p>Pas de métabolisme nécessaire</p>	<p>Transporteurs membranaires GLUT et SVCT (Ludke <i>et al.</i>, 2012b)</p>	<p>Protection de cardiomyocytes de rats adultes en culture primaire contre la DXO (Ludke <i>et al.</i>, 2012a; Ludke <i>et al.</i>, 2012b)</p> <p>Protection de lymphocytes de sang périphérique humain contre la DXO (Antunes & Takahashi, 1999)</p>	<p>Protection du cœur de rat adulte contre la DXO (Viswanatha Swamy <i>et al.</i>, 2011)</p>

Légende :

Métabolisme : résumé du métabolisme nécessaire connu pour activer les fonctions antioxydantes du composé.

Transporteurs : principal mode de transport vers l'intérieur des cellules présumé.

Essais de protection *in vitro* et *in vivo* : ceci n'est pas une liste exhaustive des effets des antioxydants sélectionnés, mais plutôt des exemples représentatifs tirés de la littérature. La mention «protection» signifie une amélioration totale ou partielle d'au moins un des paramètres de toxicité ou de stress oxydatif étudiés en réponse à la DXO ou à d'autres composés inducteurs de stress oxydatif.

AEP : *anion exchange protein*; CPA : cyclophosphamide; DXO : doxorubicine; EROs : espèces réactives de l'oxygène; GLUT : *Glucose transporters*; GSH : glutathion réduit; OCTN : *Organic cation/carnitine transporter*; SVCT : *sodium/vitamin C co-transporter*; VCR : vincristine.

5. La problématique

De manière générale, cette revue de la littérature met en évidence les points suivants. 1- Les traitements de chimiothérapie pour le traitement des cancers pédiatriques peuvent affecter la fertilité masculine une fois à l'âge adulte. 2- Les SSCs et les cellules de Sertoli présentes dans le testicule immature sont des cibles des composés de chimiothérapies. 3- Il n'existe aucune solution pour préserver la fertilité des garçons pré-pubères qui reçoivent des traitements contre le cancer. 4- La DXO, un composé de chimiothérapie largement utilisé contre les cancers pédiatriques, a le potentiel d'affecter la fertilité masculine lorsque reçue avant la puberté. 5- Les modèles animaux montrent que la DXO induit un stress oxydatif testiculaire lorsqu'administrée à l'âge adulte ou avant la puberté. 6- L'utilisation d'antioxydants a été proposée comme solution *in situ* pour diminuer la toxicité testiculaire de composés de chimiothérapie comme la DXO.

Il est donc important d'améliorer la qualité de vie des hommes survivants d'un cancer pédiatrique, notamment en évaluant les antioxydants comme solution potentielle pour diminuer l'impact des chimiothérapies sur la fonction reproductrice masculine. Par contre, les types cellulaires du testicule immature ciblés par le stress oxydatif induit par différents composés de chimiothérapie comme la DXO sont inconnus. De plus, la capacité des antioxydants à diminuer la toxicité testiculaire des chimiothérapies reste controversée et les mécanismes impliqués dans chaque type cellulaire n'ont pas été décrits.

6. L'hypothèse et les objectifs

L'hypothèse de cette étude est que la DXO induit un stress oxydatif dans les SSCs et les cellules de Sertoli du testicule pré-pubère, et que des composés antioxydants peuvent diminuer la toxicité associée dans ces cellules.

En utilisant un modèle *in vitro* de lignées cellulaires de spermatogonies aux caractéristiques souches (GC-6Spg) et de cellules de Sertoli immatures (Ser-W3) de rats, les objectifs spécifiques de l'étude sont: 1- Déterminer si la DXO induit du stress oxydatif dans ces deux lignées cellulaires. 2- Évaluer la capacité de composés antioxydants à réduire la toxicité de la DXO sur ces deux lignées.

CHAPITRE 2 : IN VITRO STUDY OF DOXORUBICIN-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN SPERMATOGONIA AND IMMATURE SERTOLI CELLS

Titre en français : Étude *in vitro* du stress oxydatif induit par la doxorubicine dans les spermatogonies et les cellules de Sertoli immatures

L'article a été soumis à la revue Toxicology and Applied Pharmacology le 4 janvier 2018, et resoumis à cette revue avec corrections le 16 mars 2018. La version présentée dans ce mémoire est celle du 16 mars 2018.

Contribution des auteurs

Toutes les expériences et analyses contenues dans cet article ont été réalisées par la première auteure, Amélie Tremblay. La directrice de recherche, Géraldine Delbès, a supervisé la démarche scientifique et l'avancement du projet de recherche. L'article a été rédigé par Amélie Tremblay en collaboration avec Géraldine Delbès.

Résumé de l'article en français

Les traitements de chimiothérapie pédiatriques peuvent affecter la fertilité masculine à long terme. Malheureusement, aucune solution de préservation de la fertilité n'est encore disponible pour les garçons pré-pubères. Des études suggèrent que la doxorubicine, utilisée dans le traitement des cancers pédiatriques, induit un stress oxydatif dans le testicule. Cependant, les types cellulaires ciblés du testicule restent inconnus. Le but de cette étude était de déterminer si la doxorubicine peut induire un stress oxydatif dans des lignées de spermatogonies (GC-6Spg) et de cellules de Sertoli immatures (Ser-W3) de rat, et d'évaluer leur protection par des antioxydants. En utilisant le test de MTT, nous avons montré que la doxorubicine induit une cytotoxicité temps- et dose-dépendante dans ces deux lignées cellulaires, les Ser-W3 étant plus sensibles que les GC-6Spg. Après 3h de traitement, les espèces réactives de l'oxygène et le 8-oxo-désoxyguanosine nucléaire ont augmenté chez les Ser-W3, mais pas chez les GC-6Spg. De plus, après 6h de traitement, les niveaux intracellulaires de glutathion réduit ont diminué significativement dans les Ser-W3. Ces résultats montrent que la doxorubicine induit un stress oxydatif dans la lignée cellulaire Ser-W3. Cependant, une déplétion en glutathion n'affecte pas leur survie, et une supplémentation n'offre qu'une faible protection après exposition à la doxorubicine, suggérant que le système du

glutathion n'est pas essentiel pour la défense des Ser-W3 contre la doxorubicine. D'autre part, parmi quatre antioxydants sélectionnés dans la littérature, aucun n'a réduit la cytotoxicité de la doxorubicine dans les Ser-W3. Ensemble, nos données suggèrent que le stress oxydatif n'est probablement pas une voie majeure de cytotoxicité de la doxorubicine dans les GC-6Spg et les Ser-W3. Cette étude apporte de nouvelles pistes pour comprendre les mécanismes par lesquels les chimiothérapies affectent le testicule pré-pubère, avec pour but à long terme d'améliorer la qualité de vie des survivants de cancers pédiatriques.

Mots-clés : antioxydants, doxorubicine, stress oxydatif, spermatogonie, cellule de Sertoli, testicule

Article soumis

IN VITRO STUDY OF DOXORUBICIN-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN SPERMATOGONIA AND IMMATURE SERTOLI CELLS

Amélie R TREMBLAY¹ and Geraldine DELBES¹

¹ INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval, Quebec, Canada (H7V 1B7)

amelie.tremblay@iaf.inrs.ca; geraldine.delbes@iaf.inrs.ca

Correspondence: Geraldine Delbes, Institut national de la recherche scientifique, Centre INRS– Institut Armand-Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval (Quebec), Canada H7V 1B7.

Telephone: 450 687-5010 ext. 8830

E-mail: geraldine.delbes@iaf.inrs.ca

Short title: Doxorubicin-induced oxidative stress in immature testicular cells *in vitro*.

Abbreviations: 8-oxoDG, 8-oxodeoxyguanosine; ANOVA: analysis of variance; BSO, CCS : childhood cancer survivor; L-buthionine-sulfoximine; DXO, doxorubicin; GSH, reduced glutathione; H₂O₂, hydrogen peroxide; mCB, monochlorobimane; NAC, N-acetylcystein; ROS, reactive oxygen species; SSCs, spermatogonial stem cells; TBHP, tert-butyl-hydroperoxide.

Abstract

Pediatric chemotherapy treatments can impair long-term male fertility. Unfortunately, no fertility preservation solution is available for pre-pubertal boys. Studies suggest that doxorubicin, used against pediatric cancers, induces oxidative stress in the testis. However, the targeted testicular cell types remain unknown. The goal of this study was to determine whether doxorubicin can induce oxidative stress in rat spermatogonia (GC-6Spg) and immature Sertoli (Ser-W3) cell lines, and to assess their protection by antioxidants. Using the MTT assay, we have shown that doxorubicin induces a time- and dose-dependent cytotoxicity in these two cell lines, Ser-W3 being more sensitive than GC-6Spg. After 3h of treatment, reactive oxygen species and nuclear 8-oxo-deoxyguanosine increase in Ser-W3, but not in GC-6Spg. Moreover, after 6h of treatment, intracellular reduced glutathione levels decrease significantly in Ser-W3 cells. These results show that doxorubicin induces oxidative stress in the Ser-W3 cell line. However, a depletion in glutathione does not affect their survival, and supplementation only offers a weak protection after exposure to doxorubicin, suggesting that the glutathione system is not essential for Ser-W3 cell line's defense against doxorubicin. On the other hand, among four antioxidants selected from the literature, none reduces the cytotoxicity of doxorubicin in Ser-W3 cells. Together, our data suggest that oxidative stress may not be a major pathway for doxorubicin's cytotoxicity in GC-6Spg and Ser-W3 lines. This study provides new insights in the mechanisms by which chemotherapies affect the pre-pubertal testis, with the long-term goal to help improve the quality of life of pediatric cancer survivors.

Key words: antioxidants, doxorubicin, oxidative stress, spermatogonia, Sertoli cells, testis

Highlights :

1. DXO induces a dose-dependent cytotoxicity in both SerW3 and GC-6Spg cell lines
2. DXO induces oxidative stress in Ser-W3 but not in GC-6Spg cell line
3. Maintaining GSH levels improves, but is not required for Ser-W3's defense against DXO
4. Out of four antioxidants tested, none reduces DXO's toxicity in GC-6Spg and Ser-W3
5. Oxidative stress may not be a major pathway for DXO's toxicity in GC-6Spg and Ser-W3

Introduction

Advances in cancer detection and effective treatment have dramatically increased survival rate for pediatric cancers, leading to a growing population of childhood cancer survivors (CCS) (Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics, 2017). In high-income countries, it is estimated that 1 person in 1000 is a CCS (Pritchard-Jones et al., 2013). Therefore, reducing long-term side effects of cancer treatments is becoming an important healthcare consideration (Chao et al., 2016; Pritchard-Jones et al., 2013). Male infertility is a known side effect of cancer treatments and remains a major issue for childhood cancer survivors (Skinner et al., 2017). Indeed, epidemiological studies from the Childhood Cancer Survivor Study (CCSS) showed an infertility prevalence of 46% for male CCS compared to 17.5% for their unaffected siblings (Green et al., 2010; Wasilewski-Masker et al., 2014). The most common cause of infertility in these patients is impairment of spermatogenesis (Romerius et al., 2011; Skinner et al., 2017; Wasilewski-Masker et al., 2014).

Spermatogonial stem cells (SSCs) and Sertoli cells are essential for the successful establishment of spermatogenesis at puberty, but their presence in seminiferous tubules before puberty makes them potential targets of pediatric chemotherapy treatments (Chemes, 2001). Indeed, experimental evidences from *in vivo* (Hou et al., 2005; Lirdi et al., 2008) and *in vitro* studies (Beaud et al., 2017; Liu et al., 2014; Marcon et al., 2010) have shown that chemotherapeutic agents can be cytotoxic to premeiotic germ cells. These results are in accordance with the decrease in spermatogonia numbers observed in testis biopsies of boys treated with alkylating agents (Poganitsch-Korhonen et al., 2017). Fewer studies are available for Sertoli cells, but alterations in blood inhibin B/FSH ratio in Hodgkin's disease CCS revealed a subtle functional impairment more than three years after the end of treatment (Bordallo et al., 2004). Furthermore, alteration in transferrin production was noted in a primary culture of immature rat Sertoli cells (Nambu et al., 1995) and in pre-pubertal rats exposed to doxorubicin (DXO) (Brilhante et al., 2012). Finally, a reduction of Sertoli cell proliferation was reported in organotypic culture of rat pre-pubertal testes treated with DXO (Nurmio et al., 2009).

Unfortunately, no clinically proven methods are available to preserve fertility of pre-pubertal boys. Sperm cryopreservation prior to cancer treatment is currently the only option, but its application for boys who do not produce sperm yet is not possible (Chan & Robaire, 2011). Cryopreservation of testicular tissue or SSCs before treatment followed by their auto-transplantation are currently evaluated as alternatives (Goossens & Tournaye, 2013; Jahnukainen et al., 2015), but these remain experimental (Jahnukainen et al., 2015). *In vivo* protection of the testis with antioxidants

has also been proposed as an alternative for fertility preservation in young boys. Indeed, many studies suggested that antioxidants can reduce chemotherapy-induced oxidative stress in the adult rodent adult (Das et al., 2012; Prahalthan et al., 2005b; Prahalthan et al., 2006a; Yeh et al., 2007). In pre-pubertal rats, amifostine and carnitine have been shown to reduce the gonadotoxicity of chemotherapeutic agents such as cisplatin (Lirdi et al., 2008) or DXO (Cabral et al., 2014; Cabral et al., 2018) respectively.

DXO is a member of the anthracycline antibiotics and is among the most effective chemotherapy compounds used in many solid and liquid tumors, including pediatric leukemias and lymphomas, which represent about half of all pediatric cancers (Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics, 2017). The principal anti-cancerous action of DXO implies the inhibition of topoisomerase II and DNA intercalation, leading to DNA damage including double-strand breaks, adducts (Yang et al., 2014), and cross-links (Granados-Principal et al., 2010). On the other hand, DXO can induce oxidative stress due to redox cycling of its quinone functional group, which is mostly associated with its secondary effects such as cardiotoxicity (Kalyanaraman, 2013). But, oxidative stress was also measured in whole extracts (Mohamed et al., 2015; Prahalthan et al., 2005b; Prahalthan et al., 2006a; Prahalthan et al., 2006b; Trivedi et al., 2010; Yeh et al., 2007) and in the mitochondrial fraction of the testis (Prahalthan et al., 2005a) following adult exposure to DXO in rodent models. These studies showed increased reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde levels, decreased non-enzymatic antioxidants (vitamin C, vitamin E, reduced glutathione GSH) and enzymatic antioxidant activities. Interestingly, one study also measured oxidative stress in adult testes in response to pre-pubertal exposure to DXO (Cabral et al., 2018). However, the use of whole testis lysate makes it impossible to identify which cell types are targeted. In addition, there is controversy surrounding the beneficial effects of antioxidants in counteracting the side effects of chemotherapy on the pre-pubertal testis. In fact, experimental data have shown only partial beneficial effects against DXO-induced oxidative stress and toxicity (Cabral et al., 2014). Furthermore, antioxidant effects highly depend on which compound is used for protection. Indeed, amifostine increased spermatozoa DNA damage and reduced pregnancy outcome in rats exposed to DXO during pre-puberty (Vendramini et al., 2012), but the opposite was seen when carnitine was used (Cabral et al., 2018).

The hypothesis for this study is that DXO induces oxidative stress in spermatogonia and immature Sertoli cells, and that antioxidant compounds could reduce related cytotoxicity. We used two rat cell lines, allowing us to study the impact of DXO on each specific cell type of interest in the immature testis, and to compare the potential of several antioxidants.

Material and methods

Chemicals

Doxorubicin hydrochloride ($\geq 98\%$, CAS #25316-40-9) was obtained from LKT Laboratories Inc (St. Paul, MN, USA) and curcumin ($\geq 95\%$, CAS #458-37-7) from Fluka Chemika (Ronkonkoma, NY, USA). Recombinant human LIF ($\geq 98\%$) was from PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA). Non-essential amino acids (100X), HEPES (1M, CAS #7365-45-9), gentamicin (50mg/ml, CAS #1403-66-3), penicillin/streptomycin (5000U/ml, CAS #69-57-8 and #3810-74-0), L-glutamine (200mM, CAS #56-85-9), FBS Australian origin, FBS Canadian origin, G418 (50mg/ml, CAS #108321-42-2) and recombinant human basic fibroblast growth factor (95%, CAS #106096-93-9) were from Fisher Scientific (Waltham, MA USA). All other chemicals were purchased from Sigma (Sigma, Oakville, ON, Canada): alkaline phosphatase from bovine intestinal mucosae (CAS #9001-78-9), amifostine (WR-2721, $\geq 97\%$, CAS #112901-68-5), aminoguanidine bicarbonate (97%, CAS #2582-30-1), N-acetylcystein (NAC, $\geq 99\%$, CAS #616-91-1), L-carnitine ($\geq 98\%$, CAS #6645-46-1), 17β -estradiol ($\geq 98\%$, CAS #50-28-2), forskolin ($\geq 98\%$, CAS #66575-29-9), hydrogen peroxide (H_2O_2 , 30%, CAS #7722-84-1), L-buthionine-sulfoximine (BSO, $\geq 98\%$, CAS #5072-26-4), platelet-derived growth factor-BB ($\geq 97\%$), sodium bicarbonate ($\geq 99.5\%$, CAS #144-55-8), tert-butyl-hydroperoxide (TBHP, 70%, CAS #75-91-2) and vitamin C ($\geq 100\%$, CAS #50-81-7).

Cell culture

GC-6Spg cell line (Van Pelt et al., 2002), a spermatogonia cell line with characteristics of SSCs, was obtained from Dr Ans Van Pelt (University of Amsterdam) and maintained at 32°C and 5% CO_2 as described previously (Beaud et al., 2017; Van Pelt et al., 2002).

Ser-W3 cell line (Pognan et al., 1997), an immature Sertoli cell line isolated from pre-pubertal rats, was obtained from DSMZ (ACC-420) and maintained at 37°C and 5% CO_2 . Culture medium was Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with low glucose (1g/ml), HEPES (25mM), sodium pyruvate (1mM), L-glutamine (2mM) and heat-inactivated FBS (10%). Cells were passaged three times per week.

Doxorubicin treatments

24h to 48h before treatment, cells were seeded in 96-well plates (Falcon #087722C, Fisher Scientific) or CultureSlides (Falcon #08-774-26, Fisher Scientific). Seeding density for GC-6Spg and Ser-W3 was 6,000 cells/well in 96-well plates, except for 9,000 cells/well for GC-6Spg in CellROX experiments. In 8-well CultureSlides, seeding density was 24,000 cells/well for GC-6Spg or 18,000 cells/well for Ser-W3. Stock solutions of DXO were made at 1000X in sterile water and

stored at -80°C. 1000X stock solutions of DXO were diluted to 1X into culture medium immediately before use, and control cells received 1:1000 of the water vehicle. GC-6spg and Ser-W3 cells were exposed to 0.001µM to 10µM DXO for 1h to 48h as indicated.

Pre- and co-treatments with antioxidants or BSO

For pre-treatments, cells were seeded in 1.25X culture media that was completed by a 5X solution of antioxidants (Table S1) or the equivalent volume of vehicle. The next day, DXO treatment was done as described above in culture medium containing either 1X antioxidant or the equivalent volume of vehicle. In co-treatment experiments, cells were only exposed to the antioxidant at the time of DXO treatment. DXO treatment in antioxidant experiments lasted 24h for Ser-W3 and 48h for GC-6Spg. To activate amifostine to its active metabolite WR-1065 and prevent its degradation, culture media was also supplemented with 1U/ml alkaline phosphatase and 1mM aminoguanidine bicarbonate (Meier & Issels, 1995; Muller et al., 2004). Pre-treatment with BSO or NAC was done the day after seeding for the indicated time before DXO exposure, then DXO was added for 12h.

Cytotoxicity assays

Mitochondrial activity after DXO treatment was investigated using the MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) assay as previously described (Beaud et al., 2017). Briefly, at the end of treatment, GC-6spg or Ser-W3 were incubated with 0.05mg/well of MTT (#M5655, Sigma), diluted in complete culture medium for 3h at 32°C or 37°C respectively, after which half of the medium was replaced by DMSO/isopropanol (1:1). The optical density was revealed by spectrometry at 540nm and expressed as a percentage of formazan formation in control cells treated with vehicle. Wells without cells served as blank value, and cells exposed for 48h (GC-6Spg) or 24h (Ser-W3) to 5% DMSO were used as a positive control for cell death (Figure S1A and S1B).

Total cell numbers and viable cell numbers after DXO treatment were also evaluated using the ReadyProbes Cell Viability Red/Blue kit (#R37610, Fisher Scientific), with a few modifications. Briefly, at the end of treatment, half of culture medium was replaced by a 2X solution of NucBlue staining and propidium iodide and incubated for 15min at 32°C (GC-6Spg) or 37°C (Ser-W3). Images were immediately acquired using the Cytation5 imaging Multi-mode Reader (BioTek, Winooski, VT, USA), with the Dapi (ex377/em447nm) and Texas Red (ex586/em647nm) filter cubes. Four images per well at 4X were taken, for a total of more than 6,000 GC-6Spg and 10,000 Ser-W3 cells analysed in control conditions per experiment. Blue cells, corresponding to total cells, and red cells, corresponding to dead cells, were counted automatically using Gen5 software (Biotek). Results are expressed as the mean total cell numbers per well and as the mean percentage of viable cells: $((\text{Blue cell} - \text{Red cells}) / \text{Blue cells}) \times 100$. Half maximal effective

concentrations (EC_{50}) were calculated using ED50plus v1.0 online software (Vargas MH, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, April 2000). EC_{50} were calculated using the mean curve of 4-10 independent experiments.

Intracellular ROS measurement

To quantify intracellular ROS, the CellROX DeepRed probe (#C10422, Fisher Scientific) was used following the manufacturer's recommendations. Briefly, CellROX DeepRed probe was freshly diluted in complete culture medium to 55 μ M. At the end of treatment, half of culture medium was removed from wells and CellROX DeepRed probe was added to a final concentration of 5 μ M. Cells were incubated for 30min at 32°C (GC-6Spg) or 37°C (Ser-W3), then the media was removed and cells were incubated with Hoechst 33342 (1:2000 in PBS, #H1399, Fisher Scientific) for 10min at 32°C (GC-6Spg) or 37°C (Ser-W3). Cells were washed two times with PBS supplemented with 0.9 mM calcium chloride and 0.5 mM magnesium chloride and left in PBS for fluorescence reading at ex640/em665nm using the Cytation5 imaging Multi-mode Reader (BioTek), with the scan area mode which performs 25 reads/well. Background from cells incubated without probe was used as the blank value. TBHP 400 μ M 45min was used as positive control for intracellular ROS accumulation, and the antioxidant NAC (1mM for GC-6Spg or 5mM for Ser-W3) added 1h before TBHP was used as a control of ROS inhibition (Figure S1C and S1D).

Intracellular GSH levels measurement

A stock solution of 100mM monochlorobimane (mCB, #69899 Sigma) diluted in DMSO was kept at -20°C. The mCB stock solution was freshly diluted in complete culture medium to 1mM. At the end of treatment, half of the culture media was removed from wells and mCB probe was added to a final concentration of 90 μ M. Cells were incubated for 20min at 32°C (GC-6Spg) or 37°C (Ser-W3). The media was then removed and cells were washed one time with PBS supplemented with 0.9 mM calcium chloride and 0.5 mM magnesium chloride. Cells were left in PBS for fluorescence reading at ex360/em460nm using the Cytation5 imaging Multi-mode Reader (BioTek), with the scan area mode which performs 25 reads/well. Background related to the plate, the cells and the probe were removed from reads values. Cells exposed to 50 μ M L-buthionine-sulfoximine (BSO) for 24h were used as positive controls of intracellular GSH depletion (Figure S1E and S1F).

Immunofluorescence for 8-oxodeoxyguanosine (8-oxoDG)

Oxidative DNA damage was measured using 8-oxoDG staining. At the end of treatment, cells were fixed for 15min in cold 70% EtOH at -20°C. After PBS washes, DNA was denatured with 4N HCl for 5min followed by neutralization with 50mM Tris-Base for another 5min at room

temperature. Cells were blocked for 30min at room temperature with Tris-HCl 10mM 10% goat serum pH 7.5, then incubated overnight at 4°C with primary antibody (Mouse anti- 8-oxoDG #ab62623, Abcam, 1:2000 for GC-6Spg or 1:5000 for Ser-W3) in 10% goat serum in PBS. After PBS washes, cells were incubated for 45min at room temperature with a fluorescent secondary antibody (Goat anti-mouse 647nm #A21236 1:200 or 488nm #A11001 1:500, Life Technologies). Finally, slides were mounted using Vectashield with Dapi (#H1200, Vector Laboratoires, Burlingame, CA, USA) and analysed using an A1 Nikon Confocal system coupled to a Nikon Eclipse Ti microscope with a 40X objective. For quantification, three areas per well, corresponding to a total of 60-150 cells for each condition in each experiment, were used for quantification of the number of 8-oxoDG foci per nucleus using the ImageJ Software (Schneider et al., 2012). Cells exposed to 400µM (GC-6Spg) or 1mM (Ser-W3) H₂O₂ for 15min before fixation were used as positive controls (Figure S1G and S1H).

Statistical analysis

Each experiment was done in duplicate wells, except for 8-oxoDG experiments where the pictures were taken in one single well, and repeated at least three times on three different cell passages. Statistical analyses were done using GraphPad Prism version 7.00 (GraphPad software, La Jolla, CA, USA). Dose-dependent effects of treatments on cytotoxicity, ROS production, oxidative DNA damage, and intracellular GSH were analyzed using a Friedman test followed by a Dunn's post-hoc test (non-parametric data) or using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett's post-hoc test (parametric data) ($p < 0.05$). Two-way ANOVA was used to assess ROS inhibition by antioxidants (Tukey's post-hoc test) or dose-dependent cytotoxicity due to DXO treatments with or without antioxidants (Bonferroni's post-hoc test) ($P < 0.05$). For positive controls and assessment of GSH depletion or the efficiency of supplementation, Wilcoxon (non-parametric data) or Paired Student's t test (parametric data) were used ($p < 0.05$).

Results

Cytotoxicity of DXO

The cytotoxicity of DXO (0.01-10µM) was evaluated after 1h to 24h of exposure in GC-6Spg and Ser-W3 cell lines using the MTT assay (Figure 1). We observed a time- and dose-dependent negative impact on both cell lines, with different kinetics (Figure 1A, 1B). The calculated EC₅₀ at 24h (Table 1) showed that Ser-W3 cells were more sensitive to DXO than GC-6Spg. Because the cytotoxicity measured with the MTT assay could be due to either an inhibition of proliferation or

increased cell death, we also quantified the impact of 24h of exposure to DXO on total cell numbers and viable cell numbers. Both cell lines showed a reduction in total cell numbers and decreased cell viability in response to DXO (data not shown). The EC_{50} obtained for total cell numbers were similar to those calculated from the MTT assay in both cell lines (Table 1). On the other hand, the EC_{50} obtained for cell viability gave different results from the other tests and showed differences between the two cell lines (Table 1). Indeed, in GC-6Spg, the EC_{50} for cell viability was lower than for the other assays, suggesting that cell death induction is the first consequence of DXO treatment on spermatogonia. Whereas, in Ser-W3, the EC_{50} for cell viability was higher than with the other tests (Table 1), suggesting other mechanisms of toxicity.

DXO-induced oxidative stress

To test if DXO induces oxidative stress in GC-6Spg and Ser-W3, potentially leading to its cytotoxicity, three oxidative stress markers were evaluated in response to DXO exposure before the onset of cytotoxicity measured by the MTT assay. In GC-6Spg cells, from 1h to 12h of DXO exposure, we did not observe increased intracellular ROS (Figure 2A) nor changes in the number of 8-oxoDG foci per nucleus (Figure 2B) compared to controls. Using the mCB fluorescent probe to quantify intracellular GSH, we observed that basic levels of GSH were very low in this cell line, which made it impossible to detect any significant decrease, even when using an inhibitor of GSH synthesis such as BSO (Figure S1E).

In Ser-W3, after a 3h exposure to $1\mu\text{M}$ or $10\mu\text{M}$ of DXO, we measured a significant increase in intracellular ROS (Figure 3A). Interestingly, ROS levels were restored after 6h, indicating possible antioxidant defense activation. This increase in ROS was correlated with an increase in DNA oxidative damage quantified by the number of 8-oxoDG foci per nucleus, after 3h and up to 6h of exposure to $10\mu\text{M}$ of DXO (Figure 3B). On the other hand, intracellular GSH levels were significantly decreased in Ser-W3 exposed to $10\mu\text{M}$ DXO after 6h of exposure (Figure 3C).

Role of the GSH pathway in Ser-W3 exposed to DXO

Because we observed a depletion in intracellular GSH in response to DXO in Ser-W3, we aimed to determine the potential of this pathway in Ser-W3 defense mechanisms. We first tested the impact of depleting approximately 70% of intracellular GSH, which was achieved with a 12h exposure to $50\mu\text{M}$ BSO, an inhibitor of GSH synthesis (Figure 4A). Interestingly, in control conditions, this severe depletion did not change Ser-W3 survival measured by the MTT assay (Figure 4C). Moreover, DXO-induced cytotoxicity after 12h was not increased (Figure 4C). On the other hand, we tested the effect of GSH supplementation induced by a pre-treatment with 1mM NAC, a precursor of GSH synthesis, for 2h before DXO exposure. The efficiency of

supplementation was confirmed half-way through DXO treatment (6h) as NAC was able to restore intracellular GSH to 96% of control levels in cells exposed to 10 μ M DXO (Figure 4B). After 12h of exposure to DXO, we measured a slight significant improvement in cell survival in supplemented conditions compared to controls using the MTT assay (70.1 \pm 1.6% with DXO and NAC vs 65.5 \pm 1.5% of control with DXO alone, Figure 4D).

Effect of antioxidants on DXO-induced cytotoxicity

To investigate if antioxidants could be used to protect cells against DXO-induced cytotoxicity, we evaluated the potential of four antioxidants described in the literature, namely vitamin C, curcumin, carnitine, and amifostine (Table 2). Cells were exposed to each antioxidant 24h prior to and during DXO treatment (pre-treatment) or only during DXO treatment (co-treatment). DXO-induced cytotoxicity was evaluated in Ser-W3 after 24h exposure, using the MTT assay (Figure 5). None of the antioxidants reduced the dose-dependent effect of DXO whether used in co-treatment (Figure 5A) or pre-treatment (Figure 5B). Nevertheless, a pre-treatment with 5 μ M curcumin had a significant positive effect on Ser-W3 cells as demonstrated by a significant increase in the MTT signal in control conditions and after exposure to low dose of DXO (0-0.01 μ M) (Figure 5B). The potential of the antioxidants was also tested in GC-6Spg but none of the tested compounds or kinetics of treatment had any beneficial effect (Figure S2).

In order to test the capacity of the antioxidants used to reduce ROS levels in Ser-W3, we performed a 3h pre-treatment followed by a stimulation of ROS by TBHP (Figure 6). Results revealed that each antioxidant alone had no effect on basal ROS production in Ser-W3 when compared to vehicle-treated cells (Figure 6). Moreover, among the four antioxidants, only vitamin C significantly reduced ROS in response to TBHP (Figure 6).

Discussion

In this *in vitro* study, we investigated the mechanisms by which DXO induces toxicity in immature testicular cells, namely spermatogonia and Sertoli cells. A toxic impact of DXO on the GC-6Spg spermatogonia cell line had already been described for 24 to 72h of exposure (Beaud et al., 2017). In the present study, we observed time- and dose-dependent toxic effects of DXO from 1 to 24h on both spermatogonia and immature Sertoli cell lines. Using the EC50 obtained from the MTT assay after 24h, we found that Ser-W3 are more sensitive to DXO than GC-6Spg. However, this difference of sensitivity could be due to culture conditions. Indeed, Ser-W3 have a higher proliferation rate *in vitro* when compared to GC-6Spg (doubling times of 25h and 42h respectively),

a factor known to be related to a greater sensitivity to anti-topoisomerase II chemotherapy compounds (Amundson et al., 2000). Moreover, it has been shown that in organotypic culture, germ cells are more sensitive, their proliferation rate decreasing before that of Sertoli cells (Nurmio et al., 2009). This discrepancy can be explained by the type of *in vitro* model used, where organotypic culture better maintains the cellular interactions and may be more representative of the *in vivo* environment. In parallel, for each individual cell line, different EC50 values were obtained from different cytotoxicity assays (MTT assay, total cell numbers, and viable cell numbers). Indeed, for Ser-W3, the loss of cell viability appears at higher doses than the reduction of total cell numbers, suggesting that DXO affects their proliferation rate. On the other hand, loss of cell viability was the most sensitive parameter in GC-6Spg, suggesting that cell death is the prime effect of DXO on spermatogonia. Divergence between EC50 from different assays measuring cytotoxicity has been reported before in response to actinomycin D (Olszewska-Slonina et al., 2004). Such discrepancies between toxicity parameters suggests cell-specific responses to a given compound, which may be due to different cell-specific gene expression networks (Johnstone et al., 2002) or to different cell culture conditions (Stepanenko & Dmitrenko, 2015). But overall, DXO toxicity results obtained *in vitro* are supported by the known chemotherapy-induced apoptosis in spermatogonias *in vivo* (Hou et al., 2005; Lirdi et al., 2008) and proliferation inhibition in Sertoli cells in organotypic culture (Nurmio et al., 2009).

Proliferation inhibition (Chatterjee et al., 2009) or cell death by apoptosis (Granados-Principal et al., 2010; Kim & Sharma, 2006) are possible consequences of an increase in intracellular ROS. DXO is known to induce oxidative stress in adult rat testes exposed during adulthood (Attia et al., 2010; Ceribasi et al., 2012; Trivedi et al., 2010) or before puberty (Cabral et al., 2018). However, it is unknown in which cell types of the immature testis such oxidative stress occurs. In the present study, we assess direct DXO-induced oxidative stress in spermatogonia and immature Sertoli cells lines. In GC-6Spg, no increase in intracellular ROS or DNA oxidative damage was observed following DXO exposure. Furthermore, when antioxidants were added to culture media, no positive impact was measured with the MTT assay, supporting a low impact of DXO-induced oxidative stress in spermatogonias *in vitro*. Surprisingly, the absence of oxidative stress in GC-6Spg was accompanied by low levels of intracellular GSH, an important component of antioxidant defence, when compared to Ser-W3. Because higher levels of GSH were measured in primary cultures of spermatocytes/spermatids compared to Sertoli cells, one can hypothesize that the GSH content could be low in spermatogonia and increase during germ cell maturation (Den Boer et al., 1989). It is also possible that levels of GSH in GC-6Spg are lowered by the monoculture conditions. Indeed, it was shown that when submitted to a GSH depletion, isolated germ cells can only restore

their GSH content when cultured with Sertoli cells in whole tubule fragments (Den Boer et al., 1989; Li et al., 1989). Furthermore, the activity of glutathione reductase responsible for recycling oxidized glutathione to GSH is much lower in germ cells than in Sertoli cells (Kaneko et al., 2002). Spermatogonia may thus have compensatory mechanisms to manage oxidative insult. As seen in GC-6Spg, resistance of spermatogonia and SSCs to oxidative stress has already been reported (Celino et al., 2012; Celino et al., 2011). Using cultured testes of Japanese Eel, Celino et al. suggested that the resistance of spermatogonia to oxidative stress was related to high levels of Cu/Zn-superoxide dismutase (Celino et al., 2011). Moreover, in the specific case of SSCs, their mitochondrial activity is promoted when they enter proliferation and differentiation toward spermatogenesis (Guo et al., 2017). They could thus be less sensitive to DXO-induced oxidative stress, which depends on mitochondrial activity (Granados-Principal et al., 2010). Similarly, GC-6Spg could be less targeted by oxidative insult considering their SSC characteristics (Carlomagno et al., 2010; Van Pelt et al., 2002). DXO-induced DNA damage could account for GC-6Spg cell death. Double-strand DNA breaks have in fact already been measured in GC-6Spg in response to DXO (Beaud et al., 2017). Moreover, pre-pubertal rats exposed to DXO showed persistent DNA breaks in spermatozoa at adulthood, suggesting permanent DNA damage in SSCs (Vendramini et al., 2012).

Unlike in GC-6Spg, oxidative stress was observed in Ser-W3 after DXO exposure. Indeed, we measured increased intracellular ROS and oxidative DNA damage after 3h, followed by decreased intracellular GSH after 6h. These observations are supported by the increase in ROS (Prahalthan et al., 2006b) and 8-oxoDG (Prahalthan et al., 2006a), and the decrease in GSH (Ahmed et al., 2013; Atessahin et al., 2006; Das et al., 2012) seen in whole rat testes exposed to DXO. Since ROS levels return to normal when GSH levels decrease (6h), one can hypothesize that ROS are detoxified by the GSH system. However, we showed that a 70% decrease in intracellular GSH did not affect Ser-W3 survival or increase their sensitivity to DXO. On the contrary, when we prevented the GSH decrease induced by DXO with a precursor of GSH synthesis, a slight significant reduction of DXO's toxicity was measured after 12h. These two experiments suggest that the maintenance of basal GSH levels in Ser-W3 improves, but is not required for their defense against DXO. Sertoli cells may therefore have a compensatory antioxidant defence in response to oxidative stress. Indeed, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)-dependant expression of several protective enzymes including catalase is important in ROS management for TM4 pre-pubertal mouse Sertoli cells exposed to triptolide (Wang et al., 2017). On the other hand, a GSH decrease in Ser-W3 could also be linked to the glutathione s-transferase detoxification pathway. This pathway has been proven to be active in primary Sertoli cells isolated from pre-pubertal rats

exposed to mono-(2-ethylhexyl)phthalate (Sobarzo et al., 2015). Furthermore, antioxidant therapy leading to an increase in glutathione s-transferase activity reduced DXO's toxicity in rat cardiomyocyte cell line (Chularojmontri et al., 2013) and whole testes of adult male rats (Das et al., 2012). Further experiments are required to investigate such pathways in Sertoli cells in response to DXO.

The effect of four antioxidants against DXO-induced toxicity, namely vitamin C, curcumin, carnitine and amifostine, was assessed in both cell lines. Vitamin C and curcumin are strong antioxidants and have successfully protected rat cardiac tissue against DXO-induced oxidative stress *in vivo* (Swamy et al., 2012; Viswanatha Swamy et al., 2011). They have also protected primary rat cardiomyocytes (Ludke et al., 2012) and a human neuroblastoma cell line (Doggui et al., 2013) against oxidative insult induced by DXO or acrolein, respectively. On the other hand, carnitine and amifostine are the only antioxidants that have been investigated in pre-pubertal rat testes exposed to DXO (Cabral et al., 2014; Cabral et al., 2018; Hou et al., 2005; Vendramini et al., 2012; Vendramini et al., 2010). As they exhibited opposite efficiency *in vivo*, this prompted us to further elucidate their mechanism *in vitro*. In our study, only curcumin used in pre-treatment showed a positive effect on Ser-W3. Furthermore, this effect was only observed at a non-toxic dose or in absence of DXO, suggesting that curcumin did not reduce DXO-induced cytotoxicity. Curcumin is known to decrease apoptosis (Cheraghi et al., 2017; Zhao et al., 2017), increase proliferation (Zhao et al., 2017) or increase mitochondrial activity (Trujillo et al., 2014) in various cell types, which could explain the slight increase in MTT signal in Ser-W3. When the ROS inhibition capacity of our four antioxidants was assessed, only vitamin C showed a strong ROS inhibition capacity in Ser-W3 cells. It is possible that the dose and kinetics of treatment were only optimal for vitamin C in our conditions. Indeed, antioxidant activity of some compounds depends on their concentration, time of exposure, and subcellular location (Osiecki et al., 2010). Still, the lack of positive effect by vitamin C despite its strong antioxidant capacity, along with the slight protective effect of the GSH pathway, suggests that oxidative stress is not a major toxicity mechanism of DXO in Ser-W3. Other mechanisms could be involved as DXO can also induce increased DNA damage or DNA synthesis inhibition, leading to proliferation inhibition.

With the help of *in vivo* exposure models, oxidative stress and the beneficial effect of antioxidants have been highlighted in the testis following pre-pubertal DXO exposure (Cabral et al., 2018). However, our *in vitro* data suggests that oxidative stress may not be a major pathway in DXO-induced toxicity in GC-6Spg and Ser-W3 cell lines. Moreover, none of the four selected antioxidants reduced the DXO-induced cytotoxicity in these cell lines. Concentrations of DXO in

human or rat pre-pubertal testes following typical cancer treatments are still unknown. However, plasmatic DXO levels in pediatric patients after a conventional injection are around 0.1-0.8 μ M (Krischke et al., 2016), which is in the middle of our dose range (0.01-10 μ M for 1h to 24h). Moreover, DXO can accumulate in adult rat testes, potentially reaching higher concentrations, with levels staying high more than 24h after treatment (Nwankwoala et al., 2008). This indicates that our dose range and treatment durations are relevant to potential clinical or pre-clinical exposure to DXO during pre-pubertal anti-cancer treatments. However, the difference between the literature and our study in regards to oxidative stress raises questions about the difficulties to mimic the testicular micro-environment using *in vitro* models. These differences could be due to the use of immortalized cell lines. Cell immortalisation affects p53 status, and can change response to oxidative stress as it is known to be involved upstream and downstream of ROS signalling (Liu et al., 2008). Another possibility is that the communication between several cell types in the whole testis context could be important in DXO's oxidative or the antioxidant's protective activities. Furthermore, induction of oxidative stress by a metabolite of DXO *in vivo* cannot be excluded. However, when assessing levels of DXO, doxorubicinol and DXO aglycone in adult rat testis after a DXO injection, the parent form of DXO was the only one detectable (Arakawa et al., 1991). Finally, it is possible that oxidative stress measured in whole testis lysate from rodents (Ahmed et al., 2013; Attia et al., 2010; Cabral et al., 2018; Mohamed et al., 2015) takes place in immature testicular cells other than spermatogonia and Sertoli cells, which were not investigated with our model. Pediatric cancer patients generally show normal testosterone levels and progression through puberty in the months or years following treatment (Bramswig et al., 1990; Thomson et al., 2002), indicating that Leydig cells are less targeted by anti-cancer treatments. On the other hand, DXO's main side effect is toxicity on cardiomyocytes (Chularojmontri et al., 2013; Jarfelt et al., 2016; Koh et al., 2015), in part because of their high mitochondrial content (Berthiaume & Wallace, 2007). One can hypothesize that peritubular myoepithelial cells could be similarly targeted in the testis. Hypertrophy of these cells due to ROS (Schell et al., 2010) or to chemotherapy such as busulphan (Sasso-Cerri et al., 2017) have been described in human primary peritubular cells and in adult rat models, respectively. Such effects could impact fertility, as peritubular cells provide essential support and signals to Sertoli cells (Maekawa et al., 1996; Mayerhofer, 2013).

Our data provide new insights in the mechanisms by which DXO affects the immature testis, underlining the potential importance of a toxicity on somatic cells. Although the use of cell lines in the present study limits the translation to effects *in vivo*, it allows to reduce the use of animals and to test a complete range of dose of DXO with several parameters of toxicity. Such experimental

model helps elucidate mechanisms of action on a specific cell types that would require validation on primary cell lines (Kaur & Dufour, 2012) or ideally *in vivo* in subsequent studies. Narrowing down doses, and possible mechanism of action *in vitro* will help developing *in vivo* studies and focus on specific outcomes with respect to the 3Rs (Russell et al., 1959). From a clinical point of view, drug screening using *in vitro* models such as cell lines can help quickly elucidate the potential toxicity of other chemotherapeutic compounds and their combination. Indeed, despite their therapeutic use, there is very little information on potential toxicity of the cocktails of chemotherapeutic compounds currently used or potential new anti-cancer compounds on testicular cells. On the other hand, the use of antioxidants to protect against chemotherapy toxicity will require extensive evaluation of their specificity to avoid toxic impact or reducing the efficiency of treatments against cancer (Harake et al., 2012). Further studies on antioxidant protectants thus need to consider pediatric patients and to include an evaluation of their reproductive toxicity, including long-term impact on the sperm DNA integrity and the health of resulting progeny. Indeed, it was shown that various chemotherapy compounds lead to possible intergenerational and transgenerational negative effects (Tremblay et al., 2017), but the effect of chemotherapy combined with antioxidants on future progeny is largely unknown. In order to improve CCS's quality of life, it is important to further characterize the action of chemotherapy and antioxidants on the immature testis using a combination of *in vitro* and *in vivo* approaches, to better predict the impact on fertility and, when applicable, the health of exposed gametes and the progeny of cancer patients.

Declaration of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Funding

This work was supported by a start-up grant from INRS and by a transition grant from the Cole Foundation. Amélie Tremblay received fellowships from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and from the Fonds de recherche du Québec en Santé (FRQS).

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr Ans Van Pelt (University of Amsterdam, The Netherlands) for the generous gift of the GC-6Spg cell line. We also acknowledge Hermance Beaud and Pr Charles Ramassamy (INRS) for their technical advice and contribution to this study.

References

- Ahmed F, Urooj A & Karim AA (2013) Protective effects of *Ficus racemosa* stem bark against doxorubicin-induced renal and testicular toxicity. *Pharmacognosy magazine* 9(34):130-134.
- Amundson SA, Myers TG, Scudiero D, Kitada S, Reed JC & Fornace AJ, Jr. (2000) An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. *Cancer research* 60(21):6101-6110.
- 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 surgery* 162(6):572-575.
- Atessahin A, Turk G, Karahan I, Yilmaz S, Ceribasi AO & Bulmus O (2006) Lycopene prevents adriamycin-induced testicular toxicity in rats. *Fertility and sterility* 85 Suppl 1:1216-1222.
- Attia SM, Al-Bakheet SA & Al-Rasheed NM (2010) Proanthocyanidins produce significant attenuation of doxorubicin-induced mutagenicity via suppression of oxidative stress. *Oxidative medicine and cellular longevity* 3(6):404-413.
- Beaud H, van Pelt A & Delbes G (2017) Doxorubicin and vincristine affect undifferentiated rat spermatogonia. *Reproduction* 153(6):725-735.
- Berthiaume JM & Wallace KB (2007) Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. *Cell biology and toxicology* 23(1):15-25.
- Bordallo MA, Guimaraes MM, Pessoa CH, Carrico MK, Dimetz T, Gazolla HM, Dobbin J & Castilho IA (2004) Decreased serum inhibin B/FSH ratio as a marker of Sertoli cell function in male survivors after chemotherapy in childhood and adolescence. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* 17(6):879-887.
- Bramswig JH, Heimes U, Heiermann E, Schlegel W, Nieschlag E & Schellong G (1990) The effects of different cumulative doses of chemotherapy on testicular function. Results in 75 patients treated for Hodgkin's disease during childhood or adolescence. *Cancer* 65(6):1298-1302.
- 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 : RB&E* 10:79.
- 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(6):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(1):236-246.
- Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics (2017) Canadian Cancer Statistics 2017. Canadian Cancer Society, Toronto, ON, Available at: cancer.ca/Canadian-CancerStatistics-2017-EN.pdf (Consulté le December 12th)
- Carlomagno G, van Bragt MP, Korver CM, Repping S, de Rooij DG & van Pelt AM (2010) BMP4-induced differentiation of a rat spermatogonial stem cell line causes changes in its cell adhesion properties. *Biology of reproduction* 83(5):742-749.
- Celino FT, Yamaguchi-Shimizu S, Miura C & Miura T (2012) Proliferating spermatogonia are susceptible to reactive oxygen species attack in Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Biology of reproduction* 87(3):70.
- Celino FT, Yamaguchi S, Miura C, Ohta T, Tozawa Y, Iwai T & Miura T (2011) Tolerance of spermatogonia to oxidative stress is due to high levels of Zn and Cu/Zn superoxide dismutase. *PloS one* 6(2):e16938.

- Ceribasi AO, Sakin F, Turk G, Sonmez M & Atessahin A (2012) Impact of ellagic acid on adriamycin-induced testicular histopathological lesions, apoptosis, lipid peroxidation and sperm damages. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* 64(7-8):717-724.
- Chan P & Robaire B (2011) *Cancer in Males: Implications for Sperm Quality, Fertility, and Progeny Outcome. Sperm Chromatin*, Springer. p 351-360.
- Chao C, Xu L, Bell E, Cooper R & Mueller L (2016) Long-term Health Outcomes in Survivors of Childhood Cancer Diagnosed Between 1990 and 2000 in a Large US Integrated Health Care System. *Journal of pediatric hematology/oncology* 38(2):123-130.
- Chao HH, Liu JC, Hong HJ, Lin JW, Chen CH & Cheng TH (2011) L-carnitine reduces doxorubicin-induced apoptosis through a prostacyclin-mediated pathway in neonatal rat cardiomyocytes. *International journal of cardiology* 146(2):145-152.
- Chatterjee S, Kundu S, Sengupta S & Bhattacharyya A (2009) Divergence to apoptosis from ROS induced cell cycle arrest: effect of cadmium. *Mutation research* 663(1-2):22-31.
- Chemes HE (2001) Infancy is not a quiescent period of testicular development. *International journal of andrology* 24(1):2-7.
- Cheraghi E, Golkar A, Roshanaei K & Alani B (2017) Aluminium-Induced Oxidative Stress, Apoptosis and Alterations in Testicular Tissue and Sperm Quality in Wistar Rats: Ameliorative Effects of Curcumin. *International journal of fertility & sterility* 11(3):166-175.
- Chularojmontri L, Gerdprasert O & Wattanapitayakul SK (2013) Pummelo protects Doxorubicin-induced cardiac cell death by reducing oxidative stress, modifying glutathione transferase expression, and preventing cellular senescence. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2013:254835.
- Das J, Ghosh J, Manna P & Sil PC (2012) Taurine protects rat testes against doxorubicin-induced oxidative stress as well as p53, Fas and caspase 12-mediated apoptosis. *Amino acids* 42(5):1839-1855.
- Den Boer PJ, Mackenbach P & Grootegoed JA (1989) Glutathione metabolism in cultured Sertoli cells and spermatogenic cells from hamsters. *Journal of reproduction and fertility* 87(1):391-400.
- Doggui S, Belkacemi A, Paka GD, Perrotte M, Pi R & Ramassamy C (2013) Curcumin protects neuronal-like cells against acrolein by restoring Akt and redox signaling pathways. *Molecular nutrition & food research* 57(9):1660-1670.
- Goossens E & Tournaye H (2013) [Fertility preservation in boys: spermatogonial stem cell transplantation and testicular grafting]. *Gynecologie, obstetrique & fertilité* 41(9):529-531.
- Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa CL, Sanchez-Rovira P & Ramirez-Tortosa MC (2010) New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 48(6):1425-1438.
- 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28(2):332-339.
- Guo J, Grow EJ, Yi C, Mlcochova H, Maher GJ, Lindskog C, Murphy PJ, Wike CL, Carrell DT, Goriely A, Hotaling JM & Cairns BR (2017) Chromatin and Single-Cell RNA-Seq Profiling Reveal Dynamic Signaling and Metabolic Transitions during Human Spermatogonial Stem Cell Development. *Cell stem cell* 21(4):533-546 e536.
- Harake D, Franco VI, Henkel JM, Miller TL & Lipshultz SE (2012) Cardiotoxicity in childhood cancer survivors: strategies for prevention and management. *Future cardiology* 8(4):647-670.

- 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 research* 65(21):9999-10005.
- Jahnukainen K, Mitchell RT & Stukenborg JB (2015) Testicular function and fertility preservation after treatment for haematological cancer. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 22(3):217-223.
- Jarfelt M, Andersen NH, Glosli H, Jahnukainen K, Jonmundsson GK, Malmros J, Nysom K & Hasle H (2016) Cardiac function in survivors of childhood acute myeloid leukemia treated with chemotherapy only: a NOPHO-AML study. *European journal of haematology* 97(1):55-62.
- Johnstone RW, Ruefli AA & Lowe SW (2002) Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108(2):153-164.
- Kalyanaraman B (2013) Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox biology* 1:244-257.
- Kaneko T, Iuchi Y, Kobayashi T, Fujii T, Saito H, Kurachi H & Fujii J (2002) The expression of glutathione reductase in the male reproductive system of rats supports the enzymatic basis of glutathione function in spermatogenesis. *European journal of biochemistry* 269(5):1570-1578.
- Kaur G & Dufour JM (2012) Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis* 2(1): 1-5.
- Kim J & Sharma RP (2006) Cadmium-induced apoptosis in murine macrophages is antagonized by antioxidants and caspase inhibitors. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 69(12):1181-1201.
- Koh JS, Yi CO, Heo RW, Ahn JW, Park JR, Lee JE, Kim JH, Hwang JY & Roh GS (2015) Protective effect of cilostazol against doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. *Free radical biology & medicine* 89:54-61.
- Krischke M, Hempel G, Voller S, Andre N, D'Incalci M, Bisogno G, Kopcke W, Borowski M, Herold R, Boddy AV & Boos J (2016) Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of doxorubicin in children with cancer: results of a "European Pediatric Oncology Off-patents Medicines Consortium" trial. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 78(6):1175-1184.
- Lee EJ, Gerhold M, Palmer MW & Christen RD (2003) p53 protein regulates the effects of amifostine on apoptosis, cell cycle progression, and cytoprotection. *British journal of cancer* 88(5):754-759.
- Li LY, Seddon AP, Meister A & Risley MS (1989) Spermatogenic cell-somatic cell interactions are required for maintenance of spermatogenic cell glutathione. *Biology of reproduction* 40(2):317-331.
- Lirdi LC, Stumpp T, Sasso-Cerri E & Miraglia SM (2008) Amifostine protective effect on cisplatin-treated rat testis. *Anat Rec (Hoboken)* 291(7):797-808.
- Liu B, Chen Y & St Clair DK (2008) ROS and p53: a versatile partnership. *Free radical biology & medicine* 44(8):1529-1535.
- 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(4):72.
- Ludke A, Sharma AK, Bagchi AK & Singal PK (2012) Subcellular basis of vitamin C protection against doxorubicin-induced changes in rat cardiomyocytes. *Molecular and cellular biochemistry* 360(1-2):215-224.
- Maekawa M, Kamimura K & Nagano T (1996) Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Archives of histology and cytology* 59(1):1-13.
- 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(2):228-237.

- Mayerhofer A (2013) Human testicular peritubular cells: more than meets the eye. *Reproduction* 145(5):R107-116.
- Meier T & Issels RD (1995) Degradation of 2-(3-aminopropylamino)-ethanethiol (WR-1065) by Cu-dependent amine oxidases and influence on glutathione status of Chinese hamster ovary cells. *Biochemical pharmacology* 50(4):489-496.
- Mohamed RH, Karam RA, Hagrass HA, Amer MG & Abd El-Haleem MR (2015) Anti-apoptotic effect of spermatogonial stem cells on doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. *Gene* 561(1):107-114.
- Mongioi L, Calogero AE, Vicari E, Condorelli RA, Russo GI, Privitera S, Morgia G & La Vignera S (2016) The role of carnitine in male infertility. *Andrology* 4(5):800-807.
- Muller AC, Pigorsch S, Beyer C, Lautenschlager C & Dunst J (2004) Radioprotective effects of amifostine in vitro and in vivo measured with the comet assay. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft ... [et al]* 180(8):517-525.
- Nambu A, Kumamoto Y & Mikuma N (1995) [Effects of anti-cancer agents on cultured rat Sertoli cells]. *Nihon Hinyokika Gakkai zasshi. The Japanese journal of urology* 86(6):1132-1136.
- Nurmio M, Toppari J, Kallio J, Hou M, Soder O & Jahnukainen K (2009) Functional in vitro model to examine cancer therapy cytotoxicity in maturing rat testis. *Reprod Toxicol* 27(1):28-34.
- Nwankwoala R, Georgewill O & Georgewill U (2008) Pharmacokinetics Of Adriamycin After Intravenous Administration In Rat. *The Internet Journal of Oncology* 6(2).
- Olszewska-Slonina D, Drewa T, Musialkiewicz D & Olszewski K (2004) Comparison of viability of B16 and CI S91 cells in three cytotoxicity tests: cells counting, MTT and flow cytometry after cytostatic drug treatment. *Acta poloniae pharmaceutica* 61(1):31-37.
- Osiecki M, Ghanavi P, Atkinson K, Nielsen LK & Doran MR (2010) The ascorbic acid paradox. *Biochemical and biophysical research communications* 400(4):466-470.
- Poganitsch-Korhonen M, Masliukaite I, Nurmio M, Lahteenmaki P, van Wely M, van Pelt AMM, Jahnukainen K & Stukenborg JB (2017) Decreased spermatogonial quantity in prepubertal boys with leukaemia treated with alkylating agents. *Leukemia* 31(6):1460-1463.
- Pognan F, Masson MT, Lagelle F & Charuel C (1997) Establishment of a rat Sertoli cell line that displays the morphological and some of the functional characteristics of the native cell. *Cell biology and toxicology* 13(6):453-463.
- Prahalathan C, Selvakumar E & Varalakshmi P (2005a) Lipoic acid ameliorates adriamycin-induced testicular mitochondriopathy. *Reprod Toxicol* 20(1):111-116.
- Prahalathan C, Selvakumar E & Varalakshmi P (2005b) Protective effect of lipoic acid on adriamycin-induced testicular toxicity. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 360(1-2):160-166.
- Prahalathan C, Selvakumar E & Varalakshmi P (2006a) Lipoic acid modulates adriamycin-induced testicular toxicity. *Reprod Toxicol* 21(1):54-59.
- Prahalathan C, Selvakumar E & Varalakshmi P (2006b) Modulatory role of lipoic acid on adriamycin-induced testicular injury. *Chemico-biological interactions* 160(2):108-114.
- 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. *The Lancet. Oncology* 14(3):e95-e103.
- Ramassamy C (2006) Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *European journal of pharmacology* 545(1):51-64.
- 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. *International journal of andrology* 34(1):69-76.
- Russell WMS, Burch RL & Hume CW (1959) The principles of humane experimental technique. Sasso-Cerri E, Oliveira B, de Santi F, Beltrame FL, Canegum BH & Cerri PS (2017) The

- antineoplastic busulphan impairs peritubular and Leydig cells, and vitamin B12 stimulates spermatogonia proliferation and prevents busulphan-induced germ cell death. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 95:1619-1630.
- Schell C, Albrecht M, Spillner S, Mayer C, Kunz L, Kohn FM, Schwarzer U & Mayerhofer A (2010) 15-Deoxy-delta 12-14-prostaglandin-J2 induces hypertrophy and loss of contractility in human testicular peritubular cells: implications for human male fertility. *Endocrinology* 151(3):1257-1268.
- Schneider CA, Rasband WS & Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9(7):671-675.
- Skinner R, Mulder RL, Kremer LC, Hudson MM, Constine LS, Bardi E, Boekhout A, Borgmann-Staudt A, Brown MC, Cohn R, Dirksen U, Giwercman A, Ishiguro H, Jahnukainen K, Kenney LB, Loonen JJ, Meacham L, Neggers S, Nussey S, Petersen C, Shnorhavorian M, van den Heuvel-Eibrink MM, van Santen HM, Wallace WH & Green DM (2017) Recommendations for gonadotoxicity surveillance in male childhood, adolescent, and young adult cancer survivors: a report from the International Late Effects of Childhood Cancer Guideline Harmonization Group in collaboration with the PanCareSurFup Consortium. *The Lancet. Oncology* 18(2):e75-e90.
- Sobarzo CM, Rosana Nde M, Livia L, Berta D & Schteingart HF (2015) Mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) affects intercellular junctions of Sertoli cell: A potential role of oxidative stress. *Reprod Toxicol* 58:203-212.
- Stepanenko AA & Dmitrenko VV (2015) Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene* 574(2):193-203.
- Surai PF (2015) Antioxidant action of carnitine: molecular mechanisms and practical applications. *EC Veterinary Science* 2(1):66-84.
- Swamy AV, Gulliaya S, Thippeswamy A, Koti BC & Manjula DV (2012) Cardioprotective effect of curcumin against doxorubicin-induced myocardial toxicity in albino rats. *Indian journal of pharmacology* 44(1):73-77.
- Thomson AB, Campbell AJ, Irvine DC, Anderson RA, Kelnar CJ & Wallace WH (2002) Semen quality and spermatozoal DNA integrity in survivors of childhood cancer: a case-control study. *Lancet* 360(9330):361-367.
- Tremblay A, Beaud H & Delbes G (2017) [Transgenerational impact of chemotherapy: Would the father exposure impact the health of future progeny?]. *Gynecologie, obstetrique, fertilité & senologie* 45(11):609-618.
- Trivedi PP, Kushwaha S, Tripathi DN & Jena GB (2010) Evaluation of male germ cell toxicity in rats: correlation between sperm head morphology and sperm comet assay. *Mutation research* 703(2):115-121.
- Trujillo J, Granados-Castro LF, Zazueta C, Anderica-Romero AC, Chirino YI & Pedraza-Chaverri J (2014) Mitochondria as a target in the therapeutic properties of curcumin. *Archiv der Pharmazie* 347(12):873-884.
- Van Pelt AM, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, Creemers LB, de Rooij DG & van Dissel-Emiliani FM (2002) Establishment of cell lines with rat spermatogonial stem cell characteristics. *Endocrinology* 143(5):1845-1850.
- Vendramini V, Robaire B & Miraglia SM (2012) Amifostine-doxorubicin association causes long-term prepubertal spermatogonia DNA damage and early developmental arrest. *Hum Reprod* 27(8):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. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 8:3.
- Viswanatha Swamy AH, Wangikar U, Koti BC, Thippeswamy AH, Ronad PM & Manjula DV (2011) Cardioprotective effect of ascorbic acid on doxorubicin-induced myocardial toxicity in rats. *Indian journal of pharmacology* 43(5):507-511.

- Wang J, Cao H, Xue X, Fan C, Fang F, Zhou J, Zhang Y & Zhang X (2014) Effect of vitamin C on growth of caprine spermatogonial stem cells in vitro. *Theriogenology* 81(4):545-555.
- Wang Y, Guo SH, Shang XJ, Yu LS, Zhu JW, Zhao A, Zhou YF, An GH, Zhang Q & Ma B (2017) Triptolide induces Sertoli cell apoptosis in mice via ROS/JNK-dependent activation of the mitochondrial pathway and inhibition of Nrf2-mediated antioxidant response. *Acta pharmacologica Sinica* 10.1038/aps.2017.95.
- 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. *Journal of cancer survivorship : research and practice* 8(3):437-447.
- Yang F, Teves SS, Kemp CJ & Henikoff S (2014) Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochimica et biophysica acta* 1845(1):84-89.
- Yeh YC, Lai HC, Ting CT, Lee WL, Wang LC, Wang KY, Lai HC & Liu TJ (2007) Protection by doxycycline against doxorubicin-induced oxidative stress and apoptosis in mouse testes. *Biochemical pharmacology* 74(7):969-980.
- Zhao L, Gu Q, Xiang L, Dong X, Li H, Ni J, Wan L, Cai G & Chen G (2017) Curcumin inhibits apoptosis by modulating Bax/Bcl-2 expression and alleviates oxidative stress in testes of streptozotocin-induced diabetic rats. *Therapeutics and clinical risk management* 13:1099-1105.

Tables

Table 1. Calculated EC₅₀ (μM) of DXO-induced cytotoxicity after a 24h exposure in GC-6Spg and Ser-W3 using three different assays.

Assay	GC-6Spg	Ser-W3
MTT	10.34	0.22
Total cell number	9.09	0.32
Viable cell number	4.86	1.46

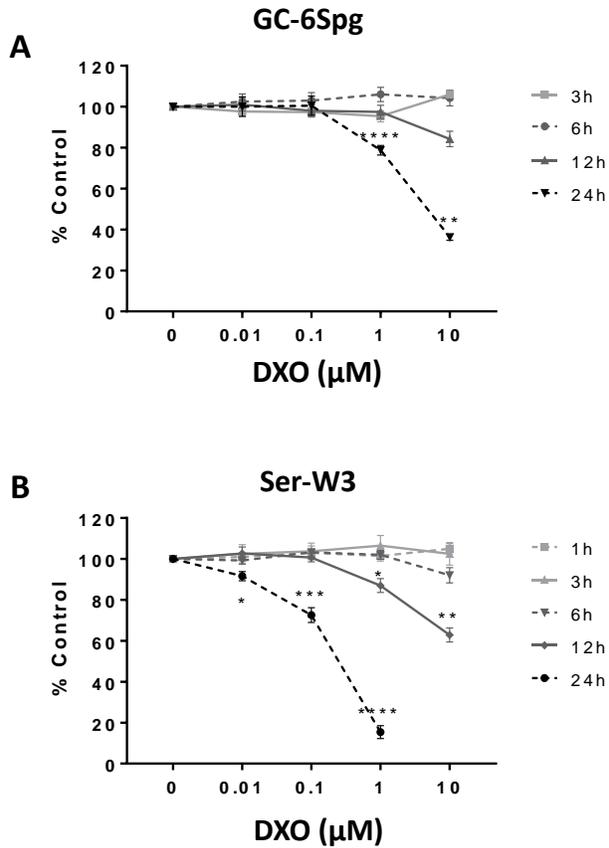
Table 2. List of selected compounds and their known mechanism of action according to the literature.

Compound	Mechanism of action	References
Vitamin C	<ul style="list-style-type: none">•ROS scavenger, reduces lipid peroxidation by vitamin E recycling•Apoptosis inhibitor	(Kalyanaraman 2013; Wang <i>et al.</i> , 2014)
Curcumin	<ul style="list-style-type: none">•ROS scavenger, metal chelator, reduces lipid peroxidation, Nrf2 activator•Anti-inflammatory properties	(Granados-Principal <i>et al.</i> , 2010; Kalyanaraman, 2013; Ramassamy, 2006)
Carnitine	<ul style="list-style-type: none">•ROS scavenger, metal chelator, Nrf2 activator•Promotor of cellular energy production•Apoptosis inhibitor	(Mongioi <i>et al.</i> , 2016; Surai, 2015)
Amifostine	<ul style="list-style-type: none">•ROS scavenger•Inhibitor of DNA breaks, intercalation, cross-links•G1-arrest of cell cycle through p53	(Lee <i>et al.</i> , 2003)

Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2; ROS: reactive oxygen species.

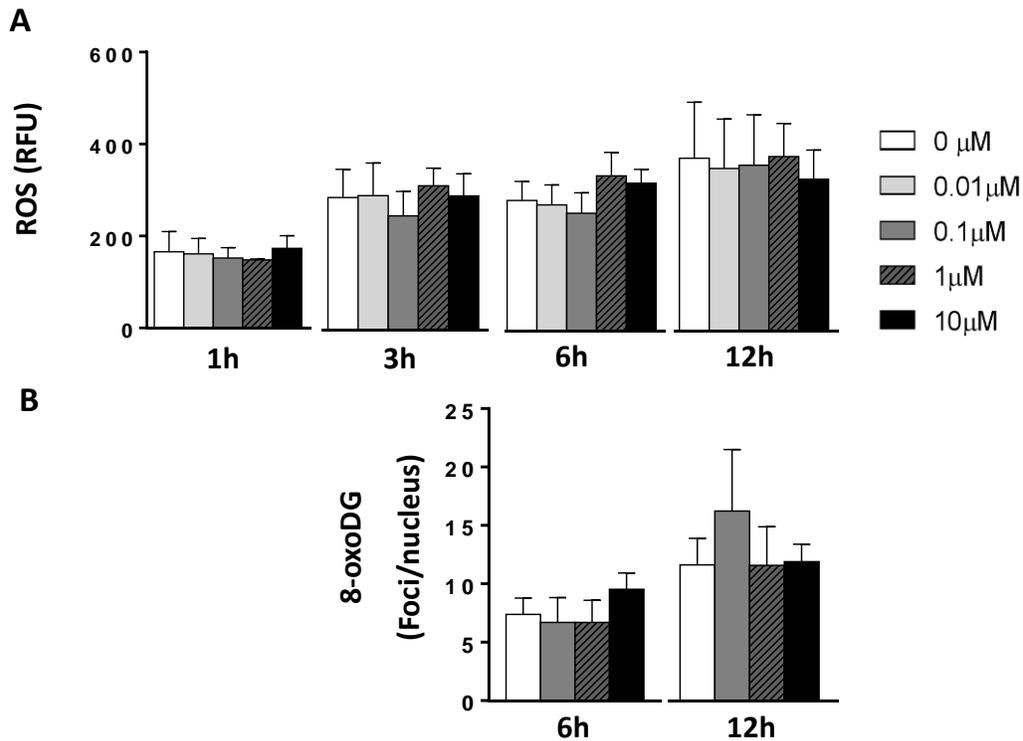
Figures

Figure 1. DXO-induced cytotoxicity in GC-6Spg and Ser-W3.



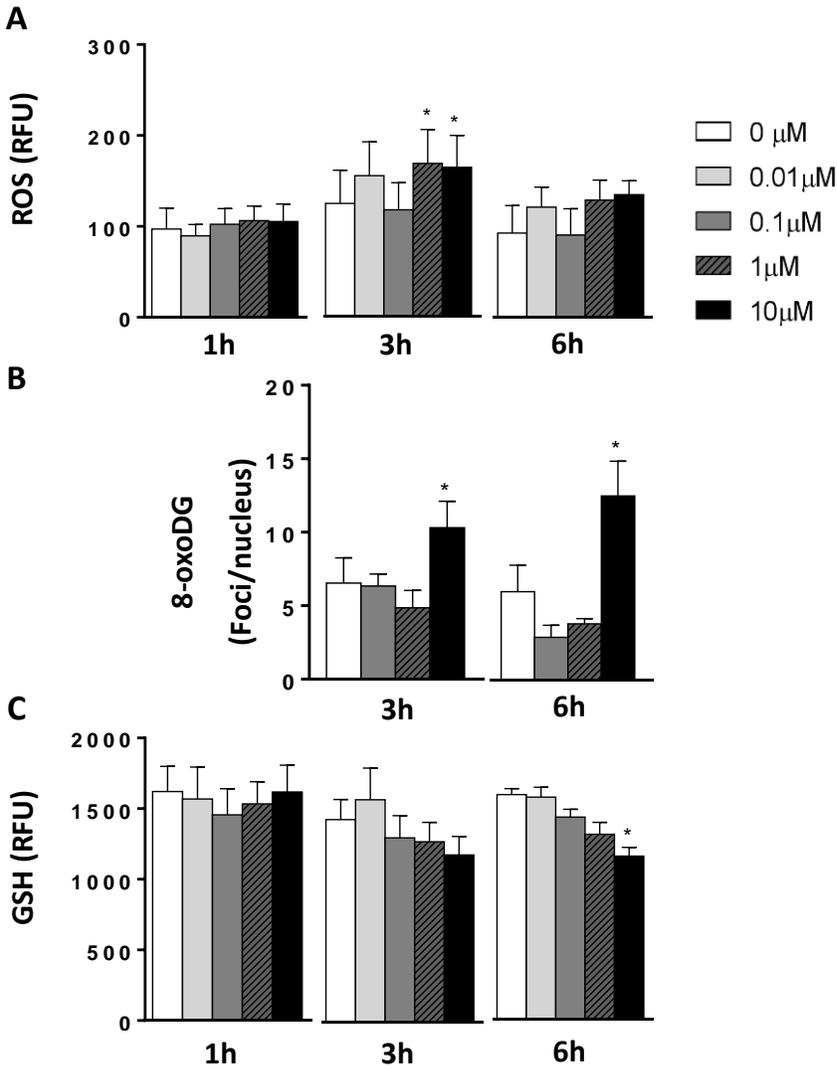
GC-6Spg (A) or Ser-W3 (B) were exposed to vehicle or to different concentrations of DXO. Cytotoxicity was evaluated using the MTT assay after increasing treatment times (1h-24h). Data are expressed as the percentage (%) of control and represent the mean \pm SEM (n=3-10). Dose effects were analysed by a one-way ANOVA (parametric data) or by a Friedman's test (non-parametric data) followed by post-hoc tests. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ compared to vehicle treated controls.

Figure 2. DXO-induced ROS and oxidative DNA damage in GC-6Spg.



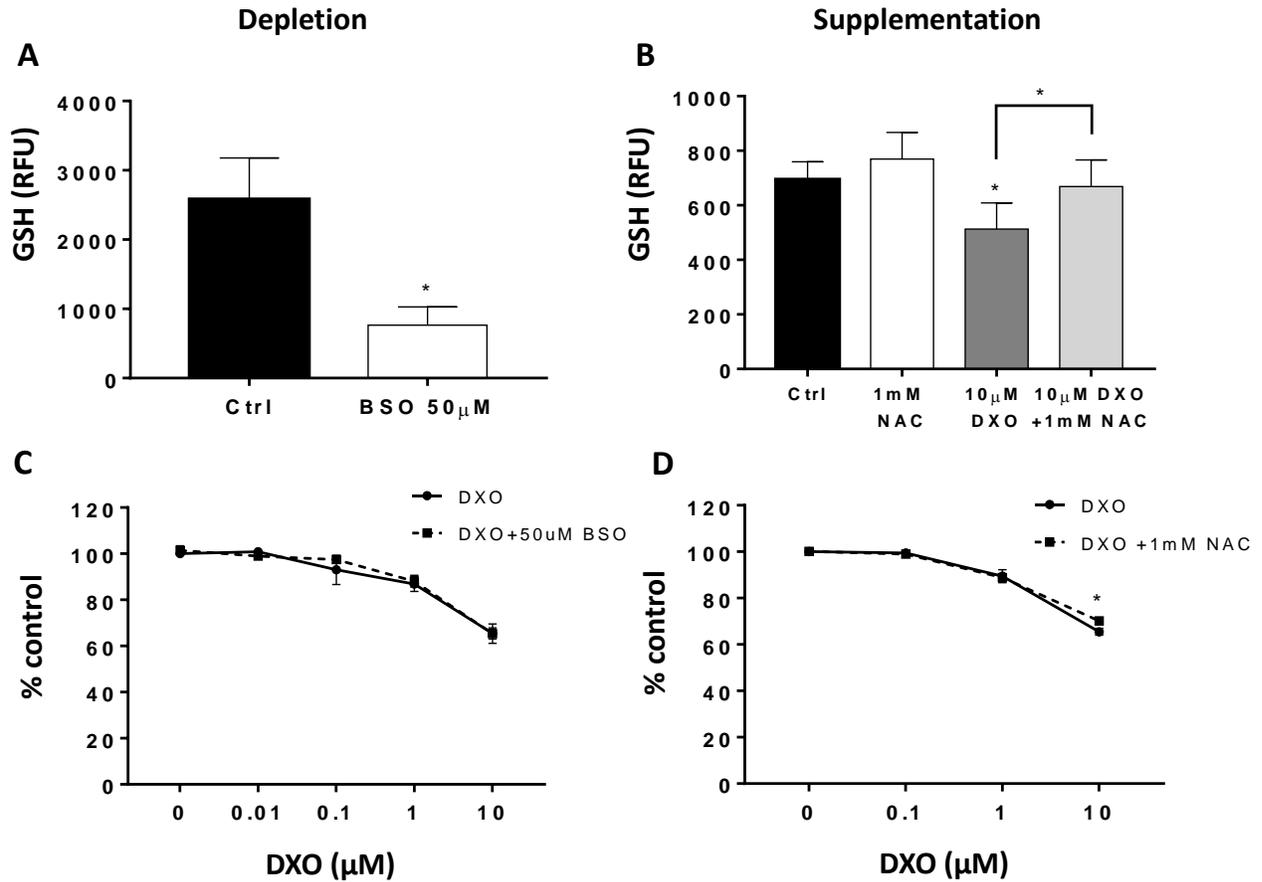
GC-6Spg were exposed to vehicle or to different concentrations of DXO, for various treatment times (1h-12h). Intracellular ROS were measured in relative fluorescence units (RFU) using the CellROX fluorescent probe (A). Oxidative DNA damage was determined by quantification of nuclear 8-oxoDG foci (Foci/nucleus) using immunofluorescence (B). Data represent the mean \pm SEM (n=3-6). Dose effects were analysed by a one-way ANOVA followed with Dunnett's post-test compared to vehicle treated controls.

Figure 3. DXO-induced ROS, oxidative DNA damage and GSH levels in Ser-W3.



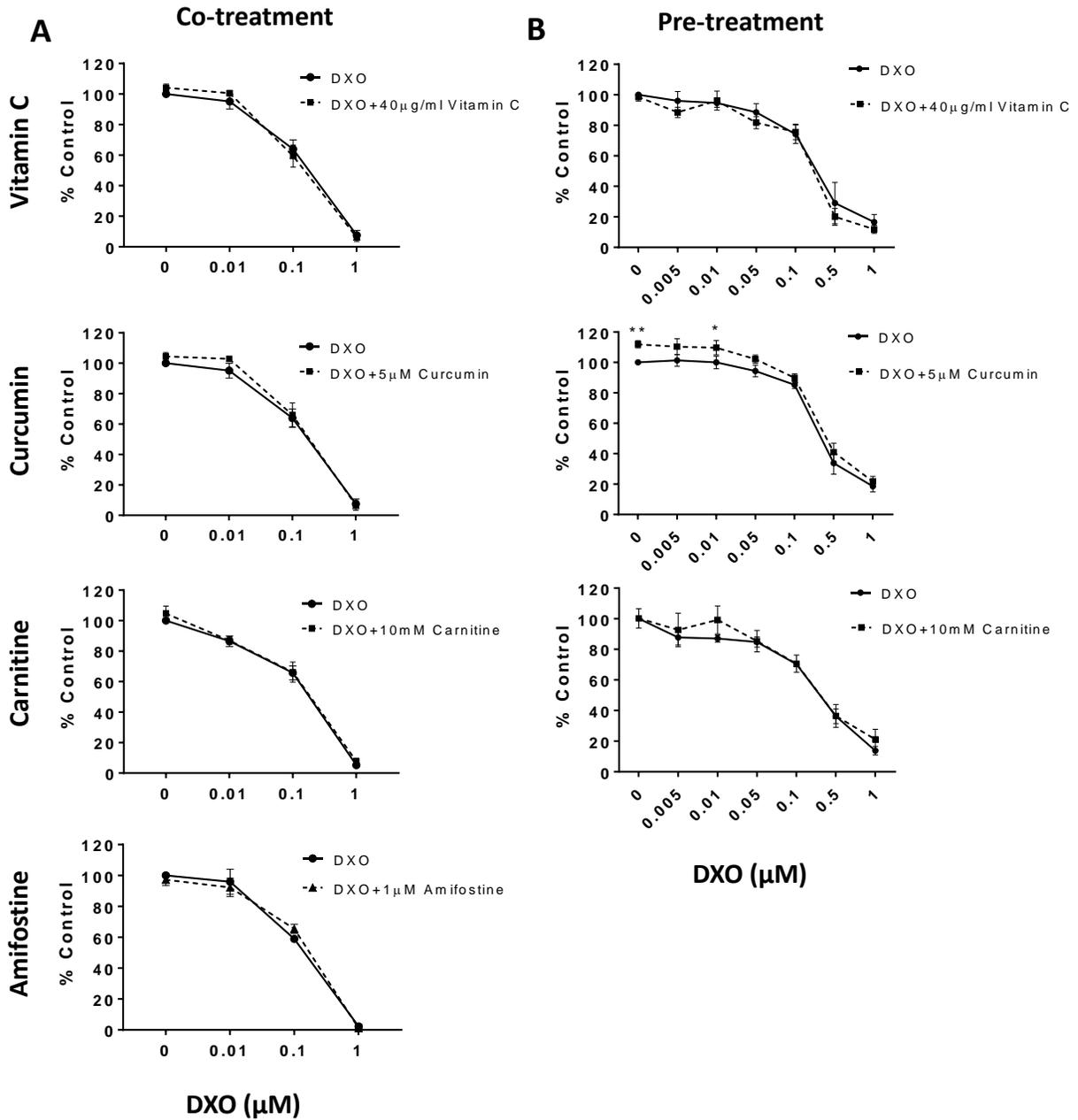
Ser-W3 were exposed to vehicle or to different concentrations of DXO, for various treatment times (1h-6h). Intracellular ROS were measured in relative fluorescence units (RFU) using the CellROX fluorescent probe (A). Oxidative DNA damage was determined by quantification of nuclear 8-oxoDG foci (Foci/nucleus) using immunofluorescence (B). Intracellular GSH levels were measured in RFU using the monochlorobimane fluorescent probe (C). Data represent the mean \pm SEM (n=4-8). Dose effects were analysed by a one-way ANOVA followed with Dunnett's post-test: *p<0.05 compared to vehicle treated controls.

Figure 4. Effect of depletion or supplementation of intracellular GSH on DXO-induced cytotoxicity in Ser-W3.



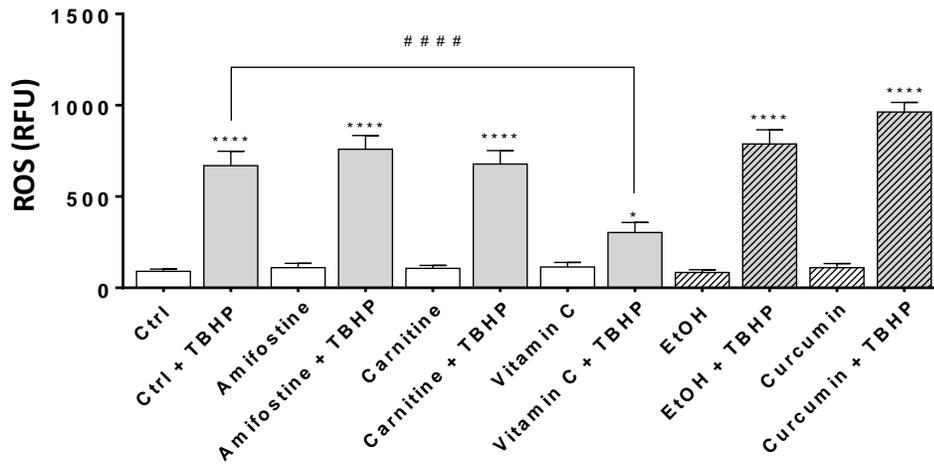
Ser-W3, depleted (A and C) or supplemented (B and D) in GSH, were exposed to vehicle or to different concentrations of DXO. Levels of intracellular GSH were measured in relative fluorescence units (RFU) using the monochlorobimane fluorescent probe (A and B). Depletion was confirmed after a 24h pre-treatment with BSO (A) and supplementation was quantified after a 2h pre-treatment with NAC followed by 6h of co-treatment with NAC and DXO or vehicle (B). Cytotoxicity was evaluated using the MTT assay after 12h of DXO exposure (C and D) and expressed as percentage of controls. Data represent the mean \pm SEM (depletion: n=3, supplementation: n=5). Efficiency of GSH depletion and supplementation were analysed using a paired student's t-test. The impact of GSH level on DXO-induced cytotoxicity were analysed by a two-way ANOVA followed with Bonferroni's post-test: *p<0.05 compared to DXO alone.

Figure 5. Effect of four antioxidants on DXO-induced cytotoxicity in Ser-W3.



Ser-W3 were exposed to each antioxidant only during DXO treatment (A, co-treatment) or 24h prior to exposure and during DXO treatment (B, pre-treatment). Cytotoxicity was evaluated using the MTT assay after 24h of DXO treatment. Data are expressed as the percentage (%) of control and represent the mean \pm SEM (n=3-8). Antioxidant effects were analysed by a two-way ANOVA followed by a Bonferroni's post-test: *p<0.05; **p<0.01; compared to DXO alone.

Figure 6. ROS inhibition by antioxidants in Ser-W3 exposed to TBHP.



Ser-W3 were exposed to the control vehicle (ctrl or EtOH) or to one of the four antioxidants for 3h followed by a 45 minute exposure to 400 μ M of TBHP. Doses of antioxidant were 1 μ M for amifostine, 10mM for carnitine, 40 μ g/ml for vitamin C, and 5 μ M for curcumin. At the end of treatment, intracellular ROS production was measured in relative fluorescence units (RFU) using the CellROX fluorescent probe. Data represent the mean \pm SEM (n=4). ROS inhibition by antioxidants compared to TBHP alone was analysed by a two-way ANOVA followed by a Tukey's post-test. *p<0.05; ****p<0.0001 compared to antioxidant without TBHP, ####p<0.0001 compared to TBHP alone.

Supplementals

Supplementary Table 1. Stock solutions and final concentrations of antioxidants and BSO for cell treatments.

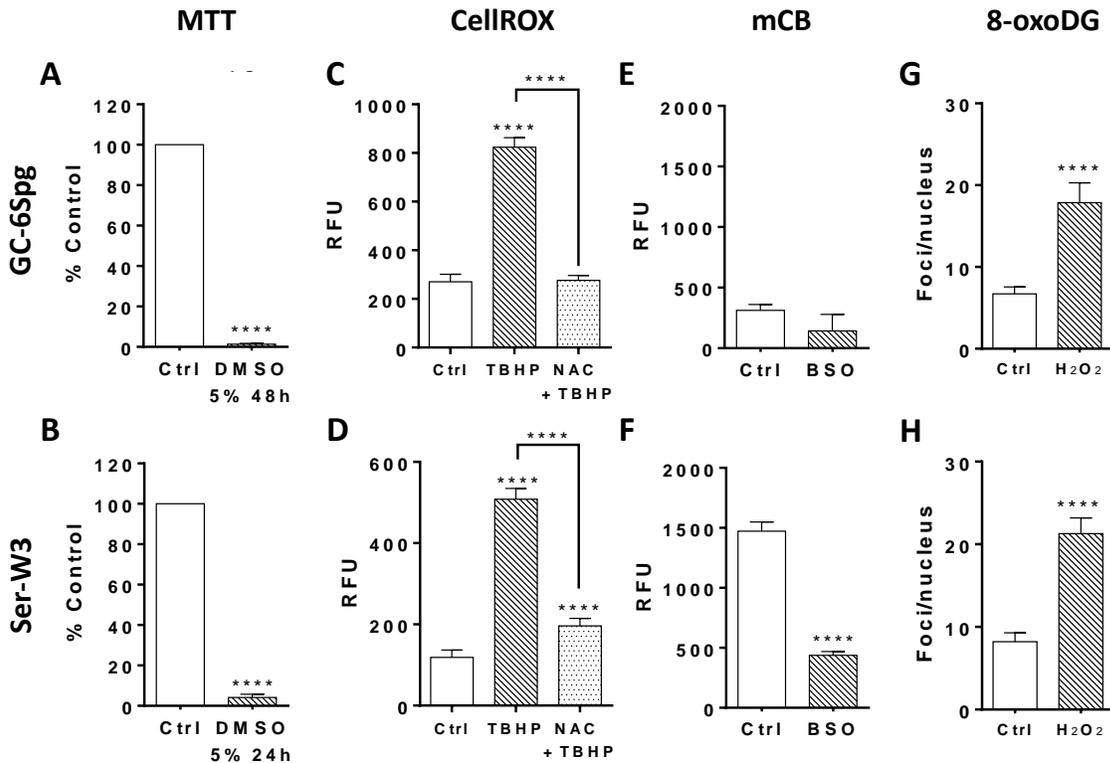
Compound	Stock solution	[Final]	Dose justification
Amifostine	12.5mM in water (GC-6Spg) or DMEM (Ser-W3) Kept at -20°C	1µM	Highest non-toxic dose tested by MTT (GC-6Spg and Ser-W3)*
BSO	50mM in water Prepared freshly	50µM	Non-toxic dose tested by MTT (Figure 4C) Efficient for reduction of GSH content in Ser-W3 (Figure 4A)
Carnitine	250mM in water (GC-6Spg) or DMEM (Ser-W3) Adjusted pH 7.4 Kept at -20°C	10mM	Non-toxic dose tested by MTT (Figure 5) Reduction of apoptosis and ROS in neonatal rat cardiomyocytes exposed to DXO (Chao <i>et al.</i> 2011)
Curcumin	200µM in EtOH, then 25µM in water (GC-6Spg) or DMEM (Ser-W3) Prepared freshly	5µM	Highest non-toxic dose tested by MTT*
NAC	500mM in water Kept at -20°C	1mM	Highest non-toxic dose tested by MTT* Efficient for supplementation of GSH content in Ser-W3 (Figure 4B)
Vitamin C	200µg/ml in water (GC-6Spg) or DMEM (Ser-W3) Adjusted pH 7.4 Prepared freshly	10, 25, 40µg/ml	Non-toxic doses tested by MTT (Figure 5) 40µg/ml beneficial for proliferation and reduces ROS in caprine spermatogonial stem cells (Wang <i>et al.</i> , 2014)

Unless specified, toxicity assessment by MTT was done using the Ser-W3 cell line.

* Data not shown

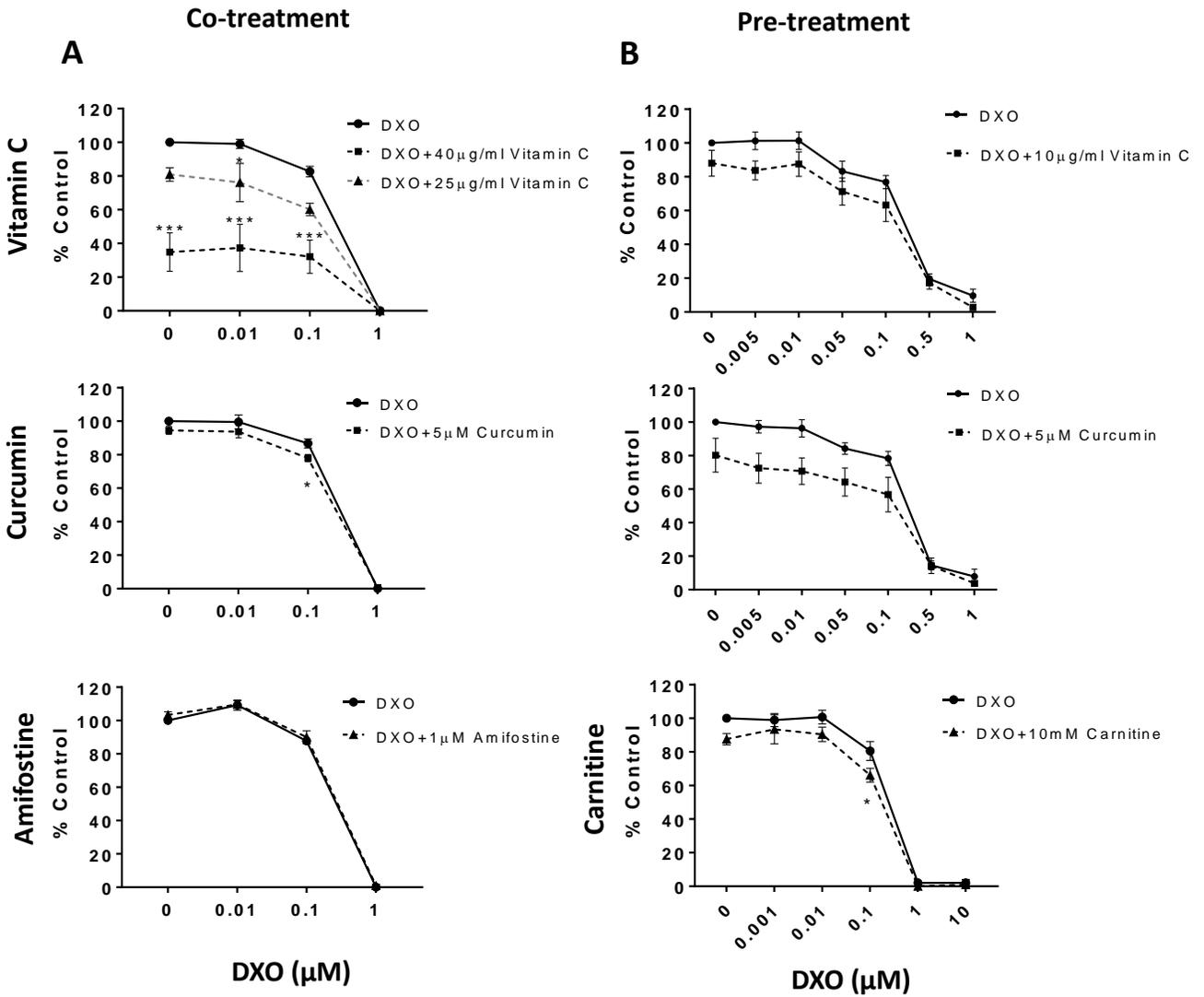
BSO: L-buthionine sulfoximine; DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium; DXO: doxorubicin; EtOH: ethanol; [Final]: final concentration for treatments; GSH: reduced glutathione; MTT: Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide; NAC: N-acetylcystein; ROS: reactive oxygen species.

Supplementary Figure 1. Positive controls for cytotoxicity, ROS, oxidative DNA damage and GSH levels measurements in GC-6Spg and Ser-W3.



GC-6Spg (A, C, E, G) and Ser-W3 (B, D, F, H) were exposed to different known inducers to validate all assays used in this study. 5% DMSO for 48h (A) or 24h (B) was used to validate the MTT assay expressed in percentage of control. A 45min 400 μ M TBHP exposure induced ROS accumulation and 1h pre-treatment with 1mM (C) or 5mM (D) N-acetylcystein (NAC) was used to quench ROS accumulation in CellROX experiments expressed in relative fluorescence units (RFU). 24h exposure to 50 μ M BSO was used to deplete intracellular GSH content (E, F) in mCB experiments expressed in RFU. Finally, 15min exposure to 400 μ M (G) or 1mM (H) H₂O₂ was used as a positive control for oxidative DNA damage in 8-oxoDG experiments expressed number of foci/nucleus. Data are represented as mean \pm SEM (n=3-28). Paired Student's t-test (parametric data) or Wilcoxon test (non-parametric data) were used. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001 compared to untreated cells.

Supplementary Figure 2. Effect of four antioxidants on DXO-induced cytotoxicity in GC-6Spg.



GC-6Spg were exposed to each antioxidant only during DXO treatment (A, co-treatment) or 24h prior to exposure and during DXO treatment (B, pre-treatment), except for carnitine were the pre-treatment lasted 20h. Cytotoxicity was evaluated using the MTT assay after 48h of DXO treatment. Data are expressed as the percentage (%) of control and represent the mean \pm SEM (n=3-4). Antioxidant effects were analysed by a two-way ANOVA followed by a Bonferroni's post-test: *p<0.05; ***p<0.001; compared to DXO alone

CHAPITRE 3 : DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les résultats

L'étude présentée dans ce mémoire s'intéresse à la nécessité de mettre en place des solutions de préservation de la fertilité adaptées aux garçons pré-pubères qui reçoivent un diagnostic de cancer (Chan & Robaire, 2011). En effet, il est connu que les composés de chimiothérapies utilisés dans le traitement des cancers pédiatriques sont toxiques pour les spermatogonies (Nurmio *et al.*, 2009a) incluant les SSCs (Marcon *et al.*, 2010) et les cellules de Sertoli (Brilhante *et al.*, 2012), toutes deux présentes dans le testicule immature. Pour pallier à ce problème, la protection *in situ* du testicule pré-pubère par des antioxydants a été proposée (Das *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2002). Ultimement, le but de cette stratégie est de diminuer la toxicité des chimiothérapies sur les cellules essentielles à la mise en place de la spermatogenèse et d'ainsi diminuer le risque d'infertilité une fois les patients devenus adultes. Afin d'étudier le potentiel protecteur des antioxydants sur les cellules du testicule immature, nous avons utilisé la DXO comme composé modèle des traitements d'oncologie pédiatrique actuels (Société canadienne du cancer, 2018a; Société canadienne du cancer, 2018b), qui est connue pour induire du stress oxydatif testiculaire (Cabral *et al.*, 2018; Das *et al.*, 2012). Dans un premier temps, nous avons émis l'hypothèse que la DXO induit un stress oxydatif dans les spermatogonies et cellules de Sertoli du testicule immature. De plus, nous avons proposé que des antioxydants pourraient protéger ces deux types cellulaires contre la toxicité de la DXO.

Pour répondre à ces hypothèses, nous avons utilisé un modèle *in vitro* de lignées cellulaires de spermatogonies aux caractéristiques souches et de cellules de Sertoli immatures de rats. L'induction de toxicité et de stress oxydatif par la DXO ont déjà été mise en évidence via des modèles *in vitro*, notamment par l'utilisation d'une lignée cellulaire de cardiomyocytes embryonnaires de rats H9c2 (Liu *et al.*, 2015). Dans notre étude, les résultats montrent que la DXO est toxique sur les deux lignées étudiées, mais un stress oxydatif n'est induit que dans la lignée de cellules de Sertoli. Par contre, nous avons vu que le système d'antioxydant du GSH ne semble pas essentiel pour la défense de la lignée de cellules de Sertoli contre la DXO. De plus, des antioxydants ayant diverses propriétés et origines n'ont pas été en mesure de protéger les deux lignées contre la toxicité de la DXO.

Afin d'évaluer la pertinence des résultats que nous avons obtenus dans un contexte de traitement *in vivo*, il faut savoir que le pic de DXO plasmatique chez des garçons pré-pubères recevant une

injection classique est d'environ 0,1-0,8 μ M pour une durée entre 1h et 4h (Krischke *et al.*, 2016). De plus, des études chez le rat adulte ont montré que la DXO peut s'accumuler dans le testicule (Nwankwoala *et al.*, 2008). Il pourrait donc être possible d'y atteindre des concentrations supérieures et pour une plus grande durée. Or, dans notre étude *in vitro*, une dose de 10 μ M (1h-12h), étant 10 à 100 fois plus élevée que celle retrouvée dans le plasma humain (Krischke *et al.*, 2016), n'a pas induit de stress oxydatif mesurable pour la lignée de spermatogonies aux caractéristiques souches. Ceci laisse supposer que le stress oxydatif ne serait pas une voie pertinente de toxicité de la DXO dans cette lignée à des doses potentiellement pertinentes en clinique.

En ce qui concerne la lignée de cellules de Sertoli, une augmentation d'EROs est visible après 3h de traitement à 1-10 μ M de DXO. Par contre, contrairement à la toxicité vue par MTT sur cette lignée, la production d'EROs ne suit pas une courbe dose réponse classique (EROs à 1 μ M supérieurs aux EROs à 10 μ M), suggérant que des voies différentes de toxicité s'activent selon la concentration de DXO. De plus, l'augmentation du 8-oxoDG et la diminution du GSH intracellulaire induits par la DXO ne sont visibles qu'à 10 μ M après 3h et 6h de traitement respectivement. Ces résultats suggèrent que d'autres voies de toxicité de la DXO sont activées dans notre lignée de cellules de Sertoli immatures à des doses pertinentes en clinique. À titre de comparaison, le traitement d'une lignée de cardiomyocytes embryonnaires de rats H9c2 avec 1 μ M de DXO augmente la production d'EROs dès 2h de traitement et l'effet s'amplifie à 4h, 8h, 12h, 24h et 36h de traitement (Sun *et al.*, 2013). Dans notre étude, les niveaux d'EROs qui étaient augmentés après 3h retournent à des niveaux contrôles après 6h de traitement, ce qui suggère l'activation d'une défense antioxydante efficace. À des doses pertinentes en clinique, les cellules cardiaques pourraient donc être plus sensibles au stress oxydatif induit par la DXO.

Toujours en faisant référence au contexte *in vivo*, chez le rat adulte, les concentrations de DXO plasmatiques diminuent rapidement entre 1h et 24h après injection, alors qu'elles tendent à rester élevés jusqu'à 24h dans le testicule (Nwankwoala *et al.*, 2008). En parallèle, l'utilisation d'une sonde fluorescente *dichlorofluorescéine-diacétate* (DCF-DA) a montré une augmentation d'EROs dans la lignée de cardiomyocytes de rats H9c2 exposées à la DXO pendant 24h (Liu *et al.*, 2015). Il est donc possible de penser qu'une exposition à la DXO sur un plus long laps de temps pourrait induire du stress oxydatif dans nos deux lignées cellulaires. Cependant, que ce soit dans la lignée de spermatogonies ou de cellules de Sertoli immatures, des doses plus faibles de DXO pendant 24h (0,1 μ M ou moins afin de limiter la perte de cellules due à la toxicité des fortes doses) n'ont pas augmenté les niveaux de 8-oxoDG ou d'EROs (données non montrées). De manière

intéressante, une dose similaire de DXO de 0,1 μ M pendant 24h induit des cassures dans l'ADN de la lignée de spermatogonies GC-6Spg (Beaud *et al.*, 2017). Donc, à une dose potentiellement pertinente en clinique, l'induction de dommages à l'ADN pourrait être davantage impliquée dans la toxicité de la DXO sur les spermatogonies. D'un autre côté, il faudrait réaliser une expérience similaire sur la lignée de cellules de Sertoli afin de valider si les cassures dans l'ADN sont présentes dans ces cellules.

Limites de l'étude

Nos résultats sont les premiers à étudier spécifiquement la voie du stress oxydatif en réponse à la DXO dans deux types cellulaires du testicule immature. Cependant, notre étude comporte des limites comme l'utilisation d'un nombre faible de marqueurs de stress oxydatif dans chacune des lignées. En effet, d'autres marqueurs pourraient avoir été affectés comme la peroxydation des lipides, un marqueur utilisé de nombreuses fois *in vivo* pour évaluer le stress oxydatif induit par la DXO (Ahmed *et al.*, 2010; Das *et al.*, 2012; Yeh *et al.*, 2007), ou encore les niveaux de protéines oxydées (Prahalthan *et al.*, 2006a). Une mesure de ces marqueurs aurait permis de confirmer la présence ou non de stress oxydatif dans chacune des lignées cellulaires étudiées. De plus, il est possible qu'une activation des défenses antioxydantes ait eu lieu (Ceribasi *et al.*, 2012), empêchant une mesure du stress oxydatif induit par la DXO à des doses inférieures à 10 μ M. Or, dans notre étude, les niveaux de GSH intracellulaire représentent la seule défense antioxydante mesurée. De plus, la génération d'EROs par la DXO passe principalement par la production d'anions superoxyde (Riddick *et al.*, 2005), ce qui pourrait expliquer pourquoi le GSH, qui ne neutralise pas directement ce EROs, n'était pas essentiel aux Ser-W3. L'évaluation d'activités enzymatiques de la SOD, de la CAT, des enzymes du système du GSH et de l'activité transcriptionnelle de Nrf2 aurait donc permis d'élaborer un portrait plus global des défenses antioxydantes différentielles dans nos lignées exposées à la DXO.

Bien que l'utilisation de lignées cellulaires ait l'avantage d'isoler les effets directs de la DXO et des antioxydants sur les cellules d'intérêt, notre modèle d'étude comporte des limites qui doivent être considérées dans l'interprétation des résultats. La principale limite est due à l'immortalisation de nos deux lignées avec l'antigène grand T du virus SV40 (Pognan *et al.*, 1997; Van Pelt *et al.*, 2002), qui inactive le suppresseur de tumeur p53. Or, p53 régule différents acteurs du métabolisme cellulaire. La perte de p53 peut augmenter l'activité d'enzymes glycolytiques, comme observé dans les cellules cancéreuses (Kondoh, 2008). L'utilisation du métabolisme glycolytique au dépend du métabolisme mitochondrial de phosphorylation oxydative pourrait rendre nos

lignées cellulaires résistantes au stress oxydatif dépendant de la mitochondrie (Kalyanaraman, 2013; Kondoh, 2008), comme c'est le cas pour le stress oxydatif induit par la DXO (Granados-Principal *et al.*, 2010). Le changement de métabolisme cellulaire est en effet un mécanisme connu de résistance des cellules cancéreuses à certaines chimiothérapies et à la radiothérapie (Kalyanaraman, 2013).

De plus, bien que la différence de sensibilité des lignées de spermatogonies et de cellules de Sertoli pourrait s'expliquer par une génération différentielle de métabolites de la DXO, notre modèle n'inclue malheureusement pas la possibilité d'une exposition aux métabolites qui seraient générés ailleurs dans l'organisme. En effet, certains métabolites comme le DOXol ont eux aussi un potentiel d'induction de stress oxydatif (Granados-Principal *et al.*, 2010; Minotti *et al.*, 2000). Par contre, l'exposition du testicule pré-pubère de rat et la réponse de chaque type cellulaire aux différents métabolites suite à une injection de DXO ne sont encore connues. En parallèle, le contexte de culture cellulaire ne permet pas la présence d'interactions entre les types cellulaires du testicule immature, ce qui pourrait aussi affecter leur réponse aux composés toxiques. Il est donc possible de penser que des résultats différents pourraient être obtenus avec des modèles préservant ces interactions, comme la culture organotypique ou l'exposition *in vivo*. Un autre point à considérer est qu'un stress oxydatif systémique pourrait être présent chez les rats traités à la DXO, et donc affecter le statut de stress oxydatif testiculaire de manière indirecte. Par exemple, l'expression de la CuZn-SOD est diminuée dans le testicule, mais aussi dans le sérum de rats adultes exposés à la DXO (Yeh *et al.*, 2007), suggérant un débalancement systémique de la défense antioxydante en réponse à la DXO. Un tel effet ne serait par contre pas reproduit dans notre modèle de culture.

Finalement, de manière plus générale, il ne faut pas oublier que le système reproducteur masculin comporte plusieurs organes importants pour la fertilité masculine, ce qui n'est pas considéré dans notre étude. Étant donné que l'inhibition de la spermatogenèse semble être la principale cause de problèmes de fertilité chez les hommes survivants d'un cancer pédiatrique (Wasilewski-Masker *et al.*, 2014), le testicule a été l'organe le plus étudié. Cependant, les problèmes de motilité des spermatozoïdes observés chez des survivants de cancers pédiatriques de la CCSS pourraient suggérer une sensibilité de l'épididyme aux traitements contre le cancer (Wasilewski-Masker *et al.*, 2014). En effet, des études ont montré que l'agent alkylant busulfan est toxique pour l'épididyme de souris adulte, en induisant des altérations histologiques ainsi qu'une baisse d'expression de protéines de jonctions cellulaires et du cytosquelette (Fang *et al.*, 2017). De plus, la DXO est capable d'augmenter les EROs et de diminuer l'activité de plusieurs enzymes

antioxydantes dans l'épididyme de rat adulte, et un traitement d'antioxydant mitige ces effets (Olusoji *et al.*, 2017). L'épididyme étant le lieu de maturation finale et d'acquisition de la motilité des spermatozoïdes (Mawhinney & Mariotti, 2013), une toxicité des chimiothérapies sur l'épididyme pré-pubère pourrait affecter la fertilité adulte si des conséquences persistent à long terme.

Perspectives techniques

Malgré les limites de notre étude, nos résultats permettent de générer des questions pertinentes à la recherche sur l'action des chimiothérapies et des antioxydants sur le testicule immature. Par exemple, comme nous l'avons vu *in vitro*, est-ce que les cellules de Sertoli sont plus sensibles que les SSCs au stress oxydatif induit par la DXO dans un contexte *in vivo*? La toxicité de la DXO sur les lignées de spermatogonies et cellules de Sertoli semble multifactorielle, alors quelles sont les différentes voies impliquées dans la toxicité de la DXO sur ces deux types cellulaires ? En fonction de ces voies, quels types de protecteurs *in situ* auraient le plus de potentiel pour diminuer l'impact de la DXO sur la spermatogenèse?

Afin de répondre à ces questions, les expériences suivantes seraient intéressantes. D'abord, pour confirmer si la DXO induit du stress oxydatif dans les spermatogonies et les cellules de Sertoli immatures ainsi que leur sensibilité différentielle, il est nécessaire de valider les résultats obtenus en utilisant un modèle *in vivo*. Des coupes histologiques de testicules de rats pré-pubère traités à la DXO sont déjà disponibles au laboratoire. Ces rats ont reçus 5mg/kg de DXO par voie intrapéritonéale à l'âge de 6 jours, et les tissus ont été récupérés 24h ou 48h après traitement. Ces coupes pourraient être utilisées pour la semi-quantification par immunofluorescence de marqueurs de stress oxydatif comme le 8-oxoDG (Pralalathan *et al.*, 2006a) et le 4-HNE (Jungsuwadee *et al.*, 2006), en co-marquage avec des marqueurs spécifiques des cellules germinales ou des cellules de Sertoli immatures. Par exemple, le marqueur Hsp90 déjà utilisé au laboratoire pourrait servir de marqueur des cellules germinales (Chemek *et al.*, 2016; Rwigemera *et al.*, 2017), alors que les cellules non-marquées par Hsp90 mais présentes à l'intérieur des tubes séminifères seraient identifiées comme des cellules de Sertoli. En parallèle, l'évaluation du marqueur γ -H2AX (forme phosphorylée de l'histone H2AX) dans la lignée Ser-W3 ainsi que sur ces mêmes coupes testiculaires de rat permettrait de voir si des cassures double brin sont induites par l'exposition des cellules de Sertoli à la DXO (Dohrmann *et al.*, 2012).

Dans un autre ordre d'idée, notre étude soulève le fait que plusieurs voies d'action agissent probablement en concert dans la toxicité de la DXO. À plus long terme, il serait donc intéressant

d'étudier l'ensemble des gènes dont l'expression est changée suite à une exposition des spermatogonies et cellules de Sertoli immatures à la DXO, incluant les gènes associés au stress oxydatif. À cet effet, l'utilisation de lignées cellulaires pourrait être remplacée par des cultures primaires de SSCs et de cellules de Sertoli immatures (Lalevee *et al.*, 1997; Marcon *et al.*, 2010), un modèle limitant les transformations du métabolisme cellulaire pouvant affecter la réponse aux chimiothérapies. Par contre, ce modèle reste peu représentatif de l'exposition réelle de chaque type cellulaire *in vivo*. Une autre option pour poursuivre ce projet serait donc de réaliser des traitements *in vivo* de rats pré-pubères à la DXO, suivant le protocole de traitement déjà en place au laboratoire mentionné ci-haut. Ensuite, il faudrait effectuer un tri cellulaire des cellules germinales (principalement des SSCs et spermatogonies à cet âge) et des cellules de Sertoli immatures. Ce modèle unique aurait l'avantage d'exposer les spermatogonies et les cellules de Sertoli dans un contexte où elles interagissent entre-elles et avec leur environnement, tout en permettant l'étude détaillée de l'impact de la DXO dans chacune de ces cellules spécifiquement. Pour ce faire, nous possédons un modèle de rats exprimant la GFP dans la lignée germinale uniquement (Cronkhite *et al.*, 2005), ce qui nous permet d'isoler les cellules germinales de rats pré-pubères par tri cellulaire activé par fluorescence (*Fluorescence activated cell sorting* (FACS)). La même expérience serait possible pour les cellules de Sertoli immatures, suite à la mise au point d'un marqueur spécifique permettant de les identifier. Par exemple, le récepteur à la FSH qui est exprimé dans les Sertoli dès les stades fœtaux chez le rat pourrait être utilisé (O'Shaughnessy, 2014). Ensuite, que ce soit avec les cultures primaires ou les cellules isolées par tri, il faudrait analyser l'expression des gènes par micro-réseau, puis mettre en évidence les voies cellulaires affectées par analyse bio-informatique.

Éventuellement, d'autres types cellulaires du testicule immature pourraient être étudiés de la même façon, comme les cellules péritubulaires myoïdes. L'impact de la DXO sur ces cellules serait intéressant à mettre en évidence, à cause de leurs caractéristiques musculaires les rapprochant des cardiomyocytes qui sont hautement sensibles aux effets de la DXO (Kalyanaraman, 2013; Liu *et al.*, 2015; Pfizer Canada Inc, 2012). Des protocoles de culture primaire de cellules péritubulaires de rats pré-pubères ont déjà été décrits dans la littérature et pourraient être utilisés (Bhushan *et al.*, 2016). De plus, la même approche expérimentale pourrait être utilisée pour évaluer la toxicité des antioxydants en combinaison avec les chimiothérapies sur les types cellulaires désirés.

Recommandations

De manière plus générale, afin de faire progresser la recherche en oncofertilité pédiatrique, il est possible d'émettre des recommandations quant à l'évaluation des antioxydants ou de tout autre composé protecteur *in situ* pour préserver la fertilité des garçons pré-pubères.

1- Privilégier l'utilisation d'animaux pré-pubères ou de cultures primaires de cellules immatures. Chez les rongeurs, la majorité des études *in vivo* sur la gonadotoxicité de la DXO combinée avec des antioxydants sont réalisées à l'âge adulte (Attia *et al.*, 2010; Ceribasi *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2012), plutôt qu'avant la puberté (Cabral *et al.*, 2018; Vendramini *et al.*, 2012). Par contre, ce sont les garçons pré-pubères qui sont les plus vulnérables aux conséquences des chimiothérapies à cause de l'impossibilité de faire la cryopréservation de spermatozoïdes (Chan & Robaire, 2011).

2- Inclure l'évaluation de la fertilité comme critère d'efficacité des antioxydants contre les chimiothérapies *in vivo*. Les études actuelles n'incluent pratiquement jamais l'évaluation de la fertilité résultante du traitement combiné de DXO et d'antioxydant (Atessahin *et al.*, 2006; Ceribasi *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2012; Prahalathan *et al.*, 2006a; Prahalathan *et al.*, 2006b). Or, l'amélioration de certains paramètres comme l'histologie testiculaire n'est pas gage d'une fertilité améliorée (Vendramini *et al.*, 2012; Vendramini *et al.*, 2010). Il est donc nécessaire de comparer la fertilité d'animaux traités aux chimiothérapies avec ou sans antioxydant, comme évalué dans les études de Cabral, Vendramini et Hagiuda par le biais d'accouplements avec des femelles contrôles (Cabral *et al.*, 2018; Hagiuda *et al.*, 2015; Vendramini *et al.*, 2012; Vendramini *et al.*, 2010).

3- Privilégier les antioxydants n'ayant pas d'effet gonadotoxique connu, notamment au niveau de la fertilité et de la qualité des spermatozoïdes. Des dizaines d'antioxydants différents ont été testés pour protéger le testicule contre la DXO. Par contre, certains antioxydants comme l'amifostine (Vendramini *et al.*, 2012) et le dexrazoxane (Levi *et al.*, 2015) ont une toxicité intrinsèque sur le testicule de rongeur immature et adulte, respectivement. Il faudrait donc rediriger les études vers d'autres composés moins gonadotoxiques. Malheureusement, l'amifostine et le dexrazoxane ont déjà été approuvés par la US Food and Drug Administration pour la diminution des effets secondaires de certains régimes de chimiothérapie chez l'adulte (Armenian *et al.*, 2017; Hensley *et al.*, 2009). L'usage du dexrazoxane n'est cependant pas recommandé chez l'enfant (Hensley *et al.*, 2009).

4- Évaluer la santé de la progéniture de mâles traités aux chimiothérapies combinées avec les antioxydants. La santé des enfants nés de pères survivants de cancers pédiatriques a déjà été

évaluée dans la population humaine (Tremblay *et al.*, 2017) (Annexe 1). Globalement, ces enfants ne semblent pas avoir de risque plus élevé de malformations congénitales majeures ou de mortalité post-natale (Tremblay *et al.*, 2017) (Annexe 1). Par contre, l'utilisation de modèles animaux a mis en évidence des effets de santé plus subtiles dans les descendants directs et sur plusieurs générations de mâles exposés aux chimiothérapies, et des mécanismes de transmissions génétiques et/ou épigénétiques ont été suggérés (Tremblay *et al.*, 2017) (Annexe 1). Cependant, l'impact de la combinaison de chimiothérapies avec des antioxydants reste à évaluer. Certaines études suggèrent que les antioxydants peuvent diminuer l'apoptose des spermatogonies (Ceribasi *et al.*, 2012), un processus qui sert normalement à éliminer les cellules endommagées. On peut donc émettre l'hypothèse que si l'antioxydant favorise la survie de SSCs dont le matériel génétique a été endommagé par les chimiothérapies, sans en diminuer la génotoxicité (Yurtcu *et al.*, 2014), il pourrait y avoir un risque de transmission de mutations génétiques ou épigénétiques à la descendance.

Les applications en clinique

Dans un contexte clinique, l'utilisation des antioxydants en suppléments de fortes doses (c'est-à-dire en doses plus fortes que ce qu'on pourrait consommer via l'alimentation) reste une controverse majeure dans le domaine de l'oncologie. Des revues de la littérature regroupant les études cliniques actuelles tirent des conclusions opposées quant à la sécurité des antioxydants en association avec les traitements contre le cancer (D'Andrea, 2005; Fuchs-Tarlovsky, 2013; Lawenda *et al.*, 2008; Simone *et al.*, 2007a; Simone *et al.*, 2007b). En général, il est admis que les antioxydants sont efficaces pour réduire les effets secondaires indésirables de certains traitements anticancer (Lawenda *et al.*, 2008; Simone *et al.*, 2007a). De plus, certaines évidences cliniques suggèrent que les antioxydants n'affectent pas l'efficacité des traitements contre le cancer (Pathak *et al.*, 2005), et même qu'ils seraient capables d'augmenter l'efficacité des chimiothérapies tout en protégeant les tissus sains (Lissoni *et al.*, 2003; Simone *et al.*, 2007b). Au contraire, d'autres études cliniques montrent une réduction de l'efficacité des traitements anticancer associée à une réduction des taux de survie à long terme chez des patients adultes (Bairati *et al.*, 2006). Entre autres, cela pourrait s'expliquer par le fait que les radiations et plusieurs composés de chimiothérapies utilisent le stress oxydatif comme mécanisme pour tuer les cellules cancéreuses (Lawenda *et al.*, 2008), ce qui est bloqué en présence d'antioxydants. Ainsi, certains oncologues et scientifiques recommandent d'éviter la supplémentation d'antioxydants pendant des traitements contre le cancer (D'Andrea, 2005; Lawenda *et al.*, 2008). Somme toute, il est clair

que beaucoup de données manquent pour tirer des conclusions définitives et établir des protocoles d'utilisation clinique des antioxydants. Jusqu'à présent, les études cliniques se sont penchées sur de multiples types de cancers et régimes de chimiothérapies, ainsi que sur des antioxydants aux mécanismes, propriétés et biodisponibilités variés, en utilisant des protocoles d'administration des antioxydants également variés. Le tout s'accompagne de critères d'évaluation de la sécurité non-uniformes entre les différentes études, ce qui rend impossible de tirer des conclusions claires sur leur efficacité et sécurité (Lawenda *et al.*, 2008). De plus, les antioxydants eux-mêmes peuvent être associés à des effets secondaires, d'où l'importance d'établir des protocoles minimisant les effets négatifs et maximisant les effets positifs désirés (Saso & Firuzi, 2014). Des études cliniques sur de plus grandes populations, avec les groupes contrôles appropriés sont requises pour répondre à ces questions et faire avancer cette problématique complexe (Fuchs-Tarlovsky, 2013).

Dans un contexte plus général, malgré cette controverse sur les antioxydants, la mise en évidence des mécanismes d'action des chimiothérapies sur le testicule immature reste importante. Il faut faire avancer la recherche dans la protection *in situ* du testicule immature, afin d'orienter le choix des composés protecteurs testés *in vivo* et en clinique. Par exemple, un traitement hormonal avec la FSH pourrait être favorisé au dépend des antioxydants si un impact significatif des chimiothérapies est vu au niveau de la prolifération ou de la fonction des cellules de Sertoli immatures. En effet, un traitement de FSH a déjà montré un potentiel d'amélioration la fertilité masculine suite à une exposition de rats adultes à la DXO (Hagiuda *et al.*, 2015). D'un autre côté, l'étude éventuelle de différents agents de chimiothérapies qui composent les régimes de traitements actuels en plus de la DXO pourrait diriger le choix de certains régimes ou cinétiques de traitements particuliers, dont l'efficacité est reconnue mais dont les effets secondaires sur le système reproducteur masculin sont moindres. Pour finir, la description des voies de toxicité des différents composés de chimiothérapies permettra de mieux prévoir quels patients ont un risque de fertilité diminué, par exemple en fonction de leur âge ou du régime de traitement reçu. Les oncologues pourront alors mieux informer leurs patients des risques potentiels de leurs traitements contre le cancer et des solutions de préservation de fertilité disponibles ou expérimentales.

Conclusion

Malgré les incertitudes au sujet de l'utilisation d'antioxydants lors d'une thérapie anticancer, il est nécessaire de mieux caractériser l'impact des chimiothérapies sur le testicule immature. En

utilisant des lignées cellulaires de rat, l'étude réalisée dans le cadre de ce mémoire de maîtrise a permis de confirmer le potentiel toxique de la DXO sur les spermatogonies à caractère souche et les cellules de Sertoli contenues dans le testicule immature. De plus, les cellules de Sertoli immatures pourraient être plus sensibles à l'induction de stress oxydatif par la DXO. Cependant, pour les deux types cellulaires étudiés, nos résultats suggèrent que le stress oxydatif pourrait ne pas être une voie majeure de toxicité de la DXO. Bien que ces résultats doivent être confirmés *in vivo* à des doses thérapeutiques, ils suggèrent que les antioxydants pourraient être peu efficaces pour protéger ces deux types cellulaires contre la toxicité de la DXO. Des études complémentaires sont requises pour déterminer les mécanismes d'action et les types cellulaires du testicule spécifiquement ciblés par les chimiothérapies pédiatriques. De plus, l'efficacité des antioxydants, ainsi que leur sécurité au niveau de l'utilisation en clinique restent à établir. À long terme, notre étude vise à mettre en évidence les solutions de préservation de la fertilité appropriées pour les garçons pré-pubères qui recevront des traitements de chimiothérapie, afin d'améliorer leur qualité de vie après cancer.

RÉFÉRENCES

- Accord Healthcare Limited (2017) *Résumé des caractéristiques du produit: Doxorubicin Accord Healthcare*. Royaume-Uni, <http://bijsluiters.fagg-afmps.be/DownloadLeafletServlet?id=105335> (Consulté le 22 janvier 2018).
- Agarwal A, Sharma RK, Nallella KP, Thomas AJ, Jr., Alvarez JG & Sikka SC (2006) Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil Steril* 86(4):878-885.
- Agnez-Lima LF, Melo JT, Silva AE, Oliveira AH, Timoteo AR, Lima-Bessa KM, Martinez GR, Medeiros MH, Di Mascio P, Galhardo RS & Menck CF (2012) DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. *Mutat Res* 751 :15-28.
- 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(1-2):84-90.
- Ahmed F, Urooj A & Karim AA (2013) Protective effects of *Ficus racemosa* stem bark against doxorubicin-induced renal and testicular toxicity. *Pharmacognosy magazine* 9(34):130-134.
- American Cancer Society (2017) Cancer Facts and Figures 2017. *American Cancer Society*, Atlanta, GA, <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2017/cancer-facts-and-figures-2017.pdf>, (Consulté le 6 décembre 2017).
- Anderson RA, Mitchell RT, Kelsey TW, Spears N, Telfer EE & Wallace WHB (2015) Cancer treatment and gonadal function: experimental and established strategies for fertility preservation in children and young adults. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 3(7):556-567.
- Andrieu-Abadie N, Jaffrezou JP, Hatem S, Laurent G, Levade T & Mercadier JJ (1999) L-carnitine prevents doxorubicin-induced apoptosis of cardiac myocytes: role of inhibition of ceramide generation. *FASEB J* 13(12):1501-1510.
- Angulo C, Maldonado R, Pulgar E, Mancilla H, Cordova A, Villarroel F, Castro MA & Concha, II (2011) Vitamin C and oxidative stress in the seminiferous epithelium. *Biol Res* 44(2):169-180.
- Antunes LM & Takahashi CS (1999) Protection and induction of chromosomal damage by vitamin C in human lymphocyte cultures. *Teratog Carcinog Mutagen* 19(1):53-59.
- Aoki A & Fawcett D (1975) Impermeability of Sertoli cell junctions to prolonged exposure to peroxidase. *Andrologia* 7(1):63-76.
- 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 surgery* 162(6):572-575.
- Armenian SH, Lacchetti C, Barac A, Carver J, Constine LS, Denduluri N, Dent S, Douglas PS, Durand JB, Ewer M, Fabian C, Hudson M, Jessup M, Jones LW, Ky B, Mayer EL, Moslehi J, Oeffinger K, Ray K, Ruddy K & Lenihan D (2017) Prevention and Monitoring of Cardiac Dysfunction in Survivors of Adult Cancers: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol* 35(8):893-911.

- Atessahin A, Turk G, Karahan I, Yilmaz S, Ceribasi AO & Bulmus O (2006) Lycopene prevents adriamycin-induced testicular toxicity in rats. *Fertil Steril* 85 Suppl 1:1216-1222.
- Attia SM, Al-Bakheet SA & Al-Rasheed NM (2010) Proanthocyanidins produce significant attenuation of doxorubicin-induced mutagenicity via suppression of oxidative stress. *Oxidative medicine and cellular longevity* 3(6):404-413.
- Ayala A, Munoz MF & Arguelles S (2014) Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2014:1-30.
- Bairati I, Meyer F, Jobin E, Gelinat M, Fortin A, Nabid A, Brochet F & Tetu B (2006) Antioxidant vitamins supplementation and mortality: a randomized trial in head and neck cancer patients. *Int J Cancer* 119(9):2221-2224.
- Bar-Shira Maymon B, Yogev L, Marks A, Hauser R, Botchan A & Yavetz H (2004) Sertoli cell inactivation by cytotoxic damage to the human testis after cancer chemotherapy. *Fertil Steril* 81(5):1391-1394.
- Beaud H, Albert O, Robaire B, Rousseau M-C, Chan PT & Delbes G (Soumis) Sperm DNA integrity in adult survivors of paediatric leukemia and lymphoma patients.
- Beaud H, van Pelt A & Delbes G (2017) Doxorubicin and vincristine affect undifferentiated rat spermatogonia. *Reproduction* 153(6):725-735.
- Bergmann M & Dierichs R (1983) Postnatal formation of the blood-testis barrier in the rat with special reference to the initiation of meiosis. *Anatomy and embryology* 168(2):269-275.
- Bhushan S, Aslani F, Zhang Z, Sebastian T, Els, sser H-P, Klug J, ouml & rg (2016) Isolation of Sertoli Cells and Peritubular Cells from Rat Testes. *JoVE* 108:e53389.
- Boonstra J & Post JA (2004) Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 337:1-13.
- Bordallo MA, Guimaraes MM, Pessoa CH, Carrico MK, Dimetz T, Gazolla HM, Dobbin J & Castilho IA (2004) Decreased serum inhibin B/FSH ratio as a marker of Sertoli cell function in male survivors after chemotherapy in childhood and adolescence. *J Pediatr Endocrinol Metab* 17(6):879-887.
- Bramswig JH, Heimes U, Heiermann E, Schlegel W, Nieschlag E & Schellong G (1990) The effects of different cumulative doses of chemotherapy on testicular function. Results in 75 patients treated for Hodgkin's disease during childhood or adolescence. *Cancer* 65(6):1298-1302.
- 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. *Reprod Biol Endocrinol* 10:79.
- 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(6):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(1):236-246.
- Calabro-Jones PM, Aguilera JA, Ward JF, Smoluk GD & Fahey RC (1988) Uptake of WR-2721 derivatives by cells in culture: identification of the transported form of the drug. *Cancer Res* 48(13):3634-3640.

- Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics (2017) Canadian Cancer Statistics 2017. *Canadian Cancer Society*, Toronto, ON, <http://www.cancer.ca/Canadian-CancerStatistics-2017-EN.pdf>, (consulté le 12 décembre 2017).
- Carlomagno G, van Bragt MP, Korver CM, Repping S, de Rooij DG & van Pelt AM (2010) BMP4-induced differentiation of a rat spermatogonial stem cell line causes changes in its cell adhesion properties. *Biol Reprod* 83(5):742-749.
- Ceribasi AO, Sakin F, Turk G, Sonmez M & Atessahin A (2012) Impact of ellagic acid on adriamycin-induced testicular histopathological lesions, apoptosis, lipid peroxidation and sperm damages. *Exp Toxicol Pathol* 64(7-8):717-724.
- Chan P & Robaire B (2011) Cancer in Males: Implications for Sperm Quality, Fertility, and Progeny Outcome. *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction*, Zini A & Agarwal A (Édit.) Springer New York. p 351-360.
- Chao C, Xu L, Bell E, Cooper R & Mueller L (2016) Long-term Health Outcomes in Survivors of Childhood Cancer Diagnosed Between 1990 and 2000 in a Large US Integrated Health Care System. *J Pediatr Hematol Oncol* 38(2):123-130.
- Chao HH, Liu JC, Hong HJ, Lin JW, Chen CH & Cheng TH (2011) L-carnitine reduces doxorubicin-induced apoptosis through a prostacyclin-mediated pathway in neonatal rat cardiomyocytes. *International journal of cardiology* 146(2):145-152.
- Chemek M, Mimouna SB, Boughammoura S, Delbes G & Messaoudi I (2016) Protective role of zinc against the toxicity induced by exposure to cadmium during gestation and lactation on testis development. *Reprod Toxicol* 63:151-160.
- Chemes HE (2001) Infancy is not a quiescent period of testicular development. *Int J Androl* 24(1):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(3):147-156.
- Cherven BO, Mertens A, Wasilewski-Masker K, Williamson R & Meacham LR (2015) Infertility Education: Experiences and Preferences of Childhood Cancer Survivors. *J Pediatr Oncol Nurs* 2015:1-8.
- 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(5):567-576.
- Clermont Y & Bustos-Obregon E (1968) Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted in toto. *Developmental Dynamics* 122(2):237-247.
- Clermont Y & Leblond C (1953) Renewal of spermatogonia in the rat. *Developmental Dynamics* 93(3):475-501.
- Clermont Y & Perey B (1957) Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am J Anat* 100(2):241-267.
- Colvin M (2003) Alkylating Agents. *Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition.*, Kufe D, Pollock R & Weichselbaum R (Édit.) BC Decker, Hamilton (ON), Disponible à: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12772/>.

- Conrad M, Ingold I, Buday K, Kobayashi S & Angeli JP (2015) ROS, thiols and thiol-regulating systems in male gametogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1850(8):1566-1574.
- 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(1):171-183.
- D'Andrea GM (2005) Use of antioxidants during chemotherapy and radiotherapy should be avoided. *CA Cancer J Clin* 55(5):319-321.
- Dalto DB & Matte JJ (2017) Pyridoxine (Vitamin B(6)) and the Glutathione Peroxidase System; a Link between One-Carbon Metabolism and Antioxidation. *Nutrients* 9(189):1-13.
- Das J, Ghosh J, Manna P & Sil PC (2012) Taurine protects rat testes against doxorubicin-induced oxidative stress as well as p53, Fas and caspase 12-mediated apoptosis. *Amino acids* 42(5):1839-1855.
- Das UB, Mallick M, Debnath JM & Ghosh D (2002) Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide- induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats. *Asian J Androl* 4(3):201-207.
- De Rooij DG & Grootegoed JA (1998) Spermatogonial stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 10(6):694-701.
- Dizdaroglu M & Jaruga P (2012) Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res* 46(4):382-419.
- Doggui S, Belkacemi A, Paka GD, Perrotte M, Pi R & Ramassamy C (2013) Curcumin protects neuronal-like cells against acrolein by restoring Akt and redox signaling pathways. *Mol Nutr Food Res* 57(9):1660-1670.
- Dohrmann M, Schorr A, Hulsbeck J, Rasmussen TL, Issinger OG & Fritz G (2012) Comparative analysis of stress responses of H9c2 rat cardiomyoblasts following treatment with doxorubicin and tBOOH. *Exp Cell Res* 318(6):779-788.
- Dorr RT, Lagel K & McLean S (1996) Cardioprotection of rat heart myocytes with amifostine (Ethyol) and its free thiol, WR-1065, in vitro. *Eur J Cancer* 32A Suppl 4:S21-25.
- Dos Santos El-Bacha R, Daval J, Koziel V, Netter P & Minn A (2001) Toxic effects of apomorphine on rat cultured neurons and glial C6 cells, and protection with antioxidants. *Biochemical pharmacology* 61(1):73-85.
- Elbini Dhouib I, Jallouli M, Annabi A, Gharbi N, Elfazaa S & Lasram MM (2016) A minireview on N-acetylcysteine: An old drug with new approaches. *Life Sci* 151:359-363.
- Essig S, Li Q, Chen Y, Hitzler J, Leisenring W, Greenberg M, Sklar C, Hudson MM, Armstrong GT, Krull KR, Neglia JP, Oeffinger KC, Robison LL, Kuehni CE, Yasui Y & Nathan PC (2014) Risk of late effects of treatment in children newly diagnosed with standard-risk acute lymphoblastic leukaemia: a report from the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *The Lancet Oncology* 15(8):841-851.
- Fang F, Ni K, Cai Y, Zhao Q, Shang J, Zhang X, Shen S & Xiong C (2017) Busulfan administration produces toxic effects on epididymal morphology and inhibits the expression of ZO-1 and vimentin in the mouse epididymis. *Biosci Rep* 37(6):1-12.
- Fiorini C, Tilloy-Ellul A, Chevalier S, Charuel C & Pointis G (2004) Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. *Reprod Toxicol* 18(3):413-421.

- 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(12):1602-1612.
- Frei EI & Eder J (2003) Combination Chemotherapy. *Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition.* , Kufe D, Pollock R & Weichselbaum R (Édit.) BC Decker, Hamilton (ON), Disponible à: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13955/>.
- Fry AM, Chresta CM, Davies SM, Walker MC, Harris AL, Hartley JA, Masters JR & Hickson ID (1991) Relationship between topoisomerase II level and chemosensitivity in human tumor cell lines. *Cancer Res* 51(24):6592-6595.
- Fuchs-Tarlovsky V (2013) Role of antioxidants in cancer therapy. *Nutrition* 29(1):15-21.
- Fulda S, Oster W & Berthold F (1997) Effects of WR-2721 (amifostine) and its metabolite WR-1065 on the antiproliferative activity of chemotherapeutic agents on neuroblastoma cells in vitro. *Anticancer Drugs* 8(1):34-41.
- Garrido N, Meseguer M, Alvarez J, Simon C, Pellicer A & Remohi J (2004) Relationship among standard semen parameters, glutathione peroxidase/glutathione reductase activity, and mRNA expression and reduced glutathione content in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men. *Fertil Steril* 82 Suppl 3:1059-1066.
- Georgy GS & Maher OW (2017) Ellagic acid and rosmarinic acid attenuate doxorubicin-induced testicular injury in rats. *J Biochem Mol Toxicol* 31(9):1-7.
- Gharagozloo P & Aitken RJ (2011) The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod* 26(7):1628-1640.
- Gharagozloo P, Gutierrez-Adan A, Champroux A, Noblanc A, Kocer A, Calle A, Perez-Cerezales S, Pericuesta E, Polhemus A, Moazamian A, Drevet JR & Aitken RJ (2016) A novel antioxidant formulation designed to treat male infertility associated with oxidative stress: promising preclinical evidence from animal models. *Hum Reprod* 31(2):252-262.
- Goossens E & Tournaye H (2013) [Fertility preservation in boys: spermatogonial stem cell transplantation and testicular grafting]. *Gynecol Obstet Fertil* 41(9):529-531.
- Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa CL, Sanchez-Rovira P & Ramirez-Tortosa MC (2010) New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. *Food Chem Toxicol* 48(6):1425-1438.
- 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(2):332-339.
- Griswold MD, Collard M, Hugly S & Huggenvik J (1986) The use of specific cDNA probes to assay Sertoli cell functions. *Adv Exp Med Biol* 205:301-317.
- Gunn SA, Gould TC & Anderson WA (1968) Mechanisms of zinc, cysteine and selenium protection against cadmium induced vascular injury to mouse testis. *Journal of reproduction and fertility* 15(1):65-70.
- Gupta AA, Donen RM, Sung L, Boydell KM, Lo KC, Stephens D, Pritchard S, Portwine C, Maloney AM & Lorenzo AJ (2016) Testicular Biopsy for Fertility Preservation in Prepubertal Boys with Cancer: Identifying Preferences for Procedure and Reactions to Disclosure Practices. *J Urol* 196(1):219-224.

- Hagiuda J, Ishikawa H, Kaneko S, Okazaki M, Oya M & Nakagawa K (2015) Follicle-stimulating hormone enhances recovery from low-dose doxorubicin-induced spermatogenic disorders in mice. *J Assist Reprod Genet* 32(6):917-923.
- Harake D, Franco VI, Henkel JM, Miller TL & Lipshultz SE (2012) Cardiotoxicity in childhood cancer survivors: strategies for prevention and management. *Future Cardiol* 8(4):647-670.
- Heibein AD, Guo B, Sprowl JA, Maclean DA & Parissenti AM (2012) Role of aldo-keto reductases and other doxorubicin pharmacokinetic genes in doxorubicin resistance, DNA binding, and subcellular localization. *BMC cancer* 12:381.
- Hensley ML, Hagerty KL, Kewalramani T, Green DM, Meropol NJ, Wasserman TH, Cohen GI, Emami B, Gradishar WJ, Mitchell RB, Thigpen JT, Trotti A, 3rd, von Hoff D & Schuchter LM (2009) American Society of Clinical Oncology 2008 clinical practice guideline update: use of chemotherapy and radiation therapy protectants. *J Clin Oncol* 27(1):127-145.
- Hoffmann U & Kroemer HK (2004) The ABC transporters MDR1 and MRP2: multiple functions in disposition of xenobiotics and drug resistance. *Drug metabolism reviews* 36(3-4):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. *Exp Cell Res* 201(2):417-435.
- Hofmann MC, Braydich-Stolle L, Dettin L, Johnson E & Dym M (2005) Immortalization of mouse germ line stem cells. *Stem Cells* 23(2):200-210.
- Hogarth CA & Griswold MD (2010) The key role of vitamin A in spermatogenesis. *J Clin Invest* 120(4):956-962.
- Hosseinzadeh L, Behravan J, Mosaffa F, Bahrami G, Bahrami A & Karimi G (2011) Curcumin potentiates doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cardiac muscle cells through generation of reactive oxygen species. *Food Chem Toxicol* 49(5):1102-1109.
- 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(21):9999-10005.
- Howell SJ & Shalet SM (2005) Spermatogenesis after cancer treatment: damage and recovery. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005(34):12-17.
- Huang D, Ou B & Prior RL (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 53(6):1841-1856.
- Injac R & Strukelj B (2008) Recent advances in protection against doxorubicin-induced toxicity. *Technol Cancer Res Treat* 7(6):497-516.
- Institute of Medicine (US) and National Research Council (US) National Cancer Policy Board (2003) *Childhood cancer survivorship: improving care and quality of life*. (Édit.) National Academies Press, Washington (DC). 225 p
- Jahnukainen K, Jahnukainen T, Salmi TT, Svechnikov K, Eksborg S & Soder O (2001) Amifostine protects against early but not late toxic effects of doxorubicin in infant rats. *Cancer Res* 61(17):6423-6427.
- Jahnukainen K, Mitchell RT & Stukenborg JB (2015) Testicular function and fertility preservation after treatment for haematological cancer. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 22(3):217-223.

- 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(11):2851-2860.
- Kaatsch P (2010) Epidemiology of childhood cancer. *Cancer Treat Rev* 36(4):277-285.
- Kalyanaraman B (2013) Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol* 1:244-257.
- Kaneko T, Iuchi Y, Kobayashi T, Fujii T, Saito H, Kurachi H & Fujii J (2002) The expression of glutathione reductase in the male reproductive system of rats supports the enzymatic basis of glutathione function in spermatogenesis. *European journal of biochemistry* 269(5):1570-1578.
- Kang J, Lee Y, No K, Jung E, Sung J, Kim Y & Nam S (2002) Ginseng intestinal metabolite-I (GIM-I) reduces doxorubicin toxicity in the mouse testis. *Reprod Toxicol* 16(3):291-298.
- Kaur P, Aschner M & Syversen T (2006) Glutathione modulation influences methyl mercury induced neurotoxicity in primary cell cultures of neurons and astrocytes. *Neurotoxicology* 27(4):492-500.
- Keros V, Hultenby K, Borgström B, Fridström M, Jahnukainen K & Hovatta O (2007) Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment. *Human Reproduction* 22(5):1384-1395.
- Kockar MC, Naziroglu M, Celik O, Tola HT, Bayram D & Koyu A (2010) N-acetylcysteine modulates doxorubicin-induced oxidative stress and antioxidant vitamin concentrations in liver of rats. *Cell Biochem Funct* 28(8):673-677.
- Kondoh H (2008) Cellular life span and the Warburg effect. *Exp Cell Res* 314(9):1923-1928.
- Krischke M, Hempel G, Voller S, Andre N, D'Incalci M, Bisogno G, Kopcke W, Borowski M, Herold R, Boddy AV & Boos J (2016) Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of doxorubicin in children with cancer: results of a "European Pediatric Oncology Off-patents Medicines Consortium" trial. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 78(6):1175-1184.
- 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(2):99-108.
- Lalevee N, Pluciennik F & Joffre M (1997) Voltage-dependent calcium current with properties of T-type current in Sertoli cells from immature rat testis in primary cultures. *Biol Reprod* 56(3):680-687.
- Langeveld NE, Grootenhuis MA, Voute PA, de Haan RJ & van den Bos C (2004) Quality of life, self-esteem and worries in young adult survivors of childhood cancer. *Psycho-oncology* 13(12):867-881.
- Lawenda BD, Kelly KM, Ladas EJ, Sagar SM, Vickers A & Blumberg JB (2008) Should supplemental antioxidant administration be avoided during chemotherapy and radiation therapy? *J Natl Cancer Inst* 100(11):773-783.
- Leblond CP & Clermont Y (1952) Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences* 55(4):548-573.
- Lee EJ, Gerhold M, Palmer MW & Christen RD (2003) p53 protein regulates the effects of amifostine on apoptosis, cell cycle progression, and cytoprotection. *Br J Cancer* 88(5):754-759.

- Levi M, Tzabari M, Savion N, Stemmer SM, Shalgi R & Ben-Aharon I (2015) Dexrazoxane exacerbates doxorubicin-induced testicular toxicity. *Reproduction* 150(4):357-366.
- Licata S, Saponiero A, Mordente A & Minotti G (2000) Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: role of cytoplasmic deglycosidation and carbonyl reduction. *Chem Res Toxicol* 13(5):414-420.
- Lilleyman J (1999) Chemotherapy of Childhood Lymphoblastic Leukaemia. *Pediatric Drugs* 1(3):197-209.
- Lirdi LC, Stumpp T, Sasso-Cerri E & Miraglia SM (2008) Amifostine protective effect on cisplatin-treated rat testis. *Anat Rec (Hoboken)* 291(7):797-808.
- Lissoni P, Chilelli M, Villa S, Cerizza L & Tancini G (2003) Five years survival in metastatic non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy alone or chemotherapy and melatonin: a randomized trial. *J Pineal Res* 35(1):12-15.
- 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(4):72.
- Liu MH, Lin XL, Zhang Y, He J, Tan TP, Wu SJ, Liu J, Tian W, Chen L, Yu S, Li J & Yuan C (2015) Hydrogen sulfide attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting reactive oxygen species-activated extracellular signal-regulated kinase 1/2 in H9c2 cardiac myocytes. *Mol Med Rep* 12(5):6841-6848.
- Loren AW, Mangu PB, Beck LN, Brennan L, Magdalinski AJ, Partridge AH, Quinn G, Wallace WH & Oktay K (2013) Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *Journal of Clinical Oncology* 31(19):2500-2510.
- Luczaj W, Gegotek A & Skrzydlewska E (2017) Antioxidants and HNE in redox homeostasis. *Free Radic Biol Med* 111:87-101.
- Ludke A, Sharma AK, Bagchi AK & Singal PK (2012a) Subcellular basis of vitamin C protection against doxorubicin-induced changes in rat cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem* 360(1-2):215-224.
- Ludke AR, Sharma AK, Akolkar G, Bajpai G & Singal PK (2012b) Downregulation of vitamin C transporter SVCT-2 in doxorubicin-induced cardiomyocyte injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 303(6):C645-653.
- Madhu P, Reddy KP & Reddy PS (2016) Role of melatonin in mitigating chemotherapy-induced testicular dysfunction in Wistar rats. *Drug Chem Toxicol* 39(2):137-146.
- Majzoub A & Agarwal A (2017) Antioxidant therapy in idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Indian J Urol* 33(3):207-214.
- 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(2):228-237.
- 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(2):341-350.

- Matfier JP (1980) Establishment and characterization of two distinct mouse testicular epithelial cell line. *Biol Reprod* 23(1):243-252.
- Mawhinney M & Mariotti A (2013) Physiology, pathology and pharmacology of the male reproductive system. *Periodontology 2000* 61(1):232-251.
- Mayerhofer A (2013) Human testicular peritubular cells: more than meets the eye. *Reproduction* 145(5):R107-116.
- Meredith AM & Dass CR (2016) Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. *J Pharm Pharmacol* 68(6):729-741.
- Mijares A & Lopez JR (2001) L-carnitine prevents increase in diastolic [CA²⁺] induced by doxorubicin in cardiac cells. *Eur J Pharmacol* 425(2):117-120.
- Minotti G, Licata S, Saponiero A, Menna P, Calafiore AM, Di Giammarco G, Liberi G, Animati F, Cipollone A & Manzini S (2000) Anthracycline metabolism and toxicity in human myocardium: comparisons between doxorubicin, epirubicin, and a novel disaccharide analogue with a reduced level of formation and [4Fe-4S] reactivity of its secondary alcohol metabolite. *Chem Res Toxicol* 13(12):1336-1341.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G & Gianni L (2004) Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological reviews* 56(2):185-229.
- Mitchell R, Saunders P, Sharpe R, Kelnar C & Wallace W (2009) Male fertility and strategies for fertility preservation following childhood cancer treatment. *Endocrinopathy after Childhood Cancer Treatment*, Wallace W & Kelnar C (Édit.) Karger Publishers, Suisse Vol 15. p 101-134.
- Mizrak SC, Gadella BM, Erdost H, Ozer A, van Pelt AM & van Dissel-Emiliani FM (2008) Spermatogonial stem cell sensitivity to capsaicin: an in vitro study. *Reprod Biol Endocrinol* 6(52):1-9.
- Mohamed RH, Karam RA, Hagrass HA, Amer MG & Abd El-Haleem MR (2015) Anti-apoptotic effect of spermatogonial stem cells on doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. *Gene* 561(1):107-114.
- Mongioi L, Calogero AE, Vicari E, Condorelli RA, Russo GI, Privitera S, Morgia G & La Vignera S (2016) The role of carnitine in male infertility. *Andrology* 4(5):800-807.
- Monsees T, Franz M, Gebhardt S, Winterstein U, Schill WB & Hayatpour J (2000) Sertoli cells as a target for reproductive hazards. *Andrologia* 32(4-5):239-246.
- Morales C & Griswold MD (1987) Retinol-induced stage synchronization in seminiferous tubules of the rat. *Endocrinology* 121(1):432-434.
- Nambu A, Kumamoto Y & Mikuma N (1995) [Effects of anti-cancer agents on cultured rat Sertoli cells]. *The japanese journal of urology* 86(6):1132-1136.
- Niki E (2009) Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med* 47(5):469-484.
- Noori S (2012) An Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System. *Journal of Clinical & Cellular Immunology* 1(8):1-9.
- North S, El-Ghissassi F, Pluquet O, Verhaegh G & Hainaut P (2000) The cytoprotective aminothiol WR1065 activates p21waf-1 and down regulates cell cycle progression through a p53-dependent pathway. *Oncogene* 19(9):1206-1214.

- Nurmio M, Keros V, Lahteenmaki P, Salmi T, Kallajoki M & Jahnukainen K (2009a) Effect of childhood acute lymphoblastic leukemia therapy on spermatogonia populations and future fertility. *J Clin Endocrinol Metab* 94(6):2119-2122.
- Nurmio M, Toppari J, Kallio J, Hou M, Soder O & Jahnukainen K (2009b) Functional in vitro model to examine cancer therapy cytotoxicity in maturing rat testis. *Reprod Toxicol* 27(1):28-34.
- Nwankwoala R, Georgewill O & Georgewill U (2008) Pharmacokinetics Of Adriamycin After Intravenous Administration In Rat. *The Internet Journal of Oncology* 6(2):1-4.
- O'Shaughnessy P (2014) Testicular Development. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Plant TM & Zeleznik AJ (Édit.) Academic Press, London, UK Vol 1. p 567-594.
- Okada FK, Stumpp T & Miraglia SM (2009) Carnitine reduces testicular damage in rats treated with etoposide in the prepubertal phase. *Cell and tissue research* 337(2):269-280.
- Olson RD, Mushlin PS, Brenner DE, Fleischer S, Cusack BJ, Chang BK & Boucek RJ (1988) Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(10):3585-3589.
- Olusoji MJ, Oyeyemi OM, Asenuga ER, Omobowale TO, Ajayi OL & Oyagbemi AA (2017) Protective effect of Gallic acid on doxorubicin-induced testicular and epididymal toxicity. *Andrologia* 49(4):e12635.
- Oyagbemi AA, Omobowale TO, Saba AB, Adedara IA, Olowu ER, Akinrinde AS & Dada RO (2016) Gallic acid protects against cyclophosphamide-induced toxicity in testis and epididymis of rats. *Andrologia* 48(4):393-401.
- Pan J-S, Hong M-Z & Ren J-L (2009) Reactive oxygen species: A double-edged sword in oncogenesis. *World Journal of Gastroenterology* 15(14):1702-1707.
- Parizek J (1957) The destructive effect of cadmium ion on testicular tissue and its prevention by zinc. *J Endocrinol* 15(1):56-63.
- Pathak AK, Bhutani M, Guleria R, Bal S, Mohan A, Mohanti BK, Sharma A, Pathak R, Bhardwaj NK, Prasad KN & Kochupillai V (2005) Chemotherapy Alone vs. Chemotherapy Plus High Dose Multiple Antioxidants in Patients with Advanced Non Small Cell Lung Cancer. *Journal of the American College of Nutrition* 24(1):16-21.
- PDQ® Pediatric Treatment Editorial Board (2017) PDQ Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment. *National Cancer Institute*, Bethesda, MD, <https://www.cancer.gov/types/leukemia/hp/child-all-treatment-pdq>, (Consulté le 12 janvier 2018).
- Perez-Arnaiz C, Busto N, Leal JM & Garcia B (2014) New insights into the mechanism of the DNA/doxorubicin interaction. *J Phys Chem B* 118(5):1288-1295.
- Perrard MH, Sereni N, Schluth-Bolard C, Blondet A, SG DE, Plotton I, Morel-Journal N, Lejeune H, David L & Durand P (2016) Complete Human and Rat Ex Vivo Spermatogenesis from Fresh or Frozen Testicular Tissue. *Biol Reprod* 95(4):89.
- Pfizer Canada Inc (2012) Monographie de produit: Adriamycine PFS. (No de contrôle : 152892, Kirkland, Québec), p 1-46.
- Pham-Huy LA, He H & Pham-Huy C (2008) Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci* 4(2):89-96.

- Pisoschi AM & Pop A (2015) The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem* 97:55-74.
- Poganitsch-Korhonen M, Masliukaite I, Nurmio M, Lahteenmaki P, van Wely M, van Pelt AMM, Jahnukainen K & Stukenborg JB (2017) Decreased spermatogonial quantity in prepubertal boys with leukaemia treated with alkylating agents. *Leukemia* 31(6):1460-1463.
- Pognan F, Masson MT, Lagelle F & Charuel C (1997) Establishment of a rat Sertoli cell line that displays the morphological and some of the functional characteristics of the native cell. *Cell Biology and Toxicology* 13(6):453-463.
- Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ & Valko M (2017) Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends Pharmacol Sci* 38(7):592-607.
- Postovsky S, Lightman A, Aminpour D, Elhasid R, Peretz M & Arush MW (2003) Sperm cryopreservation in adolescents with newly diagnosed cancer. *Med Pediatr Oncol* 40(6):355-359.
- Prahalathan C, Selvakumar E & Varalakshmi P (2005) Lipoic acid ameliorates adriamycin-induced testicular mitochondriopathy. *Reprod Toxicol* 20(1):111-116.
- Prahalathan C, Selvakumar E & Varalakshmi P (2006a) Lipoic acid modulates adriamycin-induced testicular toxicity. *Reprod Toxicol* 21(1):54-59.
- Prahalathan C, Selvakumar E & Varalakshmi P (2006b) Modulatory role of lipoic acid on adriamycin-induced testicular injury. *Chem-Biol Interact* 160(2):108-114.
- 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(3):95-103.
- Qiu R, Horvath A & Stahlmann R (2016) Effects of four nucleoside analogues used as antiviral agents on rat Sertoli cells (SerW3) in vitro. *Arch Toxicol* 90(8):1975-1981.
- Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Mataix J & Ramirez-Tortosa MC (2002) Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology* 180(1):79-95.
- Raffoul L, Capito C & Sarnacki S (2016) Fertility considerations and the pediatric oncology patient. *Seminars in pediatric surgery* 25(5):318-322.
- Raftos JE, Whillier S, Chapman BE & Kuchel PW (2007) Kinetics of uptake and deacetylation of N-acetylcysteine by human erythrocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 39(9):1698-1706.
- Ramassamy C (2006) Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *Eur J Pharmacol* 545(1):51-64.
- Riddick DS, Lee C, Ramji S, Chinje EC, Cowen RL, Williams KJ, Patterson AV, Stratford IJ, Morrow CS, Townsend AJ, Jounaidi Y, Chen CS, Su T, Lu H, Schwartz PS & Waxman DJ (2005) Cancer chemotherapy and drug metabolism. *Drug Metab Dispos* 33(8):1083-1096.
- 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(6):326-348.

- 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(1):69-76.
- Ross C, Morriss A, Khairy M, Khalaf Y, Braude P, Coomarasamy A & El-Toukhy T (2010) A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reproductive biomedicine online* 20(6):711-723.
- Russell L, Bartke A & Goh J (1989) Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. *Developmental Dynamics* 184(3):179-189.
- Rwigemera A, Joao F & Delbes G (2017) Fetal testis organ culture reproduces the dynamics of epigenetic reprogramming in rat gonocytes. *Epigenetics Chromatin* 10:19.
- Saalu LC, Osinubi AA & Olagunju JA (2010) Early and delayed effects of doxorubicin on testicular oxidative status and spermatogenesis in rats. *Int. J. Cancer Res* 6(1):1-9.
- Sadri-Ardekani H, McLean TW, Kogan S, Sirintrapun J, Crowell K, Yousif MQ, Hodges SJ, Petty J, Pranikoff T, Sieren L, Zeller K & Atala A (2016) Experimental testicular tissue banking to generate spermatogenesis in the future: A multidisciplinary team approach. *Methods* 99:120-127.
- Saso L & Firuzi O (2014) Pharmacological Applications of Antioxidants: Lights and Shadows. *Curr Drug Targets* 15(13):1177-1199.
- Schover LR (2009) Patient attitudes toward fertility preservation. *Pediatric Blood & Cancer* 53(2):281-284.
- Schover LR, Rybicki LA, Martin BA & Bringelsen KA (1999) Having children after cancer. *Cancer* 86(4):697-709.
- Scott F G (2006) Túbulo seminífero. *Wikimedia Commons*, Biología del Desarrollo, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:T%C3%BAbulo_seminífero.png#filelinks, (consulté le 16 mars 2006).
- Sebastia J, Cristofol R, Martin M, Rodriguez-Farre E & Sanfeliu C (2003) Evaluation of fluorescent dyes for measuring intracellular glutathione content in primary cultures of human neurons and neuroblastoma SH-SY5Y. *Cytometry A* 51(1):16-25.
- Sedha S, Kumar S & Shukla S (2015) Role of oxidative stress in male reproductive dysfunctions with reference to phthalate compounds. *Urology journal* 12(5):2304-2316.
- Sen Gupta R, Sen Gupta E, Dhakal BK, Thakur AR & Ahnn J (2004) Vitamin C and vitamin E protect the rat testes from cadmium-induced reactive oxygen species. *Mol Cells* 17(1):132-139.
- Sharpe R, Turner K, McKinnell C, Groome N, Atanassova N, Millar M & Buchanan D (1999) Inhibin B levels in plasma of the male rat from birth to adulthood: effect of experimental manipulation of Sertoli cell number. *Journal of andrology* 20(1):94-101.
- Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C & Fisher JS (2003) Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 125(6):769-784.
- Shono T & Taguchi T (2014) Short-time exposure to mono-n-butyl phthalate (MBP)-induced oxidative stress associated with DNA damage and the atrophy of the testis in pubertal rats. *Environmental science and pollution research international* 21(4):3187-3190.

- Showell MG, Mackenzie-Proctor R, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT & Hart RJ (2014) Antioxidants for male subfertility. *The Cochrane database of systematic reviews* 2014(12):1-190.
- Sigma-Aldrich (2018a) Curcumin: C1386 SIGMA. *Sigma-Aldrich*, Germany, <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c1386?lang=fr®ion=CA> , (Consulté le 22 janvier 2018).
- Sigma-Aldrich (2018b) L-Ascorbic acid: A4403 SIGMA. *Sigma-Aldrich*, Germany, <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a4403?lang=fr®ion=CA> , (Consulté le 22 janvier 2018).
- Sigma-Aldrich (2018c) L-Carnitine hydrochloride: C0283 SIGMA. *Sigma-Aldrich*, Germany, <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c0283?lang=fr®ion=CA> , (Consulté le 22 janvier 2018).
- Sigma-Aldrich (2018d) N-Acetyl-L-cysteine: A7250 SIGMA-ALDRICH. *Sigma-Aldrich*, Germany, <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/a7250?lang=fr®ion=CA> , (Consulté le 22 janvier 2018).
- Sigma-Aldrich (2018e) WR-1065: W2020 SIGMA. *Sigma-Aldrich*, Germany, <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/w2020?lang=fr®ion=CA> , (Consulté le 22 janvier 2018).
- Siimes MA, Rautonen J, Mäkiperna A & Sipilä I (1995) Testicular Function in Adult Males Surviving Childhood Malignancy. *Pediatric Hematology and Oncology* 12(3):231-241.
- Simone CB, 2nd, Simone NL, Simone V & Simone CB (2007a) Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, part 1. *Altern Ther Health Med* 13(1):22-28.
- Simone CB, 2nd, Simone NL, Simone V & Simone CB (2007b) Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, Part 2. *Altern Ther Health Med* 13(2):40-47.
- Skinner R, Mulder RL, Kremer LC, Hudson MM, Constine LS, Bardi E, Boekhout A, Borgmann-Staudt A, Brown MC, Cohn R, Dirksen U, Giwercman A, Ishiguro H, Jahnukainen K, Kenney LB, Loonen JJ, Meacham L, Neggess S, Nussey S, Petersen C, Shnorhavorian M, van den Heuvel-Eibrink MM, van Santen HM, Wallace WH & Green DM (2017) Recommendations for gonadotoxicity surveillance in male childhood, adolescent, and young adult cancer survivors: a report from the International Late Effects of Childhood Cancer Guideline Harmonization Group in collaboration with the PanCareSurFup Consortium. *Lancet Oncol* 18(2):75-90.
- Smith LB & Walker WH (2014) Testis Hormone Signaling. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Plant TM & Zeleznik AJ (Édit.) Academic Press, London, UK Vol 1. p 637-690.
- Société canadienne du cancer (2018a) Chemotherapy and targeted therapy for childhood leukemia. *Société canadienne du cancer*, Canada, <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/leukemia-childhood/treatment/chemotherapy/?region=on>, (Consulté le 12 janvier 2018).
- Société canadienne du cancer (2018b) Chemotherapy for childhood Hodgkin lymphoma. *Société canadienne du cancer*, Canada, <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/hodgkin-lymphoma-childhood/treatment/chemotherapy/?region=on>, (Consulté le 12 janvier 2018).

- Société canadienne du cancer (2018c) Traitements de la LAL chez l'enfant. *Société canadienne du cancer*, Canada, <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/leukemia-childhood/treatment/acute-lymphocytic-leukemia-all/?region=on>, (Consulté le 12 janvier 2018).
- Société canadienne du cancer (2018d) Traitements des tumeurs au cerveau et à la moelle épinière chez l'enfant. *Société canadienne du cancer*, Canada, <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/brain-spinal-childhood/treatment/?region=on#ixzz53zw6T6hm>, (Consulté le 12 janvier 2018).
- Société canadienne du cancer (2018e) Treatments for childhood AML. *Société canadienne du cancer*, Canada, <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/leukemia-childhood/treatment/acute-myelogenous-leukemia-aml/?region=on>, (Consulté le 12 janvier 2018).
- Société canadienne du cancer (2018f) Treatments for childhood lymphoblastic lymphoma. *Société canadienne du cancer*, Canada, <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/non-hodgkin-lymphoma-childhood/treatment/lymphoblastic-lymphoma/?region=on>, (Consulté le 12 janvier 2018).
- Stanton PG (2016) Regulation of the blood-testis barrier. *Seminars in cell & developmental biology* 59:166-173.
- Stein DM, Victorson DE, Choy JT, Waimey KE, Pearman TP, Smith K, Dreyfuss J, Kinahan KE, Sathwani D, Woodruff TK & Brannigan RE (2014) Fertility Preservation Preferences and Perspectives Among Adult Male Survivors of Pediatric Cancer and Their Parents. *J Adolesc Young Adult Oncol* 3(2):75-82.
- 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* 2013:1-13.
- Stumpp T, Sasso-Cerri E, Freymuller E & Miraglia SM (2004) Apoptosis and testicular alterations in albino rats treated with etoposide during the prepubertal phase. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 279(1):611-622.
- Sun J, Sun G, Meng X, Wang H, Luo Y, Qin M, Ma B, Wang M, Cai D, Guo P & Sun X (2013) Isorhamnetin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in vivo and in vitro. *PLoS One* 8(5):e64526.
- Swamy AV, Gulliaya S, Thippeswamy A, Koti BC & Manjula DV (2012) Cardioprotective effect of curcumin against doxorubicin-induced myocardial toxicity in albino rats. *Indian J Pharmacol* 44(1):73-77.
- Tamai I (2013) Pharmacological and pathophysiological roles of carnitine/organic cation transporters (OCTNs: SLC22A4, SLC22A5 and Slc22a21). *Biopharm Drug Dispos* 34(1):29-44.
- The American Cancer Society medical and editorial content team (2017a) About Non-Hodgkin Lymphoma in Children. *American Cancer Society*, États-Unis, <https://www.cancer.org/cancer/childhood-non-hodgkin-lymphoma/about/non-hodgkin-lymphomain-children.html>, (Consulté le 12 janvier 2018).
- The American Cancer Society medical and editorial content team (2017b) Treatment of Children With Acute Lymphocytic Leukemia (ALL). *American Cancer Society*, États-Unis, <https://www.cancer.org/cancer/leukemia-in-children/treating/children-with-all.html>, (Consulté le 12 janvier 2018).

- The American Cancer Society medical and editorial content team (2017c) Treatment of Non-Hodgkin Lymphoma in Children, by Type and Stage. *American Cancer Society*, États-Unis, <https://www.cancer.org/cancer/childhood-non-hodgkin-lymphoma/treating/by-stage.html>, (Consulté le 12 janvier 2018).
- 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(9330):361-367.
- Tremblay A, Beaud H & Delbes G (2017) [Transgenerational impact of chemotherapy: Would the father exposure impact the health of future progeny?]. *Gynecologie, obstetrique, fertilité & senologie* 45(11):609-618.
- Tremellen K (2008) Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 14(3):243-258.
- Trivedi PP, Kushwaha S, Tripathi DN & Jena GB (2010) Evaluation of male germ cell toxicity in rats: correlation between sperm head morphology and sperm comet assay. *Mutat Res* 703(2):115-121.
- Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology* 552(Partie 2):335-344.
- Uyeturk U, Uyeturk U, Firat T, Cetinkaya A, Kin Tekce B & Cakir S (2014) Protective effects of rosmarinic acid on doxorubicin-induced testicular damage. *Chemotherapy* 60(1):7-12.
- Valli H, Phillips B, Orwig K, Gassei K & Nagano M (2014) Spermatogonial Stem Cells and Spermatogenesis. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Plant TM & Zeleznik AJ (Édit.) Academic Press, London, UK Vol 1. p 595-635.
- Van Pelt AM, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, Creemers LB, de Rooij DG & van Dissel-Emiliani FM (2002) Establishment of cell lines with rat spermatogonial stem cell characteristics. *Endocrinology* 143(5):1845-1850.
- Vassilakopoulou M, Boostandoost E, Papaxoinis G, de La Motte Rouge T, Khayat D & Psyrris A (2016) Anticancer treatment and fertility: Effect of therapeutic modalities on reproductive system and functions. *Critical reviews in oncology/hematology* 97:328-334.
- Vendramini V, Robaire B & Miraglia SM (2012) Amifostine-doxorubicin association causes long-term prepubertal spermatogonia DNA damage and early developmental arrest. *Hum Reprod* 27(8):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):1-13.
- Viswanatha Swamy AH, Wangikar U, Koti BC, Thippeswamy AH, Ronad PM & Manjula DV (2011) Cardioprotective effect of ascorbic acid on doxorubicin-induced myocardial toxicity in rats. *Indian J Pharmacol* 43(5):507-511.
- 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(5):601-605.
- 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(4):209-218.
- Wang J, Cao H, Xue X, Fan C, Fang F, Zhou J, Zhang Y & Zhang X (2014) Effect of vitamin C on growth of caprine spermatogonial stem cells in vitro. *Theriogenology* 81(4):545-555.

- Wang L, Peng J, Huang H, Wang Q, Yu M & Tao L (2015) Simvastatin protects Sertoli cells against cisplatin cytotoxicity through enhanced gap junction intercellular communication. *Oncology reports* 34(4):2133-2141.
- 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. *Journal of cancer survivorship : research and practice* 8(3):437-447.
- Wattanapitayakul SK, Chularojmontri L, Herunsalee A, Charuchongkolwongse S, Niumsakul S & Bauer JA (2005) Screening of antioxidants from medicinal plants for cardioprotective effect against doxorubicin toxicity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 96(1):80-87.
- Weiss AJ & Manthei R (1983) A Hypothesis Concerning the Effect of Changes in Scheduling upon the Cardiotoxicity of Adriamycin. *Oncology* 40(3):223-226.
- Wojtala A, Bonora M, Malinska D, Pinton P, Duszynski J & Wieckowski MR (2014) Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry. *Methods in enzymology* 542:243-262.
- Yamaguchi K, Ishikawa T, Kondo Y & Fujisawa M (2008) Cisplatin regulates Sertoli cell expression of transferrin and interleukins. *Molecular and cellular endocrinology* 283(1-2):68-75.
- Yang F, Teves SS, Kemp CJ & Henikoff S (2014) Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim Biophys Acta, Rev Cancer* 1845(1):84-89.
- Yauk CL, Aardema MJ, Bentham J, Bishop JB, Dearfield KL, DeMarini DM, Dubrova YE, Honma M, Lupski JR, Marchetti F, Meistrich ML, Pacchierotti F, Stewart J, Waters MD & Douglas GR (2015) Approaches for identifying germ cell mutagens: Report of the 2013 IWGT workshop on germ cell assays. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 783:36-54.
- Yeh YC, Lai HC, Ting CT, Lee WL, Wang LC, Wang KY, Lai HC & Liu TJ (2007) Protection by doxycycline against doxorubicin-induced oxidative stress and apoptosis in mouse testes. *Biochem Pharmacol* 74(7):969-980.
- Yi J, Kim MA & Sang J (2016) Worries of childhood cancer survivors in young adulthood. *Eur J Oncol Nurs* 21:113-119.
- Yurtcu E, Iseri O & Sahin F (2014) Genotoxic and cytotoxic effects of doxorubicin and silymarin on human hepatocellular carcinoma cells. *Human & experimental toxicology* 33(12):1269-1276.
- Zeman SM, Phillips DR & Crothers DM (1998) Characterization of covalent adriamycin-DNA adducts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(20):11561-11565.
- Zimniak P (2011) Relationship of electrophilic stress to aging. *Free Radic Biol Med* 51(6):1087-1105.

ANNEXE : 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 TREMBLAY¹, Hermance BEAUD¹, Géraldine DELBES¹.

Affiliations : ¹INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, (Québec) Canada.

Titre du journal : Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie

Date de publication : Novembre 2017

Contribution des auteurs

Amélie Tremblay a rédigé la partie « données expérimentales » et créé le schéma récapitulatif. Hermance Beaud a rédigé la partie « données épidémiologiques ». Géraldine Delbès a rédigé l'introduction et la conclusion ainsi que la partie « Mécanismes impliqués et enjeux cliniques ». Elle a également assuré la 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.

Revue

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 probablement 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

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)	Pertes implantatoires	Mortalité Post-natale	Anomalies congénitales	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-implantatoires	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-implantatoires	Oui	Oui	Baisse de poids des fœtus
22	Rat	CHOP	Chronique (11)	Oui (3, 6, 9)	Post-implantatoires	n.d.	Non	n.d.
26	Rat	CHOP	Chronique (10)	Non	Pré- et post-implantatoires	n.d.	Non	n.d.
23	Souris	Cyclophosphamide	Chronique (5)	Non	Post-implantatoires	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-implantatoires	n.d.	Oui	n.d.
21	Rat	Cyclophosphamide	Chronique (1-9)	Non	Pré- et post-implantatoires	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-implantatoires	n.d.	n.d.	n.d.

28	Rat	Doxorubicine	Chronique (4)	Oui (1)	Pré- et post- implantatoires	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.

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.

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 foetal 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

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)	Pertes implantatoires	Mortalité Post-natale	Anomalies congénitales	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-implantatoires	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.

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.

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 restent 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

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

Référence	Age 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
46	<20	Tous types	Nés d'H survivants : 470 Nés de témoins : 4150			Sex ratio 1.09 Sex ratio 1.18 si diagnostic entre 10-14ans
8	9-24	Osteosarcome	Nés d'H&F survivants : 29		0/29	
47	<18	Tous types	Nés d'H survivants : 4056			Sex ratio 1.02
51	<20	Tous types	Nés d'H&F survivants : 2630 Issue de la fratrie : 5504			Sex ratio: 50,6% garçons. Anomalie chromosomique 0/2630 (0) Proportion d'anomalies chromosomique non significative après exclusion des cas d'hérédité et ajustement Sex ratio : 52,3% garçons
48	<20	Tous types	Nés d'H survivants : 1056 Nés de témoins : 1986351			Sex ratio 0.99

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 (chemotherapy[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.

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.

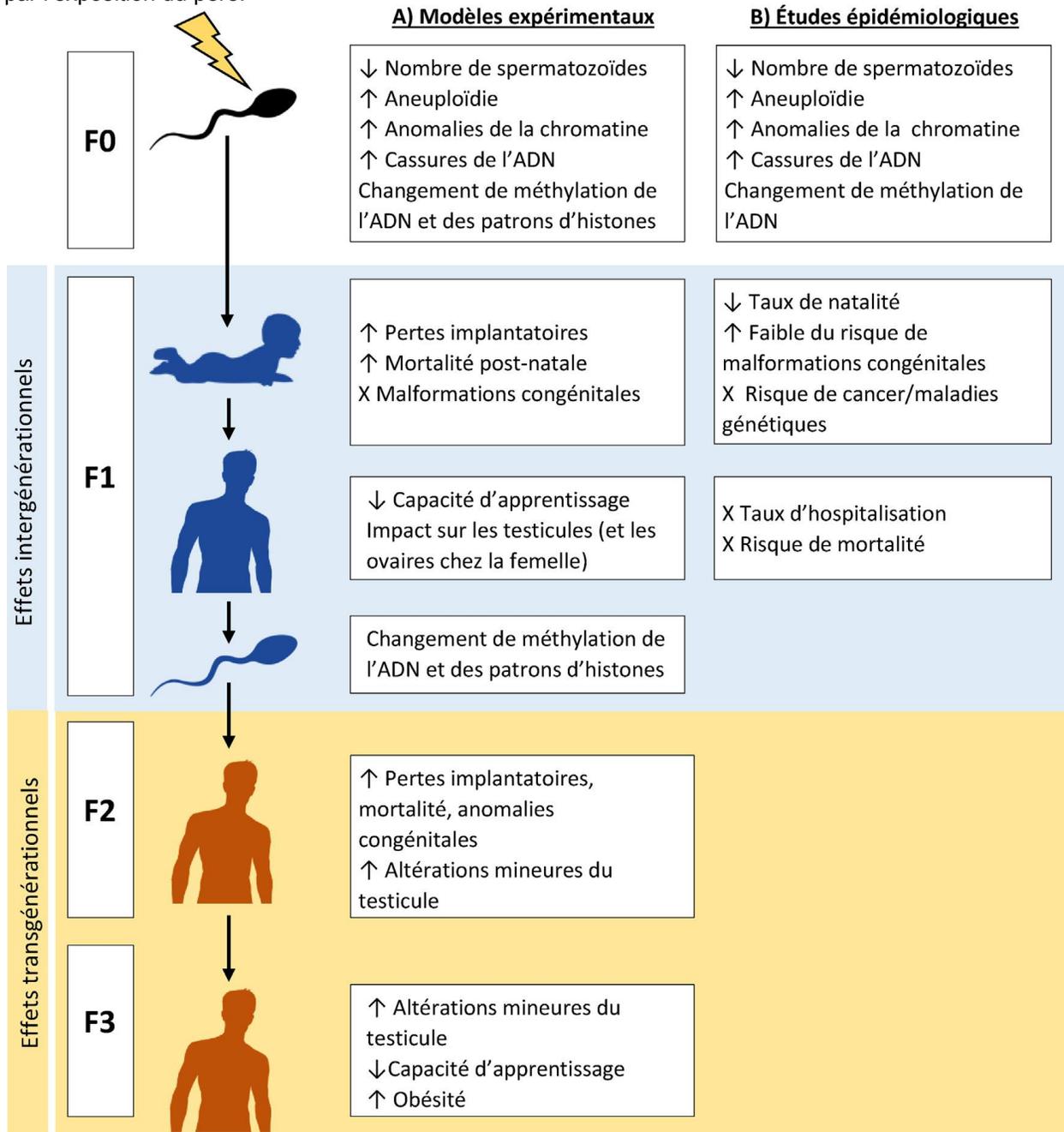
3.2. Les effets transgénérationnels

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 3^e 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 bicaténaires 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.

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.

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-Knijenburg WC, Waalkens-Berendsen ID, Smits-van Prooije 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, Lahrmann 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 cis-platinum (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, Kaminen 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, Nurmiö 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, Brugnol 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-Riggelman 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.