

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE BATNA -2-Mostefa Ben Boulaïd  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE DES ORGANISMES



*Thèse en vue de l'obtention du diplôme de*  
**DOCTORAT EN SCIENCES**

*Filière*  
**BIOLOGIE**

*Option*  
**Biologie animale**

*Thème*  
**Etude de l'instabilité génomique chez les couples avec  
infertilité idiopathique**

*Présentée par : LAANANI Ismahane*

Jury de thèse :	Grade	Université
Présidente	Leila HAMBABA	Pr Mostefa Benboulaid. Batna 2
Examineur	Omar BENNOUNE	Pr Hadj Lakhdar. Batna 1
Examineur	Mohammed KEBIECHE	Pr Mostefa Benboulaid. Batna 2
Examinatrice	Widad SOBHI	MCA Ferhat Abbas. Sétif 1
Examinatrice	Djalila CHELLAT	MCA Frères Mentouri. Constantine1
Directrice de thèse	Ghania BELAALOU	Pr Mostefa Benboulaid. Batna 2

**Année universitaire 2018-2019**

## **DEDICACES**

**A la mémoire de** mon père, mon frère et ma sœur.

**A toute ma famille**, ma mère, pour son soutien si précieux sans oublier mes frères et sœurs pour le support et le soutien moral tout au long de mes études.

**A mes amis,**

**A tous ceux qui**, de près ou de loin, ont participé à la réalisation de ce travail.

## REMERCIEMENTS

Le grand merci est à **Dieu « Le Tout Puissant »** qui m'a aidé de réaliser ce travail.

Tout d'abord je tiens à remercier toute personne qui m'a aidé, de près ou de loin, à l'accomplissement de ce travail et à leur tête mon encadreur de thèse **Pr Ghania BELAALOU** qui m'a fait l'honneur d'accepter la direction de cette thèse et aussi pour son soutien et ses conseils pertinents et incontournables dans la réalisation et la correction de cette thèse.

Je tiens aussi à exprimer mes plus chaleureux remerciements et mon profond respect à l'égard du **Pr Omar BENNOUNE**, et **Pr Ammar AYACHI** qui m'ont énormément aidé dans la réalisation de cette thèse.

Je remercie plus particulièrement **Dr Yassine Helis**, pour son aide précieuse et son entière disponibilité afin de faire évoluer ce projet de recherche.

Un remerciement particulier aux membres de jury qui m'ont honorée par leur présence et accepté d'être membres de jury et de participer dans l'évaluation de cette thèse : **Pr. Leila HAMBABA** et **Pr. Mohammed KEBIECHE** de l'université de Batna 2, **Dr. Widad SOBHI** de l'université Sétif 1 et **Dr. Djalila CHELLAT** de l'université Constantine 1, veuillez accepter mes vives remerciements.

Je remercie également tout le personnel du service de PMA de la maternité de Sidi Mabrouk à Constantine.

Pour terminer, je remercie tous ceux que j'ai involontairement oubliés....

## Résumé

L'objectif de la présente étude est d'évaluer l'étendue de l'instabilité chromosomique chez les couples présentant une infertilité idiopathique en utilisant le test des micronoyaux sur les cellules buccales.

Cette étude a inclus 54 patients (27 couples) présentant une infertilité idiopathique et 30 sujets fertiles (15 couples). Lorsqu'elles ont été évalués par individu (les données de chaque membre du couple ont été analysées séparément), les fréquences des cellules micronucléées (MNC), le nombre total de micronoyaux (TMN), des bourgeons nucléaires (NBUD) et des cellules binucléées (BN) étaient significativement plus élevés chez les sujets infertiles que les sujets fertiles ( $p=0,009$ ,  $p=0,009$ ,  $p=0,003$  et  $p<0,0001$ , respectivement). Parmi les cellules reflétant des événements de la mort cellulaire, les cellules à chromatine condensée (CC), les cellules caryorrhectiques (KHC) et les cellules pycnotiques (PYK) étaient significativement plus élevées chez les individus infertiles ( $p=0,0001$ ,  $p=0,003$ ,  $p=0,001$ , respectivement). Des résultats identiques ont été obtenus quand les données ont été analysées par couple (femme+homme). Les fréquences des MNC, TMN, NBUD et BN étaient significativement plus élevées chez les couples infertiles ( $p=0,019$ ,  $p=0,021$ ,  $p=0,013$ , and  $p<0,0001$ , respectivement). De même, les cellules CC, KHC et PYK étaient significativement plus fréquentes chez les couples infertiles ( $p=0,002$ ,  $p=0,034$ ,  $p=0,008$ , respectivement).

Pour trouver une éventuelle relation entre les dommages génétiques et les micronutriments, les taux de folates et la vitamine B12 ont été mesurés dans les sérums des couples infertiles et la corrélation entre ces vitamines et les biomarqueurs du test des micronoyaux sur cellules buccales a été étudiée. Les TMN et les NBUD étaient négativement corrélées à la concentration plasmatique de folates et de vitamine B12. Une corrélation significative entre les cellules différenciées (DIFF) et les cellules caryolytiques (KYL) et les folates a été constatée chez les hommes. Les cellules BN étaient négativement corrélées à la concentration sanguine en vitamine B12 dans le groupe des femmes et aussi dans celui de tous les individus pris séparément.

En conclusion, cette étude a montré que les couples présentant une infertilité idiopathique, comparés aux témoins, ont une fréquence significativement plus élevée de biomarqueurs de dommage de l'ADN (TMN et NBUD), des biomarqueurs de défaut ou d'arrêt de cytocinèse (BN) ainsi que des biomarqueurs de la mort cellulaire (cellules CC, KHC et PYK). Nous avons trouvé que les biomarqueurs des dommages à l'ADN sont négativement corrélés aux niveaux de vitamine B12 et de folate. Nos résultats suggèrent un rôle possible de l'instabilité chromosomique dans l'infertilité idiopathique qui pourrait être, en partie, dû au statut de la vitamine B12 et des folates. Il est également possible que ces patients présentent une déficience dans les mécanismes de réparation de l'ADN, ou encore un taux important de stress oxydatif. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ces hypothèses.

**Mots-clés :** Micronoyaux, Cellules buccales, Biomarqueurs, Infertilité idiopathique, Vitamine B12, Folates

## **Abstract**

The aim of the present study is to evaluate the extent of chromosomal damage in couples with idiopathic infertility using the buccal micronucleus cytome (BMCyt).

This study included 54 patients (27 couples) with idiopathic infertility and 30 fertile subjects (15 couples). When evaluated by individual (each subject from the couple is considered separately), the frequencies of micronucleated cells (MNC), total number of micronuclei (TMN), nuclear buds (NBUD), and binucleated cells (BN) were significantly higher in the infertile individuals than in the fertile ones ( $p=0,009$ ,  $p=0,009$ ,  $p=0,003$  and  $p<0,0001$ , respectively). Among the cells reflecting cell death events, condensed chromatin (CC), karyorrhectic (KHC) and pyknotic (PYK) cells were significantly higher in the infertile individuals ( $p=0,0001$ ,  $p=0,003$ ,  $p=0,001$ , respectively). Identical results were obtained when data were analyzed by couple (female+male). The frequencies of MNC, TMN, NBUD, and BN cells were significantly higher in the infertile couples ( $p=0,019$ ,  $p=0,021$ ,  $p=0,013$ , and  $p<0,0001$ , respectively). Likewise, CC, KHC and PYK cells were significantly higher in the infertile couples ( $p=0,002$ ,  $p=0,034$ ,  $p=0,008$ , respectively).

To investigate the possible relationship between genetic damage and nutritional variables, folate and vitamin B12 were measured in the sera of infertile couples and correlation between these vitamins and buccal micronucleus assay cytome biomarkers was investigated. TMN and NBUD were negatively correlated with plasma levels of folate and vitamin B12. A significant correlation between folate and differentiated cells (DIFF) as well as karyolytic cells (KYL) was found in men. BN cells showed a negative correlation with B12 vitamin in women and individual groups.

In conclusion, this study showed that, in comparison to controls, couples with idiopathic infertility had significantly higher frequencies of DNA damage biomarkers (TMN and NBUD), biomarkers of cytokinesis-failure or arrest (BN cells) and cell death biomarkers (CC, KHC and PYK cells). We have found that biomarkers of DNA damage are negatively correlated with the levels of B12 vitamin and folate. These results suggest a possible role of chromosomal damage in idiopathic infertility that may be partly due to the status of these two vitamins. It is also possible that these patients may have a deficiency in the DNA repair mechanisms or have an important rate of oxidative stress. Further investigations are required to confirm these hypotheses.

**Keywords:** Micronuclei, Buccal micronucleus cytome, Biomarkers, Idiopathic infertility, B12 vitamin, Folate

**المخلص:** هدف هذه الدراسة تقييم مدى عدم استقرار الكروموسومات لدى الأزواج الذين يعانون من العقم مجهول الأسباب باستعمال اختبار النويات الدقيقة لخلايا الفم. هذه الدراسة تضمنت 54 مريضا (27 زوج) يعانون من العقم مجهول الأسباب و30 شخصا (15 زوج). عند التقييم بالفرد (معطيات كل فرد تدرس على حدى) عدد الخلايا التي تحتوي على النويات الدقيقة، العدد الكلي للنويات الدقيقة، عدد البراعم النووية والخلايا ثنائية النواة عرفت ارتفاع بشكل ملحوظ لدى الأشخاص الذين يعانون من العقم مقارنة بالأشخاص الخصيين ( $p=0,0001$ ,  $p=0,003$ ,  $p=0,009$ ,  $p<0,009$ ). من بين الخلايا التي تعكس أحداث الموت الخلوي، الخلايا ذات الكروماتين المكثف، ذات تمزق النواة، والمغلظة عرفت ارتفاعا بشكل ملحوظ لدى الأشخاص الذين يعانون من العقم ( $p=0,0001$ ,  $p=0,003$ ). نتائج مماثلة وجدت عندما تم دراسة المعطيات بالزوج (المرأة+الرجل). عدد الخلايا التي تحتوي على النويات الدقيقة، العدد الكلي للنويات الدقيقة، عدد البراعم النووية والخلايا ثنائية النواة عرفت ارتفاع محسوس لدى الأزواج الذين يعانون من العقم ( $p=0,0001$ ,  $p=0,013$ ,  $p=0,021$ ,  $p<0,019$ ). كذلك، الخلايا ذات الكروماتين المكثف، ذات تمزق النواة والمغلظة عرفت ارتفاعا ملحوظا لدى الأزواج الذين يعانون من العقم ( $p=0,008$ ,  $p=0,034$ ,  $p=0,002$ ). من اجل البحث عن علاقة محتملة بين الضرر الوراثي والمتغيرات الغذائية، تم قياس الفيتامين ب 9 و ب12 لدى الأزواج الذين يعانون من العقم وتم البحث عن ارتباط بين هذه الفيتامينات والمؤشرات الحيوية لاختبار النويات الدقيقة لخلايا الفم. النويات الدقيقة والبراعم النووية ارتبطت سلبيا مع تركيز الفيتامين ب 9 و ب12. تم العثور على ارتباط ملحوظ بين الخلايا المتميزة والخلايا منحلة النواة والفيتامين ب 9 عند الرجال. الخلايا ثنائية النواة ارتبطت بشكل ملحوظ وسلبيا مع الفيتامين ب12 في مجموعة النساء والفرد. في الختام هذه الدراسة أظهرت أن الأزواج الذين يعانون من العقم مجهول الأسباب بمقارنة بالشواهد، لديهم ارتفاع محسوس في تركيز المؤشرات الحيوية لتلف الحمض النووي، المؤشرات الحيوية لخلل أو توقف الانقسام السيتوبلازمي وكذلك المؤشرات الحيوية للموت الخلوي. نتائجنا تقترح وجود دور ممكن لعدم استقرار الكروموسومات في العقم مجهول الأسباب والذي يمكن أن يكون راجع جزء منه إلى الفيتامين ب 9 و ب12. ومن المحتمل أيضا أن يكون هؤلاء المرضى يعانون نقص في آليات إصلاح الحمض النووي أو معدل مهم من الإجهاد التأكسدي. مطلوب مزيد من التحقيقات لتأكيد هذه الفرضيات.

**الكلمات المفتاحية:** النويات الدقيقة، خلايا الفم، المؤشرات الحيوية، العقم مجهول الأسباب، الفيتامين ب 9، الفيتامين ب12

## Table des matières

Résumé.....	v
Liste des abréviations.....	v
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux.....	ix
INTRODUCTION.....	
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE .....	
Section I : L'infertilité idiopathique du couple.....	
I. L'infertilité .....	3
II. L'infertilité idiopathique .....	3
A. Définition et diagnostique .....	3
B. Exploration de l'infertilité masculine.....	4
1. Interrogatoire.....	4
2. Examen clinique .....	4
3. Analyse du sperme.....	5
C. Exploration de l'infertilité féminine.....	7
1. Interrogatoire.....	7
2. Examen clinique .....	7
3. Évaluation de l'ovulation et de la réserve ovarienne.....	7
4. Évaluation de l'utérus et des trompes de Fallope.....	8
D. Les causes possibles de l'infertilité idiopathique.....	9
1. Un dysfonctionnement hypophysaire ou folliculaire.....	9
2. Un dysfonctionnement des gamètes .....	10
3. Une altération de la fonction de l'endomètre :.....	10
4. Des facteurs immunologiques.....	10
5. Un débit sanguin altéré de l'artère utérine ou spirale.....	10
6. Des facteurs environnementaux .....	11
7. Des facteurs génétiques.....	11
E. Traitement de l'infertilité idiopathique : .....	13
1. La simple expectative .....	13
2. Stimulation ovulatoire simple.....	14
3. L'insémination intra-utérine (IIU) .....	14

<b>4. La fécondation <i>in vitro</i> (FIV)</b> .....	14
<b>Section II : Le test des micronoyaux</b> .....	
<b>I. Le test des micronoyaux sur les cellules buccales</b> .....	<b>16</b>
A. Historique du test des micronoyaux .....	16
B. Principe du test des micronoyaux sur les cellules buccales.....	18
C. La nature et l'origine des micronoyaux.....	20
<b>1. La formation de micronoyaux constitués de fragments chromosomiques acentriques ou de fragments de chromatides</b> .....	<b>21</b>
<b>2. La formation de MN constitués de chromosomes entiers</b> .....	<b>21</b>
D. Le devenir des micronoyaux après leur formation.....	23
E. Mesure d'autres anomalies avec le test des micronoyaux.....	24
<b>1. Les bourgeons nucléaires</b> .....	<b>24</b>
<b>2. Les cellules binucléées</b> .....	<b>25</b>
<b>3. Les biomarqueurs de la mort cellulaire</b> .....	<b>25</b>
F. Les facteurs de variation du test des MN .....	26
<b>II. Avantages et limites du test des micronoyaux sur cellules buccales</b> .....	<b>28</b>
A. Avantages du test des micronoyaux .....	28
B. Limites du test des micronoyaux.....	29
<b>Section III : Les vitamines B9 et B12</b> .....	
<b>I. La vitamine B9 (acide folique ou folates)</b> .....	<b>30</b>
A. Caractéristiques générales de la vitamine B9.....	30
B. Apport alimentaire en vitamine B9 .....	30
C. Métabolisme et fonctions biologiques de la vitamine B9.....	30
<b>1. Structure</b> .....	<b>30</b>
<b>2. Absorption</b> .....	<b>30</b>
<b>3. Transport</b> .....	<b>31</b>
<b>4. Distribution cellulaire</b> .....	<b>31</b>
<b>5. Méthylation de l'ADN</b> .....	<b>32</b>
<b>6. Synthèse des bases nucléotidiques</b> .....	<b>33</b>
D. Conséquences du déficit en folates.....	34
<b>II. La vitamine B12</b> .....	<b>34</b>
A. Structure et définition de la vitamine 12 .....	34
B. Origine, synthèse et source alimentaire de la vitamine B12.....	35
C. Métabolisme de la vitamine B12.....	36

D. Rôle de la vitamine B12 et conséquence de sa carence.....	37
<b>CHAPITRE II PATIENTS, MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>40</b>
<b>I. Patients .....</b>	<b>40</b>
A. Recrutement des patients.....	40
B. Recrutement des témoins.....	40
<b>II. Matériel et méthodes .....</b>	<b>41</b>
A. Étude cytogénétique par le test des micronoyaux sur les cellules buccales .....	41
<b>1. La préparation des solutions .....</b>	<b>41</b>
<b>2. La procédure du test .....</b>	<b>42</b>
<b>3. Critères de lecture des cellules .....</b>	<b>44</b>
<b>4. Méthode de lecture des lames.....</b>	<b>50</b>
B. Dosage des vitamines .....	51
C. Analyse statistique.....	51
<b>CHAPITRE III RESULTATS .....</b>	<b>53</b>
<b>I. Caractéristiques générales des sujets infertiles .....</b>	<b>53</b>
<b>II. Résultats du test des micronoyaux sur les cellules buccales .....</b>	<b>55</b>
A. Effet de l'âge dans le groupe des témoins.....	55
B. Effet de l'âge dans le groupe des patients .....	56
C. Effet du sexe dans le groupe des témoins.....	56
D. Effet du sexe dans le groupe de patients .....	57
E. Comparaison des résultats du test des micronoyaux entre les deux groupes d'étude .....	57
<b>1. Evaluation par individu .....</b>	<b>59</b>
<b>2. Evaluation par couple .....</b>	<b>59</b>
<b>III. Résultats de l'étude de corrélation entre les vitamines B12 et B9 et les biomarqueurs du test des micronoyaux sur les cellules buccales .....</b>	<b>60</b>
A. Corrélation entre les biomarqueurs du test des micronoyaux et la vitamine B 9 (folates).....	61
B. Corrélation entre les biomarqueurs du test des micronoyaux et la vitamine B 12 .....	62
<b>CHAPITRE IV DISCUSSION .....</b>	<b>65</b>
<b>CHAPITRE V CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>76</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>78</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>86</b>

## Liste des abréviations

5,10 MeTHF : 5,10 méthylène tétrahydrofolate

5,10-méthényl-THF : 5,10-méthényl tétrahydrofolate

5-Me-THF : 5-méthyltétrahydrofolate

ADN: Acide désoxyribonucléique

Adocbl : 5'- Désoxyadénosylcobalamine

AMH: Anti mullerien hormon

ASGP: Asialoglycoprotéine

ASRM: American Society for Reproductive Medecine

BAS: Basales

BER : Base-Excision Repair

BN: Binucléées

BMCyt: Buccal micronucleus cytome

CatSper : Canal cationique des spermatides

Cbl : Cobalamine

CBMN Cyt: Cytokinesis block micronucleus cytome

CBMN : Cytokinesis block micronucleus

CC : Chromatine condensé

CIN : Chromosomal Instability

CNV: Copy number variation

CpG : séquence cytosine-phosphate-guanine pour la distinguer de la notation CG qui peut également désigner une paire de bases sur deux brins d'ADN distincts

MNC : Cellules micronucléées

CNCbl : Cyanocobalamine

DIFF : Différenciées

DMSO : Dimethyl sulfoxide

DNMTs : DNA méthyltransférases

dTMP : désoxythymidine monophosphate

dUMP : Désoxyuridine monophosphate

EDTA: Ethylène Diamine Tétra Acétique

FI: Facteur intrinsèque

FISH: Fluorescente in situ hybridisation

FIV: Fécondation in vitro

FR: Folate receptor  
FSH: Follicle Stimulating Hormone  
GnRH: Gonadotrophine releasing hormone  
HSG: Hystérosalpingographie  
HC: haptocorrine  
HR: Homologous recombination  
HUMN<sub>XL</sub>: Human micronucleus eXfoLiated cell  
HUMN: Human Micronucleus  
IAM: Index d'anomalies multiples  
ICSI: Intracytoplasmic sperm injection  
IgA: Immunoglobuline A  
IgG: Immunoglobuline G  
IgM: Immunoglobuline M  
IIU : insémination intra-utérine  
IMC : Indice de masse corporelle  
KHC: caryorrhectique  
KYL: caryolytique  
LH: Luteinizing Hormone  
LOH: Loss of Heterozygosity  
m5C: 5-Méthylcytosines  
MAR test: Mixed Antiglobulin Reaction Test  
MeCbl : Méthylcobalamine  
MMR : MisMatch Repair  
MN : Micronoyau  
MNC-: Micronoyaux centromère-négatif  
MNC+ : Micronoyaux centromère-positif  
MS : Méthionine synthase  
MSI : Microsatellite Instability  
MTHFR : Méthylène tétra-hydrofolate réductase  
NER: Nucleotide-Excision Repair  
NHEJ: Non-Homologous End-Joining  
NBUD: Bourgeons nucléaires

ng : Nanogramme  
OHcbl : Hydroxocobalamine  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
PCFT: Proton coupled folate transporter  
PCR : Polymerase chain reaction  
pg : picogramme  
pH : Puissance d'Hydrogène  
PMA: Procréation médicalement assistée  
POLG: Polymérase gamma  
PYK: Pycnotique  
RFC: Reduced folate carrier  
SAH: S-adénosylhomocystéine  
SAM: S-adénosylméthionine  
SD: Standard Deviation  
SHMT: Sérine hydroxyméthyltransférase  
SNP: Single-Nucleotide Polymorphism  
TCB: Transcobalamines  
THF: Tétrahydrofolate  
WHO: World Health Organization

## Liste des figures

Figure 1: Structure et différenciation de l'épithélium buccal.....	19
Figure 2: Origines séquentielles et séquence spatio-temporelle des différents types de cellules dans le test BMCyt. ....	20
Figure 3: Mécanismes de formation des MN .....	23
Figure 4: Représentation schématique des divers types de cellules observées dans le test de BMCyt. ....	26
Figure 5: Structure chimique de l'acide folique et ses différents dérivés. ....	31
Figure 6: Méthylation des cytosines par les DNMTs sur l'ADN génomique.....	32
Figure 7: Les folates et le métabolisme des unités monocarbonées.....	33
Figure 8: Structures chimiques des différentes cobalamines. ....	35
Figure 9: Les systèmes de transport de la vitamine B12.....	37
Figure 10: Métabolisme de la vitamine B12 et son lien avec celui des folates.....	38
Figure 11: Les différentes cellules observées dans le test des micronoyaux sur les cellules buccales. ....	49
Figure 12: Diagramme décrivant la méthode de lecture dans le test BMCyt. ....	50
Figure 13: Principe du test immunologique par électrochimiluminescence (ECLIA) pour le dosage des vitamines B9 ou B12.....	51

## Liste des tableaux

Tableau 1: Valeurs de référence internationales des paramètres du sperme selon l’OMS 2010. ....	6
Tableau 2: Les critères de classification des différents types de cellules et biomarqueurs dans le test des micronoyaux sur les cellules buccales. ....	47
Tableau 3: Classification des patients en fonction de l’origine géographique.....	53
Tableau 4: Caractéristiques démographiques et médicales des couples infertiles. ....	54
Tableau 5: Effet de l’âge sur les biomarqueurs du test BMCyt dans le groupe de témoins. ....	55
Tableau 6: Effet de l’âge sur les biomarqueurs du test BMCyt dans le groupe de patients.....	56
Tableau 7: Effet du sexe sur les biomarqueurs du test des micronoyaux dans le groupe de témoins. ....	56
Tableau 8: Effet du sexe sur les biomarqueurs du test des micronoyaux dans le groupe de patients. ....	57
Tableau 9: Comparaison des biomarqueurs du test BMCyt entre les sujets infertiles et les témoins fertiles évalués par individu. ....	58
Tableau 10: Comparaison des biomarqueurs du test BMCyt entre les sujets infertiles et les témoins fertiles évalués par couple. ....	59
Tableau 11: Comparaison des concentrations des folates et de vitamine B12 entre les hommes et les femmes infertiles.....	60
Tableau 12: Etude de la corrélation entre l’âge et les concentrations des folates et de la vitamine B12. ....	60
Tableau 13: Etude de la corrélation entre les biomarqueurs du test des micronoyaux et les folates. ....	62
Tableau 14: Etude de la corrélation entre les biomarqueurs du test des micronoyaux et la vitamine B12. ....	63

# **INTRODUCTION**

L'infertilité est à la fois un problème privé et social. Elle est définie comme étant l'incapacité chez un couple de procréer au bout d'une année ou plus de rapports sexuels réguliers et non protégés (Zegers-Hochschild, Adamson et al. 2009). Elle concerne environ 15% des couples ayant un désir d'enfant (Sharlip, Jarow et al. 2002). Environ 15 à 30% de ces couples infertiles souffrent d'infertilité dite idiopathique (ou inexpiquée) (Practice Committee of the ASRM 2006) qui sera diagnostiquée lorsqu'aucune étiologie décelable n'est retrouvée.

Un certain nombre de mécanismes génétiques peuvent entraîner une infertilité et il est probable que la plupart des cas d'infertilité idiopathique soient dus à des causes génétiques (Fenech 2011) dont peuvent témoigner les dommages génomiques et l'instabilité chromosomique.

Le test des micronoyaux est l'une des meilleures techniques cytogénétiques permettant l'évaluation de l'instabilité chromosomique chez l'homme (Thomas, Holland et al. 2009; Bolognesi and Fenech 2013). Les micronoyaux sont de petites entités nucléaires indépendantes du noyau, présentes dans le cytoplasme et provenant de fragments de chromosomes acentriques (sans centromère) ou de chromosomes intacts qui ne sont pas pris en charge lors de l'anaphase de la division cellulaire (Fenech, Kirsch-Volders et al. 2011). Ce test peut être réalisé sur les érythrocytes, les lymphocytes et les cellules épithéliales exfoliées orales, nasales ou urothéliales (Holland, Bolognesi et al. 2008).

Le test des micronoyaux (MN) sur les cellules buccales (The Buccal Micronucleus Cytome, BMCyt) est une méthode utile et peu invasive pour mesurer les dommages génétiques dans les cellules buccales exfoliées chez l'homme (Thomas, Holland et al. 2009; Bolognesi, Roggieri et al. 2015). Il représente un moyen de mesurer des micronoyaux (biomarqueurs de cassures et des pertes chromosomiques), des bourgeons nucléaires (biomarqueurs de l'élimination de l'ADN amplifié), des cellules binucléées (biomarqueurs de l'échec de la cytokinèse), des cellules basales et différenciées (biomarqueurs de la prolifération cellulaire) et des cellules à chromatine condensée, caryorrhétiques, pycnotiques ou caryolytiques (biomarqueurs de la mort cellulaire) (Thomas, Holland et al. 2009; Bolognesi and Fenech 2013; Bolognesi, Roggieri et al. 2015).

L'utilisation du test des micronoyaux pour étudier la relation entre les dommages de l'ADN et l'infertilité chez l'homme a considérablement augmenté (Fenech 2011). Un certain nombre d'études ont mis en évidence un lien entre la fréquence élevée de l'instabilité chromosomique mesurée par le test des micronoyaux et le risque élevé d'infertilité (Trkova, Kapras et al. 2000; Milosevic-Djordjevic, Stosic et al. 2012). Cependant, toutes ces études ont appliqué le test des micronoyaux sur les lymphocytes du sang périphérique.

Dans cette étude, nous avons utilisé le test des micronoyaux sur les cellules buccales pour étudier, pour la première fois avec ce test, la prévalence de ses biomarqueurs dans le contexte de

l'infertilité idiopathique. L'autre originalité de ce travail est que ce test soit appliqué sur une population algérienne. Ainsi, le premier objectif de notre étude était d'abord de mesurer l'instabilité génomique chez les couples présentant une infertilité idiopathique et chez les couples témoins fertiles en utilisant ce test des micronoyaux sur les cellules buccales. Le deuxième objectif consistait à rechercher une éventuelle relation entre les taux sériques des vitamines B9 et B12 et l'instabilité génomique chez les couples avec infertilité idiopathique, en considérant le rôle de ces vitamines dans le maintien de la stabilité génomique.

**CHAPITRE I :**  
**SYNTHESE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

# **Section I :**

## **L'infertilité idiopathique du couple**

# I. L'infertilité

Le comité international de surveillance des techniques de procréation assistée (ICMART) et l'organisation mondiale de la santé (OMS) définissent l'infertilité comme étant l'incapacité chez un couple de procréer au bout d'une année ou plus de rapports sexuels réguliers et non protégés (Zegers-Hochschild, Adamson et al. 2009). Généralement, on admet que sa fréquence est d'environ 15% des couples cherchant à procréer (Sharlip, Jarow et al. 2002). Cependant, cette estimation étant réalisée dans des pays développés, les données sur la prévalence de l'infertilité dans les pays moins développés font défaut et la comparabilité est limitée en raison des différences dans les contextes de recherche et les antécédents socioculturels (Dyer 2009).

Il est à savoir que le terme fécondité représente le fait d'avoir obtenu un enfant alors que la fertilité correspond à la capacité à en obtenir un, donc à une potentialité (de Mouzon 2011). Quant au terme de « stérilité » doit être réservé à l'incapacité totale et définitive de concevoir, diagnostic qui ne peut être posé que devant une cause évidente et non curable d'infertilité (R. Levy 2010; de Mouzon 2011). Le terme qui devrait être employé maintenant est celui « d'infertilité », qui recouvre donc la réalité de la pathologie des couples (de Mouzon 2011). Parfois, le terme « d'hypofertilité » est utilisé pour décrire un couple dont l'aptitude à concevoir n'est pas optimale (de Mouzon 2011).

L'infertilité est dite "primaire" lorsque le couple n'a jamais conçu et "secondaire" lorsqu'il y a déjà eu une ou plusieurs grossesses à terme (Templeton, Fraser et al. 1991).

## II. L'infertilité idiopathique

### A. Définition et diagnostique

Dans certains cas, l'évaluation standard du couple infertile ne révèle aucune anomalie décelable ou cause définitive d'infertilité et donc le couple est diagnostiqué avec une infertilité inexplicée ou idiopathique. Malgré les progrès dans les techniques de diagnostic, l'incidence moyenne de l'infertilité idiopathique a été estimée, par la Société Américaine de Médecine Reproductive (ASRM) à environ 15%–30% chez les couples infertiles (Practice Committee of the ASRM 2006). Cependant, cette incidence peut varier en fonction de la population étudiée et des critères utilisés pour établir le diagnostic (Templeton and Penney 1982; Isaksson and Tiitinen 2004).

L'infertilité idiopathique n'est pas une condition absolue, mais une incapacité relative à concevoir, et bien que plusieurs de ces couples puissent concevoir sans traitement, le traitement accélérera souvent la conception (Fisch, Casper et al. 1989).

Il s'agit d'un diagnostic d'exclusion, lorsque les résultats d'une évaluation standard de l'infertilité sont normaux, les praticiens attribuent un diagnostic d'infertilité idiopathique (Quaas and Dokras 2008). L'évaluation standard de l'infertilité variant selon les différents praticiens, il n'y a pas de consensus sur les enquêtes les plus appropriées. Elle comprend généralement une analyse du sperme, une évaluation de l'ovulation et l'évaluation de la perméabilité des trompes de Fallope et, si indiqué, des tests pour la réserve ovarienne et la laparoscopie (Practice Committee of the ASRM 2006; Quaas and Dokras 2008). Certains recommandent également une biopsie de l'endomètre, un test post-coïtal de Hühner et des dosages de la prolactine sérique (Isaksson and Tiitinen 2004).

Il semble cependant exister un consensus pour dire que l'infertilité est idiopathique si l'ovulation est présente, les trompes et la cavité utérine sont normales (une hystérosalpingographie qui visualise un appareil utéro-tubaire sans anomalie avec au moins une trompe perméable) et le sperme est normal (spermogramme sans altération significative). Mais, le test de Hühner normal n'est pas retenu comme critère diagnostique de façon systématique dans toutes les études, compte tenu de sa variabilité en fonction du moment dans le cycle où il est effectué et de sa médiocre valeur prédictive de la fertilité ultérieure (Cédrin-Durnerin 2006). Il en est de même pour la cœlioscopie à la recherche d'anomalies pelviennes indétectables autrement (Empereire 2015).

L'exploration d'un couple infertile doit être menée parallèlement chez les deux partenaires (Practice Committee of the ASRM 2006). En effet, l'identification des causes sous-jacentes de l'infertilité est une étape essentielle dans l'amélioration du diagnostic et du traitement des troubles de la fertilité.

### **B. Exploration de l'infertilité masculine**

L'évaluation du couple infertile comprend l'évaluation du partenaire masculin par l'interrogatoire, l'examen clinique et l'analyse du sperme (Quaas and Dokras 2008).

#### **1. Interrogatoire**

Les éléments importants de l'interrogatoire comprennent la paternité antérieure, des antécédents de cryptorchidie, des antécédents médicaux et chirurgicaux, un dysfonctionnement sexuel et toute consommation de médicaments, de tabac, d'alcool ou de drogues illicites (Schlosser, Nakib et al. 2006; Huyghe, Izard et al. 2008; Quaas and Dokras 2008; Marcelli, Robin et al. 2009).

#### **2. Examen clinique**

L'examen physique doit être général mais une attention particulière doit être donnée à l'examen des organes génitaux. Lors de l'examen physique, des anomalies testiculaires telles qu'une varicocèle (varices testiculaires correspondant à dilatation des veines situées au niveau du cordon spermatique) (Schlosser, Nakib et al. 2006; Quaas and Dokras 2008; Marcelli, Robin et al. 2009).

### 3. Analyse du sperme

#### Spermogramme

Il s'agit de l'examen primordial pour évaluer l'infertilité masculine. Le recueil par masturbation a lieu au laboratoire (et non au domicile), après deux à cinq jours d'abstinence sexuelle. Les principaux paramètres qui sont évalués sont le volume du sperme, la concentration, la mobilité, la vitalité et la morphologie des spermatozoïdes (Schlosser, Nakib et al. 2006; Huyghe, Izard et al. 2008; Marcelli, Robin et al. 2009).

#### Interprétation du spermogramme

L'interprétation se fait selon valeurs de référence internationales selon l'OMS 2010 (Barratt, Bjorndahl et al. 2011) (Tableau 1).

**Le volume :** Il traduit essentiellement les capacités sécrétoires des glandes annexes.

- Un faible volume (hypospermie) peut s'expliquer soit par un trouble de l'éjaculation, soit par une insuffisance sécrétoire de l'une des glandes annexes pouvant être liée à une infection (prostatite, vésiculite) ou à l'absence même de vésicules séminales.
- Un volume élevé (hyperspermie) est généralement le témoin d'une hypersécrétion des vésicules séminales qui normalement forment l'essentiel du volume de l'éjaculat et ne doit pas être considérée comme pathologique.

**Le pH :** L'éjaculat est un mélange de sécrétions prostatiques acides (blanchâtres) et de sécrétions vésiculaires basiques (jaunâtres). Des valeurs trop faibles de pH peuvent être le reflet d'un défaut de sécrétion des vésicules séminales (normalement alcalines) alors qu'un pH nettement alcalin peut révéler une insuffisance des sécrétions prostatiques (normalement légèrement acides).

#### La numération des spermatozoïdes :

Le seuil de fécondité est de 15 millions par ml.

- On parle d'oligospermie ou oligozoospermie si le nombre de spermatozoïdes < 15 millions par ml.
- On parle d'azoospermie ou absence totale de spermatozoïdes (0 / ml). Elle peut être d'origine obstructive (obstruction des voies séminales) ou non obstructive (absence de production par les testicules).

**La mobilité :** On parle d'asthénospermie ou asthénozoospermie en cas de diminution de la mobilité des spermatozoïdes par rapport aux valeurs normales.

La vitalité : reflète le pourcentage de spermatozoïdes vivants, elle trouve son intérêt dans les cas où la mobilité est faible. On parle de nécrospermie si le taux de spermatozoïdes morts est élevé.

**Tableau 1: Valeurs de référence internationales des paramètres du sperme selon l’OMS 2010.**

<b>Paramètre</b>	<b>Valeur de référence</b>	<b>Définitions de l'anomalie</b>
Volume	> 1,5 ml (1,4 - 1,7)	< 1,5 ml : <b>Hypospermie</b> > 6 ml : <b>Hyperspermie</b>
Nombre de spermatozoïdes / ml  Nombre de spermatozoïdes / éjaculat	≥ 15 million / ml (12 - 16)  > 39 million/éjaculat (33 - 46)	0 : <b>Azoospermie</b>  < 15 millions/ml : <b>Oligozoospermie</b>
Mobilité progressive  Mobilité totale	≥ 32 % (31 à 34)  ≥ 40 % (38 - 42)	<32% <b>Asthénospermie</b>  < 40 %
Vitalité	≥ 58 % (55 - 63)	<58 % : <b>Nécrosospermie</b>
Formes normales	> 4% (3,0 - 4,0)	< 4 % : <b>Tératospermie</b>
Leucocytes	< 1,0 million / ml	>1million/ml : <b>Leucospermie</b>
pH	≥ 7,2	
MAR test (anticorps anti spermatozoïdes de type IgA, IgG, IgM fixés sur les spermatozoïdes) :  < 50 %.	< 50 %	

### **Spermocytogramme**

Il consiste à rechercher les atypies morphologiques des spermatozoïdes en microscopie optique. La plupart des laboratoires utilisent la classification de DAVID. Elle distingue les anomalies de la tête, de la pièce intermédiaire et du flagelle et permet aussi de mettre en évidence les associations d’atypies au niveau d’une même cellule. Le nombre moyen d’anomalies par spermatozoïde peut être évalué en calculant l’index d’anomalies multiples (IAM). La fertilité commence à baisser significativement quand l’IAM >1,6 (Huyghe, Izard et al. 2008).

## **C. Exploration de l'infertilité féminine**

### **1. Interrogatoire**

Chez la femme, on recherchera la durée de l'infertilité, l'âge à la ménarche, les antécédents familiaux et personnels, les antécédents obstétricaux (accouchements ou fausses couches), le caractère et régularité du cycle menstruel, les méthodes contraceptives utilisées et moment de l'arrêt; les antécédents infectieux (cervicite, salpingite), les antécédents chirurgicaux, les traitements antérieurs et réponse aux différents traitements et les habitudes de vie (tabac, alcool, drogues, gestion du stress, exposition à des toxines, activité physique...) (Practice Committee of the ASRM 2006; Dechanet C 2009; Kamel 2010).

### **2. Examen clinique**

Un examen clinique général et gynécologique fait suite à l'interrogatoire. L'examen devrait préciser les éléments suivants : le poids, la taille, l'indice de masse corporelle (IMC), la pilosité (la présence d'une pilosité au niveau des seins, du visage, de l'abdomen, associée à une acné évoque un dérèglement hormonal), l'examen des seins (recherche d'une galactorrhée témoignant d'une hypersécrétion de prolactine). L'examen de la thyroïde (nodule, goitre, sensibilité) et la présence ou l'absence de signes d'androgynisme.

L'examen gynécologique complet (examen du vagin, du col et des sécrétions vaginales, la présence et qualité de la glaire cervicale) et examen pelvien en précisant l'examen de l'utérus (grosseur, position, mobilité), l'examen des annexes (sensibilité, masse) et la présence ou l'absence de nodules ou de masses palpables (Practice Committee of the ASRM 2006; Dechanet C 2009; Kamel 2010).

### **3. Évaluation de l'ovulation et de la réserve ovarienne**

#### **La courbe de température basale**

Elle sert à vérifier l'existence d'un trouble de l'ovulation et à connaître le jour de l'ovulation (Practice Committee of the ASRM 2006; Kamel 2010). Alors que les schémas biphasiques sont caractéristiques des cycles ovulatoires, des enregistrements monophasiques ou un intervalle extrêmement court d'élévation de la température de la phase lutéale (11 jours) peuvent identifier les patientes dont la fonction ovulatoire est absente ou de mauvaise qualité. Cependant, certaines femmes ovulatoires peuvent présenter des schémas monophasiques et le test ne peut pas définir de manière fiable le moment de l'ovulation (Practice Committee of the ASRM 2006). Bien que la courbe de température basale soit l'outil le moins coûteux, elle est difficile à interpréter et souvent frustrante pour les patientes (Cédrin-Durnerin 2006; Quaas and Dokras 2008).

### **Les dosages hormonaux**

Un dosage hormonal (LH, FSH, AMH et œstradiol) sera réalisé au 3<sup>ème</sup> jour du cycle. Ces dosages permettent d'évaluer la réserve ovarienne (nombre de follicules recrutés, la qualité d'ovulation et l'intégrité de l'axe hypothalamo-hypophysaire) (Kamel 2010; Empereire 2015).

Les déterminations sériques de progestérone au cours de la phase lutéale peuvent également être utilisées pour évaluer la fonction ovulatoire ; des valeurs supérieures à 3 ng/ml fournissent une preuve présomptive de l'ovulation. Le dosage de la progestérone en milieu de la phase lutéale peut offrir des informations supplémentaires sur la qualité de la fonction lutéale, bien que les concentrations puissent fluctuer considérablement même chez les femmes normales. Au cours des cycles spontanés, des taux de progestérone supérieurs à 10 ng/ml sont bien corrélés avec l'histologie endométriale normale (Practice Committee of the ASRM 2006).

### **L'échographie pelvienne**

Elle permet de rechercher certaines causes ovariennes (kystes, ovaires micropolykystiques, réserve ovarienne diminuée..) et utérines (fibromes, polypes...) (Kamel 2010; Torre, Pouly et al. 2010). Elle est réalisée au début du cycle, entre le 3<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour du cycle, afin de définir le nombre de follicules antraux au niveau des ovaires, c'est-à-dire la réserve ovarienne, et l'intégrité de l'appareil génital féminin. La réserve ovarienne est définie comme satisfaisante s'il existe au moins 5 à 10 follicules antraux par ovaire. Le compte échographique des follicules antraux et le dosage plasmatique de l'AMH semblent être les meilleurs critères d'évaluation de la réserve ovarienne (Hazout 2006).

## **4. Évaluation de l'utérus et des trompes de Fallope**

### **L'hystérosalpingographie (HSG)**

Un examen radiologique, une hystérosalpingographie met en évidence des anomalies de l'utérus (fibromes, utérus cloisonné...), ou une obstruction des trompes utérines. Il s'effectue en première partie du cycle, après les règles (Torre, Pouly et al. 2010).

### **L'hystérocopie**

L'hystérosalpingographie peut être remplacée ou complétée par une hystérocopie qui consiste à observer l'intérieur de l'utérus au moyen d'une fibre optique introduite dans la cavité utérine par le col. Elle ne permet pas d'évaluer la perméabilité des trompes, mais de préciser la normalité ou non de la cavité utérine : présence de polypes, d'une cloison, d'une synéchie, etc. (Kamel 2010; Torre, Pouly et al. 2010).

### La cœlioscopie

Elle permet l'examen direct de la cavité pelvienne, de l'utérus, des ovaires et des trompes. Elle permet aussi, le cas échéant, la réalisation de certains gestes chirurgicaux à but thérapeutique (Torre, Pouly et al. 2010). L'examen consiste à regarder l'intérieur de la cavité abdominale sous anesthésie générale, à l'aide d'une caméra introduite par une petite incision de quelques centimètres sous l'ombilic.

### D. Les causes possibles de l'infertilité idiopathique

Notre incapacité à trouver les causes de l'infertilité idiopathique des couples ne signifie pas qu'il n'y a pas de cause de cette infertilité. Des recherches approfondies doivent être menées sur d'autres causes possibles de l'échec de la conception, telles que les dysfonctionnements ovariens et testiculaires, la qualité du sperme et des ovocytes, les défauts de transport de la trompe, la réceptivité de l'endomètre, les défauts d'implantation et l'endométriose (Isaksson and Tiitinen 2004).

Plusieurs théories ont été élaborées sur l'étiologie de l'infertilité inexplicée. Parmi lesquelles on retrouve :

#### 1. Un dysfonctionnement hypophysaire ou folliculaire

La diminution de la réserve ovarienne, comme indiqué par l'augmentation du taux d'hormone FSH, peut être l'une des causes (Cahill, Wardle et al. 1995). Une étude a révélé que 5% des femmes présentant une infertilité idiopathique présentaient une élévation des niveaux de la FSH au début de la phase folliculaire (Rodin, Fisher et al. 1994).

Des modifications des taux de LH, un faible ratio FSH/LH et une concentration réduite de LH dans le liquide folliculaire ont également été supposées jouer un rôle dans l'infertilité idiopathique (Cahill, Wardle et al. 1995; Omland, Fedorcsak et al. 2001). De même, il a été observé que les anomalies de la FSH et de la LH pouvaient refléter un dysfonctionnement de l'axe hypophyso-ovarien (Leach, Moghissi et al. 1997; Omland, Fedorcsak et al. 2001). De plus, les taux sériques d'œstradiol dans la phase folliculaire et le rapport œstradiol/progestérone se sont révélés élevés chez les femmes présentant une infertilité inexplicée, suggérant une folliculogenèse altérée (Blacker, Ginsburg et al. 1997; Leach, Moghissi et al. 1997) en plus de l'absence d'élévation de la prolactine au milieu de cycle comme c'est le cas chez les femmes fertiles (Subramanian, Kowalczyk et al. 1997).

Une autre explication possible est l'altération de la phase lutéale, avec une phase lutéale plus courte ou une diminution du pic du taux sérique de progestérone (Guzick, Grefenstette et al. 1994; Blacker, Ginsburg et al. 1997; Leach, Moghissi et al. 1997). L'altération de la phase lutéale est due à une élévation et une diminution de la fréquence des pulses LH folliculaires, au faible rapport

FSH/LH ou à la diminution de la FSH mi-folliculaire, ce qui est principalement due à un déséquilibre fonctionnel dans l'hypothalamus (Nakajima and Gibson 1991).

### **2. Un dysfonctionnement des gamètes**

Une folliculogénèse altérée, une altération de la maturation des ovocytes, une réduction de la qualité des ovocytes et des défauts dans l'interaction des gamètes ont tous été suggérés (Blacker, Ginsburg et al. 1997; Omland, Fedorcsak et al. 2001). D'autre part, un dysfonctionnement du sperme altérerait la capacité des spermatozoïdes à pénétrer dans la glaire cervicale, la zone pellucide et la membrane plasmique (Hull, Williams et al. 1998; Takeuchi, Minoura et al. 2000). Il a également été suggéré qu'une réaction acrosomique insuffisante pourrait entraîner un échec de la fécondation (Esterhuizen, Franken et al. 2001). Une autre théorie suggère qu'un défaut de la trompe de Fallope lors de la capture naturelle des ovules pourrait s'observer chez ces femmes, bien que cela soit difficile à vérifier (Ahmad-Thabet 2000).

### **3. Une altération de la fonction de l'endomètre**

Une autre explication possible de l'infertilité idiopathique est l'altération de la fonction de l'endomètre (Klentzeris 1997). De plus, une faible expression des récepteurs de la progestérone au niveau de l'endomètre et une induction œstrogénique inadéquate des récepteurs de la progestérone ont été rapportés chez les femmes avec l'infertilité non expliquée (Nakajima and Gibson 1991).

### **4. Des facteurs immunologiques**

De nombreux types d'anticorps ont été suggérés comme causes possibles de l'infertilité idiopathique. Ainsi, les anticorps ovariens sont fréquents chez les femmes présentant ce type d'infertilité (Geva, Amit et al. 1997; Luborsky, Llanes et al. 1999; Luborsky, Llanes et al. 2000), de même que les anticorps anti-spermatozoïdes (Luborsky, Llanes et al. 2000). De plus, une immunosuppression maternelle inadéquate, pouvant entraîner un rejet de l'embryon chez les femmes présentant une infertilité idiopathique, a été également suspectée (Klentzeris 1997).

### **5. Un débit sanguin altéré de l'artère utérine ou spirale**

Un flux sanguin artériel utérin anormal pourrait être associé à une infertilité idiopathique. Ainsi, une impédance augmentée de l'artère utérine dans la phase mi-lutéale ou un flux anormal dans les artères spirales pourrait altérer le processus d'implantation (Kupesic and Kurjak 1993; Steer, Tan et al. 1994).

L'infertilité inexplicée pourrait également être fonctionnellement liée à l'endométriose puisque de nombreuses femmes présentant une infertilité inexplicée développent ultérieurement une endométriose (Guzick, Grefenstette et al. 1994; Cahill, Wardle et al. 1995; Hull, Williams et al. 1998).

### 6. Des facteurs environnementaux

En outre, l'exposition professionnelle au bruit, aux produits chimiques, aux rayonnements, au mercure et au cadmium pourrait être liée à une infertilité idiopathique (Mueller 1989). Même l'anxiété et le stress des femmes ont été également incriminés dans la réduction des chances de conception depuis des années (Sarrel and DeCherney 1985). Cependant, la réelle implication du stress dans l'infertilité reste, à ce jour, un sujet de débat (Rooney and Domar 2018).

### 7. Des facteurs génétiques

Il est bien établi que les anomalies génétiques jouent un rôle dans le développement de l'infertilité masculine et féminine. On estime que des anomalies génétiques sont présentes dans 50% des cas d'infertilité (Zorrilla and Yatsenko 2013). Ainsi, des anomalies bien connues de nombre ou de structure des chromosomes sexuels ou autosomiques ainsi que des mutations ponctuelles ont été impliquées (Van Assche, Bonduelle et al. 1996; Ferlin, Raicu et al. 2007; O'Flynn O'Brien, Varghese et al. 2010; Zorrilla and Yatsenko 2013). Par ailleurs, plusieurs chercheurs se sont penchés sur l'association de l'infertilité (notamment masculine) avec des polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP) et ont trouvé effectivement certaines associations (Krausz and Giachini 2007; Aston and Carrell 2012). Cependant, malgré les associations rapportées à ce jour, aucun SNP n'a été démontré comme causatif de l'infertilité de manière concluante. Il s'agit probablement d'effets additifs de ces SNP conférant une augmentation du risque d'infertilité plutôt que la causant directement.

Dans le cadre des infertilités idiopathiques, certaines anomalies génétiques ont été identifiées telles que des mutations des gènes du canal cationique des spermatozoïdes (CatSper) qui ont été associées à une proportion anormalement faible de spermatozoïdes présentant une hyperactivation (Hildebrand, Avenarius et al. 2010; Esteves 2013). L'infertilité masculine inexplicée a été également associée à des mutations des gènes mitochondriaux des spermatozoïdes (Esteves 2013). De plus, des études ont montré une association entre les polymorphismes du gène POLG et l'infertilité masculine inexplicée. La polymérase gamma (POLG) est une enzyme clé impliquée dans l'élongation et la réparation des brins d'ADN mitochondrial. Elle est codée par ce gène homonyme POLG. Il a été démontré que le polymorphisme de ce gène peut réduire la pénétration des spermatozoïdes dans l'ovocyte et la fécondation alors que les paramètres du sperme sont normaux (Rovio, Marchington et al. 2001; Jensen, Leffers et al. 2004). Une corrélation entre l'incidence des aneuploïdies chromosomiques dans les spermatozoïdes et les cellules somatiques a également été démontrée dans l'infertilité inexplicée (Gazvani, Wilson et al. 2000). L'aneuploïdie spermatique a été associée, en outre, à des fausses couches répétitives, à un échec de la fécondation

in vitro (FIV) et à un risque élevé d'anomalies chromosomiques chez les nouveau-nés (Esteves 2013).

Avec l'absence de détection de cause génétique sous-jacente dans la majorité des cas d'infertilité idiopathique et compte tenu des efforts considérables déployés pour identifier les variantes causales, il apparaît de plus en plus improbable qu'un seul défaut génétique soit responsable de l'infertilité chez une proportion significative de ces patients. En outre, de plus en plus de preuves sont en train d'apparaître pour soutenir la notion selon laquelle les phénotypes d'infertilité masculine ne se limitent pas aux défauts spermatogènes, mais plutôt que les défauts spermatogènes peuvent n'être qu'une manifestation d'un problème plus systémique (Jensen, Jacobsen et al. 2009; Salonia, Matloob et al. 2009). Ainsi, des travaux se sont alors dirigés vers l'étude de l'instabilité génomique dans le contexte de l'infertilité et plus particulièrement l'infertilité idiopathique.

### **L'instabilité génomique**

L'instabilité génomique peut être définie par l'échec de la transmission d'une copie exacte de l'intégralité du génome d'une cellule à ses deux cellules filles. Il faudrait noter que ce terme ne décrit pas un état mais plutôt un processus (Zhivotovsky and Kroemer 2004). L'instabilité génomique peut induire (a) Des variations du nombre de chromosomes causées par des défaillances de l'appareil de ségrégation des chromosomes ou du point de contrôle de la mitose. Dans ce cas, elle est également appelée « instabilité chromosomique » (CIN), (b) Des réarrangements chromosomiques, des variations du nombre de copies de séquences (CNV), des hyper-recombinaisons et des pertes d'hétérozygotie (LOH), (c) Des mutations, y compris les mutations ponctuelles et les insertions et délétions des microsatellites (instabilité des microsatellites ou MSI) causées par une réparation défectueuse par excision de nucléotide (NER) ou par excision des bases (BER), ou une réparation des mésappariements (MMR) (Aguilera and Garcia-Muse 2013).

Il est possible de détecter l'instabilité génomique par différentes méthodes telles que : le caryotypage, la cytométrie en flux, les microarrays des polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP array), le séquençage, et la PCR (Pikor, Thu et al. 2013). D'autres méthodes de détection à haut débit peuvent être également utilisées, telles que le test d'échange des chromatides sœurs (qui détecte la capacité d'un produit chimique à augmenter l'échange d'ADN entre deux chromatides sœurs d'un chromosome dupliqué) ou le test des micronoyaux (voir Section II).

Plusieurs preuves du rôle de l'instabilité génomique dans l'infertilité idiopathique ont été établies (Aston and Carrell 2012). Ainsi, des études sur l'intégrité du génome et l'infertilité indiquaient qu'un taux élevé de fragmentation de l'ADN double brin dans les spermatozoïdes humains est associé à une infertilité et à des avortements (Spano, Bonde et al. 2000; Agarwal and

Said 2003; Virro, Larson-Cook et al. 2004). De même, la proportion de spermatozoïdes dont l'ADN est fragmenté est significativement plus élevée chez les hommes normozoospermiques issus de couples présentant une infertilité idiopathique que chez les hommes jeunes sans antécédents d'infertilité (Host, Lindenberg et al. 1999; Saleh, Agarwal et al. 2003; Rybar, Markova et al. 2009). Trkova et al. ont constaté une augmentation du taux de micronoyaux dans les lymphocytes de couples présentant une infertilité idiopathique (Trkova, Kapras et al. 2000). De leur côté, Papachristou et al. ont montré que les hommes souffrant d'infertilité idiopathique présentaient une augmentation de la fréquence d'échange de chromatides sœurs dans les lymphocytes du sang périphérique après avoir été exposés simultanément à la mitomycine C et à la caféine, ce qui signifie qu'une instabilité génétique existait chez ces hommes (Papachristou, Lialiaris et al. 2006).

### **E. Traitement de l'infertilité idiopathique**

Le diagnostic d'infertilité idiopathique ne révélant aucune anomalie, son traitement sera, par définition, empirique car il ne traite pas d'un défaut spécifique ou d'une déficience fonctionnelle (Practice Committee of the ASRM 2006).

Il existe quatre propositions thérapeutiques qui constituent autant de marches à gravir vers le test de grossesse positif, cette stratégie thérapeutique étant même devenue réglementaire dans certains pays pour que la procédure soit prise en charge. Il s'agit, de la plus simple à la plus complexe, d'une expectative de six mois supplémentaires, d'une stimulation ovulatoire simple, d'une insémination intra-utérine (IIU) seule ou combinée à la stimulation ovulatoire et enfin d'une fécondation in vitro (FIV) (Isaksson and Tiitinen 2004; Quaas and Dokras 2008; Empeire 2015).

#### **1. La simple expectative**

La simple expectative est une attitude qui peut, en effet, se justifier par le fait que le couple est simplement hypofertile, que ses chances de grossesse par cycle sont inférieures à la normale mais qui existent, et qu'une grossesse spontanée reste possible avec une durée d'exposition supérieure. Le taux de grossesse chez ces couples affectés d'une infertilité idiopathique depuis un an reste de 24 % au cours d'une année supplémentaire d'exposition, et de 55,8 % dans les trois ans qui suivent la première année d'exposition. Cette option ne peut toutefois être offerte qu'aux couples jeunes, avec un partenaire féminin âgé <30-32 ans, à réserve ovarienne satisfaisante, pour une durée limitée à l'avance, après vérification de la vie sexuelle du couple (Empeire 2015).

La probabilité d'une grossesse spontanée chez les femmes présentant une infertilité idiopathique dépend de l'âge de la femme, de la durée de l'infertilité et des antécédents de grossesse (Isaksson and Tiitinen 2004).

### 2. Stimulation ovulatoire simple

Au cours des trente dernières années, le recours à la superovulation, avec ou sans IUI, a nettement augmenté dans le traitement de l'infertilité idiopathique (Guzick, Sullivan et al. 1998). Le citrate de clomiphène et les gonadotrophines ont été utilisés pour la superovulation, en association avec l'IUI ou seul (Quaas and Dokras 2008).

Le citrate de clomiphène représente le stimulateur de première intention, volontiers prescrit par les gynécologues traitants en face d'une infertilité inexplicée, principalement en raison de la facilité d'administration, du coût relativement faible et de la faible incidence des effets secondaires (Isaksson and Tiitinen 2004; Empeiraire 2015). Les mécanismes d'amélioration des taux de grossesse avec le citrate de clomiphène et les gonadotrophines sont les mêmes. Les deux médicaments augmentent les stéroïdes gonadiques à la suite du développement de plusieurs follicules. En outre, les gonadotrophines peuvent améliorer la fonction de l'endomètre chez certaines femmes présentant une infertilité idiopathique. L'inconvénient des gonadotrophines est principalement le risque de grossesses multiples (Isaksson and Tiitinen 2004).

Bien que les couples présentant une infertilité idiopathique aient généralement des cycles ovulatoires même sans traitement, la stimulation de l'ovulation peut surmonter des défauts subtils de la fonction ovulatoire non détectés par les tests conventionnels et augmenter le nombre d'ovocytes disponibles pour la fécondation et l'implantation (Guzick, Sullivan et al. 1998; Isaksson and Tiitinen 2004).

### 3. L'insémination intra-utérine (IUI)

L'IUI dans le cycle spontané constitue un premier choix alternatif de traitement pour les femmes présentant une infertilité idiopathique. Cela donne des taux de grossesse de 2,4 à 7,4% par cycle. Par l'IUI, les problèmes de mucus cervical et les légers défauts de motilité et de fonction des spermatozoïdes sont surmontés (Isaksson and Tiitinen 2004). De manière similaire, l'introduction de spermatozoïdes lavés dans la cavité utérine à l'aide d'IUI peut augmenter la densité de spermatozoïdes mobiles disponibles pour les ovocytes ovulés, ce qui devrait maximiser les chances de fécondation (Quaas and Dokras 2008).

### 4. La fécondation *in vitro* (FIV)

La FIV est la méthode ultime de traitement pour l'infertilité idiopathique. C'est une méthode chère et invasive, mais qui est considérée comme la méthode la plus efficace (Ray, Shah et al. 2012). La FIV est recommandée pour le traitement des couples avec infertilité idiopathique lorsque les autres traitements ont échoué. Elle est utile pour détecter les anomalies des gamètes et pour évaluer le pouvoir de fécondation des spermatozoïdes et des ovocytes. Si aucune fécondation n'a eu lieu

lors d'une précédente tentative de FIV, l'injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI) est le traitement de choix (Isaksson and Tiitinen 2004).

# **Section II :**

## **Le test des micronoyaux**

# I. Le test des micronoyaux sur les cellules buccales

La recherche des dommages génomiques et l'instabilité chromosomique a fait l'objet de plusieurs études car ces derniers sont associés à un risque élevé de maladies telles que les maladies neurodégénératives, cardiovasculaires et les cancers (Bonassi, Znaor et al. 2007; Murgia, Maggini et al. 2007; Migliore, Coppede et al. 2011). Le test des micronoyaux (MN) est l'une des meilleures techniques cytogénétiques permettant d'évaluer l'instabilité chromosomique chez l'homme (Thomas, Holland et al. 2009; Bolognesi and Fenech 2013). Les MN sont formés par des fragments chromosomiques ou des chromosomes entiers non intégrés dans les noyaux fils au cours de la mitose (Fenech 2007). Ils peuvent être évalués facilement dans les érythrocytes, les lymphocytes et les cellules épithéliales exfoliées (par exemple, orales, nasales, urothéliales) (Holland, Bolognesi et al. 2008). Le test des MN sur les cellules buccales (The Buccal Micronucleus Cytome, BMCyt) est une approche utile et peu invasive pour mesurer les dommages génétiques dans les cellules buccales exfoliées chez l'homme (Thomas, Holland et al. 2009; Bolognesi, Roggieri et al. 2015). Il a été utilisé pour mesurer les biomarqueurs de dommages de l'ADN, de l'échec de cytokinèse, de la prolifération cellulaire et de la mort cellulaire (Thomas, Holland et al. 2009; Bolognesi and Fenech 2013; Bolognesi, Roggieri et al. 2015).

Cette méthode est de plus en plus utilisée dans les études épidémiologiques moléculaires pour étudier l'impact de la nutrition, des facteurs de mode de vie, de l'exposition aux génotoxines et du génotype sur les dommages à l'ADN et la mort cellulaire (Thomas, Holland et al. 2009; Thomas and Fenech 2011).

## A. Historique du test des micronoyaux

À la fin des années 1800 et au début des années 1900, Howell et Jolly ont décrits des corps nucléaires Feulgen-positifs dans les réticulocytes humains, connus sous le nom de corps de Howell-Jolly qui représentent des chromosomes séparés du fuseau mitotique. C'est au début des années 1970 que le terme de micronoyaux a été proposé pour la première fois par Boller et Schmidt (Boller and Schmid 1970) et Heddle (Heddle 1973) qui ont prouvé que c'est une méthode simple pour détecter le potentiel génotoxique des agents mutagènes après l'exposition in vivo des animaux en utilisant des érythrocytes de la moelle osseuse. Quelques ans après, Countryman et Heddle (Countryman and Heddle 1976) ont montré que les lymphocytes de sang pouvaient également être utilisés pour le test des micronoyaux. Stich et ses collaborateurs (Stich, San et al. 1983) ont

développé un protocole pour le test des micronoyaux avec des cellules épithéliales humaines exfoliées, qui a été largement utilisé dans les études des expositions professionnelles et de mode de vie (Titenko-Holland, Windham et al. 1997; Al Zabadi, Ferrari et al. 2008; Holland, Bolognesi et al. 2008; Bolognesi and Holland 2016).

Le test des micronoyaux a connu un nouvel et considérable essor en 1985 lorsque Fenech et Morley proposèrent une adaptation technique permettant de bloquer la cytotérièse (division du cytoplasme) tout en conservant la division nucléaire (Fenech and Morley 1985).

Un projet collaboratif international sur les MN chez l'humain (HUMN project) ([www.humn.org](http://www.humn.org)) a été lancé en 1997, pour comprendre au mieux la signification de ce biomarqueur et pour valider son utilisation dans des études des populations humaines. La première phase de ce projet s'est concentrée sur le test des micronoyaux avec blocage de la cytokinèse ou Cytokinesis Block Micronucleus assay « CBMN » dans les lymphocytes de sang périphérique (Fenech, Chang et al. 2003). Les effets des variables méthodologiques et démographiques sur la fréquence des micronoyaux ont été définis par l'analyse d'une grande base de données (Bonassi, Neri et al. 2003; Fenech, Bonassi et al. 2003; Kirsch-Volders, Sofuni et al. 2003; Fenech and Bonassi 2011). Un exercice de lecture internationale des lames en utilisant des critères de lecture standardisés a été effectué et a permis d'évaluer la variabilité inter-laboratoires et intra-laboratoire affectant l'analyse des données issues des études multicentriques (Fenech, Bonassi et al. 2003). De plus, le projet HUMN a également mené à une étude prospective montrant qu'une fréquence élevée de MN dans les lymphocytes prédit un risque élevé de cancer (Bonassi, Znaor et al. 2007).

Plus récemment, un nouveau projet (projet HUMNxl) a été lancé pour valider le test des MN dans des cellules buccales exfoliées en suivant les mêmes étapes que pour le test CBMN dans les lymphocytes du sang périphérique humain (Fenech, Bolognesi et al. 2007; Bonassi, Biasotti et al. 2009). Des protocoles standardisés détaillés pour les tests CBMNCyt (The cytokinesis- block micronucleus cytome) et BMCyt (The buccal micronucleus cytome) ont été établis par le consortium HUMN, comprenant des critères d'échantillonnage, de préparation des lames, de coloration et de lecture en tenant compte des procédures disponibles, des facteurs de confusion et des artefacts de coloration (Fenech, Bolognesi et al. 2007; Thomas, Holland et al. 2009).

En 2011, un nouveau projet de test des micronoyaux humain sur les cellules buccales exfoliées (HUMN<sub>XL</sub>) impliquait des données de 30 laboratoires dans le monde entier. Le projet HUMN<sub>XL</sub> évalue l'impact des facteurs de variation tels que l'âge, le sexe, la profession, le mode de vie, l'état de santé et des maladies et des caractéristiques du protocole sur la survenue de micronoyaux dans les cellules buccales exfoliées. En outre, ce projet a permis d'obtenir des

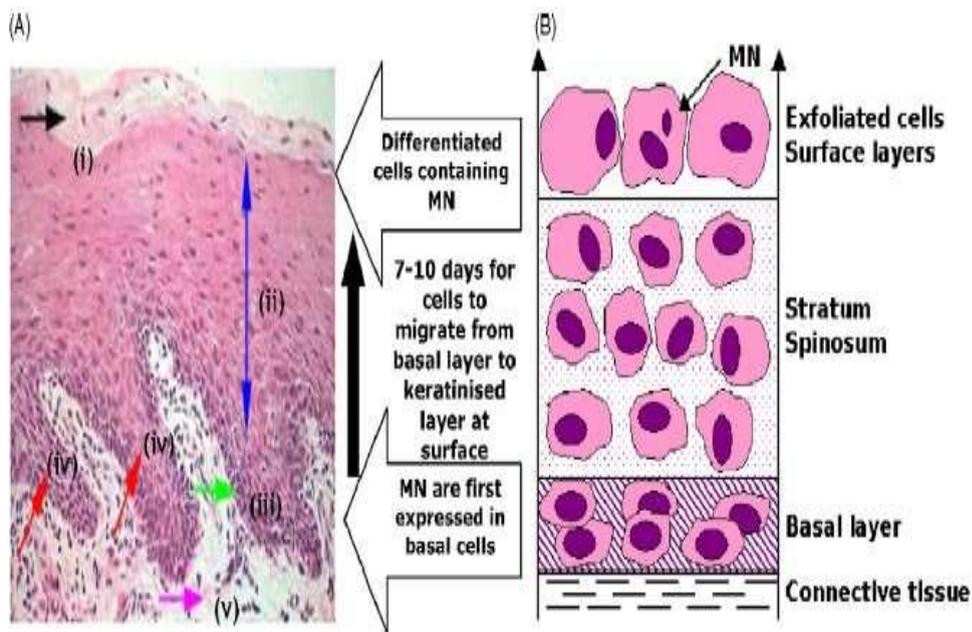
résultats plus uniformes en donnant des valeurs de référence pour tous les biomarqueurs de ce test (Bonassi, Coskun et al. 2011).

### **B. Principe du test des micronoyaux sur les cellules buccales**

Il s'agit d'un test spécial et complet de l'instabilité chromosomique utilisé pour mesurer les biomarqueurs de dommages de l'ADN (micronoyaux et bourgeons nucléaires), de défauts de cytokinèse (cellules binucléées), de la prolifération cellulaire (cellules basales et différenciées) et de la mort cellulaire (les cellules à chromatine condensée, les cellules caryorrhétiques, les cellules pycnotiques et les cellules caryolytiques) (Thomas, Holland et al. 2009).

L'épithélium buccale est composé de quatre couches de populations cellulaires structurales, progénitrices et matures, dont la lamina propria (tissu conjonctif), la couche basale (stratum basal), la couche squameuse (stratum spinosum ou prickle cell layer) et la couche kératinisée à la surface (**Fig. 1**). Une série de structures en forme de doigt appelées «rete pegs» se déplacent de la lamina propria dans la couche épidermique, produisant un effet de couche cellulaire basale ondulante (Holland, Bolognesi et al. 2008).

L'épithélium buccal se maintient par un renouvellement cellulaire continu, grâce auquel de nouvelles cellules produites dans la couche basale par mitose migrent vers la surface pour remplacer celles qui sont exfoliées. La couche basale contient les cellules souches qui peuvent exprimer les dommages génétiques (rupture ou perte chromosomique) en tant que micronoyaux pendant la division nucléaire. Les cellules filles, qui peuvent ou non contenir des micronoyaux, finissent par se différencier dans la couche squameuse et la couche superficielle kératinisée, puis s'exfolient dans la cavité buccale. Certaines de ces cellules peuvent dégénérer en cellules contenant de la chromatine condensée, des noyaux fragmentés (cellules caryorrhétiques), des noyaux pycnotiques ou perdre complètement leur matière nucléaire (cellules caryolytiques). Dans des cas rares, certaines cellules peuvent être bloquées au stade binucléé ou présenter des bourgeons nucléaires (également appelés «œufs cassés» dans les cellules buccales), ce qui est un biomarqueur de l'amplification génique. Ces biomarqueurs de dommages du génome (par exemple, micronoyaux, bourgeons nucléaires) et de la mort cellulaire (apoptose, caryolyse, par exemple) peuvent être observés à la fois dans les systèmes lymphocytaires et buccaux et permettent ainsi une évaluation plus complète des lésions génomiques par rapport aux seuls micronoyaux dans le contexte de cytotoxicité et d'effets cytostatiques (Holland, Bolognesi et al. 2008).

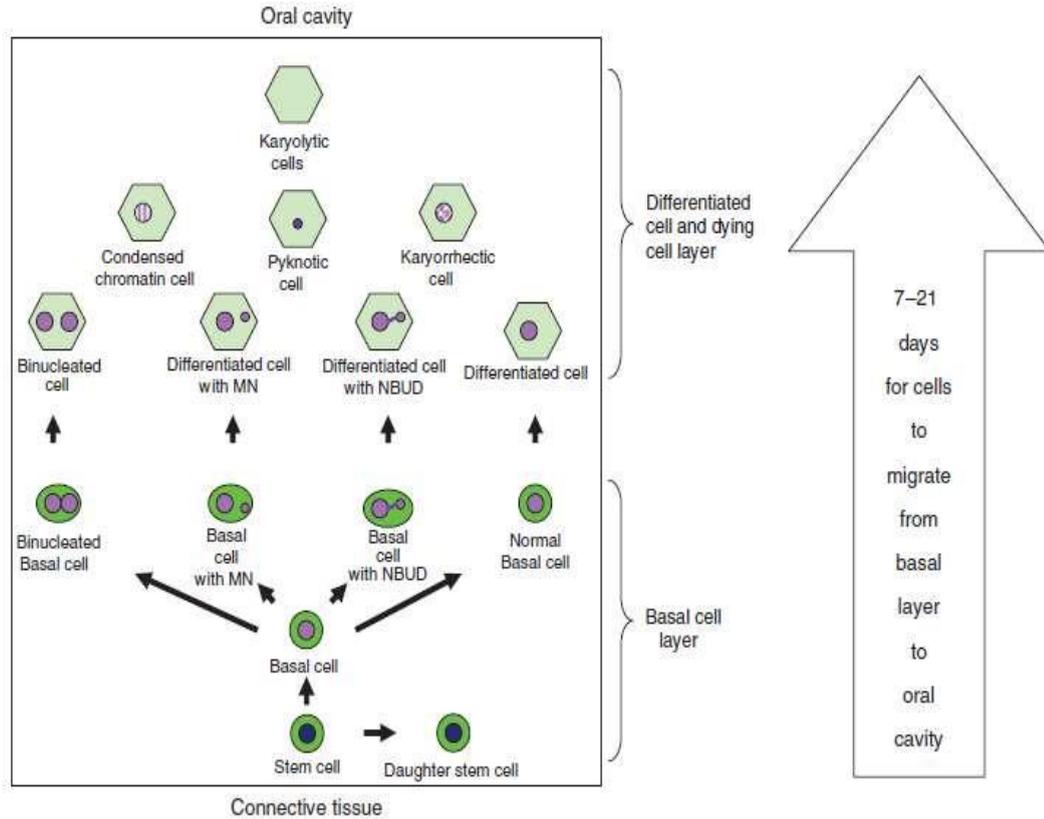


**Figure 1: Structure et différenciation de l'épithélium buccal**

(A) Une section dans la muqueuse buccale montrant les diverses couches de cellules dans l'épithélium oral. (i) la couche kératinisée à la surface, (ii) la couche squameuse (prickle cell layer ou stratum spinosum), (iii) la couche basale (ou stratum basal), (iv) rete pegs, (v) lamina propria (tissu conjonctif). (B) Schéma des couches de cellules de la muqueuse buccale et de leur renouvellement (Holland, Bolognesi et al. 2008).

D'après Thomas et al., la période de migration cellulaire de la couche basale vers la couche superficielle kératinisée se situe entre 7 et 21 jours (Thomas, Holland et al. 2009). Stich et al estiment que les micronoyaux dans les cellules buccales exfoliées reflètent des événements génotoxiques survenus dans la couche basale en division entre une et trois semaines plus tôt (Stich, San et al. 1983).

La couche basale constitue également la première barrière contre les cancérogènes potentiels (Autrup, Seremet et al. 1985; Liu, Sundqvist et al. 1993; Spivack, Hurteau et al. 2004). Ainsi, il est probable qu'elle subisse des dommages par ces agents avant de refléter une condition systémique.



**Figure 2: Origines séquentielles et séquence spatio-temporelle des différents types de cellules dans le test BM Cyt.**

Représentation de la période des événements d'une cellule souche à une cellule basale, la différenciation ultérieure, la mort cellulaire et les différents types de dommages génétiques qui peuvent se produire (Thomas, Holland et al. 2009).

### C. La nature et l'origine des micronoyaux

Les MN appelés également corps de Howell-Jolly par les hématologistes représentent soit la conséquence des lésions primaires de l'ADN non létales et non réparées conduisant à des cassures chromosomiques, soit des dysfonctionnements des structures protéiques impliquées dans la bipolarité du fuseau mitotique (disjonction, ségrégation et migration des chromosomes fils) induisant des pertes de chromosomes entiers) (Fenech, Crott et al. 1999; Mateuca, Lombaert et al. 2006; Fenech 2007; Holland, Bolognesi et al. 2008; Fenech, Kirsch-Volders et al. 2011).

Les MN sont formés par des fragments chromosomiques acentriques ou des chromosomes entiers non intégrés dans les noyaux fils au cours de la mitose. Ces chromosomes ou fragments chromosomiques restent dans le cytoplasme des cellules interphasiques et sont éventuellement enfermés dans une membrane nucléaire et, à l'exception de leur plus petite taille, sont

morphologiquement similaires aux noyaux (Fenech, Kirsch-Volders et al. 2011; Luzhna, Kathiria et al. 2013).

La présence de MN dans les cellules exfoliées reflète un dommage génétique accumulé survenant dans ces cellules au cours de leur vie (Trkova, Kapras et al. 2000; Yesilada, Sahin et al. 2006).

Le mécanisme de la formation de MN dans les cellules buccales exfoliées est conforme au modèle proposé pour les lymphocytes (Bonassi, Coskun et al. 2011). Selon le contenu des MN (fragments acentriques ou chromosomes entiers), leur mécanisme de formation sera fondamentalement différent.

### **1. La formation de micronoyaux constitués de fragments chromosomiques acentriques ou de fragments de chromatides**

Ils surviennent lors d'une exposition à divers **agents clastogènes** et résultent de cassures double brin d'ADN non ou mal réparées (Fenech 2007).

Une mauvaise réparation des cassures double-brin de l'ADN peut conduire à des échanges de chromatides et de chromosomes symétriques et asymétriques, ainsi qu'à des fragments de chromatides et de chromosomes. Une petite proportion de fragments de chromosomes acentriques peut simplement provenir de cassure double brin non réparées de la molécule d'ADN, mais cela n'est possible que lorsque le degré de dommages de l'ADN dépasse la capacité de réparation de la cellule dans un délai spécifié (Fenech 2007; Fenech, Kirsch-Volders et al. 2011; Luzhna, Kathiria et al. 2013).

D'autres mécanismes peuvent conduire à la formation de MN constitué de fragments acentriques comprennent l'excision-réparation simultanés de bases endommagées (par exemple, la 8-oxo-désoxyguanosine) ou de bases incorporées dans l'ADN de façon inappropriées (par exemple l'uracile) qui sont à proximité et sur des brins d'ADN complémentaires et opposés. De tels événements d'excision-réparation simultanés, en particulier si l'étape de comblement des lacunes (gap-filling) n'est pas terminée, conduisent à des cassures double-brin de l'ADN et à la formation de MN (Fenech 2007; Luzhna, Kathiria et al. 2013).

### **2. La formation de MN constitués de chromosomes entiers**

La perturbation des structures non génomiques impliquées dans la division (fuseau mitotique, kinétochore) peut être responsable d'une mauvaise répartition des chromosomes au cours de l'anaphase. L'anomalie chromosomique qui en résulte n'est pas issue d'un impact direct sur l'ADN, on parle alors d'un **effet aneugène** (Fenech 2007). Ils représentent alors la conséquence d'une altération des structures cellulaires impliquées dans la disjonction, la ségrégation et la migration des chromosomes. Les divers systèmes protéiques impliqués sont représentés par

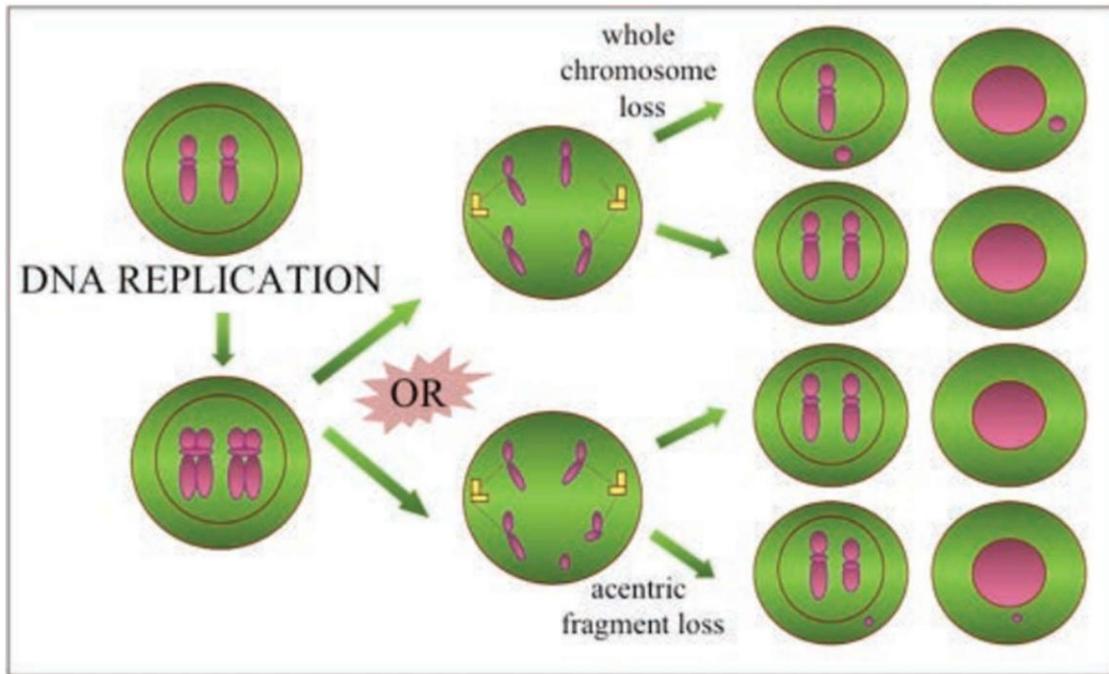
l'appareil mitotique, constitué de diverses catégories de microtubules gérant l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique puis la migration des chromosomes à l'anaphase, les centrosomes, à partir desquels se structure l'ensemble des microtubules, et les kinétochores (Fenech 2000).

Selon Fenech et al., le principal mécanisme de formation de MN provenant d'une mauvaise ségrégation des chromosomes est l'hypométhylation de la cytosine dans les régions centromériques et paracentromériques (répétitions de satellites). Habituellement, les satellites sont hyperméthylés et la perte de méthylation allonge les régions répétées, diminuant la tension des kinétochores et créant ainsi de mauvais attachements entre les microtubules du fuseau mitotique et les chromosomes (Fenech, Kirsch-Volders et al. 2011).

Parfois, les chromatides sont incapables de se séparer car le fuseau mitotique ne peut pas les séparer en raison de la dépolymérisation de la tubuline (Luzhna, Kathiria et al. 2013).

Étant donné le rôle central des protéines kinétochores dans l'engagement des chromosomes avec le fuseau mitotique, il est probable que des mutations entraînant des défauts dans la dynamique d'interaction des kinétochores et des microtubules pourraient également être à l'origine de la formation de MN par la perte de chromosomes à l'anaphase. D'autres variables susceptibles d'augmenter la formation de MN du fait de la perte de chromosomes sont des anomalies de l'assemblage du fuseau mitotique, les défauts dans le système de contrôle du cycle cellulaire ou une amplification anormale du centrosome (Mateuca, Lombaert et al. 2006; Fenech, Kirsch-Volders et al. 2011).

En conséquence, on pourra dire que les MN témoignent de la survenue d'événements aneugènes et/ou clastogènes, les deux types de contenu des MN correspondent à des mécanismes de formation fondamentalement différents (Figure 3). Ceci est bien démontré par l'association au test des MN d'une hybridation in situ fluorescente qui permet de différencier les micronoyaux contenant des fragments chromosomiques acentromériques (MNC<sup>-</sup> : MN centromère-négatif) résultant de cassures chromosomiques et ceux contenant des chromosomes entiers centromériques (MNC<sup>+</sup> : MN centromère-positif) résultant de pertes chromosomiques. Les MN résultant d'un effet aneugène répondent positivement à la sonde (Migliore, Cocchi et al. 1996).



**Figure 3: Mécanismes de formation des MN**

Les MN contenant des chromosomes ou des chromatides entiers témoignent de la survenue d'événements aneugènes, ceux contenant des fragments acentriques témoignent de la survenue d'événements clastogènes (Cerquiera 2014).

#### **D. Le devenir des micronoyaux après leur formation**

Le devenir des MN, après leur formation dans des cellules micronucléées, n'est pas encore bien élucidé. Les MN pourraient avoir diverses destinées post-mitotiques (Mateuca, Lombaert et al. 2006):

- L'élimination des cellules micronucléées via l'apoptose (Decordier, Dillen et al. 2002; Decordier and Kirsch-Volders 2006).

- L'expulsion de la cellule (l'ADN des MN n'est pas prévu pour être fonctionnel ou capable de réaliser la réplication du fait de l'absence des composants cytoplasmiques nécessaires) (Leach and Jackson-Cook 2004).

- La réincorporation dans le noyau principal (le chromosome réincorporé pourrait être confondu avec ceux du noyau principal et pourrait reprendre une activité biologique normale) (Leach and Jackson-Cook 2004).

- La conservation dans le cytoplasme des cellules comme entité extranucléaire (il n'est pas encore connu combien de temps une cellule pourrait maintenir le micronoyau ou comment leur ADN pourrait fonctionner) (Leach and Jackson-Cook 2004). Cependant, une étude récente réalisée par Utani et al. a suggéré que le MN formé après la mitose était maintenu de manière stable dans les cellules jusqu'à un cycle cellulaire. En outre, la division mitotique des cellules avec MN a conduit à la formation de cellules filles avec ou sans MN (Utani, Kohno et al. 2010). La capacité de

réplication de l'ADN des MN reste obscure, mais il a été suggéré que la réplication des MN dépend de la nature de ces derniers, et si elle se produit, elle se produit en même temps que la réplication du noyau principal (Obe, Beek et al. 1975; Luzhna, Kathiria et al. 2013).

### **E. Mesure d'autres anomalies avec le test des micronoyaux**

Comme mentionné précédemment, l'analyse du test des micronoyaux sur les cellules buccales mesure les fréquences des MN, mais également les bourgeons nucléaires, les cellules binucléées, et les différentes cellules représentant les événements de la mort cellulaires (les cellules à chromatine condensée, les cellules caryorrhétiques, les cellules pycnotiques et les cellules caryolytiques) (Figure 4) (Thomas, Holland et al. 2009).

#### **1. Les bourgeons nucléaires**

Au cours des dernières décennies, une autre anomalie nucléaire unique appelée «bourgeoisement nucléaire» a été associée à des événements d'instabilité chromosomique (Fenech, Kirsch-Volders et al. 2011).

Shimizu et al. ont montré, en utilisant des expériences in vitro avec des cellules de mammifères, que l'ADN amplifié est sélectivement localisé sur des sites spécifiques à la périphérie du noyau et éliminé par bourgeoisement nucléaire pour former des MN pendant la phase S de la mitose. L'ADN amplifié peut être éliminé par recombinaison entre régions homologues au sein des séquences amplifiées en formant des mini-cercles d'ADN acentriques et atélomériques (appelés : doubles minutes), qui se localisent dans des régions distinctes du noyau ou par excision de séquences amplifiées après ségrégation dans des régions distinctes du noyau (Shimizu, Itoh et al. 1998; Shimizu, Shimura et al. 2000).

Le processus de bourgeoisement nucléaire se produit pendant la phase S et les bourgeons nucléaires se caractérisent par la même morphologie qu'un micronoyaux, à l'exception du fait qu'elles sont liées au noyau par une tige étroite ou large de matière nucléoplasmique en fonction du stade de bourgeoisement (Shimizu, Itoh et al. 1998; Shimizu, Shimura et al. 2000). La durée du processus de bourgeoisement nucléaire et l'extrusion hors de la cellule du micronoyaux résultant restent largement inconnues (Fenech 2007).

Les bourgeons nucléaires peuvent être aussi le résultat de l'élimination des complexes de réparation de l'ADN ou des chromosomes en excès qui se produisent dans les cellules en polyploïdie pour faciliter l'échappement à l'aneuploïdie (Fenech, Kirsch-Volders et al. 2011).

Donc, comme conclusion, le mécanisme le plus probable pour la formation des bourgeons nucléaires est l'élimination de l'ADN amplifié, des complexes de réparation de l'ADN et éventuellement des chromosomes en excès des cellules aneuploïdes.

### 2. Les cellules binucléées

La formation des cellules binucléées semble être liée à l'échec de la cytokinèse (Thomas, Holland et al. 2009). L'échec de la cytokinèse, dû soit à des défauts dans la formation de l'anneau des microfilaments, soit à un arrêt du cycle cellulaire à cause d'une mauvaise ségrégation des chromosomes ou à un dysfonctionnement des télomères (Shi and King 2005; Thomas, Holland et al. 2009; Bolognesi and Fenech 2013).

D'après Shi et King, la genèse des cellules binucléées est complexe, mais la voie prédominante implique la régression du sillon de clivage dans les cellules qui subissent une mitose d'apparence normale (Shi and King 2005). La cytokinèse pourrait être inhibée dans les cellules qui ont une mauvaise ségrégation des chromosomes au cours de la précédente mitose. L'achèvement de la cytokinèse nécessite une ségrégation chromosomique précise dans les cellules humaines. Les événements de non-disjonction des chromosomes sont étroitement liés à la régression du sillon de clivage, de sorte que la non-disjonction entraîne la formation d'une cellule binucléée plutôt que de deux cellules aneuploïdes mononucléées. Un mécanisme qui pourrait expliquer cette découverte est la présence de chromatine dans le sillon de clivage, qui interfère avec l'achèvement de la cytokinèse (Shi and King 2005).

### 3. Les biomarqueurs de la mort cellulaire

Les cellules à chromatine condensée, caryorrhétiques, pycnotiques et caryolytiques sont considérées comme des biomarqueurs de la mort cellulaire (Thomas, Holland et al. 2009).

Les cellules à chromatine condensée, caryorrhétiques et pycnotiques (mais pas les cellules caryolytiques) accompagnent les premiers stades d'un type de mort cellulaire qui est l'apoptose. L'apoptose, considérée comme le principal mode de la mort dans les tissus vivants, semble être sous contrôle physiologique (Tolbert, Shy et al. 1992).

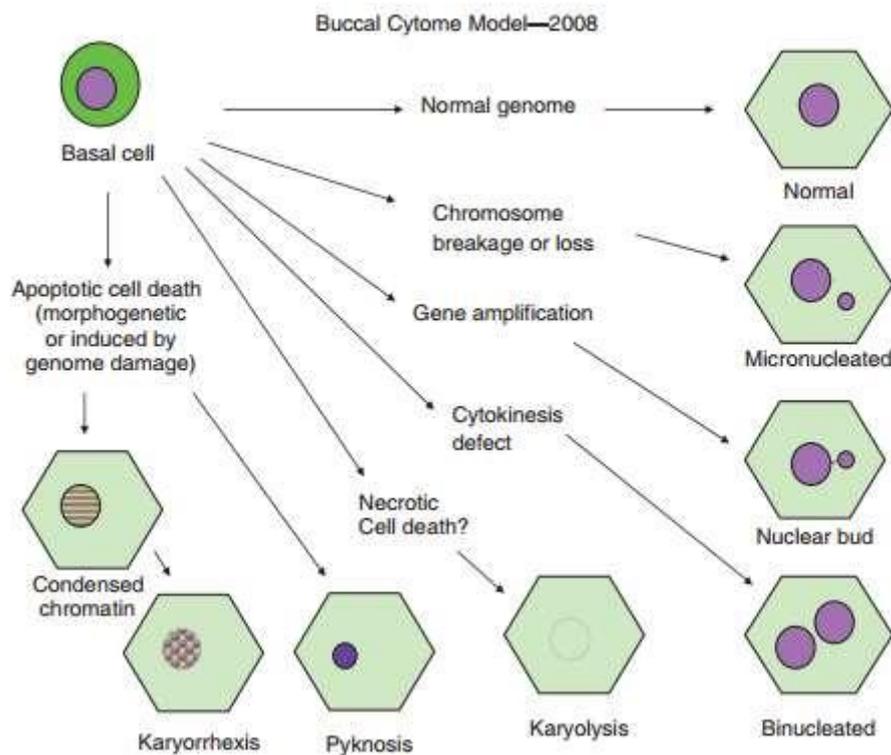
L'apoptose peut être stimulée par l'exposition à des agents mutagènes et agit comme mécanisme de protection contre le cancer en éliminant les cellules génétiquement endommagées. Des taux élevés d'apoptose peuvent constituer des signes de lésions génotoxiques, et ceci serait lié à l'initiation du processus de transformation maligne (Tolbert, Shy et al. 1992).

Les cellules à chromatine condensée ont peu ou pas d'activité transcriptionnelle (Bolognesi and Fenech 2013) et ont été associées aux stades précoces de l'apoptose (Thomas, Holland et al. 2009). Cependant, les cellules caryorrhétiques subissent des stades tardifs d'apoptose (Thomas, Holland et al. 2009; Bonassi, Coskun et al. 2011).

Les cellules pycnotiques représentent une condensation irréversible de la chromatine et elles précèdent le stade des cellules caryorrhétiques. La signification biologique des cellules pycnotiques et le mécanisme conduisant à leur formation dans les cellules buccales ne sont pas

complètement compris (Bolognesi and Fenech 2013). Cependant, il a été montré que leur fréquence était corrélée positivement avec la fréquence des cellules à chromatine condensée et des cellules caryorrhétiques, ce qui suggère qu'elles représentent une phase de mort cellulaire (Thomas, Holland et al. 2009). Elles pourraient présenter une étape intermédiaire de la mort cellulaire (Bonassi, Coskun et al. 2011) ou un mécanisme alternatif de désintégration nucléaire différent de celui des cellules à chromatine condensées ou des cellules caryorrhétiques (Chen, Arjomandi et al. 2006; Holland, Bolognesi et al. 2008).

Les cellules caryolytiques représentent le stade où la désintégration du noyau est complète et semblent ne pas avoir de noyau. Elles représentent un stade très tardif du processus de mort cellulaire et sont associées à la nécrose (Tolbert, Shy et al. 1992; Thomas, Holland et al. 2009; Bolognesi and Fenech 2013).



**Figure 4: Représentation schématique des divers types de cellules observées dans le test de BM Cyt.**

D'après (Thomas, Holland et al. 2009).

#### F. Les facteurs de variation du test des MN

Le test des MN est un test empreint d'une grande variabilité. Il existe d'abord une variabilité interlaboratoire qu'un protocole standardisé permet de minimiser, mais également une importante variabilité interindividuelle liée à des facteurs propres à l'individu (sexe, âge) ou à son mode de vie

(tabagisme, alcool, habitudes alimentaires) (Holland, Bolognesi et al. 2008) (Holland et al., 2008). La prise en compte de ces facteurs peut se faire par l'utilisation d'un questionnaire standardisé et par la constitution, parallèlement aux sujets malades ou exposés professionnellement, d'un groupe témoin apparié sur ces facteurs de variation et ne différant que pour ce qui concerne le paramètre étudié (Iarmarcovai, Botta et al. 2007).

L'âge constitue un facteur de confusion important, avec une augmentation de la fréquence des MN en fonction de l'âge (Bonassi, Coskun et al. 2011).

Contrairement aux fréquences des MN dans les lymphocytes qui sont généralement plus élevées chez les femmes, les fréquences spontanées des cellules buccales avec MN chez les hommes et les femmes ne diffèrent pas significativement. En effet, il existe un excès léger mais non significatif chez les hommes (Fenech, Holland et al. 1999; Holland, Bolognesi et al. 2008; Bonassi, Coskun et al. 2011).

Un autre facteur de confusion classiquement évoqué est le tabagisme, pour lequel les données de la littérature, quant à un éventuel effet sur la fréquence des MN restent contradictoires. D'après Holland et al., les fumeurs ont presque une fréquence trois fois plus élevée en MN par rapport aux non-fumeurs (Holland, Bolognesi et al. 2008). Cependant, d'autres publications n'indiquent aucune différence dans la fréquence des MN entre les fumeurs et les non-fumeurs (Yildirim, Yesilada et al. 2006; Wultsch, Nersesyan et al. 2014). Bonassi et al. montrent que seuls les sujets qui fumaient le plus (c'est-à-dire, 40 cigarettes par jour) avaient une augmentation significative dans la fréquence des MN par rapport aux non-fumeurs (Bonassi, Coskun et al. 2011).

La consommation d'alcool peut également influencer la fréquence de MN. Dans plusieurs études sur les facteurs liés au mode de vie, il était toutefois difficile de différencier l'effet de l'alcool de celui du tabagisme. Par exemple, ni l'alcool ni le tabagisme, à eux seuls, n'augmentaient la fréquence des MN dans les cellules buccales, mais un effet synergique du tabagisme et de l'alcool était évident, avec une augmentation dans la fréquence des MN pouvant atteindre jusqu'à 5,5 fois par rapport aux non-fumeurs et aux non-buveurs (Stich and Rosin 1983). Une étude prospective comparant des alcooliques présentant un carcinome buccal ou oropharyngé à des sujets sains qui ne consomment pas d'alcool a montré une association significative entre la fréquence des MN et l'âge de début et d'arrêt de l'alcool et la durée de la consommation d'alcool (Ramirez and Saldanha 2002). Cependant, dans une autre étude récente, aucune association n'a été trouvée entre la consommation quotidienne d'alcool et l'augmentation de la fréquence des MN (Bonassi, Coskun et al. 2011).

Les habitudes alimentaires ont également été identifiées comme pouvant influencer la fréquence des MN dans les cellules buccales. Les sujets ayant une consommation quotidienne de fruits ou de légumes verts présentaient des fréquences de MN plus faibles que ceux qui

n'indiquaient aucune consommation de ces aliments (Bonassi, Coskun et al. 2011). Une réduction dans la fréquence de MN a été associée à la consommation de thé vert chez les patients atteints de leucoplasie orale (Li, Sun et al. 1999). Un certain nombre de micronutriments, dont le bêta-carotène et d'autres vitamines, ont montré une diminution significative des taux de MN (1,4 à 4 fois) chez les consommateurs de tabac qui sont en bonne santé (Stich and Rosin 1984; Stich, Rosin et al. 1984). Des baisses dans la fréquence des MN ont été rapportées chez des enfants et des femmes en ménopause ayant reçu une supplémentation contrôlée en folates (Titenko-Holland, Jacob et al. 1998; Holland, Hartz et al. 2007) et chez les patients diabétiques (Zuniga-Gonzalez, Batista-Gonzalez et al. 2007).

Les expositions professionnelles (les solvants, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, l'arsenic, ainsi que les antinéoplasiques) ont été également associées à des augmentations significatives de MN dans les cellules buccales exfoliées (Bonassi, Coskun et al. 2011).

## II. Avantages et limites du test des micronoyaux sur cellules buccales

### A. Avantages du test des micronoyaux

Le test des MN sur les cellules buccales présente de nombreux avantages :

- La numération des MN qui se fait en interphase représente un moyen fiable d'évaluer les anomalies chromosomiques de nombre et de structure notamment quand il est associé à une hybridation in situ fluorescente (FISH) (Majer, Laky et al. 2001).
- Les critères de lecture de différents biomarqueurs sont bien définis (Fenech, Chang et al. 2003; Thomas, Holland et al. 2009; Thomas and Fenech 2011; Bolognesi and Fenech 2013).
- Les cellules peuvent être fixées et stockées pendant de longues périodes (Thomas, Holland et al. 2009; Thomas and Fenech 2011).
- Ce test forme une technique rapide et très simple, avec des facilités dans la conservation des cellules et dans la préparation des lames (Majer, Laky et al. 2001; Bonassi, Coskun et al. 2011).
- Les cellules peuvent être obtenues facilement et sans nécessité de faire une culture cellulaire (Majer, Laky et al. 2001; Holland, Bolognesi et al. 2008; Bonassi, Coskun et al. 2011).
- Le prélèvement de cellules buccales est sans doute la méthode la moins invasive disponible pour mesurer les dommages de l'ADN chez l'homme, en particulier par rapport à l'obtention d'échantillons de sang pour les dosages de lymphocytes et d'érythrocytes ou l'obtention des biopsies tissulaires (Holland, Bolognesi et al. 2008; Thomas, Holland et al. 2009; Bonassi,

Coskun et al. 2011). La simplicité de la collecte d'échantillons avec des méthodes non invasives rend le test applicable à des échantillons de grande taille (Majer, Laky et al. 2001).

- En plus des micronoyaux, il permet aussi de comptabiliser les cellules en apoptose, en nécrose ainsi que les bourgeons nucléaires et les cellules binucléées (Holland, Bolognesi et al. 2008; Thomas, Holland et al. 2009; Bonassi, Coskun et al. 2011).
- Un avantage majeur du test de MN est la puissance statistique obtenue en analysant un grand nombre de cellules par rapport aux tests classiques des aberrations chromosomiques. L'analyse cellule par cellule permet néanmoins d'avoir un grand nombre de données, ce qui peut permettre un traitement statistique performant des résultats (Fenech, Holland et al. 1999).
  - 1999).
- Il permet l'évaluation simultanée des effets clastogènes et aneugènes (Holland, Bolognesi et al. 2008; Thomas, Holland et al. 2009; Bonassi, Coskun et al. 2011; Fenech, Kirsch-Volders et al. 2011).
- Les cellules buccales ont un temps de renouvellement plus court que les lymphocytes (entre
  - 5 et 25 j contre 6 mois) ce qui peut être considéré comme une indication de leur plus grande sensibilité pour la détection des dommages à l'ADN (Nersesyan and Chobanyan 2010).

### **B. Limites du test des micronoyaux**

Le test des MN ne permet pas cependant de détecter toutes les anomalies chromosomiques de structure; dont les aberrations plus subtiles (translocations) qui ne peuvent être détectées que par l'analyse des chromosomes en métaphase. L'inconvénient du test réside dans le fait que les échanges chromosomiques et autres réarrangements ne sont pas détectés, alors que certains fragments pourraient être inclus dans le noyau principal, devenant ainsi imperceptibles, ce qui conduirait à sous-estimer la fréquence réelle du dommage chromosomique (Cerquiera 2014).

La limitation commune de ce test qui dépend de la notation visuelle est la grande hétérogénéité inter- (et souvent intra-) laboratoire du marqueur (Bonassi, Coskun et al. 2011).

# **Section III :**

**Les vitamines B9 et B12**

# I. La vitamine B9 (acide folique ou folates)

## A. Caractéristiques générales de la vitamine B9

La vitamine B9, ou folates, tire son nom du latin folium qui signifie feuille, à cause de l'abondance de cette vitamine dans les végétaux foliacés (Lucock 2000). La vitamine B9 est une vitamine hydrosoluble ayant un rôle de coenzyme dans le métabolisme monocarboné nécessaire à la synthèse du désoxythymidylate, à la synthèse de la purine et à diverses réactions de méthylation (Davis and Nicol 1988; Selhub 2002; Ebara 2017). Elle est aussi appelée folate pour la forme présente naturellement dans les aliments et acide folique pour la forme synthétisée servant de supplément (Withöft 1999; Lucock 2000; Veujoz 2013).

## B. Apport alimentaire en vitamine B9

L'homme ne peut pas synthétiser les folates et dépend donc des sources alimentaires de cette vitamine. La plus grande partie des folates alimentaires est apportée par les légumes verts, les fruits, le foie des animaux et dans certaines préparations de levures ou de bactéries (Withöft 1999; Guillard 2011; Veujoz 2013). Ces folates naturels sont sensibles à la lumière, facilement oxydables et thermolabiles (Lucock 2000). La cuisson détruira jusqu'à 80 % des folates présents dans les aliments (Vidailhet 2010). Ils se trouvent protégés, aussi bien dans les aliments que dans l'organisme par la vitamine C (acide ascorbique), un puissant agent antioxydant, qui a la propriété de limiter fortement l'oxydation des molécules réduites (Lucock 2000).

## C. Métabolisme et fonctions biologiques de la vitamine B9

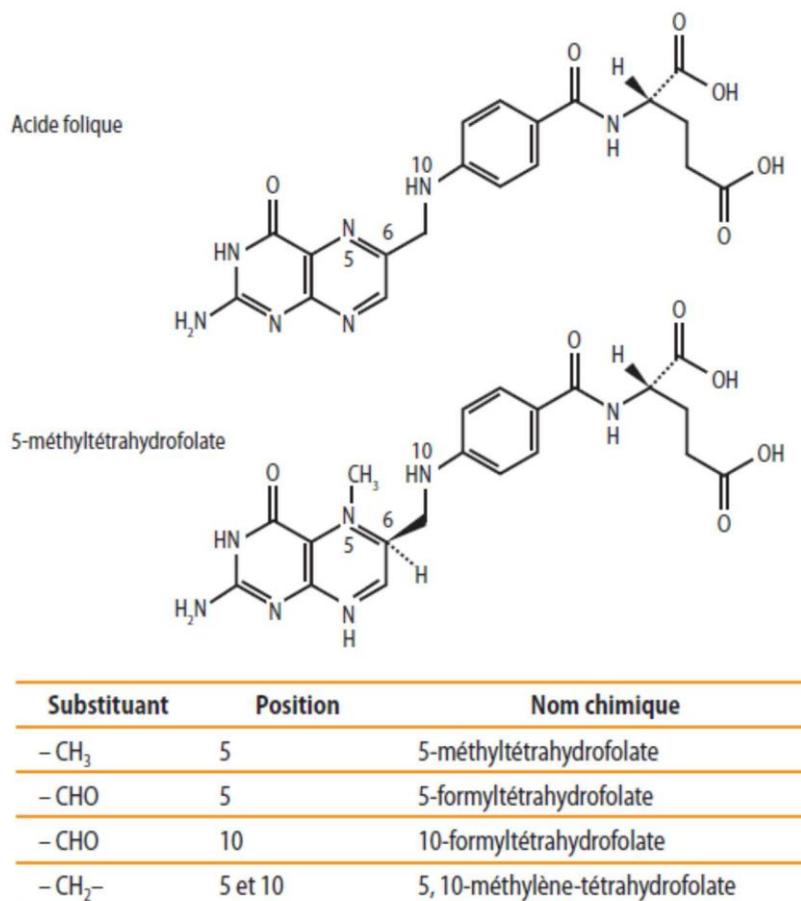
### 1. Structure

Le terme folates, ou vitamine B9, désigne un ensemble de molécules qui ont pour structure de base l'acide folique (ou acide ptéroylglutamique). Il s'agit d'un groupe de substances associant un noyau ptéridine (le cycle ptérine) et un ou plusieurs résidus glutamates reliés par un acide para-aminobenzoïque (Guillard 2011; Ebara 2017) (Figure 5).

### 2. Absorption

À l'état naturel, les folates sont sous forme polyglutamate. Celle-ci doit être transformée en forme monoglutamate pour permettre son absorption digestive. L'absorption des folates monoglutamates se produit dans le jéjunum (Lucock 2000; Visentin, Diop-Bove et al. 2014). Une fois absorbés dans la cellule intestinale et avant d'être libérés dans la veine porte, les folates monoglutamates sont réduits grâce à la dihydrofolate réductase en tétrahydrofolate (THF), et

subissent une méthylation et sont convertis en 5-méthyltétrahydrofolate (5-Me-THF) (Ebara 2017) (Figure 5).



**Figure 5: Structure chimique de l'acide folique et ses différents dérivés.**

Les dérivés THF varient par les différents radicaux carbonés portés par les azotes N5 et/ou N10, site actif de la molécule de folates (Guilland 2011).

### 3. Transport

C'est sous la forme de 5-Me-THF que les folates sont majoritairement présents dans l'organisme (Ebara 2017). Dans le sang, la vitamine B9 est transportée majoritairement par les globules rouges et minoritairement dans le plasma fixé aux protéines de transport (folate binding protein). Le stockage des folates est essentiellement hépatique avec trois récepteurs pour le transport cellulaire des folates : le transporteur de folates couplé au proton (PCFT), le transporteur de folates réduits (RFC) et le récepteur de folates (FR)-alpha/bêta (Shane 2001).

### 4. Distribution cellulaire

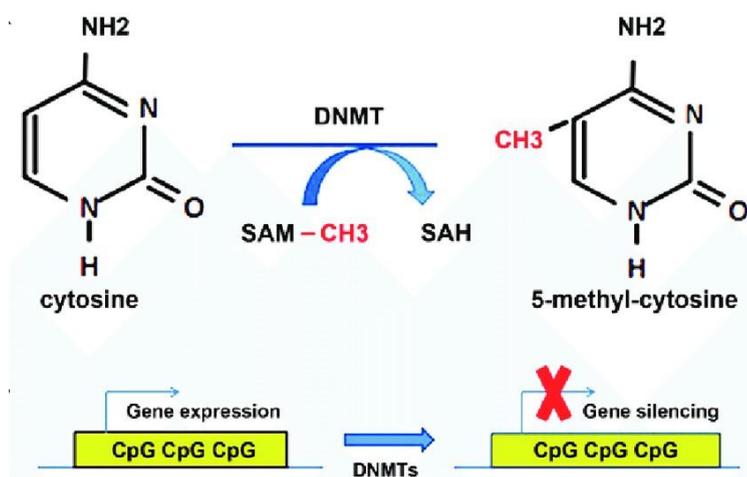
Le taux intracellulaire de folates régule son transport transmembranaire. Une fois entré dans les cellules, la molécule de 5-Me-THF doit être déméthylée en THF suite au transfert de son groupement méthyle à l'homocystéine, sous l'action de la méthionine synthase (MS), vitamine B12 dépendante, pour intégrer le cycle folique cellulaire et jouer son rôle de donneur de méthyles. Les

dérivés du tétrahydrofolate THF servent d'accepteurs et de donneurs d'unités monocarbonées dans un grand nombre de réactions du métabolisme des acides aminés et des nucléotides. Ces dérivés ont, en position N5 et/ou N10, différents radicaux monocarbonés (Shane 2001; Guillard 2011).

L'étape cruciale et primaire du métabolisme des folates est la transformation de la serine, principal source de carbone, en glycine par la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT), qui aboutit à la conversion du THF en 5,10 méthylène tétrahydrofolate (5,10-Me-THF) (Bailey and Gregory 1999; Shane 2001; Ebara 2017). Ce dernier, par sa fonction de donneur d'unités monocarbonées maintient la stabilité génomique en régulant la synthèse, la réparation et la méthylation de l'ADN (Bailey and Gregory 1999; Shane 2001; Ebara 2017). Le 5,10- Me-THF formé est soit réduit en 5-Me-THF par la 5,10-méthylène-tétrahydrofolate-réductase (MTHFR), soit oxydé en 5,10-méthényl-THF dans une réaction réversible catalysée par la méthylène-tétrahydrofolate-déshydrogénase (MTHFD) (Bailey and Gregory 1999; Shane 2001; Ebara 2017).

### 5. Méthylation de l'ADN

Le terme «méthylation de l'ADN» désigne l'ajout, par des méthyl-transférases, de groupements méthyl sur des cytosines précédant un résidu Guanine (îlots CpG). Dans le cycle de la méthionine, le 5-Me-THF reméthyle l'homocystéine en méthionine, qui est activée en S-adénosylméthionine (SAM). La SAM, le principal donneur de méthyles, assure l'ajout d'un groupement méthyle à l'ADN (Guillard 2011). La méthylation des cytosines par les DNA méthyltransférases (DNMTs) (Figure 6).



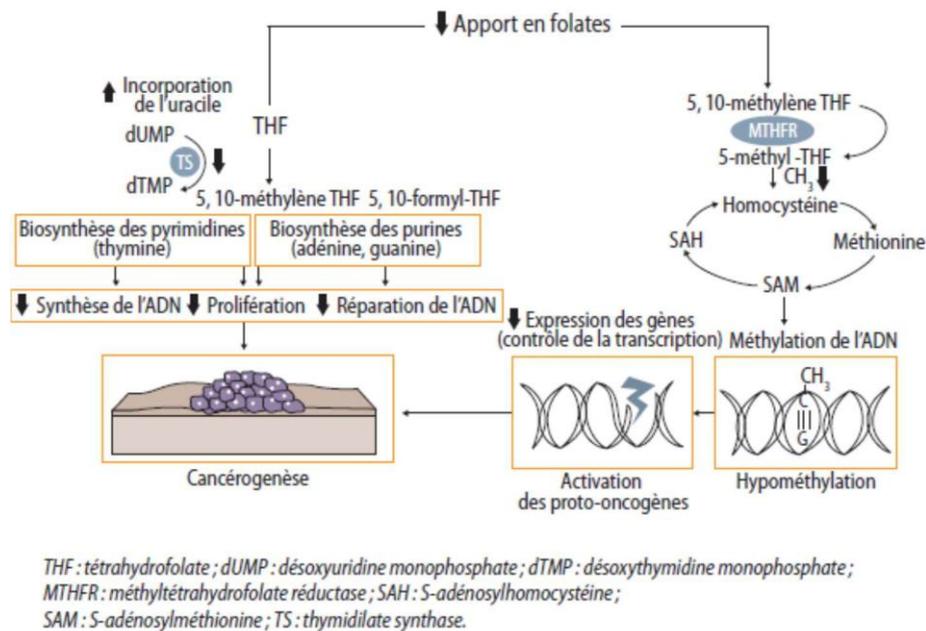
**Figure 6: Méthylation des cytosines par les DNMTs sur l'ADN génomique.**

Sur l'ADN génomique, un groupement méthyle peut être ajouté par les DNMTs sur les cytosines (C) pour former des 5-méthylcytosines (m5C). Les DNMTs utilisent le -CH<sub>3</sub> fourni par le donneur universel de groupements méthyles, la S-adénosylméthionine (SAM) (Cui, Jing et al. 2016).

Chez les eucaryotes, le site préférentiel de la méthylation est le carbone 5 de la deuxième base cytosine des séquences 5'-CCGG-3' (séquences CpG). La plupart des séquences CpG de l'ADN sont méthylées à plus de 70 % (79 % dans le cœur, 91 % dans le thymus) (Suzuki and Bird 2008). Les îlots CpG sont présents dans les régions promotrices des gènes localisées le plus souvent aux extrémités 5'. La méthylation des îlots CpG inhibe la liaison des facteurs de transcription qui interagissent avec ce site et, par conséquent, la transcription génique (Clouaire and Stancheva 2008). Lorsqu'ils sont hyperméthylés, l'expression des gènes concernés est généralement réprimée ou inhibée. On assiste au phénomène inverse lorsque ces îlots CpG sont hypométhylés (Figure 6).

### 6. Synthèse des bases nucléotidiques

De même, les folates sont essentiels à la synthèse de 3 bases nucléotidiques : la thymidine, l'adénine et la guanine. Le désoxyuridine monophosphate (dUMP) est converti en désoxythymidine monophosphate (dTMP) dans une réaction impliquant le 5,10-méthylène THF et la thymidilate synthase (TS). Le 5,10-méthylène THF est aussi le précurseur du 10-formyl-THF mis en jeu dans la synthèse de l'adénine et de la guanine. La production de ces trois bases nucléotidiques étant essentielle à la synthèse et à la réparation de l'ADN, une carence en folates induit et accélère la cancérogenèse en perturbant chacun de ces processus (Bailey 2009; Guillard 2011) (Figure 7).



**Figure 7: Les folates et le métabolisme des unités monocarbonées.**

Régulation de la synthèse, de la réparation et de la méthylation de l'ADN et conséquences du déficit en folates (Guillard 2011).

### D. Conséquences du déficit en folates

L'incorporation très élevée de l'uracile à la place de la thymidine dans l'ADN est observée en cas de carence en folates. Les dUMP s'accumulent au détriment des molécules du dTMP et peuvent être incorporés par erreur dans la synthèse des brins d'ADN au cours de la polymérisation (Guilland 2011). L'erreur d'incorporation (misincorporation) de l'uracile du dUMP dans l'ADN cause l'instabilité de l'ADN, la cassure et les anomalies de disjonction des chromosomes. Il existe dans l'organisme des enzymes qui assurent la réparation de telles anomalies génomiques. L'enzyme ADN uracile glycosylase répare cette erreur d'incorporation en excisant les uraciles anormalement présents dans l'ADN. Son action peut générer des cassures transitoires d'un des brins de l'ADN. La misincorporation augmente la probabilité que deux uraciles situés sur deux brins de l'ADN opposés se retrouvent proches dans l'espace (Blount, Mack et al. 1997). Les mécanismes de réparation de l'ADN peuvent alors induire des cassures simple- ou double-brins d'ADN, des cassures chromosomiques et la formation de micronoyaux. De plus, la carence en folates influe négativement sur la réparation de l'ADN en inhibant la production de thymidine, d'adénine et de guanine (Guilland 2011).

Il a été récemment suggéré que la dérégulation des modifications de l'état de méthylation de l'ADN génomique (modifications épigénétiques), pourrait jouer un rôle important dans le développement de nombreuses maladies telles que la manifestation du cancer par l'activation des proto-oncogènes ou par l'inhibition des gènes suppresseurs (Bailey 2009) (Figure 7) ainsi que l'infertilité masculine par changement de l'état de méthylation de l'ADN spermatique (Cui, Jing et al. 2016). De plus, il a été démontré que l'hypométhylation de l'DNA et l'incorporation très élevée de l'uracile sont des événements moléculaires fondamentaux connus qui causent la formation des micronoyaux (Fenech 2001).

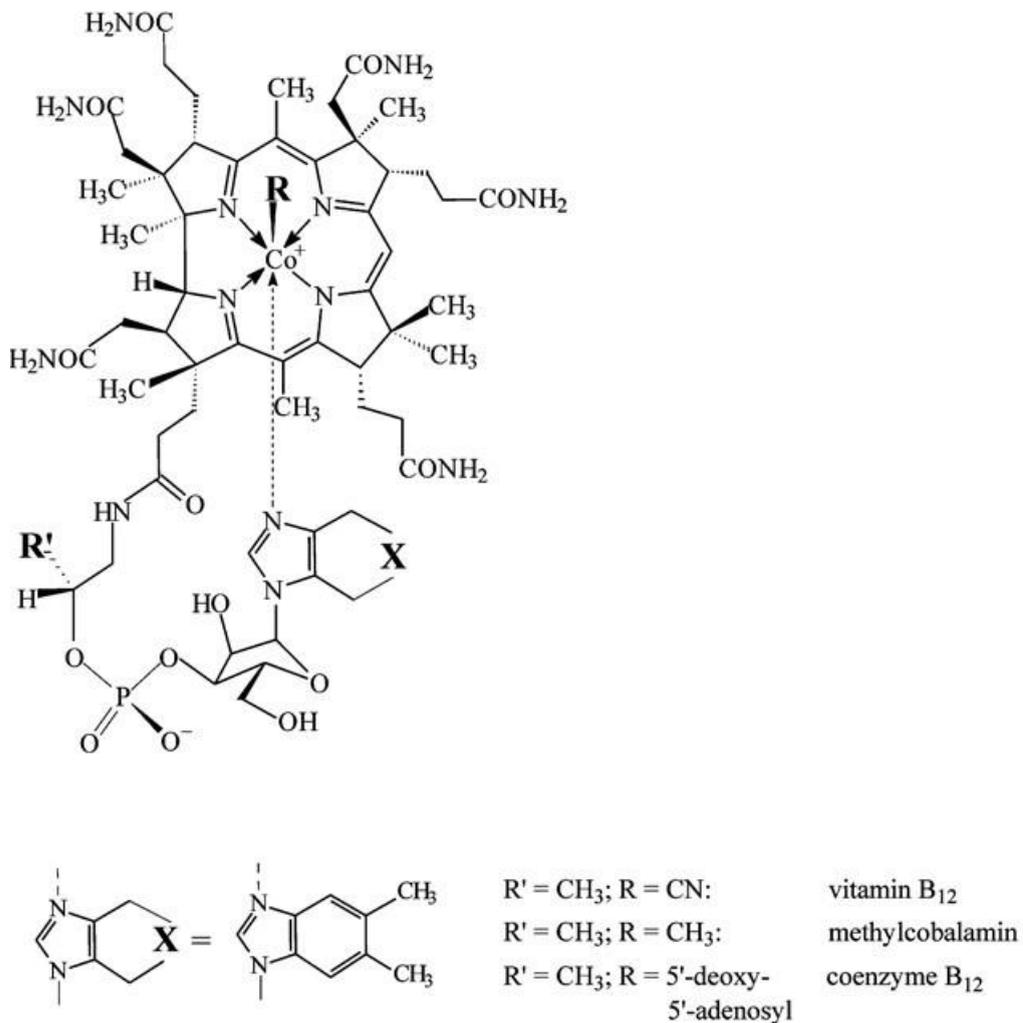
L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a défini, en 2008, le déficit en folates comme une concentration inférieure à 10 nM (soit 4 ng/ml) pour les folates sériques (témoins des apports récents habituels) et inférieur à 340 nM (soit 151 ng/ml) pour les folates globulaires (témoins des réserves en folates) (WHO 2015) (OMS, 2012).

## II. La vitamine B12

### A. Structure et définition de la vitamine 12

La vitamine B12 ou cobalamine est une vitamine hydrosoluble. Elle a une structure chimique proche de l'hème, l'atome central de fer étant remplacé par un atome de cobalt, d'où son nom cobalamine (Krautler 2005; Combs 2012). Elle appartient à une classe de composés appelés corrinoides (Guéant 1993; Combs 2012). Elle est constituée d'un noyau corrine et d'un

ribonucléotide reliés entre eux par un pont amino-2-propanol (Figure 8). Le noyau corrine est formé d'un atome de Co central relié à 4 noyaux pyrrole ainsi qu'à un radical anionique (-R) variable qui constitue le ligand symétrique du ribonucléotide par rapport au plan et qui détermine le nom du composé vitaminique : CNCbl pour cyanocobalamine (forme circulante), OHCbl pour hydroxocobalamine (forme recommandée pour traiter les déficiences en cobalamine), MeCbl pour méthylcobalamine (cofacteur de réactions de reméthylation en particulier dans la formation de la méthionine à partir de l'homocystéine) et AdoCbl pour 5'-désoxyadénylcobalamine (cofacteur de la méthyl malonyl CoA mutase) (Krautler 2005; Guéant 2014).



**Figure 8: Structures chimiques des différentes cobalamines.**  
D'après (Krautler 2005).

### B. Origine, synthèse et source alimentaire de la vitamine B12

L'apport en vitamine B12 est exogène d'origine essentiellement animale (Watanabe 2007), à partir d'aliments comme : les abats, le foie, les rognons, mais aussi la viande, les œufs, le lait, les fruits de mer et le poisson. En fait, la vitamine B12 est synthétisée uniquement par des bactéries, des levures et des algues. Certaines de ces bactéries sont présentes dans le rumen des herbivores,

notamment chez les ruminants (Guéant 1993). Le régime alimentaire normal de l'homme apporte entre 5 et 15pg de vitamine B12 dans les pays occidentaux. Les besoins sont variables selon l'âge. Chez un adulte, ils sont estimés entre 1 et 5 µg par jour et chez un enfant entre 1 et 2µg par jour. Les besoins augmentent significativement en période de croissance, d'état hypermétabolique, de grossesse et d'allaitement maternel (O'Flynn O'Brien, Varghese et al. 2010).

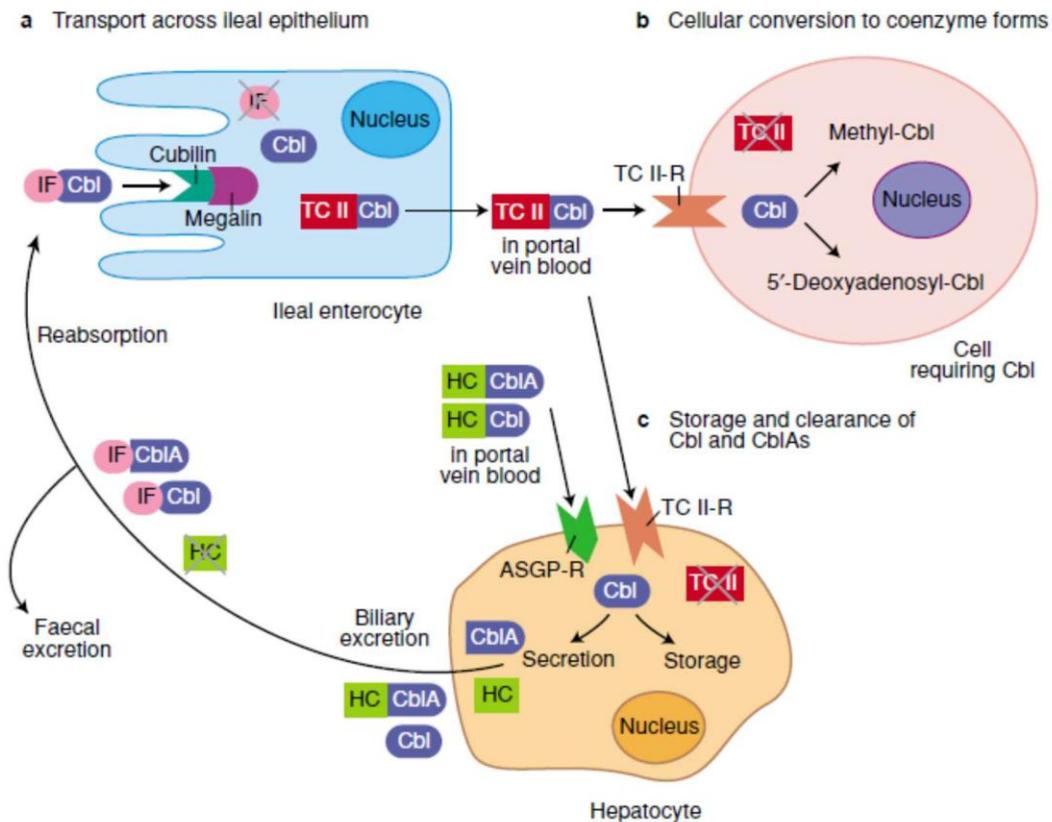
### **C. Métabolisme de la vitamine B12**

La cobalamine contenue dans les aliments n'est pas à l'état libre. Elle est combinée à des protéines alimentaires (Baik and Russell 1999). Après ingestion de la vitamine B12, elle en est dissociée sous l'influence du suc gastrique, surtout de l'acide chlorhydrique et de la pepsine (Guéant 1993; Watanabe 2007). Puis, elle se lie aux haptocorrines (HC; également appelé transcobalamine I (TCBI) ou la protéine R), glycoprotéines porteuses présentes dans les sécrétions salivaires et gastriques (Guéant 1993; Watanabe 2007). Dans le duodénum, les HC sont progressivement digérées et la vitamine B12 libre se lie alors au facteur intrinsèque (FI) (Guéant 1993; Watanabe 2007). Le FI est une glycoprotéine sécrétée par les cellules pariétales de l'estomac, qui va permettre à la cobalamine de franchir la barrière intestinale au niveau iléal (Guéant 1993; Watanabe 2007).

Deux systèmes distincts contribuent à l'absorption intestinale de la cobalamine (au niveau de l'iléon terminal). Le premier system faisant intervenir des récepteurs cellulaires spécifiques notamment la cubuline à laquelle se lie le complexe vitamine B12-FI (Kozyraki and Cases 2013). Le second système d'absorption est indépendant du FI : 1% à 5% de la dose de vitamine B12 ingérée est absorbée par simple diffusion (Rufenacht, Mach-Pascual et al. 2008).

Le complexe vitamine B12-FI lié à la cubuline nécessite une protéine nommée mégaline pour être endocyté. Lors de l'endocytose, la cobalamine est libérée du FI qui sera dégradée, quant à la cubuline et la mégaline, elles seront recyclées. Par la suite, on pense que la cobalamine est incluse dans des vésicules sécrétoires où elle est associée à la transcobalamine II (TCII). Le complexe vitamine B12-TCII est alors sécrété dans la veine porte. Les transcobalamines de type I (TCBI) et III (TCBIII) assurent également le transport de la vitamine B12 circulante, mais c'est la TCBII qui joue le rôle majeur dans les processus clés de fixation tissulaire et hépatique de la vitamine B12. Ainsi, le complexe vitamine B12-TCBII est absorbé par la plupart des cellules telles que les hépatocytes et les cellules épithéliales tubulaires rénales proximales qui expriment le récepteur de la TCBII (TCBII-R). Pour le complexe vitamine B12-TCBI (ou vitamine B12-HC), le récepteur est nommé le récepteur de l'asialoglycoprotéine (ASGP-R). Dans les cellules, la vitamine

B12 libérée de ces complexes, est soit stockée sous ses formes coenzymatiques (Me-Cbl et la AdoCbl), soit sécrété via la bile pour être réabsorbé (Seetharam and Yammani 2003) (Figure 9).



**Figure 9: Les systèmes de transport de la vitamine B12.**

D'après (Seetharam and Yammani 2003). ASGP-R : récepteur de l'asialoglycoprotéine, Cbl : cobalamine, CblA : analogues de la cobalamine, HC : haptocorrine, IF : Facteur de croissance, TCII : transcobalamine II.

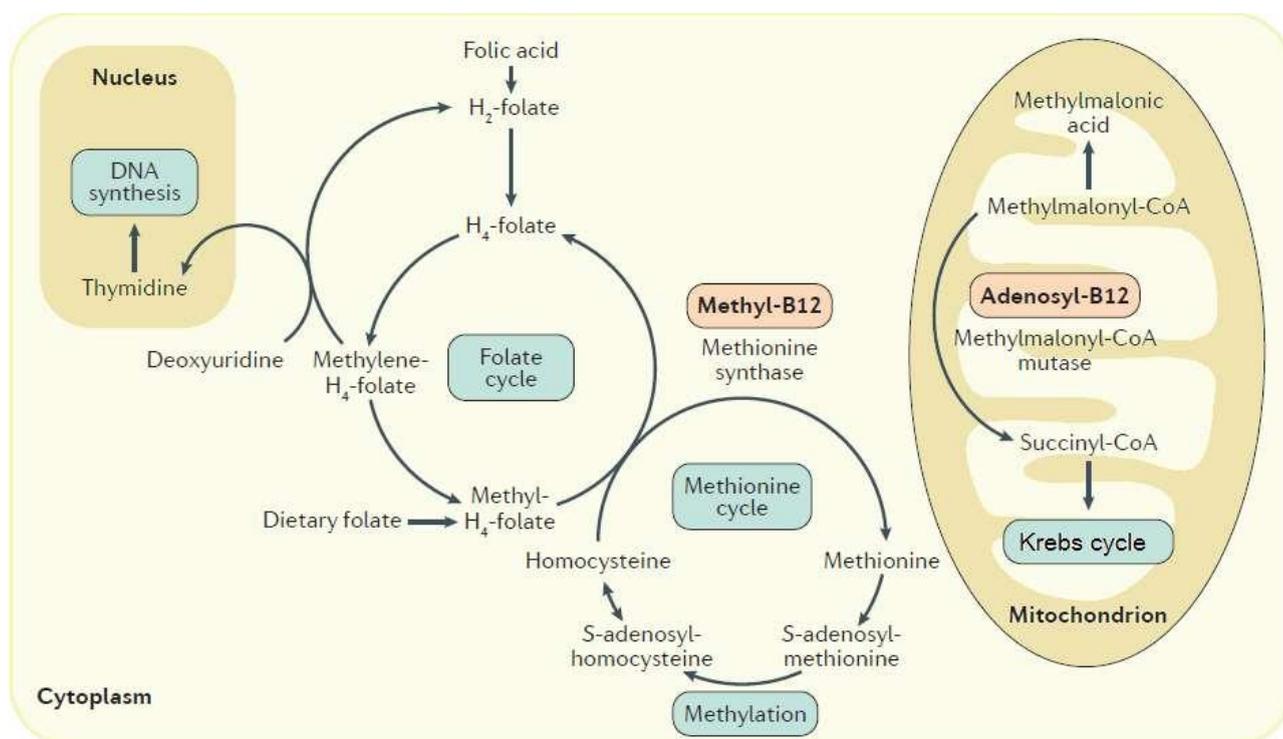
#### D. Rôle de la vitamine B12 et conséquence de sa carence

La vitamine B12 est une coenzyme ubiquitaire impliquée dans de nombreuses réactions enzymatiques intracellulaires. De manière générale, nous pouvons dire qu'elle intervient (sous ses formes coenzymatiques la MeCbl et la AdoCbl) dans les réactions qui aboutissent à la synthèse de de la méthionine à partir de l'homocystéine et de succinyl-CoA à partir du méthylmalonyl-CoA, respectivement (Seetharam and Yammani 2003).

Les réactions où intervient l'AdoCbl semblent être diverses de par leur nature. Ainsi, elles sont toutes régies par un mécanisme de transfert d'hydrogène, l'AdoCbl se comportant comme un donneur ou un accepteur d'hydrogène. C'est une coenzyme de la méthylmalonyl-CoA mutase, qui catalyse la conversion du méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA au niveau de la mitochondrie. Le

succinyl-CoA est métabolisé à son tour en acide succinique et intégré dans le cycle de Krebs et participer à la néoglucogenèse (**Figure 10**).

En ce qui concerne les réactions mettant en jeu la MeCbl comme coenzyme, la principale est la méthylation de l'homocystéine en méthionine. La MeCbl est un facteur coenzymatique d'une méthyle-transférase. Cette réaction permet la régénération du tétrahydrofolate à partir du N5-méthyl-tétrahydrofolate (Guéant 1993). Le tétrahydrofolate résultant peut ensuite être renvoyé dans le pool de folates et mis à disposition pour la production de méthylène-tétrahydrofolate, forme requise pour la synthèse de novo de la thymidine, essentielle à la réplication et à la réparation de l'ADN (Green, Allen et al. 2017). Il est donc clair que la vitamine B12 intervient avec l'acide folique dans le métabolisme de l'ADN (**Figure 10**).



**Figure 10: Métabolisme de la vitamine B12 et son lien avec celui des folates.**

D'après (Green, Allen et al. 2017)

Le rôle physiologique de la vitamine B12 explique la plupart des manifestations cliniques liées à son déficit. L'altération de la synthèse de l'ADN entraîne un blocage de maturation affectant essentiellement les cellules à multiplication rapide et donne lieu aux signes hématologiques, cutanéomuqueux (épithélium buccal, digestif, génital et urinaire) et neurologiques. Au niveau moléculaire, la carence en vitamine B12 entraîne :

- Le blocage de la méthylmalonyl-CoA mutase entraînant une acidurie méthylmalonique.
- Le blocage de la régénération de la méthionine qui perturbe le métabolisme des acides aminés soufrés et explique l'excrétion urinaire augmentée d'homocystéine (Guéant 1993).

- En plus de la perturbation du cycle de la méthionine, la carence en vitamine B12 perturbe aussi le cycle des folates, et ceci pour deux raisons:

\* Une perte de l'inhibition allostérique de la MTHFR par la SAM : la carence en vitamine B12 provoque une diminution de la méthionine et donc de la SAM. Sachant que la SAM est un effecteur allostérique de la MTHFR, la diminution de la SAM induit une baisse de l'inactivation de la MTHFR. Le N5, 10-MeTHF sera converti en N5-MeTHF en abondance. Il y' aura donc une accumulation de N5-MeTHF, un métabolite inactif et une diminution de N5,10-MeTHF, un métabolite actif (Ghemrawi, Pooya et al. 2013).

\* Un « Folate trap » ou piège des folates : Au cours du cycle des folates, le N5-MeTHF est régénéré en N5,10-MeTHF actif par un transfert du groupe méthyl vers la cobalamine lors de la synthèse de la MeCbl, catalysée par la méthionine synthase. La carence en vitamine B12 empêche cette réaction de régénération des folates qui se trouvent piégés sous la forme de N5-MeTHF. L'absence de régénération du tétrahydrofolate empêche la régénération de 5,10-méthylène tétrahydrofolate, qui est un coenzyme de la thymidylate synthétase. Il y a donc blocage de la conversion de dUMP en dTMP et par voie de conséquence blocage de la synthèse de l'ADN (Guéant 1993). L'accumulation de dUMP favorise son incorporation excessive dans l'ADN qui devient plus instable ce qui entraîne des cassures des brins et la formation des micronoyaux (Fenech 2001; Fenech and Crott 2002).

**CHAPITRE II**  
**PATIENTS, MATERIEL**  
**ET METHODES**

# I. Patients

Notre étude a porté sur un échantillon de 84 sujets, dont 54 sujets présentant une infertilité idiopathique (27 couples) et 30 sujets fertiles (15 couples). L'étude comprend trois principaux volets :

- L'étude des paramètres sociodémographiques et médicaux des couples infertiles ;
- La réalisation d'un examen cytogénétique par l'établissement d'un test des micronoyaux sur les cellules buccales pour les couples fertiles et infertiles ; et
- Le dosage des vitamines B9 (folates) et B12 (cobalamine) chez les couples infertiles.

## A. Recrutement des patients

Les patients inclus dans notre étude sont des couples présentant une infertilité idiopathique, recrutés au niveau du service de Procréation Médicalement Assistée (PMA) de la maternité de Sidi Mabrouk, Constantine. Dans tous les cas, les couples étaient orientés à la maternité par leur médecin traitant pour réaliser une insémination artificielle. Les données ont été collectées au moyen d'un questionnaire et à partir des dossiers des patients répondant aux critères d'inclusion de l'étude.

### Critères d'inclusion

Notre population d'étude comprenait des couples consultant à la maternité de Sidi Mabrouk, Constantine et chez qui le diagnostic d'infertilité était posé par les gynécologues. Nous avons inclus dans notre étude les couples présentant une infertilité idiopathique. Nous considérons comme couple avec infertilité idiopathique, tout couple qui n'avait pas conçu après au moins 12 mois de rapports sexuels réguliers et non protégés et lorsqu'aucune étiologie n'est retrouvée après un examen clinique et un bilan du couple.

**Critères d'exclusion** : les sujets avec les critères suivants sont exclus de l'étude ;

- L'exposition professionnelle aux agents génotoxiques connues, pesticides et métaux lourds notamment.
- Thérapies anticancéreuses (causant des dommages à l'ADN).
- Maladies chroniques : diabète et hypertension artérielle.
- Tabagisme et consommation d'alcool.

## B. Recrutement des témoins

Quinze couples fertiles volontaires ont été recrutés, appariés par l'âge et le sexe aux patients. Leur fertilité est prouvée par la naissance d'au moins un enfant.

Les sujets inclus dans l'étude ont été tous informés des objectifs de l'étude et ont accepté à cette fin de faire un prélèvement du sang périphérique et des cellules buccales. Le consentement écrit et éclairé a été obtenu pour l'ensemble des sujets après leur avoir expliqué la nature et les objectifs de l'étude. Il a été bien spécifié à chaque patient qu'il s'agissait d'une étude de recherche et non d'une étude de diagnostic. Pour chacun des sujets inclus dans l'étude, une description précise a été fournie au moyen d'un questionnaire : âge, profession, lieu d'habitat, histoire personnelle et familiale d'infertilité, habitudes tabagiques, consommation d'alcool, maladie chronique, activité sportive, le nombre de tentatives de FIV et d'ICSI et exposition professionnelle aux agents génotoxiques.

Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique du centre de recherches en biotechnologie (CRBt, Constantine, Algérie). Les formulaires de consentement et les questionnaires sont retrouvés en Annexes de I à IV.

## II. Matériel et méthodes

### A. Étude cytogénétique par le test des micronoyaux sur les cellules buccales

Ce test a été réalisé au niveau du Laboratoire des Maladies Génétiques Constitutionnelles et Acquises (MAGECA) de l'Université de Batna 2 et au niveau du Laboratoire d'Histologie de l'institut des Sciences Vétérinaires et des Sciences Agronomiques de l'Université de Batna 1.

Un examen cytogénétique par l'établissement d'un test des micronoyaux sur les cellules buccales a été réalisé pour les couples présentant une infertilité idiopathique et pour les couples fertiles. Le test des micronoyaux sur cellules buccales (BMCyt assay) permet de repérer les biomarqueurs de dommage d'ADN (micronoyaux et bourgeons nucléaires), les biomarqueurs des défauts de cytokinèse (cellules binucléées), les biomarqueurs de la prolifération cellulaire (cellules basales et différenciées) et les biomarqueurs de la mort cellulaire (cellules à chromatine condensée, pycnotiques, caryorrhétiques et caryolytiques).

#### 1. La préparation des solutions

**Préparation du tampon :** Pour préparer 1 litre de tampon pour cellules buccales, 1.6 g de Tris-HCl, 37.2 g de l'EDTA sel disodique et 1.2 g de chlorure de sodium sont dissouts dans 600 ml de l'eau Milli-Q. Les sels sont solubilisés complètement puis le volume est complété à 1000 ml. Le pH est ajusté à 7.0 par l'ajout de la soude (NaOH) puis le tampon est autoclavé à 121°C pendant 30 minutes. Le tampon peut être conservé jusqu'à 3 mois dans des flacons fermés et mis à température ambiante (approximativement 18–22 °C).

**Le fixateur de Saccomanno :** Le fixateur du Saccomanno se compose du polyéthylène glycol à 2% (vol/vol) et d'éthanol à 50% (vol/vol). Vingt millilitre du fixateur sont utilisés par sujet. Le fixateur peut être stocké jusqu'à 3 mois à 4 C°.

### **Acide chlorhydrique 5 M (HCl 5M) :**

Cette solution doit être préparée au moment de l'utilisation. Pour la préparation de 200 ml de HCl 5M, 83.3 ml d'acide sont ajoutés doucement à 116,7 ml d'eau.

Le fixateur éthanol/acide acétique

Le fixateur éthanol/acide acétique est préparé dans le rapport 3:1. La préparation se fait au moment de l'utilisation.

**Le colorant du cytoplasme par le Light Green:** 500 ml de Light Green sont obtenus par dissolution de 1 g de Gurr Light Green dans 450 ml d'eau Milli-Q. Une fois solubilisé, le volume est ramené à 500 ml et filtré au moyen d'un papier filtre de Whatman Numéro 1. Le colorant est conservé dans l'obscurité à la température ambiante, où il reste actif pendant quelques années.

## **2. La procédure du test**

### **a- Prélèvement des cellules buccales**

Les cellules buccales exfoliées sont utilisées pour la réalisation du test des micronoyaux. Avant le prélèvement, il faut s'assurer que le sujet rince bien la bouche à l'aide de l'eau pour enlever tous les débris possibles.

La réalisation du prélèvement se fait à l'aide d'une cytobrosse. Il est préférable que le sujet fasse le prélèvement lui-même. Il doit frotter doucement dix fois l'intérieur de chaque joue avec un mouvement circulaire à l'aide d'une cytobrosse (frottement simple non traumatisant). Deux cytobrosses différentes sont utilisés pour les deux joues. Au total, deux prélèvements par sujet sont réalisés : un prélèvement pour chaque joue.

Deux flacons stériles de 30 ml sont préparés contenant chacun 10 ml de la solution de Saccomanno et identifiés par JD (joue droite) et JG (joue gauche). La tête de la cytobrosse est déposée dans ces flacons par des mouvements de rotation de la cytobrosse pour libérer les cellules dans la solution.

Par la suite, les flacons sont fermés hermétiquement par du parafilm pour empêcher la fuite des cellules pendant le transport au laboratoire. Les cellules fixées dans la solution de Saccomanno peuvent être stockées à 4 C° pendant 1 à 2 mois. L'identification du sujet ainsi que l'heure et la date du prélèvement sont inscrits sur chaque flacon.

### **b- Centrifugation des cellules buccales et préparation des lames**

Les cellules fixées dans la solution de Saccomanno sont transférées aux tubes de centrifugation à fond conique de 15 ml (TV-10) (un tube pour la joue droite et un autre pour la joue

gauche) puis centrifugées pendant 10 min à 581g à température ambiante. A l'aide d'une pipette stérile, le surnageant est aspiré et il reste 2 ml de culot de cellules qui sont re-suspendus dans 8 ml de tampon. Les meilleurs résultats sont obtenus après trois lavages de la sorte. Ce tampon aide à inactiver les ADNases endogènes présentes dans la cavité buccale et à enlever des bactéries et des débris de cellules qui pourraient compliquer la lecture des lames. Par la suite, le surnageant est aspiré et remplacé par 5 ml de tampon. La suspension cellulaire est agitée et homogénéisée pendant 2–3 mn en utilisant un vortex ce qui permet d'enlever les gros agrégats de cellules non séparées. Pour augmenter le nombre de cellules clairement séparées, la suspension de cellules est passée 5 à 6 fois dans une seringue à l'aide d'une aiguille G18. Les cellules du tube JG et du tube JD sont transférées dans un seul flacon de 30 ml avant de les mettre dans une seringue en utilisant une aiguille G18. Pour enlever les agrégats de cellules non séparées (amas), les cellules sont filtrées par un filtre de 100 µm.

Après la filtration, les cellules en suspension sont transférées à un nouveau tube de centrifugation à fond conique de 15 ml et centrifugées 10 min à 581g puis le surnageant est aspiré et les cellules seront remis en suspension dans 1 ml de tampon.

Le DMSO est ajouté (50 µl pour 1 ml de la suspension de cellules) pour faciliter la désagrégation des cellules et obtenir des préparations de lames avec des cellules bien séparées.

A l'aide d'une micropipette, 120–150 µl de la suspension cellulaire sont étalés sur des lames propres. Les lames sont séchées à l'air ambiant durant 10 minutes avant la fixation. Les cellules sont fixées dans le fixateur éthanol : acide acétique glaciale (3:1). Par la suite, les lames sont séchées à température ambiante pour 10 minutes avant la coloration. De préférence, les lames sont laissées à reposer pendant une nuit avant la coloration.

### **c- Coloration des cellules buccales (Coloration de Feulgen-Light Green)**

#### **Le réactif de Schiff**

Habituellement, cette technique de coloration est dite technique de Feulgen car elle a été décrite pour la première fois par Feulgen (1926). Le réactif de Schiff est préparé à partir de la fuchsine basique. Le principe de la méthode est de dissocier les deux brins d'ADN grâce à une hydrolyse ménagée par l'acide chlorhydrique (HCl) et de colorer ensuite ceux-ci au moyen de la fuschine qui réagit avec les fonctions réductrices de l'ADN pour donner une coloration rouge violet au noyau. Par la suite, le cytoplasme est coloré en vert à l'aide du light Green. La technique de coloration est dite alors Feulgen-Light Green.

Les lames avec les cellules fixées sont immergées dans de l'éthanol 50% (vol/vol) puis dans de l'éthanol 20% (vol/vol) pendant 1 minute à chaque fois. Ensuite, les lames sont rincées pendant 2 minutes par de l'eau Milli-Q. Les lames sont immergées dans l'HCl 5M pendant 30 minutes puis

rincées par de l'eau du robinet pendant 3 minutes. Une lame est immergée dans de l'eau Milli-Q au lieu de l'HCl 5M pendant 30 minutes comme control négatif pour évaluer l'efficacité du traitement par l'HCl.

Les lames sont, par la suite, rincées puis égouttées mais sans les laisser se dessécher, puis colorées par le réactif de Schiff pendant 60 minutes dans l'obscurité et à température ambiante. Les lames sont rincées par l'eau du robinet pendant 5 minutes puis par l'eau Milli-Q.

Ultérieurement, une contre coloration des cellules par l'immersion des lames dans la solution de Light Green 0,2% pour 20–30s est réalisée, suivie d'un rinçage des lames par de l'eau Milli-Q.

Les lames colorées sont recouvertes d'une lamelle à l'aide du baume d'inclusion 'Eukitt' puis elles sont séchées à température ambiante pendant 15min.

### 3. Critères de lecture des cellules

Les critères de lecture de différentes cellules et des anomalies nucléaires dans le test de micronoyaux sont basés principalement sur ceux décrits par (Thomas, Holland et al. 2009). Ils sont résumés sur **le tableau 2**.

#### a- Les cellules basales

Ce sont les plus petites cellules parmi les types de cellules buccales exfoliées, soit environ 1/4 à 1/3 de la taille des cellules différenciées. Elles ont un rapport noyau-cytoplasme plus grand que les cellules buccales différenciées et un noyau uniformément coloré. Leur taille et plus petite et leur forme est plus ovale lorsqu'elles sont comparées aux cellules buccales différenciées qui sont plus angulaires et plus plates. Le cytoplasme est typiquement coloré par une nuance de vert plus foncée par rapport aux cellules différenciées (**Figure 11. a1 et a2**).

#### b- Les cellules différenciées

Elles ont un noyau uniformément coloré, de forme ovale ou ronde. Elles sont distinguées des cellules basales par leur taille qui est plus grande et par leur rapport noyau-cytoplasme qui est plus petit. Le cytoplasme est coloré en vert plus clair que les cellules basales (**Figure 11. b1 et b2**).

#### c- Les cellules micronucléées

Elles sont caractérisées par la présence d'un noyau principal et d'une ou plusieurs structures nucléaires plus petites appelées les micronoyaux. Les micronoyaux sont des formes rondes ou ovales et leur diamètre s'étend entre 1/3 et 1/16 du diamètre du noyau principal. Les micronoyaux ont la même intensité de coloration et la même texture que le noyau principal. Les micronoyaux ne sont pas connectés au noyau principal. La limite nucléaire du micronoyau doit être clairement distincte de celle du noyau principal. La plupart des cellules micronucléées contiennent uniquement un seul micronoyau mais il est possible de trouver des cellules avec deux micronoyaux ou plus.

Les noyaux des cellules micronucléées ont la même morphologie que les noyaux des cellules normales. Les micronoyaux sont situés dans le cytoplasme des cellules. Ils sont dénombrés dans les cellules différenciées et dans les cellules basales. Les cellules, qui sont pycnotiques et qui ont une chromatine condensée ou des noyaux caryorrhétiques, ne sont pas dénombrées pour la présence de micronoyaux (**Figure 11. g1, g2 et g3**).

La fréquence de base des micronoyaux dans les cellules buccales est habituellement entre 0,3 –1,7 micronoyaux dans 1000 cellules différenciées (Bonassi, Coskun et al. 2011). Les cellules qui ont plusieurs micronoyaux sont rares chez les sujets en bonne santé mais deviennent plus communes chez les individus exposés aux rayonnements ou à d'autres agents génotoxiques.

### **d- Les cellules avec bourgeon nucléaire**

Elles contiennent un noyau avec une constriction apparente, nette et à une extrémité du noyau, suggérant un processus de bourgeonnement, c'est-à-dire une élimination de la matière nucléaire par bourgeonnement. Les cellules contenant des bourgeons nucléaires contiennent des corps nucléaires reliés au noyau principal par un pont nucléoplasmique large ou mince.

Dans certains cas rares, les bourgeons nucléaires peuvent être encore plus grands, parfois presque jusqu'à la taille du noyau principal. Dans la publication originale de Tolbert et al., (Tolbert, Shy et al. 1992) ces cellules ont été désignées sous le nom de cellules à œufs cassés ('broken egg' cells). Elles sont, pour des raisons pratiques et en raison de leur apparence similaire, incluses dans la catégorie des bourgeons nucléaires.

Le bourgeon nucléaire et le noyau sont habituellement très proches et semblent être attachés les uns aux autres. Le bourgeon nucléaire a la même morphologie et l'intensité de coloration que le noyau. Cependant, son diamètre s'étend d'une moitié à un quart de celui du noyau principal (**Figure 11. f1, f2 et f3**).

Le mécanisme menant à la formation de bourgeon nucléaire n'est pas connu mais il pourrait être lié à l'élimination de l'ADN amplifié et / ou des complexes de réparation de l'ADN.

### **e- Les cellules binucléées**

Ce sont des cellules contenant deux noyaux principaux au lieu d'un. Les noyaux sont habituellement très étroits et peuvent se toucher et habituellement avoir la même morphologie que celles observées dans les cellules normales. La signification de ces cellules est inconnue, mais elles sont probablement indicatives d'un défaut de cytokinèse après la dernière division nucléaire dans la couche de cellules basales (**Figure 11. e1, e2 et e3**).

### **f- Les cellules à chromatine condensée**

Elles montrent un modèle nucléaire grossièrement strié dans lequel la chromatine agrégée est intensément colorée. Dans ces cellules, il apparaît que la chromatine est agrégée dans certaines

régions du noyau, étant perdue dans d'autres régions. Quand l'agrégation de la chromatine est étendue, le noyau peut sembler être fragmenté. Ces cellules représentent les étapes précoces de l'apoptose, bien que cela n'ait pas été montré d'une manière concluante. Ces cellules ainsi que les cellules caryorrhétiques entraînent invariablement la fragmentation des noyaux, conduisant à une éventuelle désintégration, et semblent parfois contenir des corps semblables aux micronoyaux, mais ceux-ci ne sont pas comptés comme micronoyaux dans ce test puisque leur origine ne peut être déterminée avec précision (**Figure 11. d1 et d2**).

### **g- Les cellules caryorrhétiques**

Elles ont des noyaux caractérisés par une agrégation de la chromatine nucléaire plus étendue par rapport aux cellules à chromatine condensée. Elles ont un modèle nucléaire densément tacheté indicatif de la fragmentation nucléaire menant à une éventuelle désintégration du noyau. Ces cellules représentent une étape tardive d'apoptose, mais cela n'a pas été prouvé d'une manière concluante. Ces cellules ne sont pas comptées pour les micronoyaux dans ce test (**Figure 11. c1 et c2**).

### **h- Les cellules pycnotiques**

Elles sont caractérisées par un petit noyau rétréci, avec une forte densité du matériel nucléaire qui est uniformément mais intensément coloré. Le diamètre nucléaire est habituellement de un à deux tiers du diamètre d'un noyau des cellules différenciées normales (Figure 11. i1 et i2).

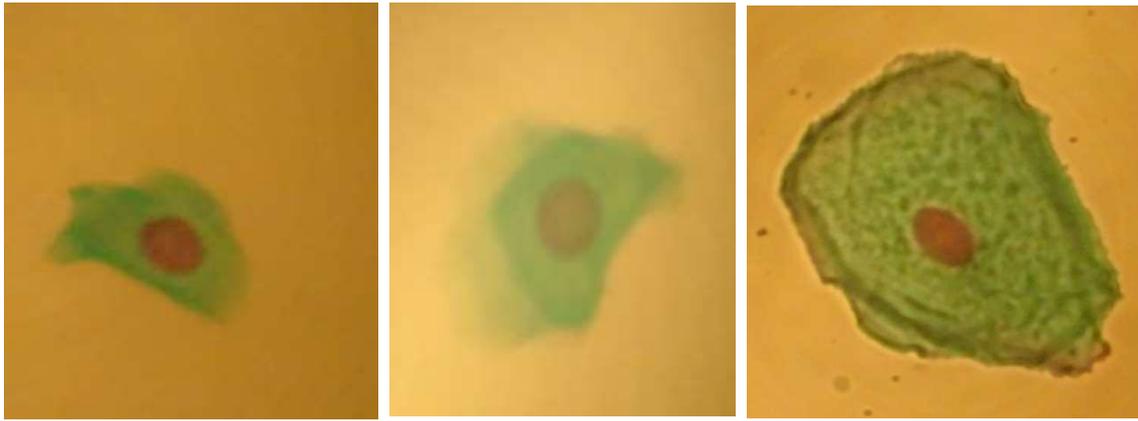
La signification biologique des cellules pycnotiques et le mécanisme conduisant à leur formation sont inconnus, mais il semble que ces cellules subissent une forme unique de mort cellulaire ; cependant, le mécanisme précis demeure inconnu. Ils peuvent représenter un mécanisme alternatif de désintégration nucléaire distinct du processus menant aux cellules à chromatine condensée et aux cellules caryorrhétiques.

### **i- Les cellules caryolytiques**

Ce sont des cellules dans lesquelles le noyau est complètement appauvri en ADN et apparaît comme une image de type fantôme qui n'a pas de coloration de Feulgen. Par conséquent, ces cellules semblent ne pas avoir de noyau et représente une étape très tardive dans le processus de la mort cellulaire (**Figure 11. h1 et h2**).

**Tableau 2: Les critères de classification des différents types de cellules et biomarqueurs dans le test des micronoyaux sur les cellules buccales.**

Cellule buccale	Dispositifs morphologiques
Basale	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Rapport noyau/cytoplasme plus large par rapport à la cellule différenciée</li> <li>*Plus petite et plus ovale que la cellule différenciée</li> <li>*Noyau uniformément coloré</li> <li>*Cytoplasme : nuance de vert plus foncée que les cellules différenciées</li> </ul>
Différenciée	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Rapport noyau/cytoplasme plus petit</li> <li>*Plus angulaire et plus plate que la cellule basale</li> <li>*Noyau rond et uniformément coloré</li> </ul>
Micronucléée	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Contient le noyau principal et le micronoyau</li> <li>*Le micronoyau est rond ou ovale avec même intensité de coloration que le noyau principal</li> <li>*Le diamètre du micronoyau varie habituellement entre 1/16 et 1/3 du diamètre moyen du noyau principal</li> <li>*Le micronoyau doit être situé dans le cytoplasme cellulaire</li> <li>*Micronoyau compté dans les cellules basales et différenciées seulement</li> </ul>
Bourgeon nucléaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Le noyau principal a une constriction pointue en formant un bourgeon</li> <li>*Le bourgeon est attaché au noyau principal</li> <li>*Le bourgeon a une intensité de coloration semblable au noyau principal</li> <li>*Le diamètre de bourgeon peut être de 1/4 à 1/2 du diamètre du noyau</li> </ul>
Binucléée	<ul style="list-style-type: none"> <li>*La cellule contient deux noyaux principaux</li> <li>*Les noyaux sont de taille et d'intensité de coloration semblable</li> </ul>
A chromatine condensée	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Le noyau montre des régions d'agrégation de chromatine</li> <li>*Des régions distinctes du noyau sont plus intensément colorées</li> <li>*Le noyau montre un modèle strié</li> </ul>
Caryorrhctique	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Le noyau a une agrégation étendue de la chromatine</li> <li>*La fragmentation nucléaire peut être évidente</li> </ul>
Pycnotique	<ul style="list-style-type: none"> <li>*La cellule a un noyau petit et rétréci</li> <li>*Le noyau est uniformément et intensément coloré</li> <li>*Le diamètre de noyau est entre 1/3 –2/3 du diamètre du noyau normal</li> </ul>
Caryolytique	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Le noyau est appauvri en ADN</li> <li>*Le noyau n'est pas coloré par la coloration de Feulgen</li> </ul>



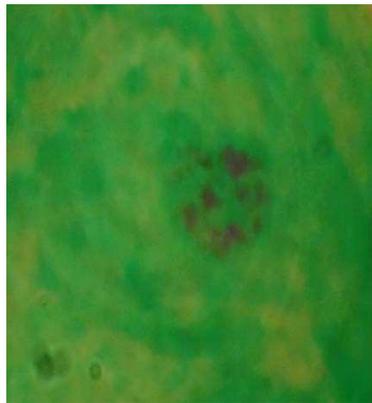
a1

a2

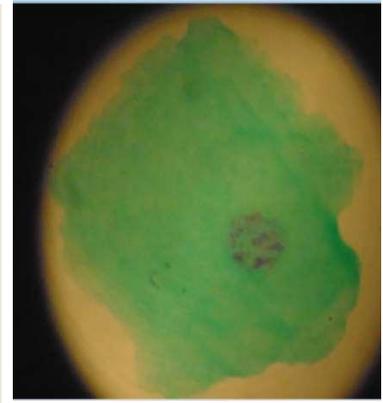
b1



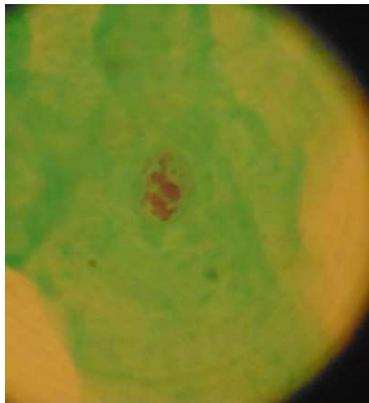
b2



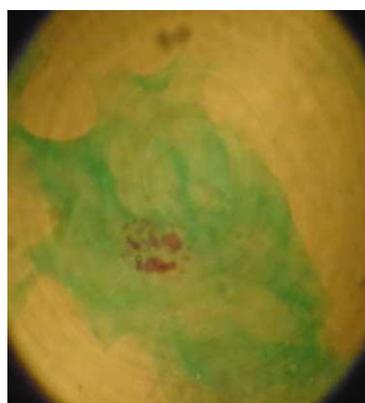
c1



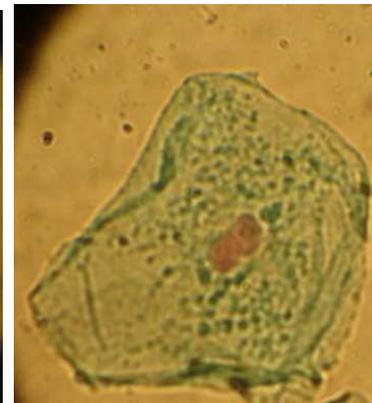
c2



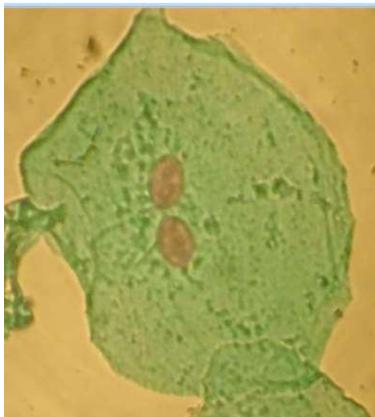
d1



d2



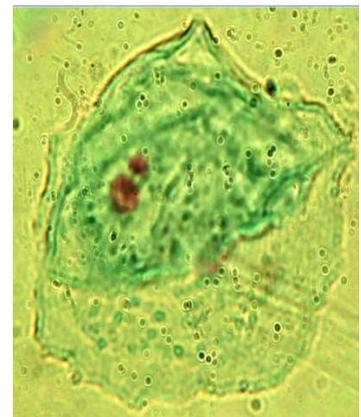
e1



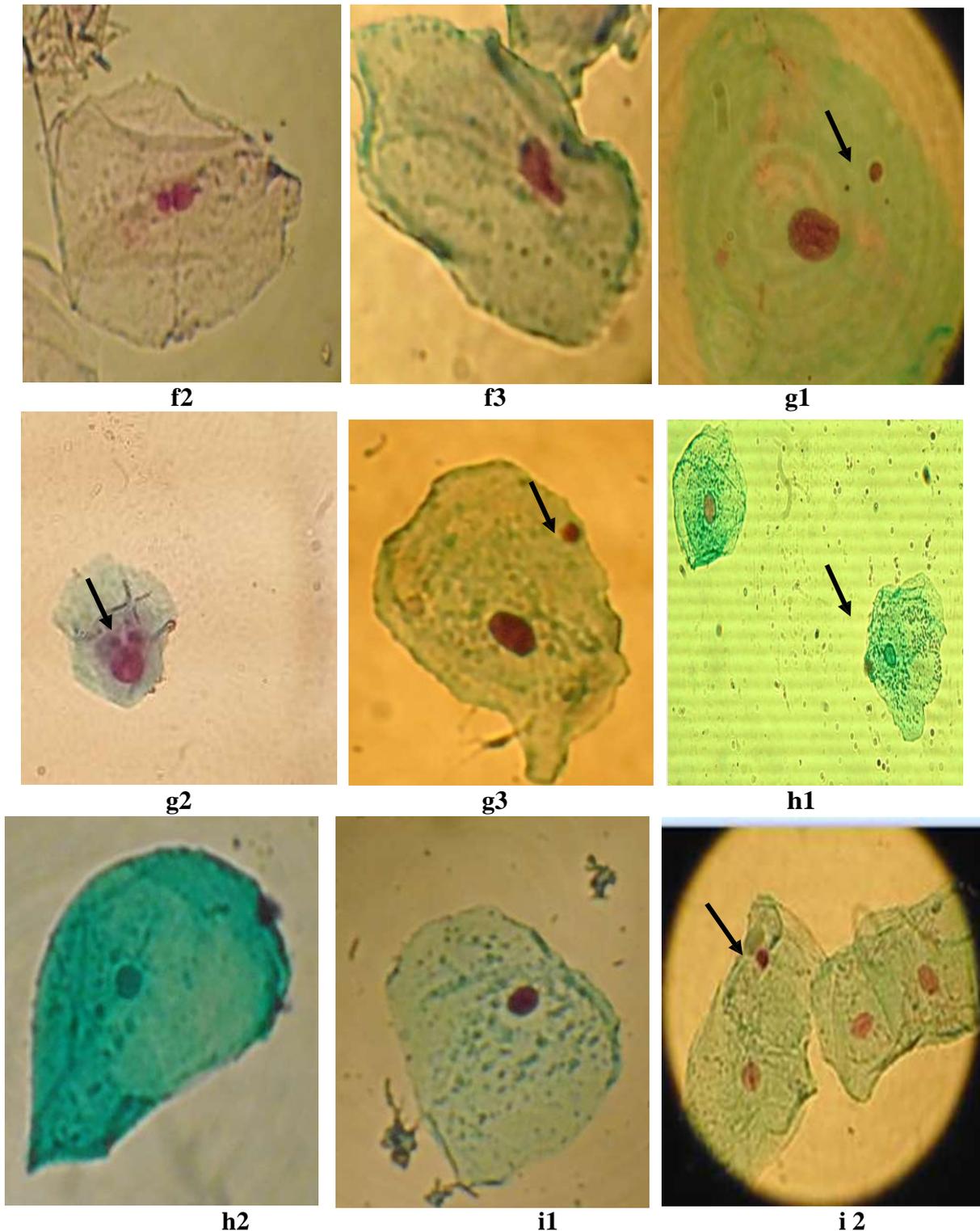
e2



e3



f1



**Figure 11: Les différentes cellules observées dans le test des micronoyaux sur les cellules buccales(X40, Microscope optique).**

**a1, a2** : Les cellules basales. **b1, b2** : Les cellules différenciées. **c1, c2** : Les cellules Caryorrhétiques. **d1, d2** : Les cellules à chromatine condensées. **e1, e 2, e3** : Les cellules Binucléées. **f1, f 2, f3** : cellule avec bourgeons nucléaires. **g1, g 2, g3** : Les cellules micronucléées. **h1, h 2**: Les cellules caryolytiques. **i1, i 2** : Les cellules pycnotiques.

### 4. Méthode de lecture des lames

Les lames sont examinées au microscope optique (Axioskop 20; Carl zeiss, Göttingen, Allemagne) équipé d'un système d'acquisition d'image, relié à un ordinateur. La lecture des lames se fait à un grossissement (x400) pour déterminer les différentes cellules et anomalies puis est confirmée au grossissement (x1000). Les lames sont codées et lues de façon séquentielle, soit verticalement soit horizontalement. La lecture commence à un angle de la lame et finie à l'angle opposé. Une ligne est suivie jusqu'au bord opposé. La lecture se fait alors en sens inverse et ainsi de suite jusqu'à atteindre le nombre de cellules à lire ou la fin de la lame.

Pour chaque individu, 1000 cellules sont examinées pour déterminer la fréquence des cellules du test de micronoyaux, ces cellules sont les cellules différenciées, basales, binucléées, à chromatine condensée, pycnotiques, caryorrhectiques ou caryolytiques. Après cette étape, la fréquence des biomarqueurs de dommages d'ADN (micronoyaux et bourgeons nucléaires) est déterminée dans au minimum 1000 cellules différenciées et basales. Toutes les lectures ont été effectuées en aveugle par rapport au groupe de sujets étudiés et par deux personnes différentes.

Pour chaque lame, les informations suivantes sont enregistrées :

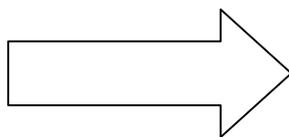
1. Le nombre de cellules basales et différenciées par 1000 cellules.
2. Le nombre de cellules à chromatine condensée, pycnotiques, caryorrhectiques et caryolytiques par 1000 cellules.
3. Le nombre des cellules binucléées par 1000 cellules.
4. Le nombre des micronoyaux et des bourgeons nucléaires dans au moins 1000 cellules différenciées et basales.
5. Les fréquences de différents types de cellules et biomarqueurs dans ce test sont exprimés pour 1000 cellules.

#### Étape 1

Dénombrement de 1000 cellules pour déterminer

La fréquence de ces types de cellules:

- Basales
- Différenciées
- Binucléées
- Chromatine condensées
- Caryorrhectiques
- Pycnotiques
- Caryolytiques



#### Étape 2

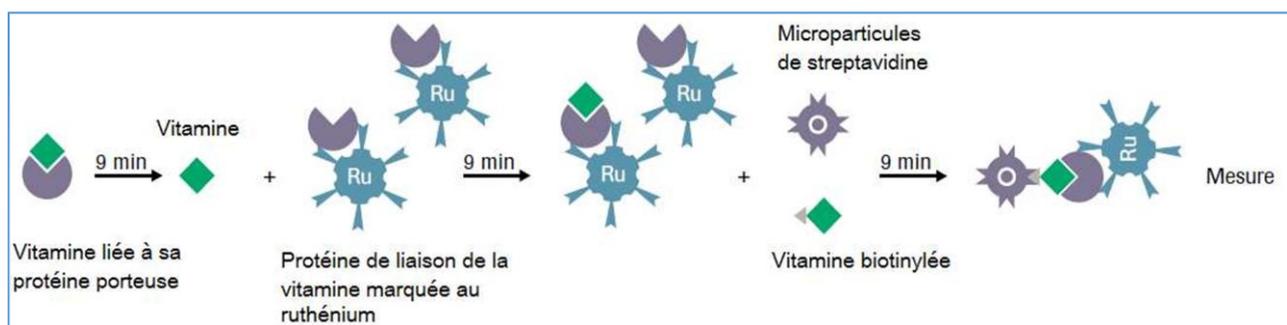
1000 cellules différenciées et basales sont examinées pour la présence des micronoyaux et des bourgeons nucléaires

**Figure 12: Diagramme décrivant la méthode de lecture dans le test BMCyt.**

## B. Dosage des vitamines

Les prélèvements ont été réalisés par ponction veineuse et sur tubes secs à jeun. La quantité de sang nécessaire est de 2 à 5ml. Le sérum a été séparé par centrifugation à 2250 g pendant 10mn. Le sérum est transporté au laboratoire sous conservation du froid. Il peut être également conservé à 4°C pour une durée maximale de 4 jours ou congelé à -20°C pour une durée maximale de 3 mois.

Le dosage des vitamines B12 et B9 a été réalisé au niveau de laboratoire d'Analyses Médicales « Ibn Rochd » à Batna. Ce dosage a été réalisé par un test immunologique par électrochimiluminescence (ECLIA) sur un automate 'Cobas 6000'. Le principe du test est d'effectuer un dosage par compétition par rapport au site de fixation de la vitamine sur sa protéine porteuse sérique. Ainsi, une première étape de dissociation de la vitamine sérique de sa protéine porteuse est réalisée, suivie de l'ajout de ruthénium qui va se fixer sur la protéine porteuse. Par la suite, de la vitamine biotinylée et des microparticules de streptavidine sont ajoutées. Une réaction de chimiluminescence permet de quantifier le complexe ruthénium-protéine porteuse dont la quantité est proportionnelle à celle de la quantité de la vitamine originelle (**Figure 13**).



**Figure 13:** Principe du test immunologique par électrochimiluminescence (ECLIA) pour le dosage des vitamines B9 ou B12.

## C. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées par le logiciel Graph Pad Prism 5. Les données sont présentées comme le nombre de cellules et de biomarqueurs pour 1000 cellules (%). Lorsque l'analyse des histogrammes à l'aide de test de normalité de Shapiro-Wilk montre des distributions non gaussiennes, les tests non paramétriques ont été utilisés dans cette étude.

Le test non paramétrique de Mann Whitney a été utilisé afin de comparer les valeurs obtenues avec les couples fertiles aux valeurs obtenues avec les couples infertiles. La variation des différents biomarqueurs du test des micronoyaux en fonction du sexe est analysée avec le test de Mann Whitney. Le test t de Student a été utilisé pour la comparaison de l'âge entre les deux groupes. La corrélation de Spearman a été réalisée pour mettre en évidence des corrélations et des liens éventuels entre les différents biomarqueurs du test des micronoyaux et l'âge. La relation entre

les vitamines et les biomarqueurs du test des micronoyaux sur les cellules buccales a été évaluée à l'aide de test de la corrélation de Spearman. Les résultats sont exprimés en valeur moyenne  $\pm$ SD (Standard Deviation). Un  $p < 0,05$  est considéré comme statistiquement significatif.

# **CHAPITRE III**

## **RESULTATS**

# I. Caractéristiques générales des sujets infertiles

Notre population est composée de 54 sujets avec infertilité idiopathique (27 couples) et 30 sujets fertiles témoins (15 couples). Les deux groupes étaient appariés selon le sexe et l'âge.

Les couples infertiles qui ont été inclus dans cette étude proviennent de deux régions géographiques différentes (Est et littoral méditerranéen) et de 5 Wilaya de l'Algérie (**Tableau 3**). Selon les régions géographiques, la wilaya de Constantine représente le pourcentage le plus élevé des patients, suivi par la wilaya d'Oum El Bouaghi.

**Tableau 3: Classification des patients en fonction de l'origine géographique.**

Wilaya	Nombre de couples infertiles
Batna	1
Constantine	21
Oum El Bouaghi	3
Guelma	1
Skikda	1

L'âge moyen des sujets infertiles était de  $36,52 \pm 6,27$  ans (24 à 52 ans) et celui des sujets fertiles était de  $34,50 \pm 6,11$  ans (23 à 51 ans). Il n'y avait pas de différence significative dans l'âge moyen des sujet fertiles et infertiles ( $p=0,157$ ). Chez les femmes infertiles, la tranche d'âge supérieure à 30 ans était la plus représentée avec une fréquence de 77,77%. Chez les hommes également cette tranche était la plus représentée avec une fréquence de 92,59%. Ceci peut s'expliquer par l'âge du mariage qui est de plus en plus tardif.

La durée d'infertilité supérieure à 5 ans était la plus représentée avec une fréquence de 66,66%. Ceci pourrait s'expliquer par le recoure de plus en plus tardif des couple à un traitement par PMA. Parmi ces couples, 44,44 % uniquement ont déjà eu recours au traitement par PMA.

Les antécédents familiaux d'infertilité ont été retrouvés chez 6 femmes uniquement soit 22,22% et chez 5 hommes soit 18,51%.

Concernant le statut professionnel, seulement 18,51% des femmes étaient fonctionnaires. Cependant 92,59 % des hommes étaient fonctionnaires.

Vingt-deux femmes soit (81,48%) ne pratiquaient pas d'activité sportive contre des 5 femmes qui faisaient du sport régulièrement ( $\geq 2$  fois par semaine) soit (18,51%), le même pourcentage a été enregistré chez les hommes.

**Tableau 4: Caractéristiques démographiques et médicales des couples infertiles.**

<b>Caractéristiques</b>		<b>Variables</b>	<b>N (%)</b>
Tranche d'âge (ans)	Femme	$\leq 25$	3 (11,12)
		26-30	3 (11,11)
		$>30$	21 (77,77)
	Homme	$\leq 25$	0 (0)
		26-30	2 (7,4)
		$>30$	25 (92,60)
Profession	Femme	Fonctionnaire	5 (18,52)
		Non Fonctionnaire	22 (81,48)
	Homme	Fonctionnaire	25 (92,6)
		Non Fonctionnaire	2 (7,40)
Antécédents familiaux d'infertilité	Femme	Oui	6 (22,23)
		Non	21 (77,77)
	Homme	Oui	5 (18,52)
		Non	22(81,48)
Durée d'infertilité (ans)	Couple	$\leq 5$	9 (33,34)
		$>5$	18 (66,66)
Tentative de FIV et d'ICSI	Couple	Oui	12 (44,45)
		Non	15 (55,55)
Activité sportive	Femme	Oui	5 (18,52)
		Non	22 (81,48)
	Homme	Oui	5 (18,52)
		Non	22 (81,48)
Lieu d'habitat	Couple	Côtier	2 (7,41)
		Rural	3 (11,11)
		Urbain	22 (81,48)

## II. Résultats du test des micronoyaux sur les cellules buccales

Nous avons étudié les fréquences des biomarqueurs du test des micronoyaux sur les cellules buccales chez le groupe témoin et le groupe de patients en déterminant le nombre total de micronoyaux (TMN), de cellules micronucléées (MNC), de bourgeons nucléaires (NBUD), de cellules basales (BAS), de cellules différenciées (DIFF), de cellules binucléées (BN), de cellules à chromatine condensée (CC), de cellules caryorrhectiques (KHC), de cellules pycnotiques (PYK) et de cellules caryolytiques (KYL).

Tout d'abord, nous avons étudié l'effet de l'âge et du sexe sur la fréquence de ces biomarqueurs chez les patients et les témoins. Les résultats se retrouvent dans les **Tableaux de 5 à 8**.

### A. Effet de l'âge dans le groupe des témoins

Les coefficients de corrélation de Spearman entre les biomarqueurs du test des micronoyaux et l'âge, montrent que seules les cellules à CC ont une association positive mais faible avec l'âge ( $r=0,372$ ,  $p=0,042$ ).

**Tableau 5: Effet de l'âge sur les biomarqueurs du test BMCyt dans le groupe de témoins.**

Biomarqueurs	Groupe des témoins	
	r	p
MNC (‰)	0,068	0,717
TMN (‰)	0,073	0,700
NBUD (‰)	0,226	0,228
DIFF	-0,157	0,404
BAS (‰)	0,178	0,345
BN (‰)	0,223	0,236
CC (‰)	0,372	<b>0,042</b>
KHC(‰)	0,307	0,097
PYK(‰)	-0,046	0,812
KYL(‰)	0,175	0,373

**Les abréviations:** r : coefficient de corrélation, TMN : nombre total des micronoyaux, MNC : cellules micronucléées, NBUD : bourgeons nucléaires, BAS : cellules basales, DIFF : différenciées, BN : binucléées, CC : à chromatine condensée, KHC : caryorrhectiques, PYK : pycnotiques, KYL : caryolytiques.

**B. Effet de l'âge dans le groupe des patients**

L'étude de l'effet de l'âge chez les patients a montré une corrélation positive mais faible également avec la fréquence de cellules BN ( $r=0,291$ ,  $p = 0,032$ ).

**Tableau 6: Effet de l'âge sur les biomarqueurs du test BMCyt dans le groupe de patients.**

Biomarqueurs	Groupe des patients	
	r	p
MNC (‰)	0,041	0,767
TMN (‰)	0,036	0,794
NBUD (‰)	0,093	0,500
DIFF	0,080	0,563
BAS (‰)	0,178	0,196
BN (‰)	0,291	0,032
CC (‰)	0,179	0,193
KHC(‰)	0,207	0,131
PYK(‰)	0,078	0,574
KYL(‰)	-0,126	0,362

**Les abréviations :** r :coefficient de corrélation, TMN : nombre total des micronoyaux, MNC : cellules micronucléées, NBUD : bourgeons nucléaires, BAS : cellules basales, DIFF : différenciées, BN : binucléées, CC : à chromatine condensé, KHC : caryorrhétiques, PYK : pycnotiques, KYL : caryolytiques.

**C. Effet du sexe dans le groupe des témoins**

Dans le groupe de témoins, les fréquences des cellules KHC et KYL étaient significativement plus élevées chez les hommes que chez les femmes ( $p=0,021$ ,  $p=0,032$ , respectivement) alors que les DIFF étaient significativement plus élevées chez les femmes que chez les hommes. Cependant, les autres biomarqueurs (MNC, TMN, NBUD, BAS, BN, CC et PYK) ne montrent pas des différences significatives entre les femmes et les hommes ( $p > 0,05$ ).

**Tableau 7: Effet du sexe sur les biomarqueurs du test des micronoyaux dans le groupe de témoins.**

Biomarqueurs	Groupe des témoins		
	Femme	Homme	p
MNC (‰)	0,83±0,89 (0-3)	1,10±1,13 (0-3,5)	0,609
TMN (‰)	0,83±0,89 (0-3)	1,20±1,36 (0-4,5)	0,594
NBUD (‰)	0,86±0,76 (0-2)	1,13±1,14 (0-4)	0,64
DIFF (‰)	862,8±73,32 (731,5-951)	796,9±72,10 (683-921,5)	<b>0,031</b>
BAS (‰)	3,93 ±2,39 (0,5-8,5)	3 ±2,146 (0-7)	0,307

BN (‰)	3,60±1,46 (2-7)	4,30±2,62 (0,5-11)	0,478
CC (‰)	0,36 ± 0,48(0-1,5)	0,6±0,91 (0-3)	0,768
KHC(‰)	0,63±0,91 (0-3)	2,36±2,19 (0-6)	<b>0,021</b>
PYK(‰)	2,90±1,49 (1,5-6)	2,26±1,59 (0-5)	0,216
KYL(‰)	125,8±72,10 (42-258,5)	190,5±71,05 (66-302,5)	0,032

**Les abréviations :** TMN : nombre total des micronoyaux, MNC : cellules micronucléées, NBUD : bourgeons nucléaires, BAS : cellules basales, DIFF : différenciées, BN : binucléées, CC : à chromatine condensé, KHC : caryorrhectiques, PYK : pycnotiques, KYL : caryolytiques.

#### D. Effet du sexe dans le groupe de patients

Chez les patients, le sexe n'a aucun effet sur la fréquence des biomarqueurs du test des micronoyaux ( $p > 0,05$ ).

**Tableau 8: Effet du sexe sur les biomarqueurs du test des micronoyaux dans le groupe de patients.**

Biomarqueurs	Groupe des patients		
	Femme	Homme	p
MNC (‰)	2,62±2,82 (0-9)	2,16±2,37 (0-9)	0,859
TMN (‰)	3,08±3,93 (0-14)	2,64±3,49 (0-13)	0,643
NBUD (‰)	2,29± 2,63(0-11)	1,87±1,81 (0-9)	0,826
DIFF (‰)	794,4±70,78 (687-935,5)	793,4±76,13 (668-903,5)	1,000
BAS (‰)	2,96±0,64 (0-12)	3,01±1,789 (0,5-7)	0,208
CBN (‰)	7,333±3,11 (3-15)	7,741±3,378 (2-17)	0,493
CC (‰)	1,33±1,201 (0-4)	1,85±2,23 (0-11)	0,544
KHC(‰)	3,00±3,39 (0-14)	4,37±4,21(0-14)	0,172
PYK(‰)	3,81 ±2,62 (0-12)	5,09 ±2,96 (1-14)	0,081
KYL(‰)	187,4±70,39 (53-297,0)	184,5±71,87 (80-293)	0,889

**Les abréviations :** TMN : nombre total des micronoyaux, MNC : cellules micronucléées, NBUD : bourgeons nucléaires, BAS : cellules basales, DIFF : différenciées, BN : binucléées, CC : à chromatine condensé, KHC : caryorrhectiques, PYK : pycnotiques, KYL : caryolytiques.

#### E. Comparaison des résultats du test des micronoyaux entre les deux groupes d'étude

Les biomarqueurs du test des micronoyaux ont été analysés de manière comparative entre le groupe de patients et celui des témoins. Ces biomarqueurs ont été évalués par couple (les données des femmes et des hommes ont été analysées en ensemble) et par individu (les données de chaque membre du couple ont été analysées séparément). Les résultats détaillés du test des micronoyaux des deux groupes d'étude sont représentés dans le **Tableau 9** et le **Tableau 10**.

**1. Evaluation par individu**

Les résultats du test des micronoyaux évalués par individu dans les deux groupes d'étude montrent que les sujets infertiles ont une fréquence plus élevée de micronoyaux TMN que les sujets fertiles ( $2,96 \pm 3,71\%$ ,  $1,01 \pm 1,14\%$ ,  $p = 0,009$ , respectivement). Le taux de cellules micronucléées MNC était approximativement 3 fois plus élevé chez les sujets infertiles ( $2,45 \pm 2,64\%$ ) que chez les témoins ( $0,96 \pm 1,01\%$ ) et cette différence était statistiquement significative ( $p = 0,009$ ). En plus, la fréquence de bourgeons nucléaires NBUD était significativement plus élevée chez les sujets infertiles ( $p = 0,003$ ).

La différence la plus forte a été constatée dans les cellules binucléées BN ( $p < 0,0001$ ), dont la fréquence a été significativement plus élevée chez les sujets infertiles.

Parmi les cellules reflétant des événements de la mort cellulaire, les cellules à chromatine condensé CC, les cellules caryorrhétiques KHC et les cellules pycnotiques PYK étaient significativement plus fréquentes chez les patients. Cependant, les cellules caryolytiques KYL n'ont pas montré une différence significative. Les cellules basales BAS et différenciées DIFF, biomarqueurs de la prolifération cellulaire, étaient plus fréquentes chez les sujets infertiles; cependant, cette différence n'a atteint pas la signification statistique ( $p > 0,05$ ), (**Tableau 9**).

**Tableau 9: Comparaison des biomarqueurs du test BMCyt entre les sujets infertiles et les témoins fertiles évalués par individu.**

			Infertile (n=54)	Témoins (n=30)	p
<b>Biomarqueurs</b>	Instabilité Chromosomique	MNC	2,45± 2,64(0-9)	0,96±1,01 (0-3,5)	<b>0,009</b>
		TMN	2,96±3,71 (0-14)	1,01±1,14 (0-4,5)	<b>0,009</b>
		NBUD	2,08±2,25 (0-11)	1.00± 0,96 (0-4,0)	<b>0,003</b>
	Prolifération Cellulaire	BAS	2,99±2,66 (0-12)	3,46±2,28 (0-9)	0,183
		DIFF	793,9±72,81 (668-935,5)	829,8±78,92 (683-951)	0,056
	Echec de la cytotéière	BN	7,53±3,22 (2-17)	3,95±2,11 (0,5-11)	<b>&lt; 0,0001</b>
	Mort cellulaire	CC	1,59±1,79 (0-11)	0,48±0,72 (0-3)	<b>0,0001</b>
		KHC	3,68± 3,85 (0-14)	1.50±1,87 (0-6)	<b>0,003</b>
		PYK	4,45±2,84 (0-14)	2.58±1,54 (0-6)	<b>0,001</b>
		KYL	186 ± 70.48 (53-297)	158,2±77,65 (42-302,5)	0,100

**Les abréviations :** TMN : nombre total des micronoyaux, MNC : cellules micronucléées, NBUD : bourgeons nucléaires, BAS : cellules basales, DIFF : différenciées, BN : binucléées, CC : à chromatine condensé, KHC : caryorrhétiques, PYK : pycnotiques, KYL : caryolytiques.

**2. Evaluation par couple**

Comme représenté dans le **Tableau 10**, des résultats identiques ont été obtenus quand les données ont été analysées par couple. Les fréquences des micronoyaux TMN et des cellules micronucléées MNC, lorsqu'elles sont évaluées par couple, étaient statistiquement significatives par rapport aux couples fertiles ( $p = 0,019$ ,  $p = 0,021$ , respectivement). Une différence significative dans la fréquence des bourgeons nucléaires NBUD a été également détectée entre les couples fertiles et infertiles ( $p = 0,013$ ). La fréquence de cellules binucléées BN a montré la différence la plus prononcée entre les couples fertiles et infertiles. ( $p < 0,0001$ ). Les cellules à chromatine condensé CC, les cellules caryorrhectiques KHC et les cellules pycnotiques PYK étaient significativement plus fréquentes chez les couples infertiles. Aucune différence significative n'a été constatée dans les fréquences des cellules basales BAS, différenciées DIFF et caryolytiques KYL entre les couples fertiles et les couples infertiles.

**Tableau 10: Comparaison des biomarqueurs du test BMCyt entre les sujets infertiles et les témoins fertiles évalués par couple.**

			Infertile (n=27)	Témoins (n=15)	p
<b>Biomarqueurs</b>	Intabilité Chromosomique	MNC	4,90±4,59 (0-18)	1,93±1,42 (0-4)	<b>0,019</b>
		TMN	5,92±6,82 (0-27)	2,03 ±1,62 (0-5,5)	<b>0,021</b>
		NBUD	4,16±4,07 (1-17)	2,00±1,51 (0,5-5)	<b>0,013</b>
	Prolifération Cellulaire	BAS	5,98±4,55 (0,5-19)	6,93±2,91 (0,5-10,5)	0,197
		DIFF	1558±113,1 (1363-1785)	1660±116,2 (1453-1845)	0,0982
	Echec de la cytodièrese	BN	15,07±5,57 (6,5-28,00)	7,90±3,40 (3,5-18)	<b>&lt; 0,0001</b>
	Mort cellulaire	CC	3,18±3,16 (0-15)	0,96±0,97 (0-3)	<b>0,0026</b>
		KHC	7,37±6,81 (0-22)	3,00±2,08 (0-6)	<b>0,034</b>
		PYK	8,90±4,97 (1-22)	5,16±1,99 (2-8)	<b>0,008</b>
		KYL	372,0±105,6 (180,5-563)	316,3±114,5 (140-519,5)	0,198

**Les abréviations :** TMN : nombre total des micronoyaux, MNC : cellules micronucléées, NBUD : bourgeons nucléaires, BAS : cellules basales, DIFF : différenciées, BN : binucléées, CC : à chromatine condensé, KHC : caryorrhectiques, PYK : pycnotiques, KYL : caryolytiques.

### III. Résultats de l'étude de corrélation entre les vitamines B12 et B9 et les biomarqueurs du test des micronoyaux sur les cellules buccales

Cette partie a pour but de déterminer une éventuelle corrélation entre les biomarqueurs de l'instabilité chromosomique et de la mort cellulaire observés chez nos patients (couple avec une infertilité idiopathique) et la concentration sanguine en vitamine B9 (folates) et B 12. Pour cette raison, nous avons réalisé un dosage de vitamines B9 et B12 dans le groupe des couples infertiles.

Les données brutes des dosages montrent une moyenne de vitamine B9 qui est de  $7,4 \pm 4,16$  ng/ml chez les femmes et de  $6,70 \pm 3,92$  ng/ml chez les hommes. En ce qui concerne les taux de vitamine B12, nous avons trouvé une moyenne de  $362,45 \pm 199,46$  pg/ml chez les femmes et de  $397,49 \pm 249,51$  pg/ml chez les hommes.

L'évaluation des taux des vitamines B12 et B9 a permis d'enregistrer des valeurs qui se situent dans les limites de la normale (4,84 à 14,96 ng/ml pour les folates et 191 à 946 pg/ml pour la vitamine B12) mais aussi des valeurs inférieures à ces seuils. En effet, 14,81% des femmes (8 parmi les 54 individus) et 24,07% des hommes (13 parmi les 54 individus) ont des carences en folates et 12,96% des femmes (7 parmi les 54 individus) et 12,96% des hommes (7 parmi les 54 individus) ont des carences en vitamine B12.

Les valeurs des folates et de la vitamine B12 sont indépendantes des facteurs comme le sexe et l'âge. Par ailleurs, comme il est attendu, le test de corrélation a révélé un lien étroit entre ces deux vitamines ( $r = 0,2971$ ,  $p = 0,0291$ ).

**Tableau 11: Comparaison des concentrations des folates et de vitamine B12 entre les hommes et les femmes infertiles**

	Femmes	Hommes	p
Folates (ng/ml)	$7,939 \pm 4,160$	$6,704 \pm 3,918$	0,303
Vitamine B12 (pg/ml)	$362,4 \pm 199,5$	$397,5 \pm 249,5$	0,822

**Tableau 12: Etude de la corrélation entre l'âge et les concentrations des folates et de la vitamine B12.**

	r	p
Folates (ng/ml)	-0,015	0,911
Vitamine B12 (pg/ml)	-0,068	0,624

**A. Corrélation entre les biomarqueurs du test des micronoyaux et la vitamine B 9 (folates)**

Nous avons étudié la corrélation de la concentration de la vitamine B9 avec les biomarqueurs de test des micronoyaux dans le groupe de patients en faisant l'analyse chez 4 sous-groupes comme suit :

- Les femmes infertiles (27 sujets)
- Les hommes infertiles (27 sujets)
- Les individus infertiles (54 sujets)
- Les couples (femme + homme soit 27 couples) (Tableau 13).

Les résultats de la corrélation avec la vitamine B9 (folates) chez les femmes infertiles montrent que le nombre total de micronoyaux (TMN) et la fréquence des cellules micronucléées (MNC) étaient significativement et négativement corrélés à la concentration sanguine de folates ( $r=-0,569$ ,  $p=0,0019$ ,  $r=-0,578$ ,  $p=0,0016$  ; respectivement). Les bourgeons nucléaires (NBUD) étaient, eux aussi, significativement et négativement corrélés aux valeurs de la vitamine B9 ( $r=-0,3911$ ,  $p=0,0437$ ). Les cellules basales (BAS) et différenciées (DIFF), biomarqueurs de la prolifération cellulaire, n'ont aucune corrélation significative avec la vitamine B9. De même, aucune corrélation significative n'a été constaté entre les cellules à chromatine condensée (CC), les cellules pycnotiques (PYK), les cellules caryorrhétiques (KHC) et les cellules caryolytiques (KYL) et les teneurs sanguines en acide folique.

Chez les hommes infertiles, les résultats montre l'existence d'une corrélation négative et fortement significative ( $r = -0,634$ ;  $p = 0,0004$ ) entre les micronoyaux (TMN) et la concentration sanguine en folates. Une corrélation négative très nette ( $r = -0,621$ ;  $p = 0,0005$ ) entre les cellules micronucléées (MNC) et le taux sanguin en folates a été également notée. Les bourgeons nucléaires (NBUD) ont montré également une corrélation négative et significative ( $r = -0,4085$ ;  $p = 0,0344$ ). En plus des biomarqueurs de l'instabilité chromosomique (TMN, MNC et NBUD), nous avons trouvé également une corrélation positive et statistiquement significative entre les cellules différenciées (DIFF) et les folates ( $r = 0,417$ ;  $p = 0,0301$ ). Parmi les cellules reflétant la mort cellulaire, seules les cellules caryolytiques (KYL) ont montré une corrélation négative et statistiquement significative avec les folates ( $r = -0,4118$ ;  $p = 0,032$ ). Par contre, nous n'avons pas trouvé de corrélation significative entre les autres biomarqueurs et les folates.

Lorsque la corrélation a été étudiée par individu, une corrélation très hautement significative et négative a été constatée entre les micronoyaux (TMN) et les cellules micronucléées (MNC) d'un côté et la concentration sanguine en folates d'un autre côté ( $r = -0,589$ ;  $p = <0,0001$ ,  $r = -0,5958$ ;  $p = <0,0001$ , respectivement). Une corrélation négative et significative a été également observée entre

la fréquence des bourgeons nucléaires (NBUD) et la concentration sérique en folates ( $r = -0,4191$ ;  $p = 0,0016$ ). Nous n'avons mis aucune évidence de corrélation significative entre les autres biomarqueurs et la concentration sanguine en folates.

Lorsque la corrélation a été étudiée par couple, nous avons trouvé une corrélation négative et statistiquement significative entre les micronoyaux (TMN) et les cellules micronucléées (MNC) et les folates ( $r = -0,590$ ;  $p = 0,0012$ ,  $r = -0,587$ ;  $p = 0,0013$ , respectivement). Nous n'avons pas trouvé de corrélation concernant les autres biomarqueurs.

En conclusion, les micronoyaux (TMN) et les cellules micronucléées (MNC) représentent les biomarqueurs les mieux corrélés avec les folates, suivis par les bourgeons nucléaires (NBUD). Pour les biomarqueurs de la prolifération cellulaire, seules les cellules différenciées (DIFF) étaient significativement corrélées avec les folates (cas des hommes infertiles). Concernant les biomarqueurs de la mort cellulaire, la corrélation significative a été notée uniquement dans les cellules caryolytiques (KYL) (cas des hommes infertiles).

**Tableau 13: Etude de la corrélation entre les biomarqueurs du test des micronoyaux et les folates.**

	Femme		Homme		Individu		Couple	
	r	P	r	P	r	P	r	P
<b>MNC</b>	-0,578	<b>0,0016</b>	-0,621	<b>0,0005</b>	-0,5958	<b>&lt;0,0001</b>	-0,587	<b>0,0013</b>
<b>TMN</b>	-0,569	<b>0,0019</b>	-0,634	<b>0,0004</b>	-0,589	<b>&lt;0,0001</b>	-0,590	<b>0,0012</b>
<b>NBUD</b>	-0,391	<b>0,0437</b>	-0,408	<b>0,0344</b>	-0,419	<b>0,0016</b>	-0,354	0,069
<b>DIFF</b>	-0,2204	0,269	0,417	<b>0,0301</b>	0,091	0,509	0,229	0,2506
<b>BAS</b>	-0,319	0,104	-0,056	0,778	-0,212	0,122	-0,274	0,165
<b>BN</b>	-0,226	0,256	-0,142	0,477	-0,212	0,122	-0,1702	0,395
<b>CC</b>	-0,054	0,786	0,3401	0,082	0,121	0,359	0,312	0,112
<b>KHC</b>	-0,208	0,296	-0,222	0,265	-0,225	0,1005	-0,209	0,294
<b>PYK</b>	-0,207	0,298	0,034	0,862	-0,138	0,319	-0,092	0,647
<b>KYL</b>	0,291	0,139	-0,411	<b>0,032</b>	-0,052	0,706	-0,227	0,254

**Les abréviations :** r : coefficient de corrélation, TMN : micronoyaux, MNC : cellules micronucléées, NBUD : bourgeons nucléaires, BAS : cellules basales, DIFF : différenciées, BN : binucléées, CC : à chromatine condensé, KHC : caryorrhétiques, PYK : pycnotiques, KYL : caryolytiques.

### **B. Corrélation entre les biomarqueurs du test des micronoyaux et la vitamine B 12**

Les résultats de la corrélation entre les biomarqueurs du test des micronoyaux et la vitamine B12 pour les sous-groupes : femmes, hommes, individus pris séparément et couples, sont représentés dans le **Tableau 14**.

Dans le cas de la vitamine B12, les biomarqueurs de l'instabilité chromosomique (TMN, MNC, et NBUD) étaient négativement corrélés à la concentration sanguine en vitamine B12 chez les femmes infertiles. En plus, nous avons trouvé une corrélation négative et statistiquement significative entre les cellules binucléés (biomarqueurs de l'échec de la cytocinèse) et la concentration sanguine en vitamine B 12 (R = -0,520; p = 0,005).

Dans le groupe hommes et le groupe couples, seuls les biomarqueurs de l'instabilité chromosomique (TMN, MNC et NBUD) étaient significativement et négativement corrélés à la concentration sanguine en vitamine B12.

Lorsque l'étude de la corrélation a été réalisée par individu, nous avons trouvé des résultats similaires aux résultats obtenus chez les femmes infertiles, c.-à-d. les micronoyaux (TMN), les cellules micronucléées (MNC), les bourgeons nucléaires (NBUD) et les cellules binucléés (BN) étaient significativement et négativement corrélés à la concentration sanguine en vitamine B12.

Comme conclusion, les biomarqueurs de l'instabilité chromosomique (micronoyaux, cellules micronucléées et bourgeons nucléaires) représentent la corrélation la plus forte avec la vitamine B12, suivis par les biomarqueurs de l'échec de cytocinèse (cellules binucléées). Les biomarqueurs de la prolifération cellulaire (cellules différenciées et les cellules basales) et les biomarqueurs de la mort cellulaire (cellules à chromatine condensée, cellules pycnotiques, les cellules caryorrhétiques et les cellules caryolytiques) ne présentent pas de corrélation avec la vitamine B12.

**Tableau 14: Etude de la corrélation entre les biomarqueurs du test des micronoyaux et la vitamine B 12.**

	Femme		Homme		Individu		Couple	
	r	P	r	P	r	P	r	P
MNC	-0,5403	<b>0,0036</b>	-0,555	<b>0,0026</b>	-0,547	<b>&lt;0,0001</b>	-0,548	<b>0,003</b>
TMN	-0,525	<b>0,0049</b>	-0,5703	<b>0,0019</b>	-0,553	<b>&lt;0,0001</b>	-0,561	<b>0,002</b>
NBUD	-0,432	<b>0,0243</b>	-0,486	<b>0,0101</b>	-0,448	<b>0,0007</b>	-0,554	<b>0,002</b>
DIFF	-0,236	0,234	0,0068	0,972	0,053	0,7005	-0,032	0,8703
BAS	-0,203	0,308	0,0757	0,707	-0,069	0,616	-0,072	0,719
BN	-0,520	<b>0,0054</b>	-0,1004	0,618	-0,303	<b>0,024</b>	-0,303	0,123
CC	0,116	0,546	-0,1404	0,485	-0,006	0,963	0,026	0,894
KHC	0,114	0,568	-0,3772	0,052	-0,1464	0,289	-0,170	0,396
PYK	-0,005	0,979	0,0549	0,785	0,043	0,753	0,156	0,434
KYL	0,252	0,203	0,0201	0,9205	0,127	0,3602	0,059	0,769

**Les abréviations :** r : coefficient de corrélation, TMN : micronoyaux, MNC : cellules micronucléées, NBUD : bourgeons nucléaires, BAS : cellules basales, DIFF : différenciées, BN : binucléées, CC : à chromatine condensé, KHC : caryorrhétiques, PYK : pycnotiques, KYL : caryolytiques.

# **CHAPITRE IV**

## **DISCUSSION**

Le test des micronoyaux est l'une des meilleures techniques cytogénétiques pour évaluer l'instabilité chromosomique chez l'homme (Thomas, Holland et al. 2009; Bolognesi and Fenech 2013). En plus de sa capacité à détecter les micronoyaux (révélant cassures ou pertes chromosomiques) (Fenech 2007), ce test peut apporter d'autres mesures de génotoxicité et de cytotoxicité. En effet, il permet de mesurer les biomarqueurs de dommages d'ADN (micronoyaux et bourgeons nucléaires), de défauts de cytocinèse (cellules binucléées), de la prolifération cellulaire (cellules basales et différenciées) et de la mort cellulaire (cellules à chromatine condensé, cellules caryorrhétiques, cellules pycnotiques et cellules caryolytiques ) (Thomas, Holland et al. 2009; Bolognesi and Fenech 2013; Bolognesi, Roggieri et al. 2015). Ces biomarqueurs peuvent être évalués facilement dans les érythrocytes, les lymphocytes et les cellules épithéliales exfoliées buccales, nasales ou urothéliales (Holland, Bolognesi et al. 2008).

Le test des micronoyaux sur les cellules buccales (The Buccal Micronucleus Cytome, BMCy) est une approche utile et peu invasive (Thomas, Holland et al. 2009; Bolognesi and Fenech 2013). Il a également l'avantage d'être réalisé sans nécessité d'induire une division nucléaire par cultures cellulaires ex vivo, contrairement aux tests cytogénétiques basés sur l'analyse des chromosomes en métaphase, tels que le test d'échanges de chromatides-sœurs et le test des aberrations chromosomiques (Holland, Bolognesi et al. 2008), sans oublier le fait qu'il soit également, aussi sensible que ce dernier examen (Müller and Streffer 1994; Fenech 1997).

Malgré ces avantages, l'utilisation de ce test était limitée à l'évaluation des dommages génomiques induits par les facteurs liés au mode de vie, les professions et le régime alimentaire (Fenech 2011) mais nullement pour évaluer l'infertilité des couples. Ainsi, dans cette étude, nous avons utilisé ce test pour étudier, pour la première fois, la prévalence de ses biomarqueurs dans le contexte de l'infertilité idiopathique. Notre étude est aussi la première évaluation de l'instabilité chromosomique par le test des micronoyaux sur les cellules buccales dans une population algérienne.

### **Le test des micronoyaux sur les cellules buccales dans le groupe de sujets fertiles**

La fréquence spontanée des micronoyaux dans les lymphocytes humains en culture ainsi que dans les cellules exfoliées reflète les dommages génétiques accumulés survenant dans ces cellules au cours de leur vie (Trkova, Kapras et al. 2000; Yesilada, Sahin et al. 2006). Par conséquent, la détermination de la fréquence spontanée des micronoyaux dans une population témoin est d'une grande importance car elle sert de base pour estimer l'étendue des dommages génomiques dans les situations pathologiques.

Notre étude sur les cellules buccales humaines, via le test de numération des micronoyaux (BMCyt), a permis de définir les fréquences des différents biomarqueurs étudiés dans le groupe de témoins. Beaucoup de nos résultats dans ce groupe de témoins étaient en accord avec ceux décrits dans le projet des micronoyaux humains sur les cellules buccales exfoliées (HUMN<sub>XL</sub> project) qui a rassemblé les données de 30 laboratoires dans le monde entier et qui a établi des valeurs de référence pour ce test (Bonassi, Coskun et al. 2011). Ainsi, la fréquence spontanée (niveau de base) des cellules micronucléées est en moyenne de 0,96‰ dans notre étude. Ce résultat est en accord avec les résultats de la collaboration internationale du projet des micronoyaux sur les cellules buccales (HUMN<sub>XL</sub> project) où la fréquence spontanée de cellules micronucléées varie entre 0,3 et 1,7‰ (Bonassi, Coskun et al. 2011). Ceci est une validation importante de notre test car il est bien connu que la fréquence spontanée des micronoyaux dans les cellules buccales est inférieure à celle des lymphocytes et cette caractéristique offre un niveau de base faible facilitant ainsi l'observation des dommages du génome dans les cellules buccales (Fenech, Holland et al. 2011).

De plus, nous n'avons pas trouvé un effet du sexe sur les fréquences des cellules micronucléées (MNC) et des micronoyaux (TMN) dans le groupe de témoins ce qui est en accord avec plusieurs études antérieures (Fenech 1999; Holland, Bolognesi et al. 2008; Bonassi, Coskun et al. 2011).

Il a été décrit, dans le projet HUMN<sub>XL</sub>, que l'âge est une variable significative influençant le taux des micronoyaux avec une élévation de la fréquence des micronoyaux avec l'âge (Bonassi, Coskun et al. 2011). Cependant, l'analyse statistique de nos résultats n'a pas révélé un effet de l'âge sur les fréquences des cellules micronucléées et des micronoyaux chez les sujets témoins. Cela pourrait être expliqué par la différence importante de la taille des échantillons entre notre étude et l'étude collaborative entre les laboratoires dans le projet HUMN<sub>XL</sub>. Nos résultats pourraient être expliqués également par l'écart d'âge qui est relativement réduit dans le groupe de témoins, étant donné qu'il dérive d'une population de sujets fertiles.

De même, les fréquences spontanées des cellules binucléées, caryorrhétiques et pycnotiques et des bourgeons nucléaires chez les sujets témoins étaient proches de celles rapportées dans le projet HUMN<sub>XL</sub>. Il n'y a eu aucun effet du sexe ou de l'âge sur la fréquence des cellules binucléées et des bourgeons nucléaires comme il a été décrit dans le projet HUMN<sub>XL</sub> (Bonassi, Coskun et al. 2011). De même, l'effet du genre a été constaté dans les cellules caryorrhétiques avec une augmentation significative chez les hommes, ce qui est conforme au projet HUMN<sub>XL</sub> (Bonassi, Coskun et al. 2011).

Il n'était pas possible de comparer nos résultats sur des cellules caryolytiques, à chromatine condensé, différenciées et basales avec ceux de l'étude collaborative parce que les critères de

sélection définitifs pour ces cellules ont été décrits par Thomas et al (Thomas, Holland et al. 2009) peu de temps avant la publication des résultats du projet de HUMN<sub>XL</sub> qui ne les a, ainsi, pas rapportées (Bonassi, Coskun et al. 2011).

### **La comparaison des différents biomarqueurs entre le groupe fertile et le groupe infertile**

Dans la présente étude, nous avons évalué les différents biomarqueurs par individus (chaque sujet du couple est considéré séparément, 54 sujets infertiles et 30 sujets fertiles) et par couple (femme+homme, 27 couples infertiles et 15 couples fertiles).

Les fréquences des cellules micronucléées (MNC) et celle des micronoyaux (TMN) étaient significativement plus élevées chez les sujets infertiles que les sujets fertiles. Quand elles sont évaluées par couple, les fréquences des MNC et celle des TMN étaient, encore une fois, augmentées significativement chez les couples infertiles que les couples fertiles.

Les micronoyaux sont de petites entités extranucléaires. Ils peuvent être constitués de chromosomes entiers lorsque l'appareil mitotique présente des anomalies de fonctionnement entraînant la perte de chromosomes entiers. Ils représentent alors la conséquence d'une altération des structures cellulaires impliquées dans la disjonction, la ségrégation et la migration des chromosomes (effet aneugènes) (Fenech, Crott et al. 1999; Fenech 2007; Holland, Bolognesi et al. 2008; Fenech, Kirsch-Volders et al. 2011). Il peut s'agir également d'un fragment acentriques consécutif à une cassure double brin de la molécule d'ADN (effet clastogène) (Majer, Laky et al. 2001; Fenech 2007; Fenech, Kirsch-Volders et al. 2011). Par conséquent, nos résultats indiquent une relation possible entre l'instabilité chromosomique, mesurés comme fréquence de micronoyaux et des cellules micronucléées, et l'infertilité idiopathique. Trovka et al ont obtenu des résultats similaires, mais dans les lymphocytes périphériques des couples présentant une infertilité idiopathique (Trkova, Kapras et al. 2000). Milošević-Djordjević et al ont rapporté une augmentation de la fréquence des micronoyaux dans les lymphocytes périphériques des hommes et des femmes présentant des étiologies divers de l'échec de la reproduction (Milosevic-Djordjevic, Stosic et al. 2012).

La corrélation des fréquences de micronoyaux dans les cellules buccales exfoliées avec celles dans les lymphocytes périphériques a été rapportée dans de nombreux cas (Ceppi, Biasotti et al. 2010). Cela pourrait s'expliquer par le fait que les défauts héréditaires dans le maintien du génome sont systémiques et se produisent dans tous les tissus, ce qui pourrait faire que les deux types de cellules partagent la même hérédité concernant les mécanismes de réparation de l'ADN. Les micronoyaux sont exprimés dans les cellules basales proches de la circulation sanguine, ce qui les expose à presque les mêmes substances que les lymphocytes (Thomas, Holland et al. 2009;

Bonassi, Coskun et al. 2011; Fenech, Kirsch-Volders et al. 2011). De plus, bien que les différences dans la cinétique de réplication et dans la demi-vie entre les cellules buccales et les lymphocytes puissent affecter l'expression des micronoyaux, ces différences deviennent sans importance dans les situations d'exposition chronique. En effet, l'exposition chronique conduit à un niveau stable d'expression élevée de micronoyaux, quel que soit le taux de division, si la période d'exposition dépasse la période d'une division nucléaire, à savoir 20 à 30 h (Fenech 2002). La corrélation des fréquences de micronoyaux dans les cellules buccales exfoliées avec celles dans les lymphocytes périphériques en plus des avantages du test BM Cyt (non invasivité, facilité de conservation des échantillons avant et après traitement et absence de besoin de réplication cellulaire ex vivo) (Bonassi, Coskun et al. 2011; Fenech, Holland et al. 2011), fournissent davantage de validation pour l'utilisation de ce test en tant que détecteur des biomarqueurs des dommages de l'ADN dans les cellules épithéliales.

En plus des micronoyaux et des cellules micronucléées, nous avons mis en évidence une augmentation significative dans la fréquence des bourgeons nucléaires (NBUB) et des cellules binucléées (BN) dans le groupe infertile.

Les NBUD ont été associés à des événements d'instabilité chromosomique (Fenech, Kirsch-Volders et al. 2011). Le mécanisme menant à leur formation n'est pas connu mais il pourrait être lié à l'élimination de l'ADN amplifié et / ou des complexes de réparation de l'ADN (Shimizu, Itoh et al. 1998; Nersesyan 2005).

Quant aux BN, le mécanisme le plus probable de leur formation est l'échec ou l'arrêt de la cytokinèse, soit par des défauts de formation de l'anneau des microfilaments, soit par arrêt du cycle cellulaire dû à une malségrégation des chromosomes ou à un dysfonctionnement des télomères (Shi and King 2005; Thomas, Holland et al. 2009; Bolognesi and Fenech 2013). Il a été observé que la non-disjonction chromosomique se produit avec un taux plus élevé dans les cellules BN qui ne parviennent pas à compléter la cytokinèse plutôt que dans les cellules qui ont terminé la cytokinèse (Shi and King 2005). En outre, il a été observé que les cellules épithéliales humaines présentant un dysfonctionnement des télomères sont plus susceptibles de devenir des cellules tétraploïdes suite à un échec de cytokinèse en raison de la persévérance des ponts d'anaphase dans le plan de clivage (Pampalona, Frias et al. 2012). Thomas et al, ont montré également que les patients atteints du syndrome de Down, qui est caractérisé par un taux anormal d'aneuploïdie, présentaient une fréquence deux fois plus élevée de cellules binucléées dans les cellules buccales par rapport au groupe de témoins. Les auteurs ont suggéré aussi que le ratio cellules binucléées / cellules mononucléées est un biomarqueur utile indiquant l'échec de la cytokinèse et le risque d'aneuploïdie (Thomas, Harvey et al. 2008). Ainsi, la présence de ces cellules est bien associée à un taux élevé

d'aneuploïdie, et il est bien connu que l'aneuploïdie est impliquée dans de nombreux cas d'infertilité idiopathique (Esteves 2013).

Par conséquent, nous pouvons dire que nos résultats démontrent une instabilité génomique par le biais d'une augmentation des fréquences des TMN, des MNC ainsi que des NBUD et des BN.

Nos résultats ont révélé également une augmentation significative des fréquences des cellules à chromatine condensé (CC), caryorrhétiques (KHC) et pycnotiques (PYK) dans le groupe des couples avec infertilité idiopathique par rapport au groupe témoins. Les cellules CC et KHC correspondent à des stades précoces et tardifs d'apoptose, respectivement, alors que les cellules PYK représentent une étape intermédiaire de la mort cellulaire (Thomas, Holland et al. 2009; Bonassi, Coskun et al. 2011) ou un mécanisme alternatif de désintégration nucléaire différent de celui des CC et des KHC (Chen, Arjomandi et al. 2006; Holland, Bolognesi et al. 2008). Les trois types de cellules (CC, KHC et PYK) sont associées à la fois à la cytotoxicité (nécrose et kératinisation) et à la génotoxicité (apoptose). Des niveaux élevés de ces cellules reflètent une lésion cellulaire. L'apoptose peut jouer un rôle de surveillance par lequel les cellules présentant des dommages génétiques sont éliminées. Ainsi, un excès dans les niveaux d'apoptose peut être considéré comme un indicateur de lésion génotoxique (Tolbert, Shy et al. 1992). D'ailleurs, plusieurs études rapportent que la plupart des agents aneugènes et clastogènes sont de bons inducteurs à la fois des micronoyaux et de l'apoptose (Elhajouji, Van Hummelen et al. 1995; Elhajouji, Tibaldi et al. 1997; Decordier, Cundari et al. 2005). L'apoptose, en elle-même, est impliquée dans l'élimination sélective des cellules endommagées et ce phénomène est observé pour les cellules ayant des micronoyaux contenant aussi bien des chromosomes complets ou partiels que des fragments chromosomiques acentriques, de l'ADN amplifié (Shimizu, Shimura et al. 2000).

Par conséquent, nous pouvons dire que nos résultats sur les biomarqueurs de mort cellulaire corroborent avec l'importance d'instabilité génomique dans le groupe des couples ayant une infertilité idiopathique.

### **Origine d'instabilité génomique observée dans le groupe des infertiles**

Les connaissances actuelles sur les dommages génomiques et l'instabilité chromosomique suggèrent que plusieurs mécanismes pourraient expliquer leur déclenchement. Ils sont, par ailleurs, probablement en cause du développement de plusieurs maladies. Il est également bien établi que l'instabilité génomique est causée par des facteurs génétiques tels que les défauts génétiques des points de contrôle du cycle cellulaire ou du métabolisme cellulaire et / ou des mécanismes de réparation de l'ADN. L'exposition à des génotoxiques endogènes ou environnementaux, le stress oxydatif, les déficiences en micronutriments nécessaires comme cofacteurs dans le métabolisme de

l'ADN et dans la ségrégation des chromosomes ainsi que les facteurs liés au mode de vie (alcool, tabagisme, drogues et stress) ont tous été impliqués dans la survenue de l'instabilité génomique (Fenech, Baghurst et al. 2005; Holland, Bolognesi et al. 2008; Fenech, Kirsch-Volders et al. 2011).

Comme il a été préconisé lors de l'inclusion des sujets dans l'étude, des facteurs tels que l'exposition professionnelle à des agents mutagènes, le tabagisme; la consommation d'alcool et les traitements anticancéreux ont été exclus dans les deux groupes. Ainsi, la contribution de ces facteurs à l'augmentation de l'instabilité chromosomique observée chez les couples infertiles paraît improbable. Par conséquent, nous suggérons que l'instabilité chromosomique observée chez nos sujets pourrait être due à des défauts dans les mécanismes de réparation de l'ADN ; au stress oxydatif ou aux déficiences en micronutriments.

En effet, il a été démontré qu'une fréquence élevée en micronoyaux est directement associée à une diminution de l'efficacité de la réparation de l'ADN et à une instabilité génomique élevée (Orsiere, Sari-Minodier et al. 2006). Et bien que la cause définitive de l'infertilité idiopathique chez ces couples soit inconnue; des anomalies génétiques des mécanismes de réparation chez l'un ou l'autre partenaire peuvent être responsables de l'infertilité (Fenech 2011). Une autre étude a confirmé une fréquence significativement plus élevée de micronoyaux dans les lymphocytes des hommes infertiles, comparée aux témoins, avant et après l'exposition aux rayons gamma (Moghbeli-Nejad, Mozdarani et al. 2012). Les conséquences biologiques de l'exposition aux rayonnements ionisants incluent les mutations ponctuelles et des cassures simple- ou double-brins de l'ADN. Ces cassures peuvent être réparées, en principe, soit par le système de jonction non homologue des extrémités (NHEJ), soit par recombinaison homologue (HR). Les résultats de cette étude suggèrent que les hommes infertiles auraient une réduction de la capacité de réparation des mutations de leur ADN. Papachristou et al. ont montré également que les hommes souffrant d'infertilité idiopathique présentent une augmentation de la fréquence d'échange entre chromatides-sœurs dans les lymphocytes du sang périphérique après avoir été exposés simultanément à la mitomycine C et à la caféine (Papachristou, Lialiaris et al. 2006). Ces deux substances inhibent les mécanismes de réparation de l'ADN. Il est donc probable que cette inhibition soit plus prononcée chez les hommes infertiles car ils avaient déjà une défaillance dans ces mécanismes de réparation de l'ADN. Nous pouvons donc dire que nos résultats pourraient être expliqués par un fond génétique des sujets infertiles leur conférant une incapacité à réparer les dommages causés à l'ADN et les rendant plus sensibles aux agents mutagènes et clastogènes qui ne sont toujours bien répertoriés dans notre environnement et qui pourraient donc exister malgré nos précautions lors de la sélection des malades.

Par ailleurs, les événements qui conduisent à la formation de micronoyaux dans les cellules peuvent être induits par le stress oxydatif (Umegaki and Fenech 2000). Nous pouvons donc stipuler également que l'augmentation des fréquences des micronoyaux chez les couples infertiles dans notre étude pourrait également être la conséquence d'un stress oxydatif.

D'autre part, les carences en plusieurs micronutriments sont connues pour causer des dommages chromosomiques et une amplification génique (tels que le zinc, la vitamine C, la vitamine E, l'acide folique et la vitamine B12) (Fenech 2003; Fenech 2003). Ainsi, les carences en ces micronutriments deviennent une cause probable de l'instabilité génomique chez nos patients.

Nos résultats sur la relation entre les taux de vitamines B12 et B9 et les différents biomarqueurs, seront discutés en détail dans la section suivante. Quant autres micronutriments (Zn, vitamine C et vitamines E), des investigations supplémentaires seront nécessaires.

### **La relation entre les vitamines B9 et B12 et les biomarqueurs de l'instabilité chromosomique**

Plusieurs micronutriments jouent un rôle important dans la protection contre les dommages de l'ADN générés par des facteurs endogènes ou exogènes, et ceci en agissant comme cofacteurs ou substrats pour des enzymes qui détoxifient les génotoxines ainsi que les enzymes impliquées dans la réparation, la méthylation et la synthèse de l'ADN. De plus, il est évident que les carences en micronutriments ou les excès peuvent modifier la stabilité du génome (Fenech 2003; Fenech, Baghurst et al. 2005).

Nos résultats ont montré une corrélation négative et statistiquement significative entre la fréquence des cellules micronucléées et des micronoyaux et les teneurs plasmatiques en folates et en vitamine B12. Ces élévations proportionnelles dans la fréquence des biomarqueurs d'instabilité chromosomique sont probablement dues au niveau bas de ces vitamines. Ceci pourrait être expliqué par le rôle important de ces vitamines dans la stabilité génomique en agissent comme des facteurs protecteurs.

Plusieurs études ont démontré une relation entre l'instabilité chromosomique mesurée par le test de micronoyaux et ces vitamines. Ainsi, il a été démontré que les individus avec une fréquence élevée en micronoyaux dans leurs érythrocytes ont des valeurs particulièrement basses en folates et en vitamine B12 (MacGregor, Wehr et al. 1997). La fréquence de micronoyaux dans les érythrocytes est de trois fois plus élevée que la normale chez les sujets carencés en folates et splénectomisés (Blount, Mack et al. 1997). De plus, et d'après Everson et al., la fréquence des micronoyaux dans les érythrocytes est élevée chez les sujets présentant un faible taux de folates dans le sang (Everson, Wehr et al. 1988). Plusieurs travaux ont été réalisés pour étudier l'effet de la concentration en folates et en vitamine B12 sur l'instabilité génomique dans les lymphocytes

humains. Ainsi, Fenech et al. ont mis en évidence une corrélation négative entre la fréquence des micronoyaux dans les lymphocytes et les teneurs plasmatiques en vitamine B12 et en acide folique (Fenech, Aitken et al. 1998). Dans une étude chez 64 hommes en bonne santé, la fréquence des micronoyaux a été significativement et négativement corrélée avec la concentration plasmatique en vitamine B12, bien que les valeurs de cette vitamine chez ces sujets se situent dans les limites de la normale (Fenech, Dreosti et al. 1997). Dans une autre étude, Fenech et al. ont trouvé une association entre les taux de la vitamine B12 et la fréquence des micronoyaux. Les mêmes auteurs ont constaté également qu'une supplémentation en acide folique (700 µg/jour) et en vitamine B12 (7 µg/jour), réduit au minimum la fréquence des cellules micronucléées chez des jeunes adultes australiens (Fenech, Aitken et al. 1998). De même, une corrélation existe entre la fréquence des MN et la concentration sanguine de folates (Duthie, Narayanan et al. 2002). Ainsi, beaucoup d'études menées in vivo et in vitro, montrent qu'un déficit en folates et en vitamine B12 séparément ou de manière combinées induit des dommages des chromosomes et la formation de micronoyaux (Fenech 2001). En plus des micronoyaux, et en accord avec nos résultats, des études sur les lymphocytes humains in vitro ont également démontré une corrélation négative et significative entre l'acide folique et les bourgeons nucléaires qui sont des témoins d'amplification génique (Crott and Fenech 2001; Fenech and Crott 2002; Wang and Fenech 2003).

Peu d'études ont été réalisées pour chercher la relation entre ces vitamines et les micronoyaux dans les cellules buccales. Une étude sur des femmes ménopausées a démontré que des concentrations plasmatiques faibles en folate, sans symptômes cliniques d'anémie, ont comme conséquence des niveaux plus élevés des dommages cytogénétiques mesurés par micronoyaux dans les lymphocytes et dans les cellules buccales. Cette étude a démontré également qu'une supplémentation en acide folique (516 µg /jour) permettait d'abaisser la fréquence des micronoyaux dans les cellules buccales (Titenko-Holland, Jacob et al. 1998). De plus, il a été rapporté que la vitamine B12 semble constituer une légère protection contre les dommages chromosomiques mesurés par les micronoyaux dans les cellules buccales chez les consommateurs de tabac (Piyathilake, Macaluso et al. 1995). Des diminutions dans la fréquence des micronoyaux des cellules buccales ont été signalées chez les enfants ayant reçu une supplémentation contrôlée en folates (Holland, Harmatz et al. 2007) et chez les patients diabétiques (Zuniga-Gonzalez, Batista-Gonzalez et al. 2007).

Au niveau moléculaire, l'explication des effets des folates et de la vitamine B12 vient du fait qu'ils jouent tous les deux un rôle important dans la synthèse, la réparation et dans la modulation de son niveau de méthylation de l'ADN, constituant ainsi des facteurs à ne pas négliger lors de l'étude d'une instabilité génomique (Fenech 2001; Jhaveri, Wagner et al. 2001; Wagner 2001; Battershill,

Burnett et al. 2008; Fenech 2012). Les folates jouent un rôle direct et critique dans la prévention de l'incorporation d'uracile dans l'ADN et l'hypométhylation de l'ADN. La biodisponibilité des folates en tant que donneur de méthyle pour la conversion de dUMP en dTMP et de l'homocystéine en méthionine est compromise lorsque la vitamine B12 est limitée. Par conséquent, les carences en folates et en vitamine B12, indépendamment ou de manière combinée mènent donc à l'incorporation très élevée de l'uracile dans l'ADN et à l'hypométhylation de l'ADN. Ceci induit des mutations ponctuelles, des cassures simple-brin et double-brin de l'ADN, des cassures chromosomiques et la formation de micronoyaux (Blount, Mack et al. 1997; Fenech 2001; Wagner 2001).

L'évaluation des taux sériques des vitamines B12 et B9 chez nos patients a permis d'enregistrer des valeurs qui se situent dans les limites de la normale mais aussi des valeurs inférieures aux seuils normaux (dans 15 et 24% des sujets pour le cas de la vitamine B9 et environ 13% des sujets pour le cas de la vitamine B12). Cependant, les résultats obtenus dans notre étude, révèlent l'existence d'une corrélation significative et négative entre les biomarqueurs de l'instabilité chromosomique (les micronoyaux et les bourgeons nucléaires) et les concentrations plasmatiques en folates et en vitamine B12, bien que les valeurs de ces vitamines chez la plus part des sujets se situent dans les limites de la normale. L'élévation dans la fréquence de ces biomarqueurs d'instabilité chromosomique est donc liée aux niveaux bas de ces vitamines même si ces derniers ne sont pas inférieurs aux niveaux de norme, ce qui est le cas pour la majorité des sujets. Cela pourrait signifier que les taux sanguins de folates et de la vitamine B12 qui sont considérés comme nécessaires pour prévenir l'anémie et l'hyperhomocystéinémie (valeurs de norme) ne sont pas adéquats pour protéger contre l'instabilité chromosomique. Deux études avaient effectivement montré que des hommes non carencés en vitamine B9 et en vitamine B12 (Fenech, Dreosti et al. 1997) et des femmes non carencées en vitamine B9 mais carencées en vitamine B12 (seulement 4.4% parmi les 57 femmes) (Fenech, Aitken et al. 1998) présentaient des taux élevés de micronoyaux. Après les résultats de ces deux études, Fenech et al. avaient suggéré eux aussi que les valeurs de la vitamine B12 qui sont considérées dans la limite de la normale ne sont peut-être pas adéquats pour minimiser l'ampleur des dommages chromosomiques (Fenech, Aitken et al. 1998). Dans ce même contexte, des résultats identiques sont obtenus concernant l'acide folique, pour lequel les fréquences des micronoyaux et des bourgeons nucléaires sont réduites pour des concentrations en acide folique qui sont supérieures aux valeurs observées dans le plasma des individus sains (Fenech and Crott 2002). Ces observations ainsi que les nôtres posent ainsi la question sur les valeurs de ces vitamines qui soient nécessaires pour prévenir l'instabilité chromosomique par rapport aux valeurs de norme. Les taux sanguins de folates et de la vitamine

B12 nécessaires pour prévenir l'anémie et l'hyperhomocystéinémie sont bien définis, cependant il est encore incertain si ces niveaux sont adéquats pour réduire les taux de dommages chromosomiques et pour optimiser le statut de méthylation de l'ADN (Fenech, Aitken et al. 1998). Des études approfondies dans ce domaine sont nécessaires pour répondre à cette question.

### **La relation entre les vitamines B9 et B12 et les biomarqueurs de la mort cellulaire et de la prolifération cellulaire**

Concernant les biomarqueurs de la mort cellulaire, nous avons trouvé une corrélation négative et significative entre les cellules caryolytiques et les concentrations sanguines en folates. Cette corrélation a été observée uniquement dans le groupe des hommes. De plus, les cellules différenciées présentaient une corrélation positive et significative avec les folates. Cette corrélation a été constatée uniquement dans le groupe des hommes. Les autres biomarqueurs de la mort cellulaire ne présentaient pas de corrélation significative avec les folates ou avec la vitamine B12.

Il faut noter que nos résultats de comparaison des cellules différenciées et de cellules caryolytiques entre les couples fertiles et les couples infertiles n'ont pas montré une différence significative.

Les cellules différenciées sont des biomarqueurs de la prolifération cellulaire (Thomas, Holland et al. 2009) alors que les cellules caryolytiques sont associées à la nécrose (Tolbert, Shy et al. 1992). Et nous savons qu'en tant qu'élément clé dans le métabolisme monocarboné, les folates jouent un rôle dans la prolifération et la survie cellulaire. La synthèse de l'ADN et la prolifération cellulaire nécessitent le transfert de "groupes carbonés"; qui est une fonction fondamentale des folates. Ainsi, un excès d'apoptose et une réduction de la prolifération cellulaire sont des phénomènes observés en cas de carence en folates (Duthie, Narayanan et al. 2002). En outre, une étude réalisée avec le test des micronoyaux sur les lymphocytes, a montré une corrélation significative et négative entre les cellules nécrotiques et les taux plasmatiques des folates (Wang and Fenech 2003). Dans une étude *in vitro* sur les lymphocytes humains, le pourcentage de cellules nécrotiques était en corrélation négative avec la concentration en acide folique. L'apoptose n'était pas en corrélation avec la concentration en acide folique; cependant, une augmentation significative de l'apoptose est survenue à une concentration d'acide folique de 60 nM, comparativement à 120 nM. Ces résultats suggèrent qu'une concentration en acide folique comprise entre 60 et 120 nM est nécessaire pour minimiser la cytotoxicité (Crott, Mashiyama et al. 2001).

D'après nos résultats, nous pouvons conclure, qu'en plus de leur rôle dans la prévention de l'instabilité chromosomique, les folates jouent un rôle important dans la prolifération cellulaire.

Cependant, cet effet a été constaté uniquement lorsque les résultats sont analysés dans le groupe des hommes.

### **La relation entre les vitamines B9 et B12 et les cellules binucléées**

Nous avons trouvé une corrélation négative et significative entre les cellules binucléées et les concentrations sanguines en vitamines B12. Cette corrélation a été observée lorsque les résultats sont analysés dans le groupe 'femmes' et le groupe 'individus'. Ces résultats sont suggestifs d'un rôle possible de la vitamine B12 dans la survenue de cette anomalie.

Le mécanisme le plus probable pour la formation des cellules binucléées est l'échec de la cytokinèse, soit par des défauts dans la formation de l'anneau des microfilaments, soit par arrêt du cycle cellulaire dû à une mauvaise répartition des chromosomes ou à un dysfonctionnement des télomères (Bolognesi and Fenech 2013). On ne sait pas clairement le mécanisme par lequel la vitamine B12 induit la formation des cellules binucléées mais il est probable que des taux faibles de cette vitamine induisent un échec de la cytokinèse par l'un ou l'autre des deux mécanismes sus-cités. On sait que la fonction biochimique de base de la vitamine B12 est de soutenir la synthèse de l'ADN pour la division cellulaire en régénérant les taux de folates après la consommation de folates. Ainsi, nous pouvons dire que probablement les niveaux bas en cette vitamine peuvent empêcher la division cellulaire ce qui entraîne la formation des cellules binucléées. Davantage d'études dans ce contexte seront nécessaires afin de déterminer le mécanisme précis par lequel la vitamine B12 intervient dans la formation des cellules binucléées.

L'importance du rôle que pourraient jouer les vitamines B9 et B12 dans le maintien de la stabilité génomique pourrait être soulignée par les études qui ont montré que les dommages génomiques causés par une carence en micronutriments pourraient être du même ordre et de la même ampleur, voire supérieurs, que les dommages génomiques causés par une exposition à des doses importantes de génotoxines environnementales telles que les carcinogènes chimiques, les rayons ultraviolets et les rayonnements ionisants (Fenech 2012). De même, les résultats obtenus avec l'acide folique montrent clairement que la carence en ce micronutriment peut, à elle seule, provoquer une instabilité génomique comparable à celle observée dans le cancer (Fenech, Baghurst et al. 2005).

**CHAPITRE V**  
**CONCLUSION ET**  
**PERSPECTIVES**

Dans certains cas, l'évaluation standard du couple infertile ne révèle aucune anomalie décelable ou cause définitive d'infertilité et le couple est ainsi diagnostiqué avec une infertilité inexplicée ou idiopathique. L'incidence moyenne de l'infertilité idiopathique a été estimée à environ 15%–30% des couples infertiles (Practice Committee of the ASRM 2006). Bien que sa cause définitive soit inconnue; des anomalies génétiques chez l'un ou l'autre partenaire pourraient en être responsables (Fenech 2011).

Le test des micronoyaux sur les cellules buccales permet de détecter l'instabilité chromosomique (micronoyaux et bourgeons nucléaires), l'échec de la cytocinèse (les cellules binucléées), la prolifération cellulaire (les cellules basales et différenciées) et la mort cellulaire (les cellules à chromatine condensée, caryorrhétiques, pycnotiques et caryolytiques). En plus d'être peu invasif, facile et rapide, ce test présente l'avantage d'être réalisé sans nécessité d'une culture cellulaire et il est aussi sensible que le test d'aberrations chromosomiques classique (Müller and Streffer 1994; Fenech 1997).

Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé ce test pour étudier la prévalence de ses biomarqueurs dans le contexte de l'infertilité idiopathique chez une population de l'Est algérien. Notre étude a montré que les couples présentant une infertilité idiopathique, comparés aux témoins, ont une fréquence significativement plus élevée des biomarqueurs de dommage de l'ADN, des biomarqueurs de défaut ou d'arrêt de cytocinèse ainsi que des biomarqueurs de la mort cellulaire. Nos résultats suggèrent ainsi un rôle possible de l'instabilité génomique dans l'infertilité idiopathique. Par ailleurs, l'augmentation significative des fréquences de cellules à chromatine condensée, caryorrhétiques et pycnotiques dans le groupe des patients pourrait être liée à des tentatives d'élimination des cellules présentant des dommages génétiques.

Afin d'identifier les facteurs qui pourraient être en cause de cette instabilité, nous avons d'abord procédé par l'élimination des facteurs génotoxiques environnementaux identifiables (tabac, alcool, chimiothérapie ou exposition professionnelle à des agents mutagènes) et ceci dès l'étape de sélection des sujets pour l'étude. Ainsi, la contribution de ces facteurs à l'instabilité chromosomique observée chez les couples infertiles est peu probable. Par la suite, nous avons effectué des dosages sériques des vitamines B9 et B12 dans le groupe des sujets infertiles, étant donné que ces deux vitamines sont impliquées dans le métabolisme de l'ADN et que tout déficit les touchant est incriminé d'augmenter l'instabilité génomique (Fenech, Baghurst et al. 2005; Fenech 2012). L'étude des biomarqueurs du test des micronoyaux en fonction des taux sériques de la vitamine B9 et la vitamine B12 a permis de mettre en évidence une corrélation négative et significative entre la fréquence des micronoyaux et des bourgeons nucléaires d'un côté et les teneurs sériques en ces deux vitamines de l'autre côté.

En conclusion, nos résultats amènent à penser que l'instabilité génomique observée chez les sujets infertiles pourrait être due, en partie, aux niveaux insuffisants de vitamine B12 et de folates. Il est également possible que ces patients présentent une déficience dans les mécanismes de réparation de l'ADN, ou encore un taux important de stress oxydatif. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ces hypothèses.

De plus, étant donné ce lien entre les vitamines B9 et B12 et la survenue d'une instabilité génomique, il devient important de déterminer les concentrations sériques optimales de ces vitamines qui soient nécessaires pour prévenir les dommages de l'ADN dans les cellules humaines. En effet, d'après nos résultats et ceux d'autres études, les seuils sériques de normalité de ces vitamines qui sont utilisés afin de prévenir l'anémie et l'hyperhomocystéinémie ne sont applicables dans le contexte de prévention de l'instabilité génomique.

Notre étude a montré l'utilité du test de micronoyaux sur les cellules buccales dans la détection de l'instabilité chromosomique dans des délais satisfaisants, avec des conditions de mise en œuvre relativement aisées et à un coût relativement peu élevé. Cependant, ce test ne permet pas de connaître l'origine des micronoyaux. Pour cela, il sera souhaitable d'associer au test des micronoyaux un protocole de FISH, permettant de détecter la présence ou l'absence de centromères dans les micronoyaux et donc la distinction entre les effets clastogènes et aneugènes.

À notre connaissance, le test des micronoyaux sur les cellules buccales n'a jamais été utilisé dans la littérature pour étudier les cas d'infertilité idiopathique. Cette étude est la première à utiliser ce test dans ce contexte. C'est aussi la première évaluation de l'instabilité chromosomique par ce test dans une population algérienne. L'élargissement de l'échantillon permettrait certainement d'avoir plus d'information sur l'importance de l'instabilité chromosomique chez les couples présentant une infertilité idiopathique.

# **ANNEXES**

## Annexe I :

## Fiche de renseignements sur les couples fertiles

**\*Epouse**

Code : .....

Date : .....

Nom et prénom: .....

Date de naissance : .....

Taille et Poids : .....

Années de mariage : .....

Profession : .....

Lieu d'habitat : .....

Nombre d'enfants: .....

Le statut tabagique : Fumeur Non fumeur

Consommation d'alcool : Oui Non

Exposition à la chaleur : T élevées dans leur milieu de travail Oui Non.

Exposition aux agents toxiques : pesticides et métaux lourds notamment.

Exposition aux radiations : UV les rayons X

Activité physique (sport) : Oui type de sport.....Non

**\*Epoux**

Code : .....

Date : .....

Nom et prénom: .....

Date de naissance : .....

Taille et Poids : .....

Années de mariage : .....

Profession : .....

Lieu d'habitat : .....

Nombre d'enfants: .....

Le statut tabagique : Fumeur Non fumeur

Consommation d'alcool : Oui Non

Exposition à la chaleur : T élevées dans leur milieu de travail Oui Non.

Exposition aux agents toxiques : pesticides et métaux lourds notamment.

Exposition aux radiations : UV les rayons X

Activité physique (sport) : Oui type de sport.....Non

**Annexe II : Consentement du participant (témoin ou patient)**

Je déclare avoir été informé(e), oralement et par écrit, des objectifs et du déroulement de l'étude sur les infertilités idiopathique des couples, et j'autorise l'utilisation de ces informations dans cette fiche d'enquête au profit de cette étude.

Lieu, date	Signature du patient
------------	----------------------

### Annexe III : Fiche de renseignements sur les infertilités idiopathique des couples

#### **\*Epouse**

Code : .....

Date: .....

#### **1. Paramètres épidémiologiques**

Nom et Prénom : .....

Date de naissance : .....

Poids et Taille: .....

Profession : .....

Lieu d'habitat : .....

Statut tabagique : fumeur                      non fumeur

Consommation d'alcool : Oui Non

Exposition à la chaleur : T élevées dans leur milieu de travail    Oui    Non

Exposition aux agents toxiques: pesticides et métaux lourds    Oui    Non

Exposition aux radiations : UV Rayons X    Non

Activité physique (sport) : Oui type de sport,    Non

#### **1. Les paramètres cliniques**

Durée d'infertilité : .....

Antécédents médicaux : HTA, Diabète ou autres maladies, s'il a pris des médicaments de quelle nature.

Antécédents familiaux : .....

Le nombre de tentatives de FIV et ICSI : .....

#### **\*Epoux**

Code : .....

Date: .....

#### **1. Paramètres épidémiologiques**

Nom et Prénom : .....

Date de naissance : .....

Poids et Taille: .....

Profession : .....

Lieu d'habitat : .....

Statut tabagique : fumeur non fumeur

Consommation d'alcool : Oui Non

Exposition à la chaleur : T élevées dans leur milieu de travail Oui Non

Exposition aux agents toxiques: pesticides et métaux lourds Oui Non

Exposition aux radiations : UV Rayons X Non.....

Activité physique (sport) : Oui type de sport, Non.....

## 2. Les paramètres cliniques

Durée d'infertilité :.....

Antécédents médicaux : HTA, Diabète ou autres maladies, s'il a pris des médicaments de quelle nature.

Antécédents familiaux : .....

Le nombre de tentatives de FIV et ICSI :.....

## Annexe IV: Les professions des couples infertiles

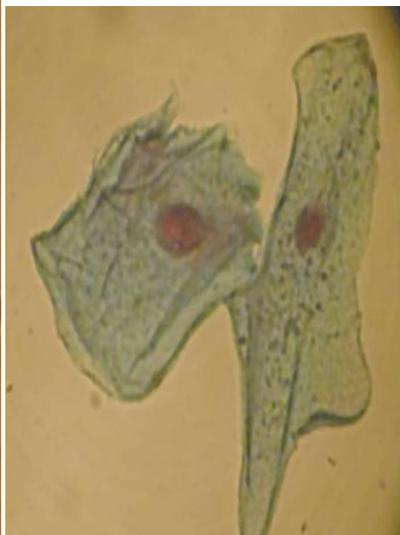
Couple	Profession	
	Epouse	Epoux
1.	-	Protection civil
2.	-	Agent dans l'abattoir avicole
3.	Avocate	Technicien supérieur en informatique
4.	-	Bijoutier
5.	-	Electricien
6.	-	-
7.	Laborantine	Commerçant
8.	-	Chauffeur
9.	-	Agent de sécurité
10.	-	Agent de sécurité
11.	Comptable	Menuisier aluminium
12.	-	Lavage des voitures
13.	-	Agent de sécurité
14.	-	Peintre
15.	-	Maçon
16.	Fonctionnaire	Commerçant
17.	-	Maçon
18.	-	-
19.	-	Commerçant
20.	-	Commerçant
21.	-	Commerçant
22.	-	Fonctionnaire
23.	-	Chauffeur
24.	-	Maçon
25.	-	Agent de sécurité
26.	Fonctionnaire	Commerçant
27.	-	Commerçant

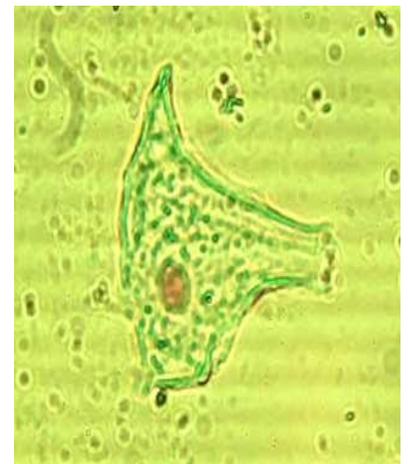
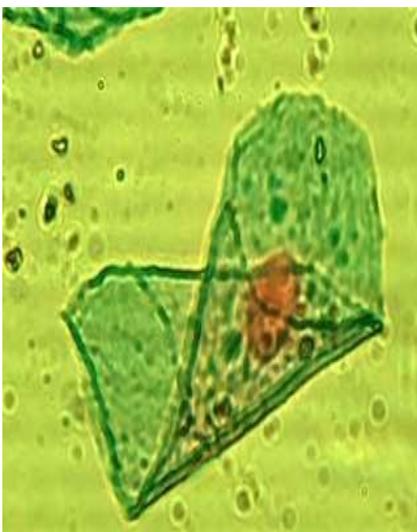
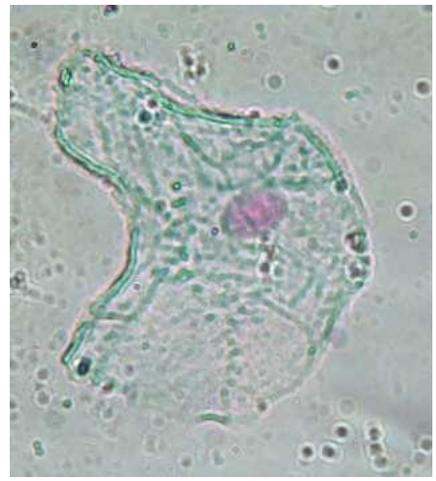
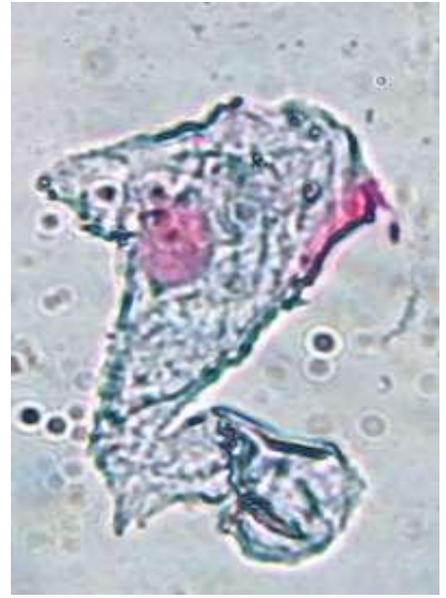
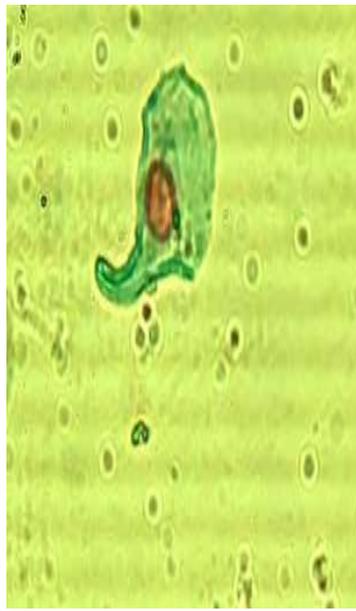
**Annexe V : Cas de cellules avec des formes et des anomalies exceptionnelles**

Les cellules trinuéclées (3 noyaux) :



Cellules avec des formes qui ne sont pas ordinaires :





# **PUBLICATION**

## Buccal micronucleus cytome biomarkers in Algerian couples with idiopathic infertility

Ismahane Laanani<sup>a,b</sup>, Safia Boutelis<sup>a,b</sup>, Omar Bennoune<sup>c</sup>, Ghania Belaaloui<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Acquired and Constitutional Genetic Diseases (MAGECA), Faculty of Medicine, Batna 2 University, Batna 05000, Algeria

<sup>b</sup>Faculty of Nature and Life Sciences, Batna 2 University, Batna, Algeria

<sup>c</sup>Laboratory of Histology, Veterinary Department, Batna 1 University, Batna, Algeria



### ARTICLE INFO

Keywords:  
Micronuclei  
Buccal micronucleus cytome  
Biomarkers  
Idiopathic infertility

### ABSTRACT

The buccal micronucleus cytome (BMCyt) assay is a useful and a minimally invasive cytogenetic method for measuring genomic damage. The aim of the present study is to evaluate the extent of chromosomal damage incouples with idiopathic infertility using a BMCyt.

This study included 54 patients (27 couples) with idiopathic infertility and 30 fertile subjects (15 couples). When evaluated by individual (each subject from the couple is considered separately), the frequencies of micronucleated cells (MNC), total micronuclei (TMN), nuclear buds (NBUD), and binucleated cells (BN) were significantly higher in the infertile individuals than in the fertile ones ( $p = 0.009$ ,  $p = 0.009$ ,  $p = 0.003$  and  $p < 0.0001$ , respectively). Among the cells reflecting cell death events, condensed chromatin (CC), karyorrhectic (KHC) and pyknotic (PYK) cells were significantly higher in the infertile individuals ( $p = 0.0001$ ,  $p = 0.003$ ,  $p = 0.001$ , respectively). Identical results were obtained when data were analysed by couple (female + male). The frequencies of MNC, TMN, NBUD, and BN cells were significantly higher in the infertile couples ( $p = 0.019$ ,  $p = 0.021$ ,  $p = 0.013$ , and  $p < 0.0001$ , respectively). Likewise, CC, KHC and PYK cells were significantly higher in the infertile couples ( $p = 0.002$ ,  $p = 0.034$ ,  $p = 0.008$ , respectively). BN cells showed the most pronounced difference between the fertile and infertile groups. The basal (BAS) and karyolytic (KYL) cells did not show a significant difference. In conclusion, this study showed that, in comparison to controls, couples with idiopathic infertility had significantly higher frequencies of DNA damage biomarkers (MN and NBUD), biomarkers of cytokinesis-failure or arrest (BN cells) and cell death biomarkers (CC, KHC and PYK cells). These results suggest a possible role of chromosomal damage in idiopathic infertility that may be due to an imbalance between DNA damage rates and DNA repair mechanisms.

### 1. Introduction

Infertility can be defined as the failure of a couple to achieve a clinical pregnancy after at least one year of regular unprotected sexual intercourse [1]. Idiopathic infertility is diagnosed when a couple does not conceive and no underlying mechanism(s) of infertility can be identified following a complete evaluation of both partners. Despite the advances in diagnostic techniques, the estimation of average prevalence of idiopathic infertility is approximately 15%–30% of infertile couples [2–4]. A certain number of genetic mechanisms can lead to infertility and it is likely that most currently idiopathic infertility cases are due to genetic causes (Fenech [14]).

It is well known that genome damage and chromosome instability are associated with an increased risk of neurodegenerative diseases, accelerated aging syndromes, cardiovascular diseases and cancers [5–8].

\* Corresponding author.

E-mail address: [g.belaaloui@univ-batna2.dz](mailto:g.belaaloui@univ-batna2.dz) (G. Belaaloui). <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.08.010>

Received 25 June 2018; Received in revised form 1 August 2018; Accepted 24 August 2018 Available online 25 August 2018 1383-5718/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

The micronucleus (MN) assay is one of the best cytogenetic techniques to evaluate the chromosome instability in humans [9,10]. The MN are formed by chromosome fragments or whole chromosomes that lag behind at anaphase during nuclear division [11]. They can be evaluated easily in erythrocytes, lymphocytes, and exfoliated epithelial cells (e.g. oral, nasal, urothelial) [12]. The BMCyt is a useful and a minimally invasive approach for measuring genetic damage in human exfoliated buccal cells [9,13]. It has been used to measure biomarkers of DNA damage, cytokinetic defects, cell proliferation, and cell death [9,10,13].

The use of MN assays to study the relationship between DNA damage and infertility in humans has greatly increased [14]. A number of studies have found an association between the high frequency of chromosome instability measured by the MN assays and the increased risk of infertility [15–21]. However, all these studies applied MN assays on peripheral blood lymphocytes. The present study was undertaken to

**Table 1**  
Demographic and medical characteristics of the infertile couples.

Characteristics			
Age (year)	Female	33.56 ± 5.26	24–41
	Male	39.48 ± 5.86	28–52
Occupational status	Female	Employed	5 (18.51%)
	Unemployed	Male	22 (81.48%)
		Employed	25 (92.59%)
	Unemployed	Male	2 (7.40%)
Family history of infertility	Female	Yes	6 (22.22%)
		No	21 (77.77%)
	Male	Yes	5 (18.51%)
		No	22 (81.48%)
Infertility duration (year)	Couple	≤5	9 (33.33%)
		> 5	18 (66.66%)
Attempt of IVF and ICSI*	Couple	Yes	12 (44.44%)
		No	15 (55.55%)
Residence	Couple	Coastal	2 (7.40%)
		Rural	3 (11.11%)
		Urban	22 (81.48%)

Abbreviations: \* IVF: in vitro fertilization, ICSI: Intracytoplasmic sperm injection.

investigate idiopathic infertility in couples using the BMCyt assay. To our knowledge, this study is the first to use the noninvasive BMCyt assay to investigate genetic damage biomarkers in the buccal cells of couples with idiopathic infertility. This is also the first evaluation of chromosomal instability by the BMCyt assay in an Algerian population.

## 2. Subjects, materials and methods

### 2.1. Subjects

This study included 27 couples with idiopathic infertility (54 patients) referred to the service of medically assisted reproduction in Sidi Mabrouk maternity, Constantine, Eastern Algeria. All participants underwent a standard basic infertility evaluation (semen analysis, assessment of ovulation, hysterosalpingogram and assessment of sexual dysfunction of the couple) and no definitive causes of infertility were found. Their ages ranged from 24 to 52 years with a mean ( $\pm$ SD) of 36.52  $\pm$  6.27 (Table 1).

The control group is composed 15 fertile couples (they had at least one child) with matched age. Their mean age ( $\pm$ SD) was 34.50  $\pm$  6.11 years (range 23–51).

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethical Committee of the Research Center in Biotechnology (CRBt, Constantine, Algeria).

A written informed consent was obtained from patients and controls. Before collecting the samples, a detailed questionnaire was answered by all participants regarding their medical history, residence and occupational status. Exclusion criteria for both groups included work-related exposure to mutagenic agents, smoking history, anticancer therapy, alcohol consumption and chronic illnesses.

### 2.2. Buccal micronucleus cytome assay (BMCyt)

Buccal cell samples were collected from all subjects after rinsing the mouth with tap water. Cells were obtained by scraping the cheek mucosa with a cytobrush. Then, they were transferred to a tube containing Saccomanno's fixative and transported to the histology laboratory where they were centrifuged for 10 min at 580 g at room temperature. The supernatant was removed and replaced with 10 ml of buccal cell buffer (1.6 g Tris–HCl, 37.2 g EDTA disodium salt, 1.2 g sodium chloride) at pH 7.0 and centrifuged for 10 min at 581 g. This process was repeated twice more, as the buffer helps to inactivate endogenous DNAses and aid in removing cell debris and bacteria that may cause difficulties in scoring. The cells were homogenized 2–3 minutes by a

homogenizer, and then passed through a 100  $\mu$ m nylon filter held in a Swinex holder to remove large cell aggregates. Cells were further centrifuged at 580 g for 10 min. After removing the supernatant they were resuspended in 1 ml of buccal cell buffer. One hundred twenty microliters of the cell suspension were dropped onto clean slides that were air-dried for 10 min and then fixed with a fresh mixture of ethanol: acetic acid (3:1) for 10 min. Later, the slides were stained using the Feulgen/Fast Green method.

The slides were scored by two scorers without knowledge from which group the samples were obtained. Each slide was scored twice and the result was the average of both readings. The observation was done under light microscope Axioskop 20; Carl Zeiss, (Göttingen, Germany), first at  $\times$ 400 then at  $\times$ 1000 magnification in order to confirm the results. Initially, 1000 cells were scored per subject to find the frequency of various cell types observed in BMCyt assay. The observed cells included BAS, BN, PYK, KHC, CC and KYL cells. Then, DNA damage biomarkers including MN and NBUD were scored in 1000 differentiated and basal cells. The scoring was done according to the criteria defined by Thomas et al [9].

### 2.3. Statistical analysis

The data were analyzed using GraphPad Prism ver. 5.01 for Windows (GraphPad Software, USA). The non-parametric Mann-Whitney U test was used for comparison of data in both studied groups. The effect of age on MN and other BMCyt assay biomarkers was determined by the Spearman's correlation coefficient. The comparison of ages in groups was performed using the Student's t-test. The data were presented as mean  $\pm$  standard deviation (S.D.). A p value of less than 0.05 was considered significant for all statistical tests.

## 3. Results

The BMCyt assay biomarkers were analyzed by couple (data of the male and the female were analysed together) and by individual (data from each member of the couple were analysed separately). The results for the BMCyt assay the two studied groups are represented in Tables 2 and 3.

We studied frequencies of BMCyt assay biomarkers following age and sex. The results showed that, in the control group, the frequencies of the KHC and KYL cells were significantly higher in males compared to females ( $p = 0.021$ ,  $p = 0.032$ , respectively). However, the other biomarkers (MNC, TMN, NBUD, BAS, BN, CC and PYK) did not show significant differences between females and males ( $p > 0.05$ ).

The Spearman correlation coefficients for the BMCyt assay

**Table 2**

Age and buccal micronucleus cytome assay biomarkers evaluated by individual.

	Infertile	Controls	p value
Number of subjects <sup>a</sup>	54	30	
Age (years)	36.52 $\pm$ 6.27	34.50 $\pm$ 6.11	0.157
MNC (‰)	2.45 $\pm$ 2.64	0.96 $\pm$ 1.01	0.009
TMN (‰)	2.96 $\pm$ 3.71	1.01 $\pm$ 1.14	0.009
NBUD (‰)	2.08 $\pm$ 2.25	1.00 $\pm$ 0.96	0.003
BAS (‰)	2.99 $\pm$ 2.66	3.46 $\pm$ 2.28	0.183
BN (‰)	7.53 $\pm$ 3.22	3.95 $\pm$ 2.11	<0.0001
CC (‰)	1.59 $\pm$ 1.79	0.48 $\pm$ 0.72	0.0001
KHC (‰)	3.68 $\pm$ 3.85	1.50 $\pm$ 1.87	0.003
PYK (‰)	4.45 $\pm$ 2.84	2.58 $\pm$ 1.54	0.001
KYL (‰)	186 $\pm$ 70.48	158.2 $\pm$ 77.65	0.100

Abbreviations: MNC: micronucleated cells, TMN: total number of micronuclei, NBUD: nuclear buds, BAS: basal cells, BN: binucleated, CC: condensed chromatin, KHC: karyorrhectic, PYK: pyknotic, KYL: karyolytic. Data are presented as means  $\pm$  SD. Data in bold is statistically significant ( $p < 0.05$ ).

<sup>a</sup> Subjects were members of couples; so, half of each group were females and half were males.

**Table 3**  
Buccal micronucleus cytome assay evaluated by couple.

	Infertile	Controls	p value
Number of couples	27	15	
MNC (‰)	4.90 ± 4.59	1.93 ± 1.42	0.019
TMN (‰)	5.92 ± 6.82	2.03 ± 1.62	0.021
NBUD (‰)	4.16 ± 4.07	2.00 ± 1.51	0.013
BAS (‰)	5.98 ± 4.55	6.93 ± 2.91	0.197
BN (‰)	15.07 ± 5.57	7.90 ± 3.40	< 0.0001
CC (‰)	3.18 ± 3.16	0.96 ± 0.97	0.0026
KHC (‰)	7.37 ± 6.81	3.00 ± 2.08	0.034
PYK (‰)	8.90 ± 4.97	5.16 ± 1.99	0.008
KYL (‰)	372.0 ± 105.6	316.3 ± 114.5	0.198

Abbreviations: MNC: micronucleated cells, TMN: total number of micronuclei, NBUD: nuclear buds, BAS: basal cells, BN: binucleated, CC: condensed chromatin, KHC: karyorrhectic, PYK: pyknotic, KYL: karyolitic. Data are presented as means ± SD. Data in bold is statistically significant ( $p < 0.05$ ).

biomarkers and the age of the control subjects, show that only CC cells have a weak positive association with the age ( $r = 0.372$ ,  $p = 0.042$ ).

The infertile individuals' samples were also analyzed regarding gender and age as well. The sex had no effect on the BMCyt assay biomarkers in these individuals ( $p > 0.05$ ). However, the age showed a weak positive correlation only on the frequency of the BN cells ( $r = 0.291$ ,  $p = 0.032$ ).

The results concerning the BMCyt assay biomarkers in the two studied groups evaluated by individual show that infertile individuals had higher frequency of TMN than fertile ones ( $2.96 \pm 3.71\%$ ,  $1.01 \pm 1.14\%$ ,  $p = 0.009$ , respectively). MNC rate was approximately 3-fold higher in the infertile individuals ( $2.45 \pm 2.64\%$ ) compared with controls ( $0.96 \pm 1.01\%$ ) and this difference is statistically significant ( $p = 0.009$ ). Moreover, the NBUD frequency was significantly higher in the infertile individuals ( $p = 0.003$ ).

The strongest difference was reported in the BN cells ( $p < 0.0001$ ). Among the cells reflecting cell death events, CC, KHC and PYK were significantly higher in the infertile individuals. However, KYL cells did not show significant difference. The BAS cells, biomarkers of cell proliferation, were higher in the infertile individuals; however, this difference did not reach statistical significance ( $p > 0.05$ ), (Table 2).

As represented in Table 3, identical results were obtained when data were analysed by couple. Frequencies of MN and MNC, as evaluated by couple, were statistically significant when compared to fertile couples ( $p = 0.019$ ,  $p = 0.021$ , respectively). A significant difference in the frequency of NBUD was also detected between the fertile and infertile couples ( $p = 0.013$ ). The BN cells frequency showed also the most pronounced difference between the fertile and infertile couples. The CC, KHC and PYK cells were significantly higher in the infertile couples, as well. There were no significant differences in the frequencies of BAS and KYL cells between the fertile and infertile couples.

#### 4. Discussion

It has been shown that MN assays are as sensitive as classical chromosome aberration tests [22–24] since MN represent a measure of chromosome breakage and chromosome loss during nuclear division. In addition to be minimally invasive, the BMCyt has the advantage to be performed without the need of an ex vivo nuclear division induction. Despite these benefits, the use of the BMCyt assay was limited to assess the genomic damages induced by lifestyle factors, occupations and diet [25] but at no time to assess couples infertility. In this study, we used it to investigate the prevalence of its biomarkers in the context of idiopathic infertility.

In MN assays, determining the spontaneous frequencies of MN and MNC is of great importance since they serve as baseline for estimating the extent of genome damages in pathological situations. Many of our results in the healthy group were in accordance with those described in

the human micronucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN<sub>XL</sub>) which involved data from 30 laboratories worldwide giving a range of reference values for the BMCyt [26]. We found that the mean frequency of MNC observed in the control subjects was 0.96‰, which is in the range of 0.3 and 1.7‰ as published in the HUMN<sub>XL</sub> project [26]. This is an important validation of our assay because it is well known that the spontaneous frequency of MNC in buccal cells is lower than in lymphocytes and this characteristic offers a low baseline that facilitates an easier observation of genome damage in buccal cells [25]. Additionally, we did not find an effect of sex on the TMN and MNC frequencies in the control subjects and this is in accordance with many previous studies [3,8,26]. However, when looking for a possible effect of age on TMN or MNC frequencies, as it was described in the HUMN<sub>XL</sub> project [26], we

did not find it in the control group. This could be explained by the important difference in the sample sizes between our study and the collaborative HUMN<sub>XL</sub> study. Likewise, the mean frequencies of BN, KHC and PYK cells and NBUD in control subjects were close to those reported in the HUMN<sub>XL</sub> project. There was no effect of sex or age on the frequency of the BN cells and NBUD biomarkers as it was described [26]. Similarly, gender effect was found in the KHC cells with significant increase in males which is in accordance with the HUMN<sub>XL</sub> project [26]. It was not possible to compare our results on KYL, CC, and BAS cells with those in the reference collaborative study because the final scoring criteria for these cells have been described shortly before the HUMN<sub>XL</sub> project [9] so this one did not report them [26].

MN are biomarkers of chromosome breakage (clastogenesis) or unequal chromosome distribution in daughter cells nuclei (aneuploidy) during cell division [27,28]. In the current investigation, we found a significant increase in MN and MNC frequency compared to matched controls. These results indicate a possible relationship between chromosomal damages, measured as MN and MNC frequency, and idiopathic infertility. Trovka et al obtained similar results but in peripheral lymphocytes of couples with idiopathic infertility [15]. Milošević-Djordjević et al reported an increase in the MN frequency in peripheral lymphocytes of men and women with merged etiologies of reproductive failure [20]. Correlation of MN frequencies in exfoliated buccal cells with those in peripheral lymphocytes was reported in many cases [29]. This could be explained by the fact that both cell types share the same inheritance regarding DNA repair mechanisms. In addition, MN are found in the basal cells that are near the blood stream that makes them exposed at almost the same substances as the lymphocytes. Nevertheless, buccal cells show many practical advantages: apart from the noninvasiveness of the BMCyt, samples are more easily stored, before and after processing, and there is no need for an ex vivo cell replication step [25,26]. In addition to MN and MNC, we found a significant increase in NBUD and BN cells frequencies in the infertile group. It is thought that NBUD formation is a process by which the cell can eliminate excess amplified DNA [30–32]. While BN cells probably represent cytokinesis-failure or arrest which occurs as a consequence of chromosome malsegregation. Their presence is associated to a high rate of aneuploidy [9,33] and it is well known that aneuploidy is involved in many cases of idiopathic infertility [34]. Together, MN, NBUD and BN cells are mainly due to genetic defects in cell cycle checkpoint and/or DNA repair genes, to micronutrients deficiencies required for proteins involved in DNA repair or synthesis, to oxidative stress, or to exposure to endogenous or environmental genotoxicants [35–37]. The definitive cause of the idiopathic infertility in these couples is unknown; however, genetic defects in either partner may be responsible for infertility [14]. A previous study confirmed a significantly higher frequency of MN in lymphocytes of infertile males, compared to the controls, before and after exposure to gamma rays [21]. Accordingly, Papachristou et al. showed that men with idiopathic infertility displayed an increase in sister chromatid exchange frequency in peripheral blood lymphocytes after being exposed simultaneously to mitomycin C and caffeine [16] which means that a genetic instability exists in infertile men.

Our results revealed also a significant increase in the frequencies of

CC, KHC and PYK cells in case of idiopathic infertility. CC and KHC cells are thought to be undergoing early and late stages of apoptosis, respectively, while PYK cells thought to represent an intermediate stage in cell death event [9,26]. The PYK, KHC and CC cells are associated to keratinization, cell necrosis and cell apoptosis. Elevated levels of these cells reflect cell injury. It is well known that apoptosis can be triggered by a multitude of stimuli and conditions. Apoptosis may have a role of surveillance, by which cells with genetic damage are eliminated. Thus, in the context of BMCyt assay, it has been speculated that an excess in the levels of apoptosis, may be considered as an indicator of genotoxic insult [38].

In conclusion, this study showed that couples with idiopathic infertility, in comparison to controls, had significantly higher frequency of DNA damage biomarkers (MN and NBUD),

### Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### Acknowledgements

The authors would thank all the volunteer participants to this study, as well as Dr Mokhbi S, Dr Gouga, S and Dr Bendoukhan, K, from the service of medically assisted procreation in Sidi Mabrouk, Constantine. We also thank Professor Fenech, M for his guidance about the buccal micronucleus cytochrome assay.

### References

- [1] F. Zegers-Hochschild, et al., International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology 2009, *Fertil. Steril.* 92 (5) (2009) 1520–1524.
- [2] A.A. Templeton, G.C. Penney, The incidence, characteristics, and prognosis of patients whose infertility is unexplained, *Fertil. Steril.* 37 (2) (1982) 175–182.
- [3] R. Isaksson, A. Tiitinen, Present concept of unexplained infertility, *Gynecol. Endocrinol.* 18 (5) (2004) 278–290.
- [4] Practice Committee of the ASRM, A.S.f.R.M., Effectiveness and treatment for unexplained infertility, *Fertil. Steril.* 86 (5 Suppl. 1) (2006) S111–4.
- [5] L. Migliore, et al., Association of micronucleus frequency with neurodegenerative diseases, *Mutagenesis* 26 (1) (2011) 85–92.
- [6] P. Thomas, et al., The buccal cytochrome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls, *Mutat. Res.* 638 (1-2) (2008) 37–47.
- [7] E. Murgia, et al., Micronuclei, genetic polymorphisms and cardiovascular disease mortality in a nested case-control study in Italy, *Mutat. Res.* 621 (1-2) (2007) 113–118.
- [8] S. Bonassi, et al., An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans, *Carcinogenesis* 28 (3) (2007) 625–631.
- [9] P. Thomas, et al., Buccal micronucleus cytochrome assay, *Nat. Protoc.* 4 (6) (2009) 825–837.
- [10] C. Bolognesi, M. Fenech, Micronucleus assay in human cells: lymphocytes and buccal cells, *Methods Mol. Biol.* 1044 (2013) 191–207.
- [11] M. Fenech, Cytokinesis-block micronucleus cytochrome assay, *Nat. Protoc.* 2 (5) (2007) 1084–1104.
- [12] N. Holland, et al., The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps, *Mutat. Res.* 659 (1-2) (2008) 93–108.
- [13] C. Bolognesi, et al., Buccal micronucleus cytochrome assay: results of an intra- and inter-laboratory scoring comparison, *Mutagenesis* 30 (4) (2015) 545–555.
- [14] M. Fenech, Micronuclei and their association with sperm abnormalities, infertility, pregnancy loss, pre-eclampsia and intra-uterine growth restriction in humans, *Mutagenesis* 26 (1) (2011) 63–67.
- [15] M. Trkova, et al., Increased micronuclei frequencies in couples with reproductive failure, *Reprod. Toxicol.* 14 (4) (2000) 331–335.
- [16] F. Papachristou, et al., Evidence of increased chromosomal instability in infertile males after exposure to mitomycin C and caffeine, *Asian J. Androl.* 8 (2) (2006) 199–204.
- [17] E. Yesilada, et al., Increased micronucleus frequencies in peripheral blood lymphocytes in women with polycystic ovary syndrome, *Eur. J. Endocrinol.* 154 (4) (2006) 563–568.
- [18] L.J. Moran, et al., Genome instability is increased in lymphocytes of women with polycystic ovary syndrome and is correlated with insulin resistance, *Mutat. Res.* 639 (1-2) (2008) 55–63.
- [19] A. Nersesyan, N. Chobanyan, Micronuclei and other nuclear anomalies levels in exfoliated buccal cells and DNA damage in leukocytes of patients with polycystic ovary syndrome, *J. BUON* 15 (2) (2010) 337–339.
- [20] O. Milosevic-Djordjevic, et al., Chromosomal instability in peripheral blood lymphocytes of patients with reproductive failure assessed by micronucleus assay, *Arh Hig Rada Toksikol* 63 (3) (2012) 367–375.
- [21] S. Moghbeli-Nejad, H. Mozdarani, A. Aleyasin, Increased frequency

of biomarkers of cytokinesis-failure or arrest (BN cells) as well as cell death biomarkers (CC, KHC and PYK cells). As mentioned above, factors like work-related exposure to mutagenic agents, smoking, alcohol consumption, anticancer therapy and chronic diseases were excluded in both groups. Therefore, the contribution of these factors in the increased chromosomal instability found in infertile couples is unlikely. We suggest that these patients may have a deficiency in either DNA repair mechanisms or some micronutrients (such as Zn, vitamins C, E, B9 or B12) or have an important rate of oxidative stress. Further investigations are required to confirm these hypotheses.

- of micronuclei in lymphocytes of infertile males after exposure to gamma irradiation: a possible sign of genomic instability, *J. Assist. Reprod. Genet.* 29 (1) (2012) 89–94.
- [22] W.-U.S.C. Muller, *Micronucleus assays*, *Adv. Mutagen. Res.* 5 (1994) Berlin: Obe, G..
- [23] B. Miller, et al., Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the in vitro chromosome aberration test: industrial experience, *Mutat. Res.* 392 (1-2) (1997) p. 45–59, 187–208.
- [24] M. Fenech, The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method, *Mutat. Res.* 392 (1-2) (1997) 11–18.
- [25] M. Fenech, et al., The HUMN and HUMNXL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells—past, present and future, *Mutagenesis* 26 (1) (2011) 239–245.
- [26] S. Bonassi, et al., The Human MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol, *Mutat. Res.* 728 (3) (2011) 88–97.
- [27] M. Fenech, et al., The Human MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans, *Mutat. Res.* 428 (1-2) (1999) 271–283.
- [28] P.M. Wiedermann, H. Schütz, *The Role of Evidence in Risk Characterization: Making Sense of Conflicting Data*, Wiley-VCH, Weinheim, 2008.
- [29] M. Ceppi, et al., Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues, *Mutat. Res.* 705 (1) (2010) 11–19.
- [30] A.K. Nersesyan, Nuclear buds in exfoliated human cells, *Mutat. Res.* 588 (1) (2005) 64–68.
- [31] M. Fenech, J.W. Crott, Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes—evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay, *Mutat. Res.* 504 (1-2) (2002) 131–136.
- [32] N. Shimizu, et al., Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase, *J. Cell Biol.* 140 (6) (1998) 1307–1320.
- [33] Q. Shi, R.W. King, Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines, *Nature* 437 (7061) (2005) 1038–1042.
- [34] S.C. Esteves, A clinical appraisal of the genetic basis in unexplained male infertility, *J. Hum. Reprod. Sci.* 6 (3) (2013) 176–182.
- [35] M. Fenech, et al., Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, beta-carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability—results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia, *Carcinogenesis* 26 (5) (2005) 991–999.
- [36] K. Umegaki, M. Fenech, Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils, *Mutagenesis* 15 (3) (2000) 261–269.
- [37] M. Fenech, et al., Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells, *Mutagenesis* 26 (1) (2011) 125–132.
- [38] P.E. Tolbert, C.M. Shy, J.W. Allen, Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development, *Mutat. Res.* 271 (1) (1992) 69–77.

# **REFERENCES**

- Agarwal, A. and T. M. Said (2003). "Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility." HumReprodUpdate 9(4): 331-345.
- Aguilera, A. and T. Garcia-Muse (2013). "Causes of genome instability." AnnuRevGenet 47: 1-32.
- Ahmad-Thabet, S. M. (2000). "The fimbrio-ovarian relation and its role on ovum picking in unexplained infertility: the fimbrio-ovarian accessibility tests." JObstetGynaecolRes 26(1): 65-70.
- Al Zabadi, H., L. Ferrari, et al. (2008). "Biomonitoring of complex occupational exposures to carcinogens: the case of sewage workers in Paris." BMCCancer 8: 67.
- Aston, K. I. and D. T. Carrell (2012). "Emerging evidence for the role of genomic instability in male factor infertility." SystBiolReprodMed 58(2): 71-80.
- Autrup, H., T. Seremet, et al. (1985). "Metabolism of benzo[a]pyrene by cultured rat and human buccal mucosa cells." Carcinogenesis 6(12): 1761-1765.
- Baik, H. W. and R. M. Russell (1999). "Vitamin B12 deficiency in the elderly." AnnuRevNutr 19: 357-377.
- Bailey, L. B. (2009). FolateinHealthandDisease, CRC Press.
- Bailey, L. B. and J. F. Gregory, 3rd (1999). "Folate metabolism and requirements." JNutr 129(4): 779-782.
- Barratt, C. L., L. Bjorndahl, et al. (2011). "ESHRE special interest group for andrology basic semen analysis course: a continued focus on accuracy, quality, efficiency and clinical relevance." HumReprod 26(12): 3207-3212.
- Battershill, J. M., K. Burnett, et al. (2008). "Factors affecting the incidence of genotoxicity biomarkers in peripheral blood lymphocytes: impact on design of biomonitoring studies." Mutagenesis 23(6): 423-437.
- Blacker, C. M., K. A. Ginsburg, et al. (1997). "Unexplained infertility: evaluation of the luteal phase; results of the National Center for Infertility Research at Michigan." FertilSteril 67(3): 437-442.
- Blount, B. C., M. M. Mack, et al. (1997). "Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage." ProcNatlAcadSciUSA 94(7): 3290-3295.
- Boller, K. and W. Schmid (1970). "[Chemical mutagenesis in mammals. The Chinese hamster bone marrow as an in vivo test system. Hematological findings after treatment with trenimon]." Humangenetik 11(1): 35-54.
- Bolognesi, C. and M. Fenech (2013). "Micronucleus assay in human cells: lymphocytes and buccal cells." MethodsMolBiol 1044: 191-207.

- Bolognesi, C. and N. Holland (2016). "The use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for monitoring pesticide-exposed populations." MutatRes 770(Pt A): 183-203.
- Bolognesi, C., P. Roggeri, et al. (2015). "Buccal micronucleus cytome assay: results of an intra- and inter-laboratory scoring comparison." Mutagenesis 30(4): 545-555.
- Bonassi, S., B. Biasotti, et al. (2009). "State of the art survey of the buccal micronucleus assay--a first stage in the HUMN(XL) project initiative." Mutagenesis 24(4): 295-302.
- Bonassi, S., E. Coskun, et al. (2011). "The HUman MicroNucleus project on eXfoLiated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol." MutatRes 728(3): 88-97.
- Bonassi, S., M. Neri, et al. (2003). "Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project." MutatRes 543(2): 155-166.
- Bonassi, S., A. Znaor, et al. (2007). "An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans." Carcinogenesis 28(3): 625-631.
- Cahill, D. J., P. G. Wardle, et al. (1995). "Pituitary-ovarian dysfunction as a cause for endometriosis-associated and unexplained infertility." HumReprod 10(12): 3142-3146.
- Cédrin-Durnerin, I. (2006). "Contre l'utilisation du citrate de clomifène dans les infertilités inexplicées." GynécologieObstétrique&Fertilité 34: 61-65.
- Ceppi, M., B. Biasotti, et al. (2010). "Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues." MutatRes 705(1): 11-19.
- Cerquiera, E., Meireles, J. (2014). The use of the micronucleus test to monitor individuals at risk of oral cancer. The research and biology of cancer II. , Hong Kong, iConcept Press Ltd.
- Chen, C., M. Arjomandi, et al. (2006). "Cytogenetic damage in buccal epithelia and peripheral lymphocytes of young healthy individuals exposed to ozone." Mutagenesis 21(2): 131-137.
- Clouaire, T. and I. Stancheva (2008). "Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin?" CellMolLifeSci 65(10): 1509-1522.
- Combs, G. F. (2012). Properties of Vitamins. The Vitamins. C. University. Ithaca, NY: 33-70.
- Countryman, P. I. and J. A. Heddle (1976). "The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes." MutatRes 41(2-3): 321-332.
- Crott, J. and M. Fenech (2001). "Preliminary study of the genotoxic potential of homocysteine in human lymphocytes in vitro." Mutagenesis 16(3): 213-217.
- Crott, J. W., S. T. Mashiyama, et al. (2001). "The effect of folic acid deficiency and MTHFR C677T polymorphism on chromosome damage in human lymphocytes in vitro." Cancer EpidemiolBiomarkersPrev 10(10): 1089-1096.

- Cui, X., X. Jing, et al. (2016). "DNA methylation in spermatogenesis and male infertility." Exp TherMed 12(4): 1973-1979.
- Davis, R. E. and D. J. Nicol (1988). "Folic acid." IntJBiochem 20(2): 133-139.
- de Mouzon, J. (2011). Épidémiologie de l'infertilité. Physiologie, pathologie et thérapie de la reproductionchezl'humain. Paris, Springer Paris: 123-129.
- Dechanet C, B. C., Anahory T, Reyftmann L, Hedon B, Dechaud H. (2009). "Infertilité du couple : de l'interrogatoire à l'orientation thérapeutique." Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction 38(1): 9-18.
- Decordier, I., E. Cundari, et al. (2005). "Influence of caspase activity on micronuclei detection: a possible role for caspase-3 in micronucleation." Mutagenesis 20(3): 173-179.
- Decordier, I., L. Dillen, et al. (2002). "Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules." Mutagenesis 17(4): 337-344.
- Decordier, I. and M. Kirsch-Volders (2006). "The in vitro micronucleus test: from past to future." MutatRes 607(1): 2-4.
- Duthie, S. J., S. Narayanan, et al. (2002). "Impact of folate deficiency on DNA stability." J Nutr 132(8 Suppl): 2444S-2449S.
- Dyer, S. J. (2009). "International estimates on infertility prevalence and treatment seeking: potential need and demand for medical care." HumReprod 24(9): 2379-2380; author reply 2380-2373.
- Ebara, S. (2017). "Nutritional role of folate." CongenitAnom(Kyoto) 57(5): 138-141.
- Elhajouji, A., F. Tibaldi, et al. (1997). "Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors in vitro in human lymphocytes." Mutagenesis 12(3): 133-140.
- Elhajouji, A., P. Van Hummelen, et al. (1995). "Indications for a threshold of chemically-induced aneuploidy in vitro in human lymphocytes." EnvironMolMutagen 26(4): 292-304.
- Empeire, J.-C. (2015). "Infertilité idiopathique: la stimulation ovarienne simple chez la femme ovulatoire est-elle indiquée?" MédecinedelaReproduction 17(2): 134-140.
- Esterhuizen, A. D., D. R. Franken, et al. (2001). "Clinical importance of zona pellucida-induced acrosome reaction and its predictive value for IVF." HumReprod 16(1): 138-144.
- Esteves, S. C. (2013). "A clinical appraisal of the genetic basis in unexplained male infertility." J HumReprodSci 6(3): 176-182.
- Everson, R. B., C. M. Wehr, et al. (1988). "Association of marginal folate depletion with increased human chromosomal damage in vivo: demonstration by analysis of micronucleated erythrocytes." JNatlCancerInst 80(7): 525-529.

- Fenech, M. (1997). "The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method." MutatRes 392(1-2): 11-18.
- Fenech, M. (1999). "Micronucleus frequency in human lymphocytes is related to plasma vitamin B12 and homocysteine." MutatRes 428(1-2): 299-304.
- Fenech, M. (2000). "The in vitro micronucleus technique." MutatRes 455(1-2): 81-95.
- Fenech, M. (2001). "The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells." MutatRes 475(1-2): 57-67.
- Fenech, M. (2002). "Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology." Toxicology 181-182: 411-416.
- Fenech, M. (2003). "Genomic stability: a new paradigm for recommended dietary allowances (RDAs)." ForumNutr 56: 97-100.
- Fenech, M. (2003). "Nutritional treatment of genome instability: a paradigm shift in disease prevention and in the setting of recommended dietary allowances." NutrResRev 16(1): 109-122.
- Fenech, M. (2007). "Cytokinesis-block micronucleus cytome assay." NatProtoc 2(5): 1084-1104.
- Fenech, M. (2011). "Micronuclei and their association with sperm abnormalities, infertility, pregnancy loss, pre-eclampsia and intra-uterine growth restriction in humans." Mutagenesis 26(1): 63-67.
- Fenech, M. (2012). "Folate (vitamin B9) and vitamin B12 and their function in the maintenance of nuclear and mitochondrial genome integrity." MutatRes 733(1-2): 21-33.
- Fenech, M., C. Aitken, et al. (1998). "Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young Australian adults." Carcinogenesis 19(7): 1163-1171.
- Fenech, M., P. Baghurst, et al. (2005). "Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, beta-carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability--results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia." Carcinogenesis 26(5): 991-999.
- Fenech, M., C. Bolognesi, et al. (2007). "Harmonisation of the micronucleus assay in human buccal cells--a Human Micronucleus (HUMN) project ([www.humn.org](http://www.humn.org)) initiative commencing in 2007." Mutagenesis 22(1): 3-4.
- Fenech, M. and S. Bonassi (2011). "The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes." Mutagenesis 26(1): 43-49.

- Fenech, M., S. Bonassi, et al. (2003). "Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project." MutatRes 534(1-2): 45-64.
- Fenech, M., W. P. Chang, et al. (2003). "HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures." MutatRes 534(1-2): 65-75.
- Fenech, M., J. Crott, et al. (1999). "Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide." Mutagenesis 14(6): 605-612.
- Fenech, M. and J. W. Crott (2002). "Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay." MutatRes 504(1-2): 131-136.
- Fenech, M., N. Holland, et al. (1999). "The HUman MicroNucleus Project--An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans." MutatRes 428(1-2): 271-283.
- Fenech, M., N. Holland, et al. (2011). "The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells--past, present and future." Mutagenesis 26(1): 239-245.
- Fenech, M., M. Kirsch-Volders, et al. (2011). "Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells." Mutagenesis 26(1): 125-132.
- Fenech, M. and A. Morley (1985). "Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay." Cytobios 43(172-173): 233-246.
- Fenech, M. F., I. E. Dreosti, et al. (1997). "Folate, vitamin B12, homocysteine status and chromosome damage rate in lymphocytes of older men." Carcinogenesis 18(7): 1329-1336.
- Ferlin, A., F. Raicu, et al. (2007). "Male infertility: role of genetic background." ReprodBiomed Online 14(6): 734-745.
- Fisch, P., R. F. Casper, et al. (1989). "Unexplained infertility: evaluation of treatment with clomiphene citrate and human chorionic gonadotropin." FertilSteril 51(5): 828-833.
- Gazvani, M. R., E. D. Wilson, et al. (2000). "Role of mitotic control in spermatogenesis." Fertil Steril 74(2): 251-256.
- Geva, E., A. Amit, et al. (1997). "Autoimmunity and reproduction." FertilSteril 67(4): 599-611.
- Ghemrawi, R., S. Pooya, et al. (2013). "Decreased vitamin B12 availability induces ER stress through impaired SIRT1-deacetylation of HSF1." CellDeath&Disease 4: e553.

- Green, R., L. H. Allen, et al. (2017). "Vitamin B12 deficiency." NatRevDisPrimers 3: 17040.
- Guéant, J. L., Adjalla, C., Lambert, D., Nicolas, J.P. (1993). "Physiology and pathology of cobalamin assimilation." Immuno-analyse&BiologieSpécialisée 8(2): 89-96.
- Guéant, J. L., Coelho, D., Nicolas, J. (2014). "La vitamine B12 et les maladies génétiques associées." Bull.Acad.NatleMéd. 198(6): 1141-1156.
- Guilland, J. C. (2011). "Folate and Cancer. The right dose." CorrespondancesenMétabolismes HormonesDiabètesetNutrition. 15(6): 196-200.
- Guzick, D. S., I. Grefenstette, et al. (1994). "Infertility evaluation in fertile women: a model for assessing the efficacy of infertility testing." HumReprod 9(12): 2306-2310.
- Guzick, D. S., M. W. Sullivan, et al. (1998). "Efficacy of treatment for unexplained infertility." FertilSteril 70(2): 207-213.
- Hazout, A. (2006). "[Oocyte quality and ovarian reserve]." JGynecolObstetBiolReprod(Paris) 35(5 Pt 2): 2S35-32S36.
- Heddle, J. A. (1973). "A rapid in vivo test for chromosomal damage." MutatRes 18(2): 187-190.
- Hildebrand, M. S., M. R. Avenarius, et al. (2010). "Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels." EurJHumGenet 18(11): 1178-1184.
- Holland, N., C. Bolognesi, et al. (2008). "The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps." MutatRes 659(1-2): 93-108.
- Holland, N., P. Harmatz, et al. (2007). "Cytogenetic damage in blood lymphocytes and exfoliated epithelial cells of children with inflammatory bowel disease." PediatrRes 61(2): 209-214.
- Host, E., S. Lindenberg, et al. (1999). "DNA strand breaks in human sperm cells: a comparison between men with normal and oligozoospermic sperm samples." Acta Obstet Gynecol Scand 78(4): 336-339.
- Hull, M. G., J. A. Williams, et al. (1998). "The contribution of subtle oocyte or sperm dysfunction affecting fertilization in endometriosis-associated or unexplained infertility: a controlled comparison with tubal infertility and use of donor spermatozoa." HumReprod 13(7): 1825-1830.
- Huyghe, E., V. Izard, et al. (2008). "[Optimal evaluation of the infertile male. 2007 French urological association guidelines]." ProgUrol 18(2): 95-101.
- Iarmarcovai, G., A. Botta, et al. (2007). "[Micronuclei and genetic polymorphisms: from exposure to susceptibility]." AnnBiolClin(Paris) 65(4): 357-363.
- Isaksson, R. and A. Tiitinen (2004). "Present concept of unexplained infertility." Gynecol Endocrinol 18(5): 278-290.

- Jensen, M., H. Leffers, et al. (2004). "Frequent polymorphism of the mitochondrial DNA polymerase gamma gene (POLG) in patients with normal spermiograms and unexplained subfertility." HumReprod 19(1): 65-70.
- Jensen, T. K., R. Jacobsen, et al. (2009). "Good semen quality and life expectancy: a cohort study of 43,277 men." AmJEpidemiol 170(5): 559-565.
- Jhaveri, M. S., C. Wagner, et al. (2001). "Impact of extracellular folate levels on global gene expression." MolPharmacol 60(6): 1288-1295.
- Kamel, R. M. (2010). "Management of the infertile couple: an evidence-based protocol." Reprod BiolEndocrinol 8: 21.
- Kirsch-Volders, M., T. Sofuni, et al. (2003). "Report from the in vitro micronucleus assay working group." MutatRes 540(2): 153-163.
- Klentzeris, L. D. (1997). "The role of endometrium in implantation." HumReprod 12(11 Suppl): 170-175.
- Kozyraki, R. and O. Cases (2013). "Vitamin B12 absorption: mammalian physiology and acquired and inherited disorders." Biochimie 95(5): 1002-1007.
- Krausz, C. and C. Giachini (2007). "Genetic risk factors in male infertility." ArchAndrol 53(3): 125-133.
- Krautler, B. (2005). "Vitamin B12: chemistry and biochemistry." BiochemSocTrans 33(Pt 4): 806-810.
- Kupesic, S. and A. Kurjak (1993). "Uterine and ovarian perfusion during the periovulatory period assessed by transvaginal color Doppler." FertilSteril 60(3): 439-443.
- Leach, N. T. and C. Jackson-Cook (2004). "Micronuclei with multiple copies of the X chromosome: do chromosomes replicate in micronuclei?" MutatRes 554(1-2): 89-94.
- Leach, R. E., K. S. Moghissi, et al. (1997). "Intensive hormone monitoring in women with unexplained infertility: evidence for subtle abnormalities suggestive of diminished ovarian reserve." FertilSteril 68(3): 413-420.
- Li, N., Z. Sun, et al. (1999). "The chemopreventive effects of tea on human oral precancerous mucosa lesions." ProcSocExpBiolMed 220(4): 218-224.
- Liu, Y., K. Sundqvist, et al. (1993). "Metabolism and macromolecular interaction of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in cultured explants and epithelial cells of human buccal mucosa." Carcinogenesis 14(11): 2383-2388.
- Luborsky, J., B. Llanes, et al. (1999). "Ovarian autoimmunity: greater frequency of autoantibodies in premature menopause and unexplained infertility than in the general population." Clin Immunol 90(3): 368-374.

- Luborsky, J., B. Llanes, et al. (2000). "Ovarian antibodies, FSH and inhibin B: independent markers associated with unexplained infertility." HumReprod 15(5): 1046-1051.
- Lucock, M. (2000). "Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes." MolGenetMetab 71(1-2): 121-138.
- Luzhna, L., P. Kathiria, et al. (2013). "Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond." FrontGenet 4: 131.
- MacGregor, J. T., C. M. Wehr, et al. (1997). "'Spontaneous' genetic damage in man: evaluation of interindividual variability, relationship among markers of damage, and influence of nutritional status." MutatRes 377(1): 125-135.
- Majer, B. J., B. Laky, et al. (2001). "Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials." MutatRes 489(2-3): 147-172.
- Marcelli, F., G. Robin, et al. (2009). "[Treatment of male infertility]." ProgUrol 19(4): 260-264.
- Mateuca, R., N. Lombaert, et al. (2006). "Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring." Biochimie 88(11): 1515-1531.
- Migliore, L., L. Cocchi, et al. (1996). "Detection of the centromere in micronuclei by fluorescence in situ hybridization: its application to the human lymphocyte micronucleus assay after treatment with four suspected aneugens." Mutagenesis 11(3): 285-290.
- Migliore, L., F. Coppede, et al. (2011). "Association of micronucleus frequency with neurodegenerative diseases." Mutagenesis 26(1): 85-92.
- Milosevic-Djordjevic, O., I. Stosic, et al. (2012). "Chromosomal instability in peripheral blood lymphocytes of patients with reproductive failure assessed by micronucleus assay." ArhHig RadaToksikol 63(3): 367-375.
- Moghbeli-Nejad, S., H. Mozdarani, et al. (2012). "Increased frequency of micronuclei in lymphocytes of infertile males after exposure to gamma irradiation: a possible sign of genomic instability." JAssistReprodGenet 29(1): 89-94.
- Mueller, B. A. a. D., J R (1989). Epidemiology of infertility. Extent of the problem-risk factors and associated social changes. Controversiesinreproductiveendocrinologyandinfertility M. R. Soules. New York, Elsevier: 1-13.
- Müller, W.-U. and C. Streffer (1994). Micronucleus Assays. AdvancesinMutagenesisResearch. G. Obe. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 1-134.
- Murgia, E., V. Maggini, et al. (2007). "Micronuclei, genetic polymorphisms and cardiovascular disease mortality in a nested case-control study in Italy." MutatRes 621(1-2): 113-118.

- Nakajima, S. T. and M. Gibson (1991). "Pathophysiology of luteal-phase deficiency in human reproduction." ClinObstetGynecol 34(1): 167-179.
- Nersesyan, A. and N. Chobanyan (2010). "Micronuclei and other nuclear anomalies levels in exfoliated buccal cells and DNA damage in leukocytes of patients with polycystic ovary syndrome." JBUON 15(2): 337-339.
- Nersesyan, A. K. (2005). "Nuclear buds in exfoliated human cells." MutatRes 588(1): 64-68.
- O'Flynn O'Brien, K. L., A. C. Varghese, et al. (2010). "The genetic causes of male factor infertility: a review." FertilSteril 93(1): 1-12.
- Obe, G., B. Beek, et al. (1975). "The human leukocyte test system. III. Premature chromosome condensation from chemically and x-ray induced micronuclei." MutatRes 27(1): 89-101.
- Omland, A. K., P. Fedorcsak, et al. (2001). "Natural cycle IVF in unexplained, endometriosis-associated and tubal factor infertility." HumReprod 16(12): 2587-2592.
- Orsiere, T., I. Sari-Minodier, et al. (2006). "Genotoxic risk assessment of pathology and anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde by use of personal air sampling and analysis of DNA damage in peripheral lymphocytes." MutatRes 605(1-2): 30-41.
- Pampalona, J., C. Frias, et al. (2012). "Progressive telomere dysfunction causes cytokinesis failure and leads to the accumulation of polyploid cells." PLoSGenet 8(4): e1002679.
- Papachristou, F., T. Lialiaris, et al. (2006). "Evidence of increased chromosomal instability in infertile males after exposure to mitomycin C and caffeine." AsianJAndrol 8(2): 199-204.
- Pikor, L., K. Thu, et al. (2013). "The detection and implication of genome instability in cancer." CancerMetastasisRev 32(3-4): 341-352.
- Piyathilake, C. J., M. Macaluso, et al. (1995). "Cigarette smoking, intracellular vitamin deficiency, and occurrence of micronuclei in epithelial cells of the buccal mucosa." Cancer Epidemiol BiomarkersPrev 4(7): 751-758.
- Practice Committee of the ASRM, A. S. f. R. M. (2006). "Effectiveness and treatment for unexplained infertility." FertilSteril 86(5 Suppl 1): S111-114.
- Practice Committee of the ASRM, A. S. f. R. M. (2006). "Optimal evaluation of the infertile female." FertilSteril 86(5 Suppl 1): S264-267.
- Quaas, A. and A. Dokras (2008). "Diagnosis and treatment of unexplained infertility." RevObstet Gynecol 1(2): 69-76.
- R. Levy, N. S., E. Hafhouf, C. Dupont, B. Benzacken, I. Aknin-Seifer (2010). "À la recherche d'une étiologie génétique chez les hommes infertiles." MédecinedelaReproduction 12(1): 4-11.
- Ramirez, A. and P. H. Saldanha (2002). "Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas." GenetMolRes 1(3): 246-260.

- Ray, A., A. Shah, et al. (2012). "Unexplained infertility: an update and review of practice." Reprod BiomedOnline 24(6): 591-602.
- Rodin, D. A., A. M. Fisher, et al. (1994). "Cycle abnormalities in infertile women with regular menstrual cycles: effects of clomiphene citrate treatment." FertilSteril 62(1): 42-47.
- Rooney, K. L. and A. D. Domar (2018). "The relationship between stress and infertility." Dialogues ClinNeurosci 20(1): 41-47.
- Rovio, A. T., D. R. Marchington, et al. (2001). "Mutations at the mitochondrial DNA polymerase (POLG) locus associated with male infertility." NatGenet 29(3): 261-262.
- Rufenacht, P., S. Mach-Pascual, et al. (2008). "[Vitamin B12 deficiency: a challenging diagnosis and treatment]." RevMedSuisse 4(175): 2212-2214, 2216-2217.
- Rybar, R., P. Markova, et al. (2009). "Sperm chromatin integrity in young men with no experiences of infertility and men from idiopathic infertility couples." Andrologia 41(3): 141-149.
- Saleh, R. A., A. Agarwal, et al. (2003). "Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility." Fertil Steril 79 Suppl 3: 1597-1605.
- Salonia, A., R. Matloob, et al. (2009). "Are infertile men less healthy than fertile men? Results of a prospective case-control survey." EurUrol 56(6): 1025-1031.
- Sarrel, P. M. and A. H. DeCherney (1985). "Psychotherapeutic intervention for treatment of couples with secondary infertility." FertilSteril 43(6): 897-900.
- Schlosser, J., I. Nakib, et al. (2006). "[Assessment of male infertility]." AnnUrol(Paris) 40(6): 349-354.
- Seetharam, B. and R. R. Yammani (2003). "Cobalamin transport proteins and their cell-surface receptors." ExpertRevMolMed 5(18): 1-18.
- Selhub, J. (2002). "Folate, vitamin B12 and vitamin B6 and one carbon metabolism." JNutrHealth Aging 6(1): 39-42.
- Shane, B. (2001). "Folate chemistry and metabolism." ClinicalResearchandRegulatoryAffairs 18(3): 137-159.
- Sharlip, I. D., J. P. Jarow, et al. (2002). "Best practice policies for male infertility." FertilSteril 77(5): 873-882.
- Shi, Q. and R. W. King (2005). "Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines." Nature 437(7061): 1038-1042.
- Shimizu, N., N. Itoh, et al. (1998). "Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase." JCellBiol 140(6): 1307-1320.

- Shimizu, N., T. Shimura, et al. (2000). "Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei." MutatRes 448(1): 81-90.
- Spano, M., J. P. Bonde, et al. (2000). "Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team." FertilSteril 73(1): 43-50.
- Spivack, S. D., G. J. Hurteau, et al. (2004). "Gene-environment interaction signatures by quantitative mRNA profiling in exfoliated buccal mucosal cells." CancerRes 64(18): 6805-6813.
- Steer, C. V., S. L. Tan, et al. (1994). "Midluteal-phase vaginal color Doppler assessment of uterine artery impedance in a subfertile population." FertilSteril 61(1): 53-58.
- Stich, H. F. and M. P. Rosin (1983). "Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells." IntJCancer 31(3): 305-308.
- Stich, H. F. and M. P. Rosin (1984). "Micronuclei in exfoliated human cells as a tool for studies in cancer risk and cancer intervention." CancerLett 22(3): 241-253.
- Stich, H. F., M. P. Rosin, et al. (1984). "Reduction with vitamin A and beta-carotene administration of proportion of micronucleated buccal mucosal cells in Asian betel nut and tobacco chewers." Lancet 1(8388): 1204-1206.
- Stich, H. F., R. H. San, et al. (1983). "Adaptation of the DNA-repair and micronucleus tests to human cell suspensions and exfoliated cells." AnnNYAcadSci 407: 93-105.
- Subramanian, M. G., C. L. Kowalczyk, et al. (1997). "Midcycle increase of prolactin seen in normal women is absent in subjects with unexplained infertility." FertilSteril 67(4): 644-647.
- Suzuki, M. M. and A. Bird (2008). "DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics." NatRevGenet 9(6): 465-476.
- Takeuchi, S., H. Minoura, et al. (2000). "In vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection for couples with unexplained infertility after failed direct intraperitoneal insemination." J AssistReprodGenet 17(9): 515-520.
- Templeton, A., C. Fraser, et al. (1991). "Infertility--epidemiology and referral practice." Hum Reprod 6(10): 1391-1394.
- Templeton, A. A. and G. C. Penney (1982). "The incidence, characteristics, and prognosis of patients whose infertility is unexplained." FertilSteril 37(2): 175-182.
- Thomas, P. and M. Fenech (2011). "Buccal micronucleus cytome assay." MethodsMolBiol 682: 235-248.

- Thomas, P., S. Harvey, et al. (2008). "The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls." MutatRes 638(1-2): 37-47.
- Thomas, P., N. Holland, et al. (2009). "Buccal micronucleus cytome assay." NatProtoc 4(6): 825-837.
- Titenko-Holland, N., R. A. Jacob, et al. (1998). "Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate." MutatRes 417(2-3): 101-114.
- Titenko-Holland, N., G. Windham, et al. (1997). "Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers." MutatRes 388(1): 85-95.
- Tolbert, P. E., C. M. Shy, et al. (1992). "Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development." MutatRes 271(1): 69-77.
- Torre, A., J. L. Pouly, et al. (2010). "[Anatomic evaluation of the female of the infertile couple]." J GynecolObstetBiolReprod(Paris) 39(8 Suppl 2): S34-44.
- Trkova, M., J. Kapras, et al. (2000). "Increased micronuclei frequencies in couples with reproductive failure." ReprodToxicol 14(4): 331-335.
- Umegaki, K. and M. Fenech (2000). "Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils." Mutagenesis 15(3): 261-269.
- Utani, K., Y. Kohno, et al. (2010). "Emergence of micronuclei and their effects on the fate of cells under replication stress." PLoSOne 5(4): e10089.
- Van Assche, E., M. Bonduelle, et al. (1996). "Cytogenetics of infertile men." HumReprod 11 Suppl 4: 1-24; discussion 25-26.
- Veujoz, M., Gaudineau, A., Sananes, N., Fritz, G., Langer, B. (2013). "Folates et grossesse. ." Médecinethérapeutique. 19(4): 275-284.
- Vidailhet, M. (2010). "Carences vitaminiques (hormis la carence en vitamine D)" EMC: 1-18.
- Virro, M. R., K. L. Larson-Cook, et al. (2004). "Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles." FertilSteril 81(5): 1289-1295.
- Visentin, M., N. Diop-Bove, et al. (2014). "The intestinal absorption of folates." AnnuRevPhysiol 76: 251-274.

- Wagner, C. (2001). "Biochemical role of folate in cellular metabolism." Clinical Research and Regulatory Affairs 18(3): 161-180.
- Wang, X. and M. Fenech (2003). "A comparison of folic acid and 5-methyltetrahydrofolate for prevention of DNA damage and cell death in human lymphocytes in vitro." Mutagenesis 18(1): 81-86.
- Watanabe, F. (2007). "Vitamin B12 sources and bioavailability." Exp Biol Med (Maywood) 232(10): 1266-1274.
- WHO, W. H. O. (2015). Serum and red blood cell folate concentrations for assessing folate status in populations. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. Geneva, WHO: 7.
- Witthöft, C., Forssén, K., Johannesson, L., Jägerstad, M. (1999). "Folates-food sources, analyses, retention and bioavailability." Näringsforskning 43(1): 138-146.
- Wultsch, G., A. Nersesyan, et al. (2014). "The sensitivity of biomarkers for genotoxicity and acute cytotoxicity in nasal and buccal cells of welders." IntJHygEnvironHealth 217(4-5): 492-498.
- Yesilada, E., I. Sahin, et al. (2006). "Increased micronucleus frequencies in peripheral blood lymphocytes in women with polycystic ovary syndrome." EurJEndocrinol 154(4): 563-568.
- Yildirim, I. H., E. Yesilada, et al. (2006). "Micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes and exfoliated buccal cells of untreated cancer patients." Genetika 42(5): 705-710.
- Zegers-Hochschild, F., G. D. Adamson, et al. (2009). "International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009." FertilSteril 92(5): 1520-1524.
- Zhivotovsky, B. and G. Kroemer (2004). "Apoptosis and genomic instability." NatRevMolCell Biol 5(9): 752-762.
- Zorrilla, M. and A. N. Yatsenko (2013). "The Genetics of Infertility: Current Status of the Field." CurrGenetMedRep 1(4).
- Zuniga-Gonzalez, G. M., C. M. Batista-Gonzalez, et al. (2007). "Micronuclei in diabetes: folate supplementation diminishes micronuclei in diabetic patients but not in an animal model." MutatRes 634(1-2): 126-134.