

Identification du gamète normal

Fragmentation de l'ADN

Paul COHEN-BACRIE

Laboratoire d'EYLAU

AMP Mulette AMP Cherest

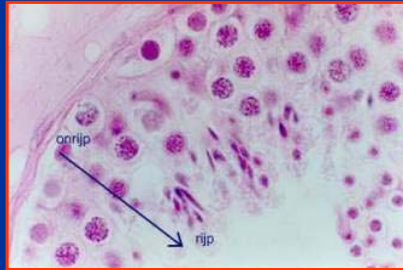
Hôpital AMERICAIN 25 Novembre 2005

Fragmentation de l'ADN

- Premières méthodes « automatiques »
« débutées il y a 25 ans
- Evenson et al : Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. Science .1980
- Multiplication des articles depuis 5 ans
- La plupart en faveur d'une baisse du taux de grossesses si taux $\geq 30\%$

Fragmentation de l'ADN

- Spermatogenèse caractérisée par un taux élevé de prolifération cellulaire
- Élimination de cellules par apoptose



Première théorie (Gorczyca W et col, 1993)

- Application aux spermatozoïdes du modèle de l'apoptose des cellules somatiques présentant une fragmentation de l'ADN
- Apoptose permet l'élimination des spermatozoïdes éjaculés anormaux, potentiellement dangereux.

Deuxième théorie

(Sakkas D et col, 1999)

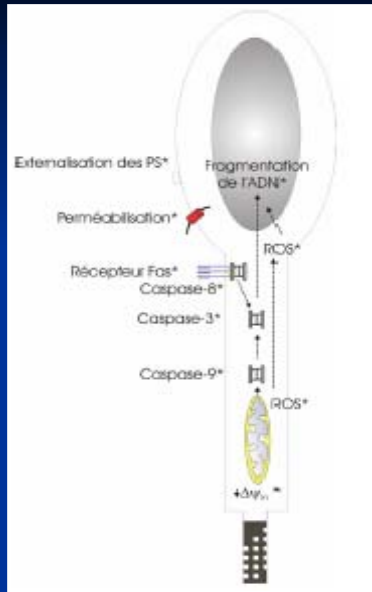
- **Compaction de l'ADN pendant la spermiogenèse.**
- **Spermatides en élongation avec cassures physiologiques de l'ADN des nucléases endogènes.**
- **cassures disparaissant avant la fin de la spermiogenèse.**
- **En cas d'anomalie des enzymes de réparation de l'ADN: persistance de la fragmentation de l'ADN dans les spz éjaculés.**

NECROSE

- **Compaction légère de la chromatine**
- **Fragmentation aléatoire de l'ADN**

APOPTOSE

- **Fragmentation oligonucléosomique d'ADN (200 paires de bases)**



Les voies apoptotiques extrinsèques débutent par l'engagement des récepteurs de mort (ex. Fas), suivies par l'activation de la caspase-8, puis de la caspase-3, qui précède la fragmentation de l'ADN.

Marchetti et al

Stigmates apoptotiques /sperme (Baccetti et col, 1996)

- Présence de stigmates apoptotiques dans tous les spermes en quantité variable.
- Donneurs fertiles : 0,1%
- Infection tractus génital : 8%
- SIDA : 3 à 8%
- Varicocèle : 1 à 10%
- Cryptorchidie : 15 à 20%
- Stérilité inexplicée : 25%
- Séminome testiculaire : 50%

APOPTOSE

- **Système Fas / Fas Ligand privilège immunitaire conféré au testicule**
- **Fas (CD95/APO-1) : récepteur de mort, protéique et transmembranaire de 45 kDa superfamille des récepteurs du TNF/NGF**
- **L'interaction spécifique de Fas avec son ligand, Fas ligand (FasL), conduit au suicide de la cellule**

**Origine de la
fragmentation des
spermatozoïdes
éjaculés**

Le taux de fragmentation varie avec

- **Abstinence**
- **Age**
- **Tabac**
- **Pollution**
- **Leucocytospermie**
- **Fièvre**
- **Nourriture**
- **Infection**



Origine des altérations de l'ADN

- **Les agents physiques.**
 - **Rayons X, gamma, UV: formation de dimères de thymine et thymine-cytosine: blocage de la réplication de l'ADN et de la transcription, létale pour la cellule.**



Origine des altérations de l'ADN

- Les agents chimiques.
 - Agents alkylants
 - L'acide nitreux (dérivé des nitrates ou nitrites: produits alimentaires et engrais)
 - Composés ressemblant à des bases puriques ou pyrimidiques.
 - Agents intercalants. bromure d'éthyidium ou B.E.T : blocage de la réplication de l'ADN

TYPES DE DOMMAGES DE L'ADN.

- Perte d'une base:
- Modification d'une base.
- Déamination: Cytosine transformée en uracile, l'adénine en hypoxanthine etc...
- Modifications chimiques: hydroxylations, Alkylation: addition de groupes méthyles ou alkyles
- structures entraînant une distorsion de la structure de l'ADN.

Etude du sperme

De nombreuses études trouvent
Une corrélation entre le % de Spz fragmentés
Et les paramètres du sperme :
Concentration, mobilité, atypies

Irvine D.S et col, Biol Reprod, 1999
Sakkas D et col, Exp. Cell. Res., 1999
Shen H.M. et col, Hum Reprod, 2002
Zini A et col, Fertil Steril, 2001

Préparation du sperme.

Parmi les différentes techniques de préparation
du sperme, le gradient de densité semble
plus efficace pour sélectionner les Spz
non fragmentés que la migration ascendante

Donnelly E.T. et col, Human Reprod, 2000.
Gandini L et col, Human Reprod, 2000
Levy R et col, Ann. Biol. Clin., 2001
Sakkas D et col, Human Reprod, 2000
Younglai E.V. et col, Human Reprod, 2001

TUNEL Cyt flux si >1M spz/ml

Frg %	abst	Spz/ éjac	vital	mobA	atyp	IAM	Surv %	n
<20	3,5	111	74	40	71	1,8	61	445
≥20 <30	3,7	115	71	28	73	1,8	59	313
≥30 <40	3,9	122	69	25	74	1,8	59	198
≥40	4*	114	61*	22*	75	1,9	62	168

Données Eylau non publiées

Techniques pour mesurer le taux de fragmentation du sperme

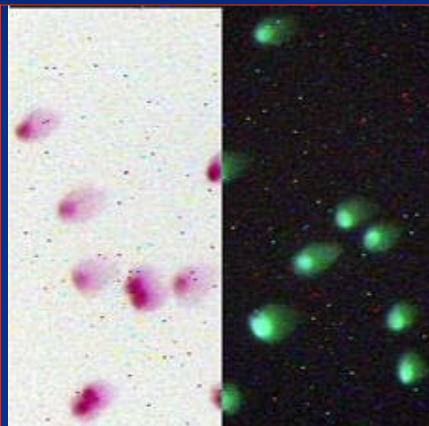
- Comet: Electrophoresis + Fluorescent dye
- UTP binding + Flow cytometry
- NT: Nick translation biotinylated UTP
- AO: Acridine orange + microscopy
- SCSA: Acridine Orange + Flow cytometry
- 8 OH dG /8 Oxo dG: HPLC + Electrochemistry
- SCD: Fernández et al., J. Androl .24:59-66, 2003

Technique COMET

(Single Cell Gel Electrophoresis : SCGE)

- Spz sur microgel très fins d'agarose, sur lame, lysés in situ, soumis à électrophorèse, puis marqués par colorant fluo de l'ADN.
- L'ADN fragmenté migre de la tête du Spz vers l'anode: donne un aspect de comète.
- L'intensité de la fluo et la longueur de la queue de la comète sont proportionnelles aux cassures des brins d'ADN des Spz.

COMET



- Irvine 2002 : niveau + élevé chez les H infertiles
- technique très sensible pour détecter les cassures dans l'ADN,
- aucun seuil n'a été établi
- pas de standardisation
- pas réalisée en routine

Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test Halosperm® Kit

Halo Size

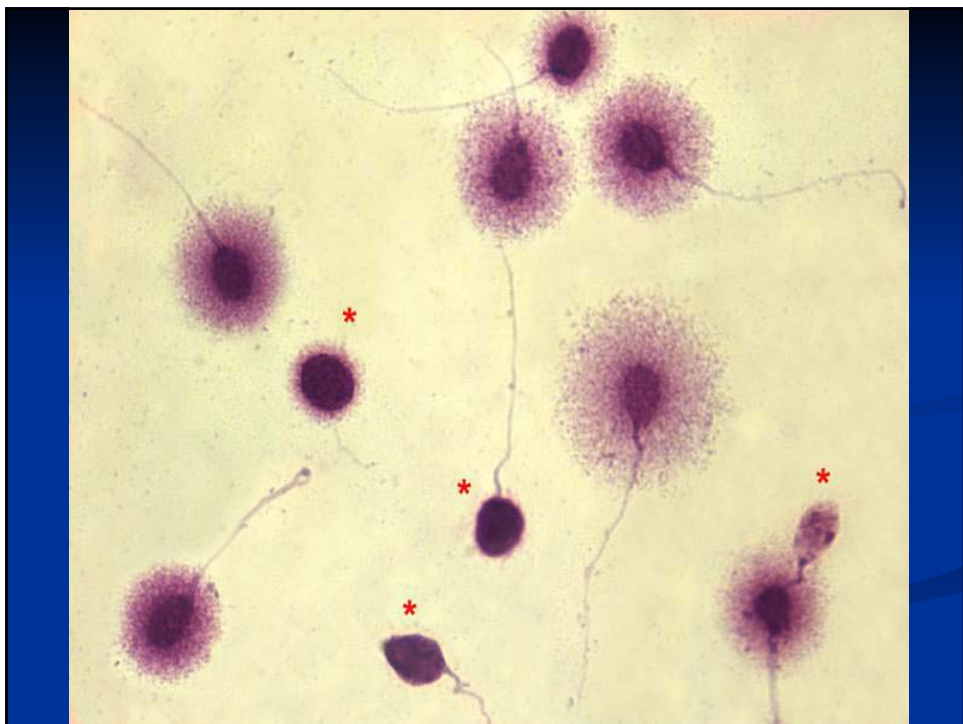
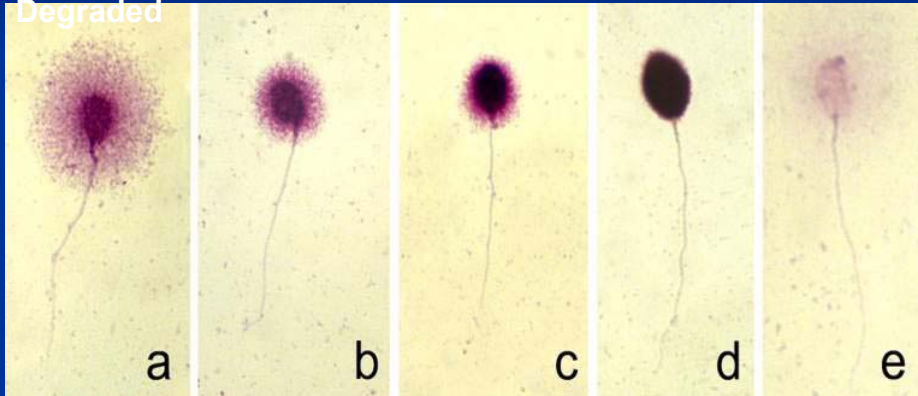
Big

Medium

Small

Without

Degraded

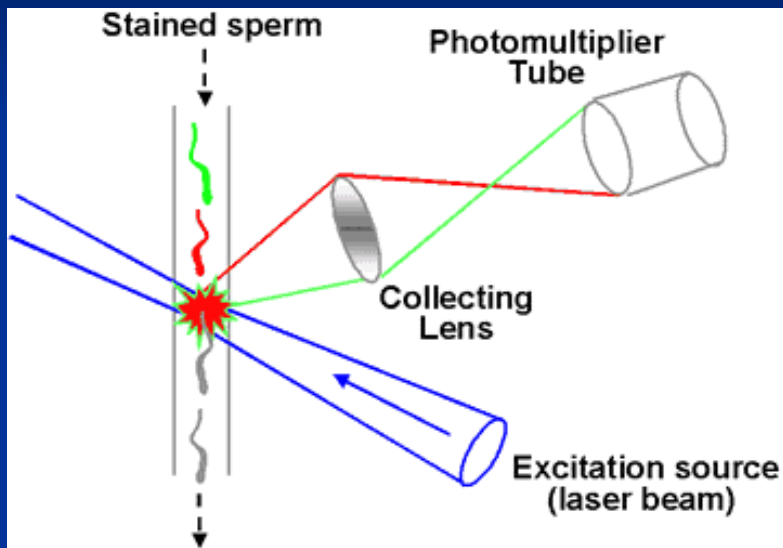


Technique TUNEL

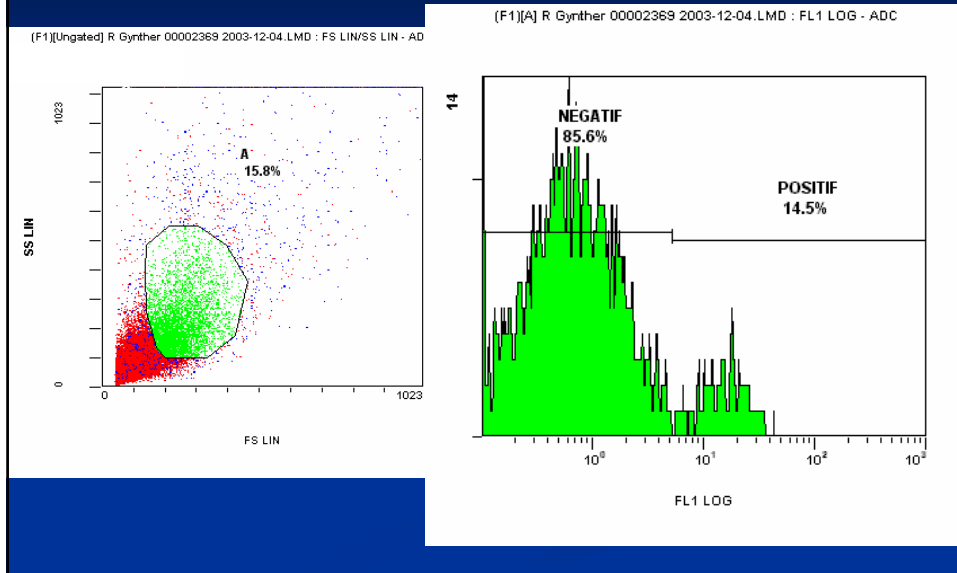
TdT-médiated dUTP-biotin Nick End Labeling

- **Technique de référence** pour la mise en évidence de l'apoptose dans cellules somatiques.
- Incorporation de nucléotides biotinylés aux extrémités des cassures d'ADN par action de polymérase (déoxynuclotide terminal transferase).
- Nucléotides biotinylés + Ac antidigoxigénine couplés à fluorochrome : permet la visualisation des fragments d'ADN.

Cytométrie de flux



Cytométrie de flux

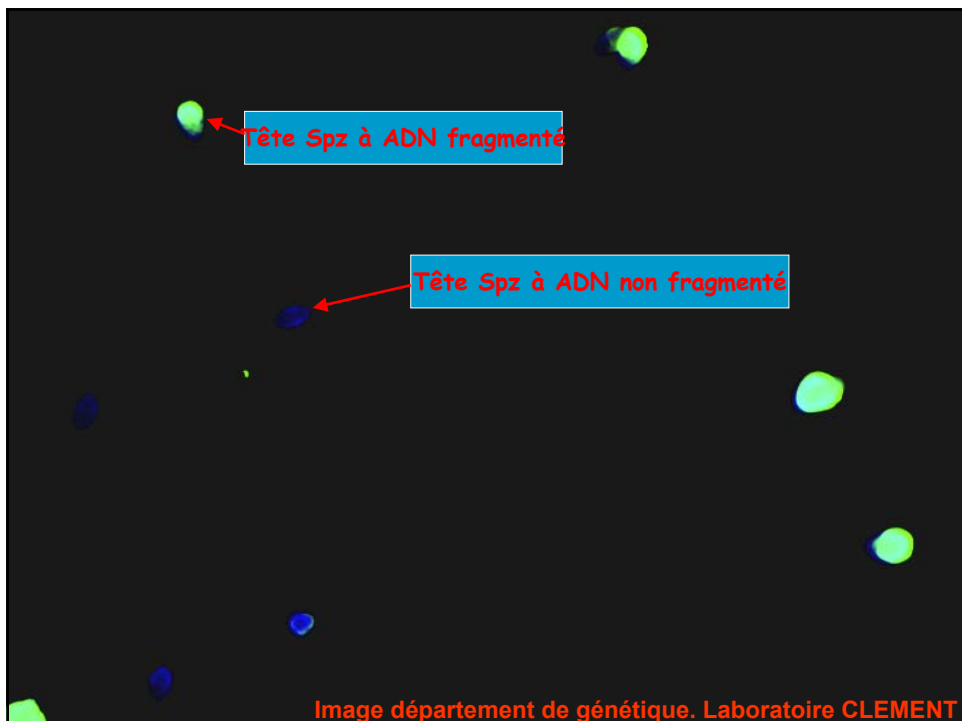


TUNEL cytométrie de flux

- Sergerie et al. Fertiles/Infertiles 73 ~ 13,0 % pour les fertiles et ~ 40,6 % pour les infertiles in press
- Oosterhuis et al. Infertiles 34 ~ 20 % pour les infertiles 2004
- Shen et al. Infertiles 60 ~ 15 % pour les infertiles 2002
- Muratori et al. Infertiles 140 ~ 11 % pour les infertiles 2003
- Sergerie et al. Volontaires 97 ~ 15 % pour la population étudiée 2000
- Muratori et al. Infertiles 43 ~ 15 % pour les infertiles 2000

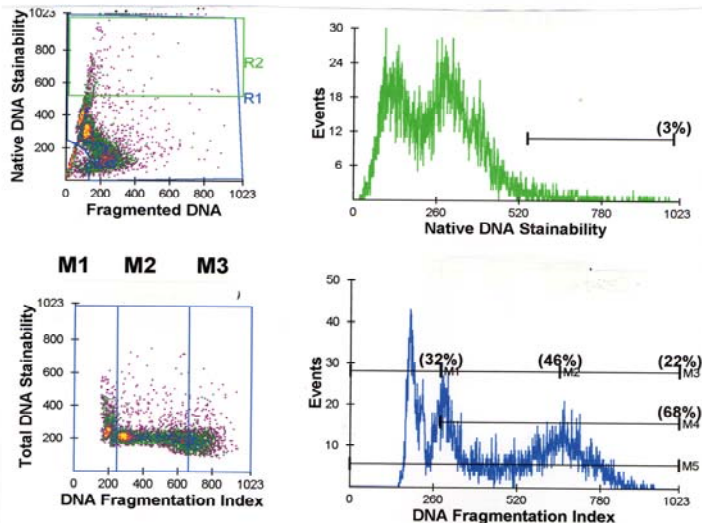
TUNEL in SITU

- Henkel et al. Infertiles FIV 167 < 36,5 % pour une grossesse 2004
- Benchaib et al. Infertiles FIV/ICSI 104 < 20 % pour une grossesse 2003
- Henkel et al. Infertiles FIV/ICSI 262 < 36,5 % FIV et < 24,3 % ICSI pour une grossesse 2003
- Lopes et al. Infertiles ICSI 131 < 25 % pour obtenir une fécondation 1998



Technique SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay)

- coloration à l'AO.
- Calcul d'une index de fragmentation : DFI (Evenson)
- DFI corrélé aux COMET ou TUNEL
- Pronostic pour fertilité :
 - DFI < 15% : bon
 - 15% < DFI < 30% : réservé
 - DFI > 30% : mauvais (taux de grossesses très faible et taux de FCS augmenté)
- Toute fragmentation aura un impact sur le développement embryonnaire précoce




**Fragmentation très élevée
High DFI: 68%**

- Si FRG bas les ovocytes ont des capacités de réparation Sakkas 1996 Ahmadi, 1999
- Si FRG élevée les capacités de réparation sont dépassées Sakkas (1996_)
- FRG contribue à l'échec de décondensation en ICSI et donc à l'échec de fécondation

• un taux élevé de FRG n'intervient pas sur l'échec de fécondation mais sur la formation des blastocystes . Ahmadi 1999

■

- La ZP sélectionne les spz
 - Van Dyk *et al.* (2000)
- Cependant les spz à taux élevé de FRG ont peu de chance à féconder les ovocytes en FIV
- (capacité de réparation des ovocytes)
- En ICSI, le choix du spz en cas de très forte oligo peut être un spz à risque de FRG élevée.  HM ICSI

RBM on line in press

- Meta analyse de la frg de l'ADN 4 études
- Evenson et al
- IIU : il y a 7,1x + de chances d'achever une grossesse si DFI <30% 1962 cas p=0,0001
- FIV : il y a 2 x + de chances d'achever une grossesse si DFI <30% 375 cas p=0,02
- FIV ICSI 1,7x + de chances d'achever une grossesse si DFI <30% 322 cas p=0,06

Tesarik et al

- Frq >15% des spermés éjaculés
- Frq < 6% des spz testiculaires
- Technique sur lame
- 200 spz comptés
- Non fumeurs
- 2° intention

Steele et al., 1999

- Les spz testiculaires (azoospermies sécrétoires) ont un taux de fragmentation plus élevés que les spz épидидymaires

A decrease in Blastocyst formation is observed when Sperm DNA fragmentation is increased
Virro et al. (2003). Sakkas et al. (2004),

Critically short telomeres are associated with sperm DNA fragmentation
Rodriguez et al (2005)

Oral antioxidant treatment (1g vitamin C, 1 g vitamin E daily, 2 months)

Time of analysis	TUNEL+ sperm (%)
Before treatment	22.1 ± 7.7
After treatment	9.1 ± 7.2

P<0.001

Greco et al., J. Androl 2005

Oral antioxidant before ICSI

(1g vitamin C, 1 g vitamin E daily, 2 months)

Time of attempt	Pregnancy rate	Implantation rate
Before treatment	6.9%	2.2%
	P<0.001	P<0.001
After treatment	48.3%	19.6%

Greco et al., Hum. Reprod. 2005

ASRM 2005

- O-11 Sperm Mitochondrial DNA Copy Number and Integrity in Infertile Men: A Comparison With Nuclear DNA Integrity. G. Song, et al
- O-35 Leukocytospermia: Relationship to Sperm DNA Integrity. Moskovtsev et al
- O-186 Oxidative Processes and Paternal Contribution of Spermatozoa: Relationship Between Reactive Oxygen Species (ROS) Production and Unexplained Male Infertility.. Bennett, et al.

ASRM 2005

- O-191 Outcomes of High-magnification ICSI in Cases With Low, Moderate and High Degrees of Sperm DNA Fragmentation.. Hazout, P. Cohen-Bacrie, A. Junca, J. Tesarik.
- O-336 Impact of Apoptosis and DNA Damage on Sperm Chromatin condensation Following Intracytoplasmic Injection. T. M. Said,

ASRM 2005

- P-153 Sperm DNA Damage as Measured by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) Does Not Predict Sperm Survival Rate. C. Adams,
- P-159 Meta-Analysis of SCSA® Defined DFI and PG Outcomes. Evenson, SCSA® is a crucial component of the infertility workup. Such data suggest that if a man has a DFI of 30% that IUI should not be considered and that the couple consider routine IVF or go directly to ICSI.

ASRM 2005

- P-192 The Semen Handling Procedures (Freezing or Refrigeration) Have Significant, Different Effect on the Sperm DNA Fragmentation Test.. Stone,
- P-197 Semen Functional Tests in Evaluation of Patients With Borderline Semen Analysis Results. Moskovtsev, J
 - The data support the importance of sperm function testing in the presence of a normal or borderline abnormal semen analysis and provides additional information regarding relationship of DNA damage and sperm functional tests.

ASRM 2005

- P-206 Estimation of Human Sperm Gene-Specific DNA Damage by Real-Time PCR Analysis. M. San Gabriel,
- P-378 Embryo Quality is Predicted With Sperm DNA Fragmentation levels, Measured by the Sperm Chromatin Dispersion (SCD) Test in IVF Cycles. Meseguer,
- P-396 High Sperm DNA Fragmentation Rate Observed the Day of ART Decreases the Pregnancy Rate But Does Not Preclude Patients From Achieving a Pregnancy. N. Frydman,, R. Fanchin, G. Tachdjian, R. Frydman, P. Cohen Bacrie.

Frag ADN	<30	≥ 30	P
Ovo ins	11.3±4.9	11.51±5.2	NS
Spz apres mig	24.7	22.7	NS
fec	70.7%	71.3%	NS
emb	7.8±4.45	7.55±4.31	NS
TQE	23.6%	25.3%	NS
Emb transf	2.05 ± 0.67	1.94 ±0.75	NS
Emb top transf	63%	60.5%	NS
PR	54.4%	30.3%	0.0055
PR evol	46.8%	23.2%	0.0051
IR	35.8%	20.2%	0.0057
IR evol	32.1%	16.5%	0.0041

Frydman Fanchin Cohen-Bacrie Tadjian

HM ICSI et FRAGMENTATION

DNA frag	<30%	<30%	30-40%	30-40%	>40%	>40%
	n=51	n=51	n = 11	n = 11	n = 10	n = 10
	IR	BR	IR	BR	IR	BR
ICSI	1/107 0.9%	0/107 0%	0/25 0%	0/25 0%	1/24 0.7%	0/24 0%
HM-ICSI	25/106 23.6%	20/106 18.9%	4/23 17.4%	4/23 17.4%	7/21 33.3%	6/21 28.6%
p	<0,001	<0,001	<0,05	<0,05	<0,01	<0,01

Conclusion

- les altérations de l'ADN sont le plus souvent liées à une spermatogenèse déficiente
- Très grande prudence pour la prise en charge de ces patients en AMP surtout en ICSI si taux $>30\%$ (intérêt de l'HM ICSI)
- L'absence de corrélation dans le cas des sp normaux et subnormaux pourrait en faire un examen incontournable pour l'exploration des couples infertiles
- Traitement antioxydant
- En défaveur :acte HN