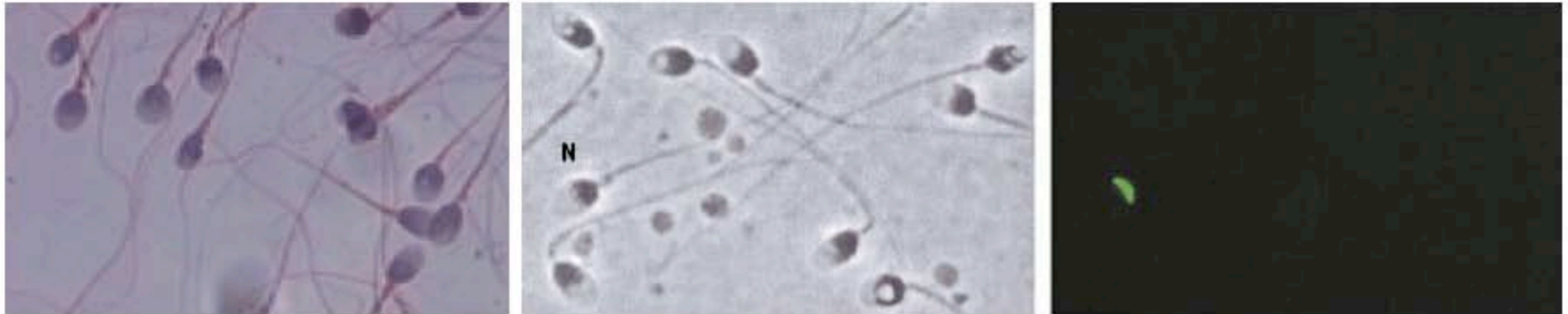
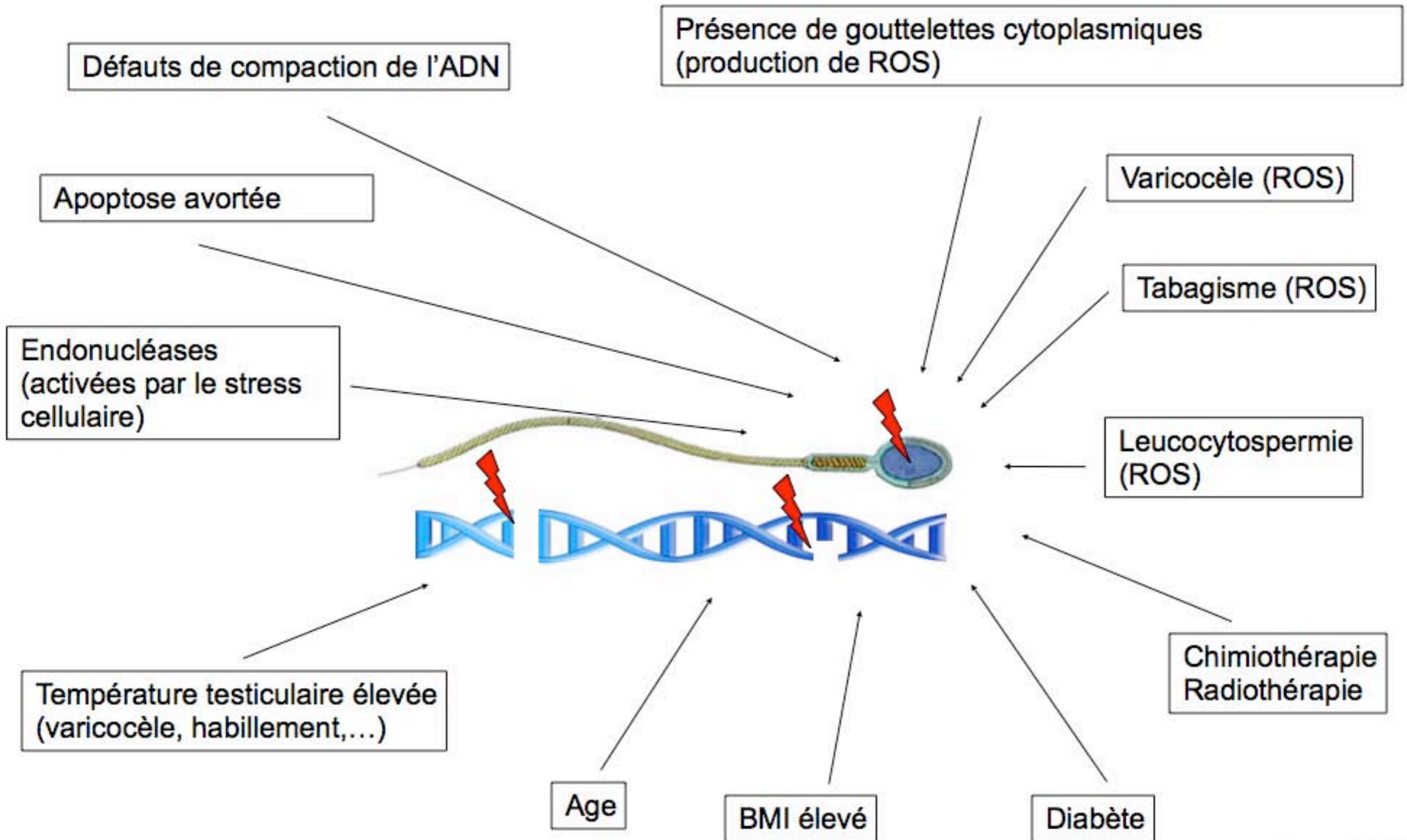


Analyse de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes

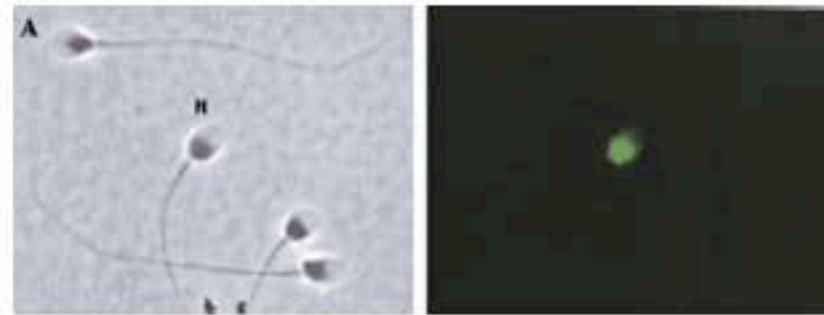
Fabien Murisier



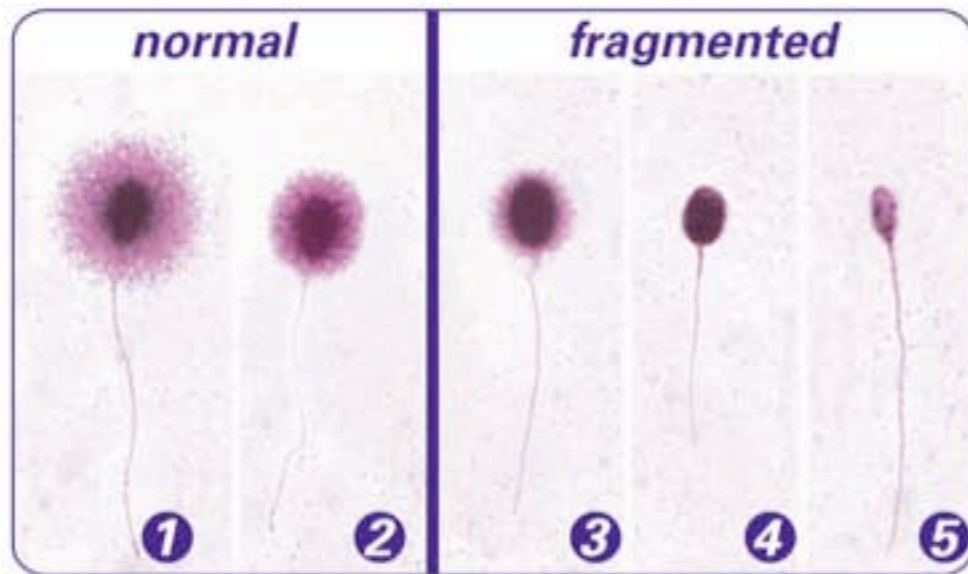
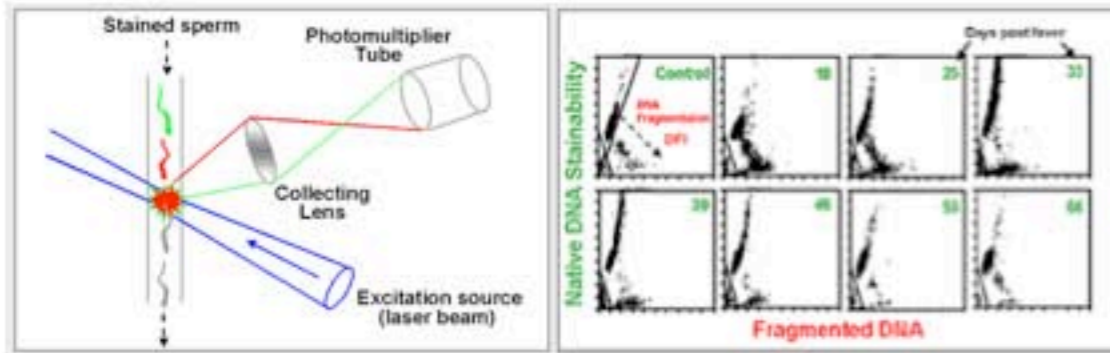
Origines de la fragmentation de l'ADN du spermatozoïde



Techniques d'analyse de la fragmentation de l'ADN



QuickTime™
 décompresseur TFF (r
 sont requis pour visionn



Single-cell gel electrophoresis (Comet Assay)

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP- nick end labelling – TUNEL

Acridine Orange Technique (AOT)

Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)

In situ nick translation

Sperm chromatin dispersion test (SCD)

DNA diffusion assay

Acidic Aniline Blue

Toluidine blue stain

Chromomycin A₃ – CMA₃

Single and double-strand breaks, evaluates DNA integrity

DNA fragmentation, single and double-strand breaks

Distinguish between single and double stranded DNA

Acid DNA denaturation

Single-strand DNA breaks

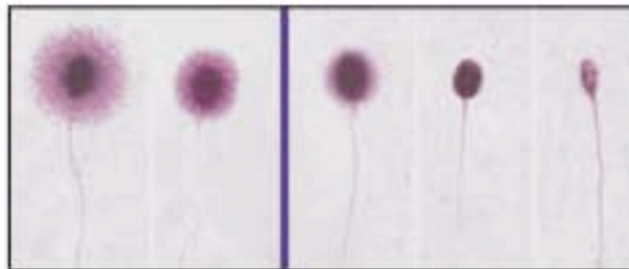
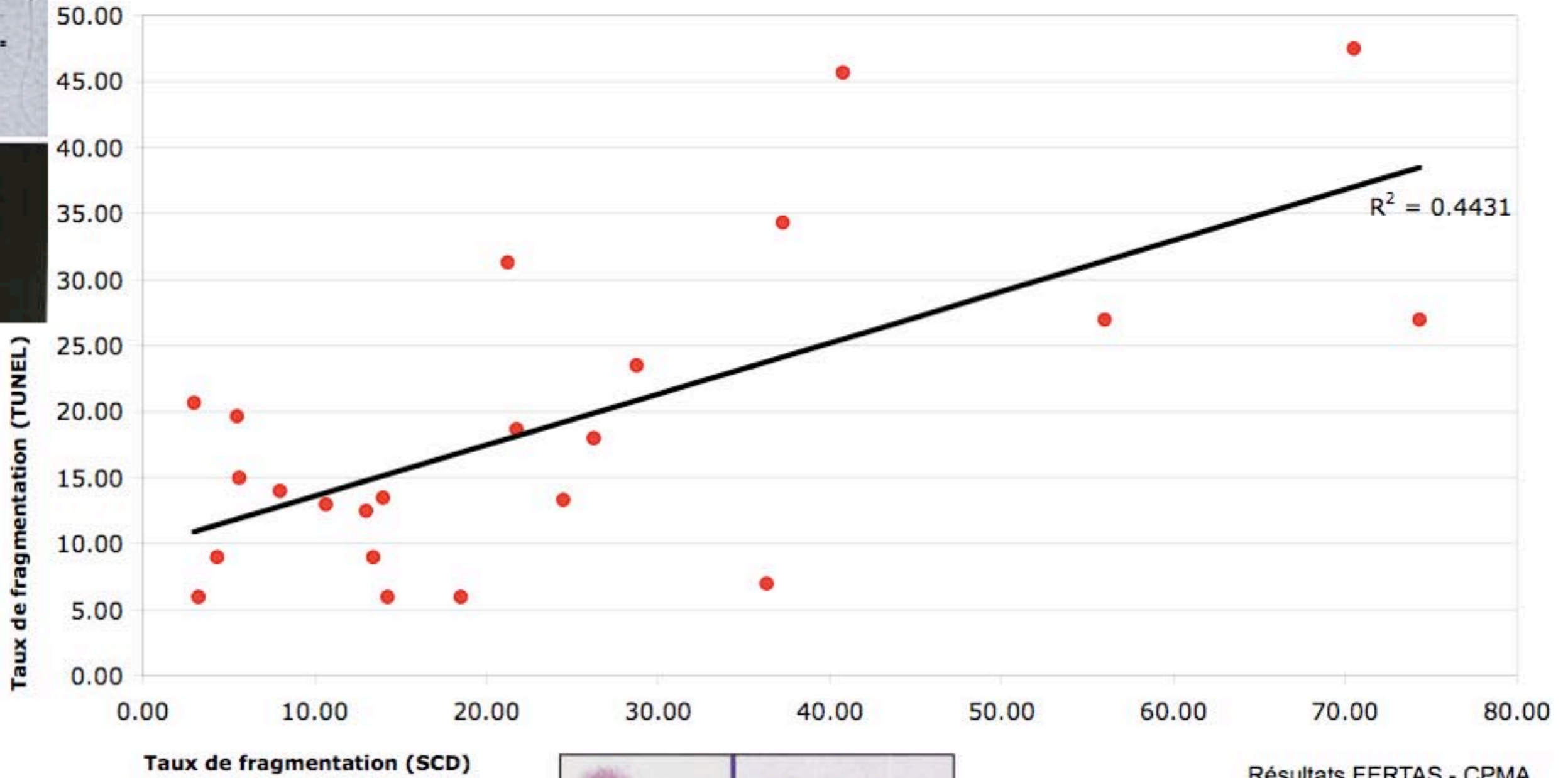
Determines the susceptibility of sperm DNA to acid denaturation

Alkali-labile sites in alkaline conditions yield low- molecular-weight DNA fragments

Stains lysine residues of persisting histones

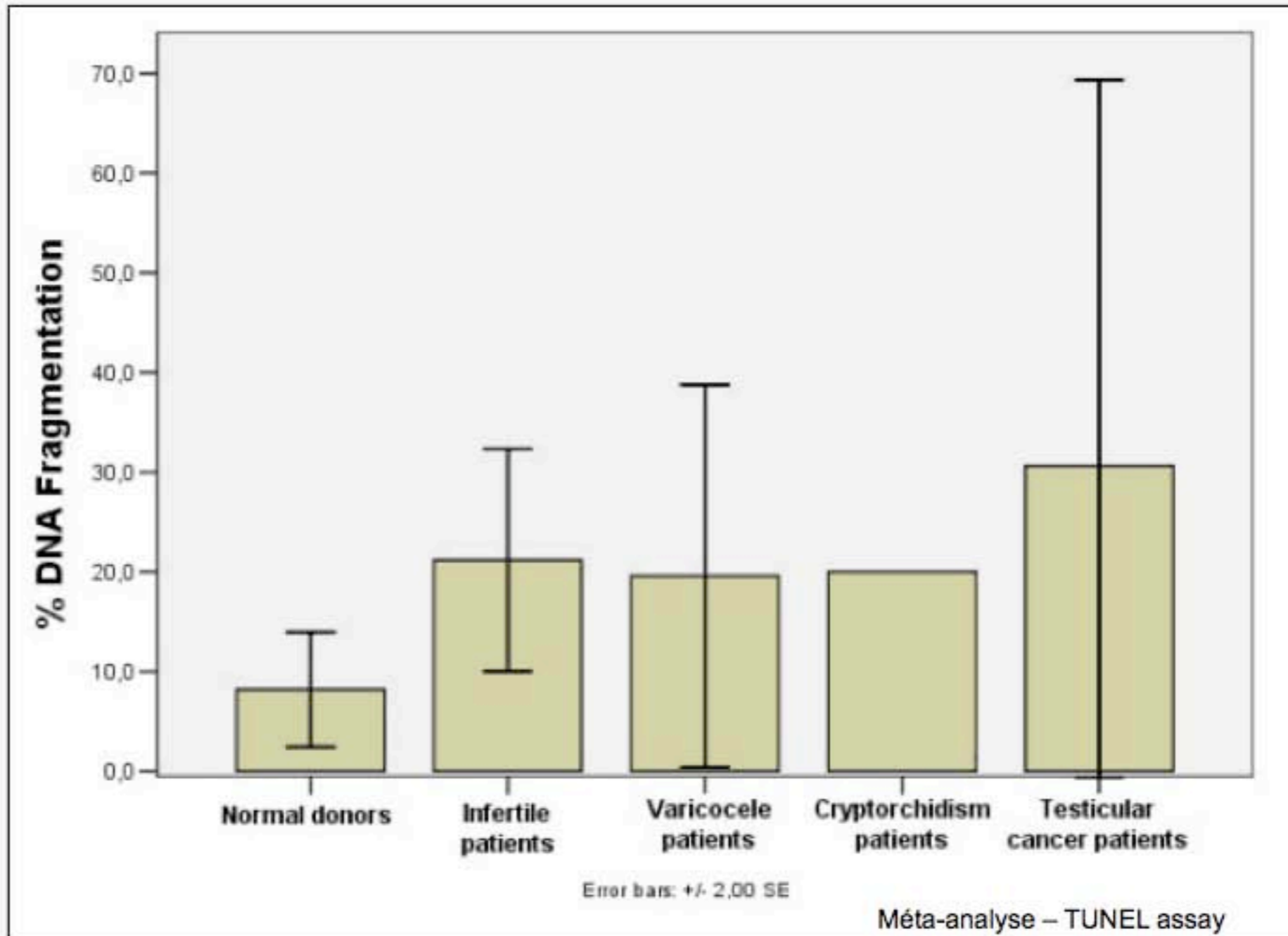
DNA structure and chromatin packaging, incorporates in the damaged dense chromatin

Indirect visualization of nicked denatured DNA

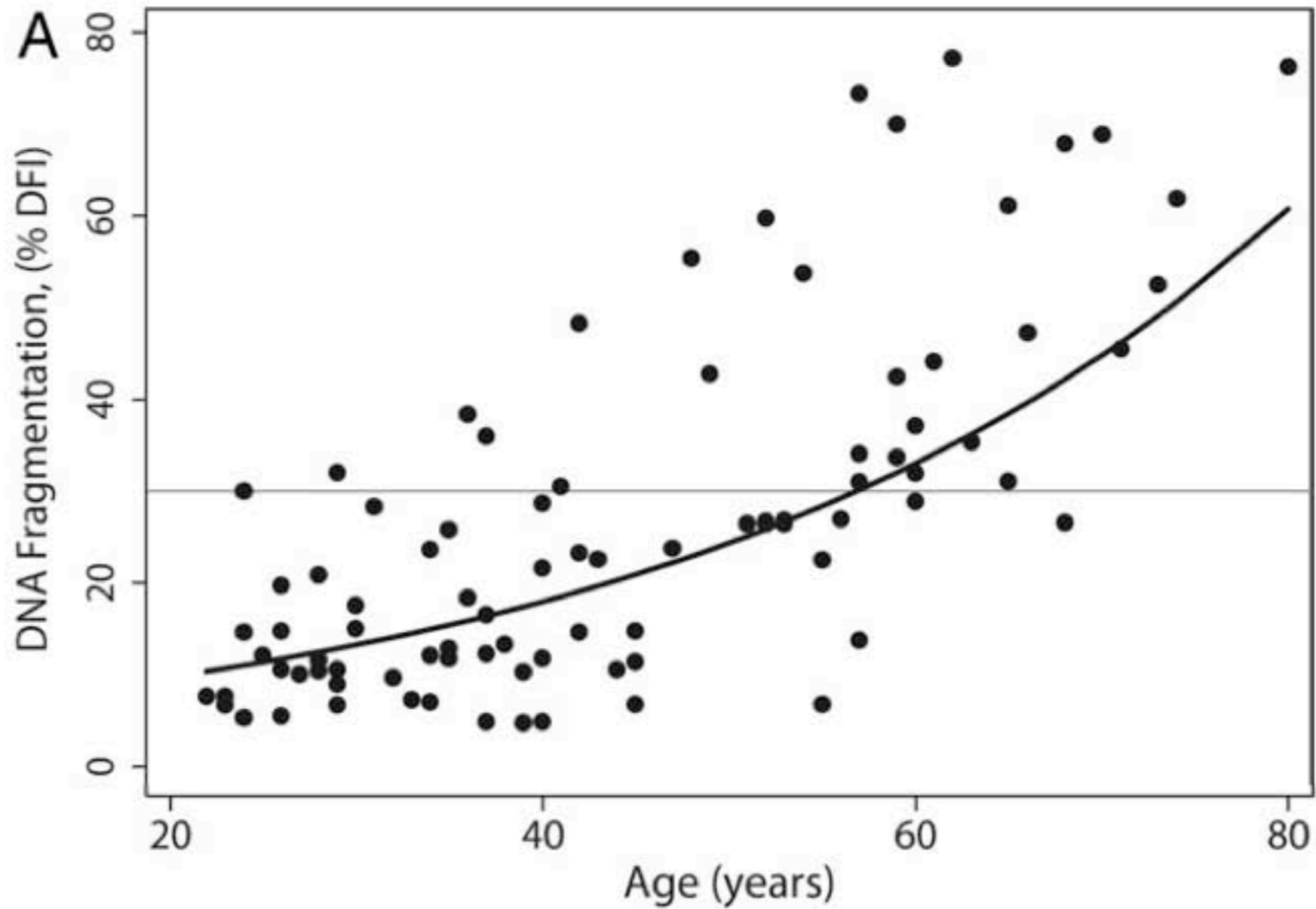


Résultats FERTAS - CPMA

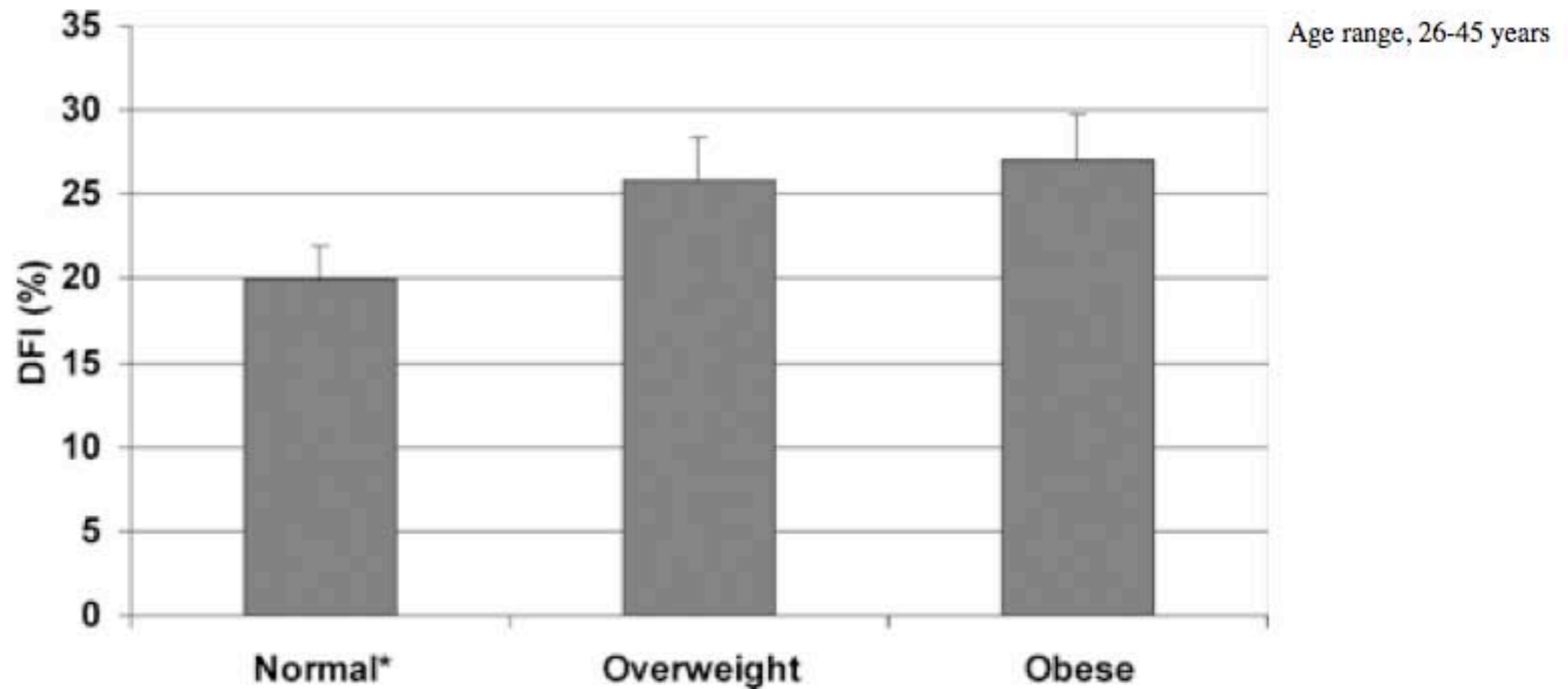
Angelopoulou et al., *Reprod. Biol. Endocrinol.* (2007).
Avendano et al., *Fertil. Steril.* (2008).



Wyrobek et al., PNAS (2006).

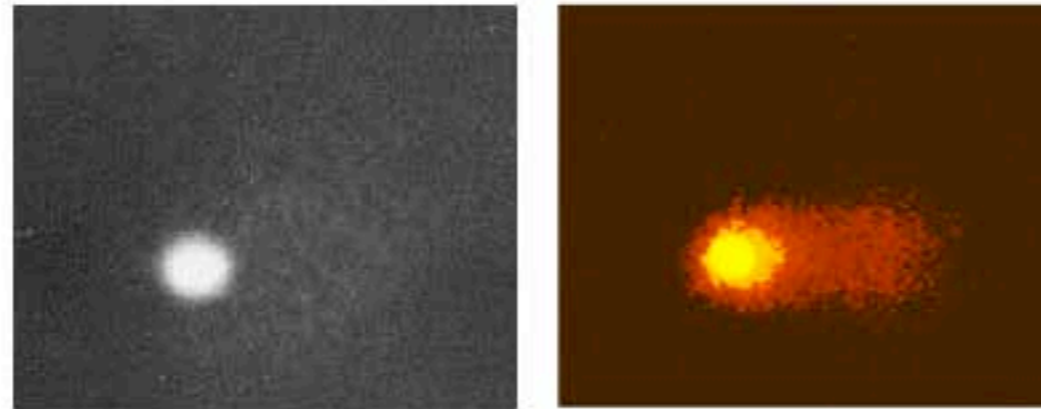


Kort et al., J. Androl. (2006).



Les patients présentant un BMI supérieur à 25 montrent une augmentation du taux de fragmentation.

Agbaje et al., Hum. Reprod. (2007)

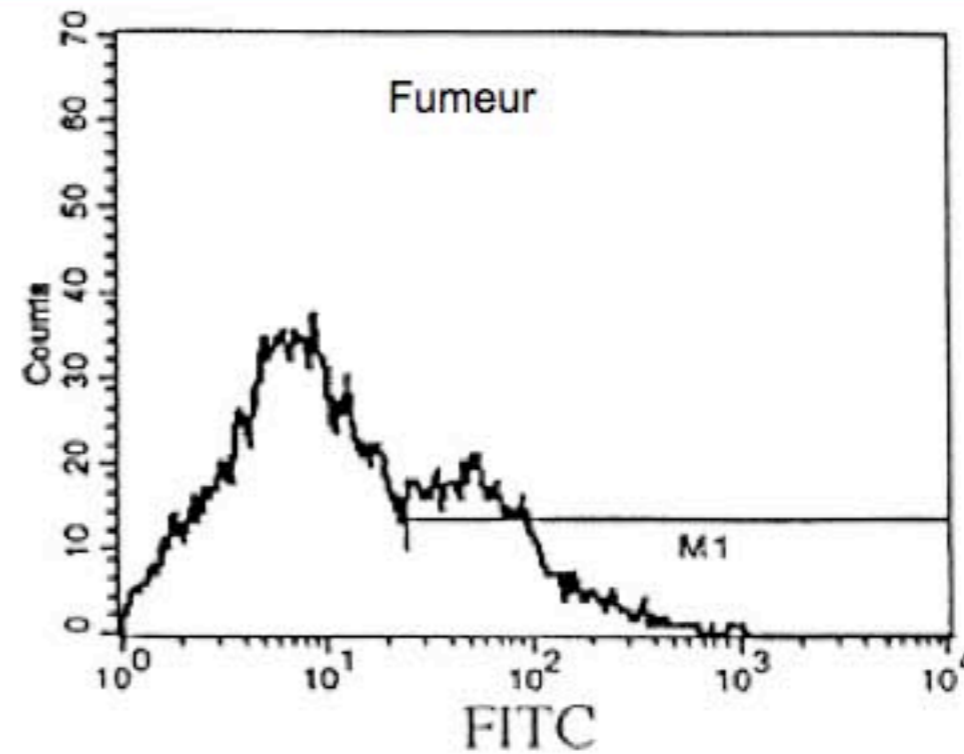
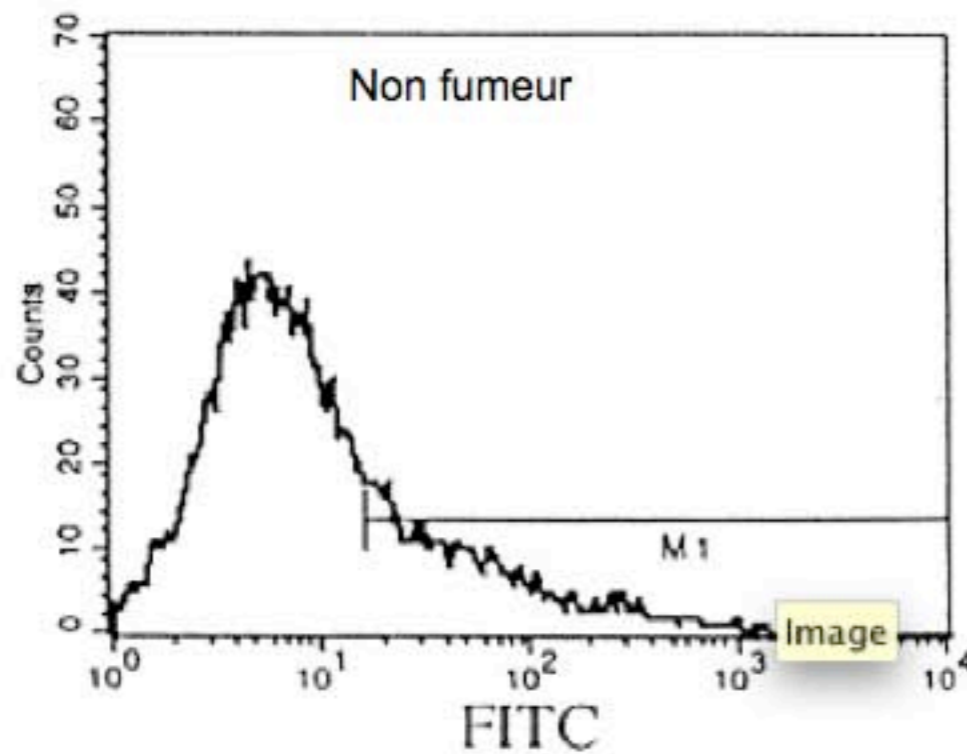


	Sujets non diabétiques (n=23)	Sujets diabétiques (n=24)
Taux de fragmentation (Comet Assay)	32 ± 2%	53 ± 3%

Age range 18–60
years

Les patients atteints de diabète montrent une augmentation de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes.

Potts et al., Mutat. Res. (1999).



	Non fumeurs (n=35)	Fumeurs (n=35)
Taux de fragmentation (TUNEL-FACS)	19.6 ± 2.1	25.8 ± 4.6

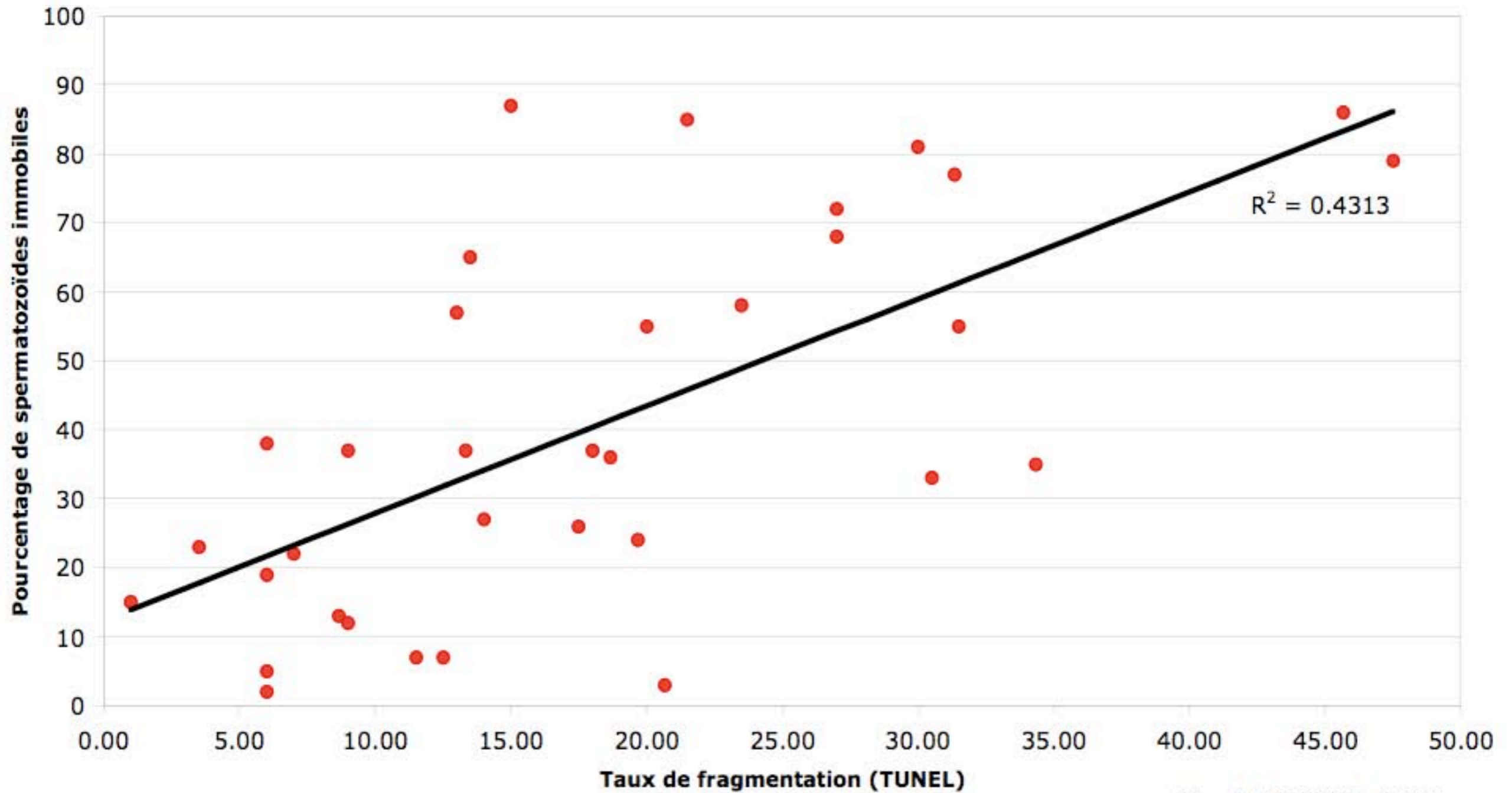
Les fumeurs ont une fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes augmentée.

Saleh et al., Fertil. Steril. (2002).

	Donneurs (n=13)	Patients sans leucocytospermie (n=32)	Patients avec leucocytospermie (n=16)
Taux de fragmentation (SCSA)	15.1	20.5	27.7

La leucocytospermie est associée à une fragmentation augmentée induite par une augmentation des ROS.

Asthénozoospermie et fragmentation



Résultats FERTAS - CPMA

Indication principale

Echecs répétés des traitements de PMA
(IAC, FIV, ICSI, abortus à répétition)

Indications masculines secondaires

Pathologies de l'appareil reproducteur:

- Cryptorchidie
- Varicocèle
- Leucocytospermie
- Cancer testiculaire (radiothérapie)

Autres pathologies:

- Diabète
- Obésité
- Cancer (chimiothérapie)

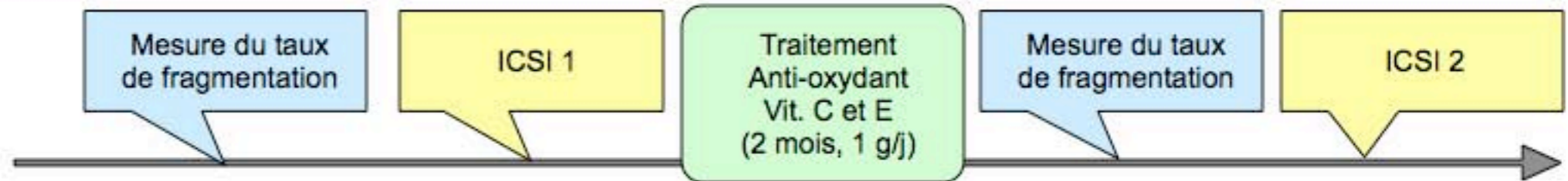
Altération de la spermatogenèse

- Nécrozoospermie
- Asthénozoospermie
- Oligozoospermie
- Tératozoospermie

- Age
- Tabagisme

Est-il possible de diminuer le taux de fragmentation?

Greco et al., Hum. Reprod. (2005)
Etude sur 38 patients présentant un taux de fragmentation >15% (TUNEL)



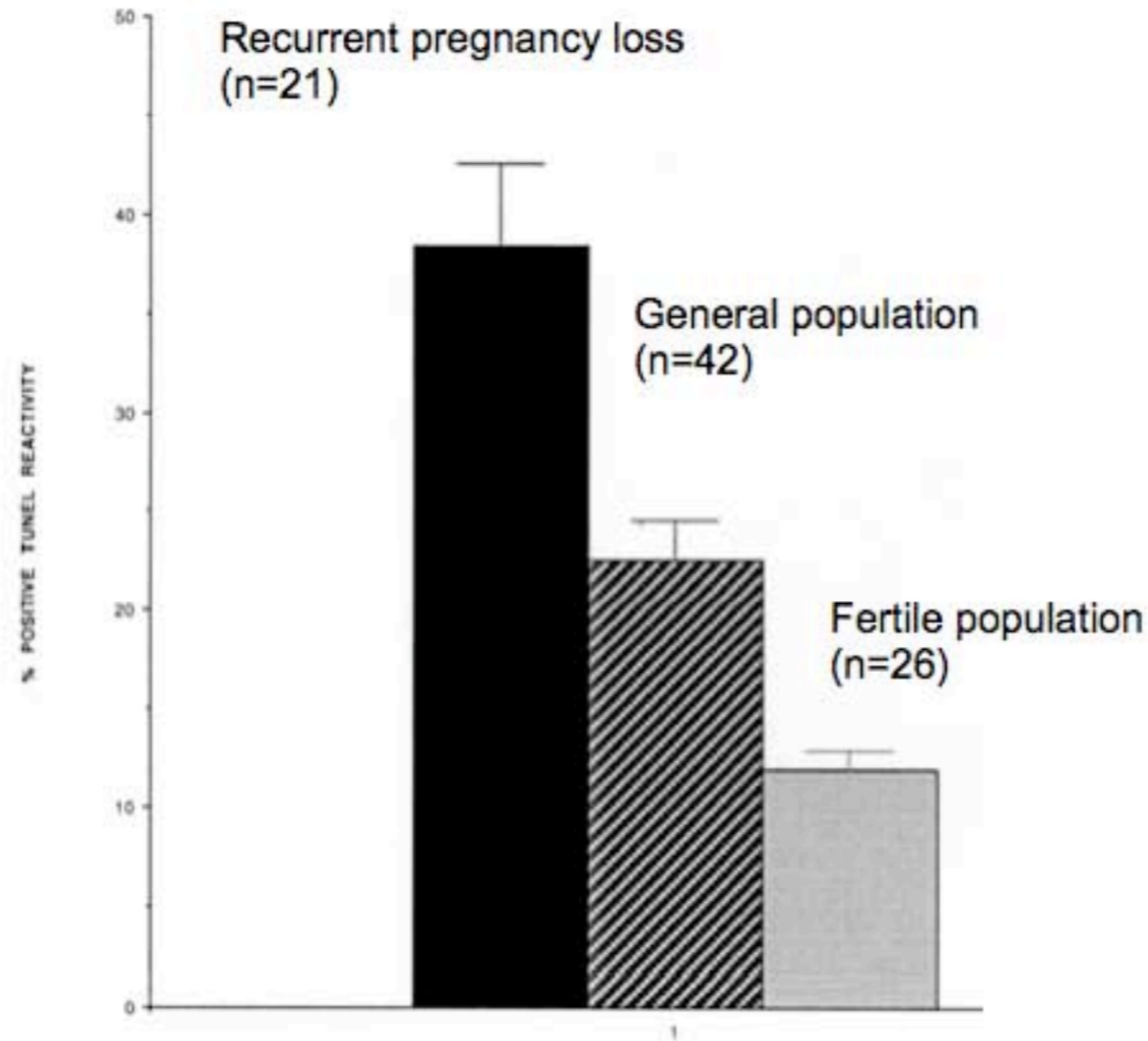
	Taux de fragmentation	Taux d'implantation		Taux de fragmentation	Taux d'implantation
Groupe répondeur (n= 29, 76%)	24% ± 8	2.2% (2 abortus)		8% ± 4	19.6 % (14 grossesses)
Groupe non-répondeur (n=9, 24%)	25% ± 9	0		24% ± 9	?

Groupe répondeur: diminution de >10% du taux de fragmentation et taux après traitement <10%

La prise d'un traitement anti-oxydant par voie orale diminue le taux de fragmentation chez certains patients et permet d'améliorer les chances de grossesse en ICSI.

- Certaines études ont montré que la prise d'anti-oxydants n'avait aucun effet sur la fragmentation (Silver et al., J. Androl. (2005)).
- La prise d'anti-oxydants peut conduire à une décondensation de l'ADN du spermatozoïde (Ménézo et al., RBM Online (2007)).

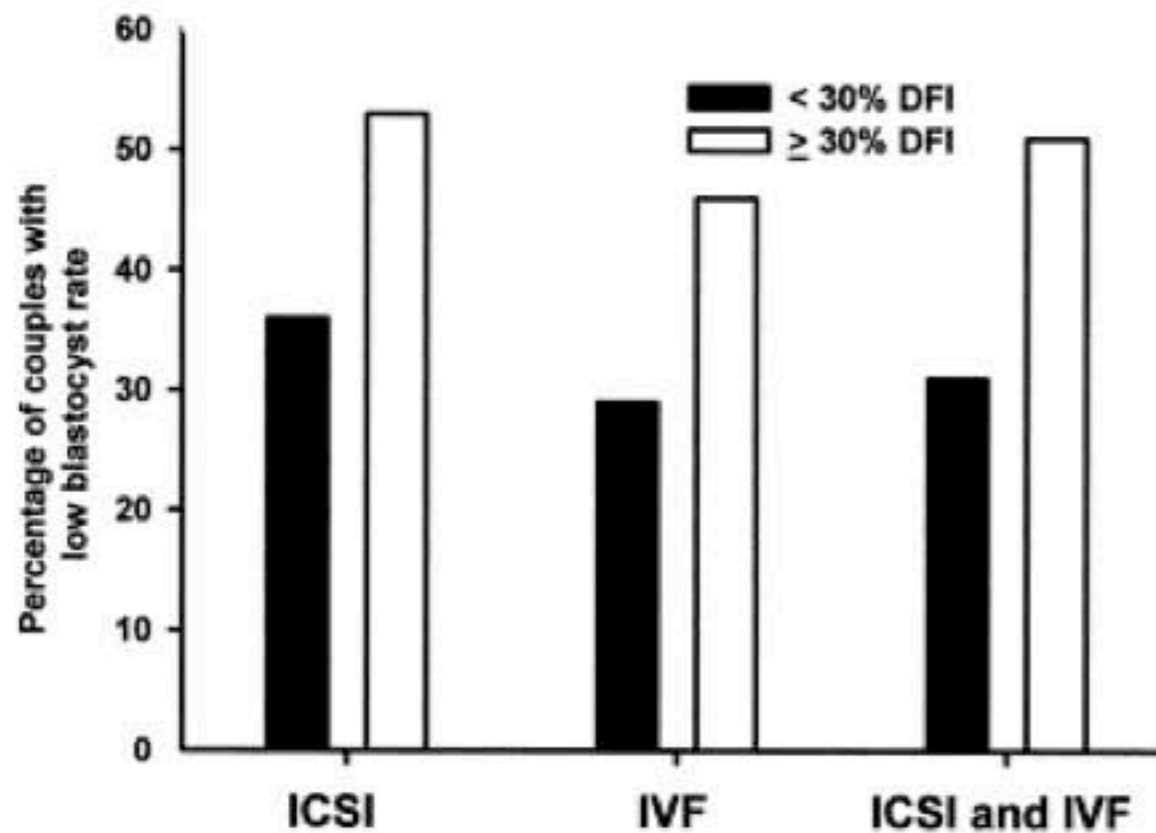
Carrell et al., Arch. Androl (2003).



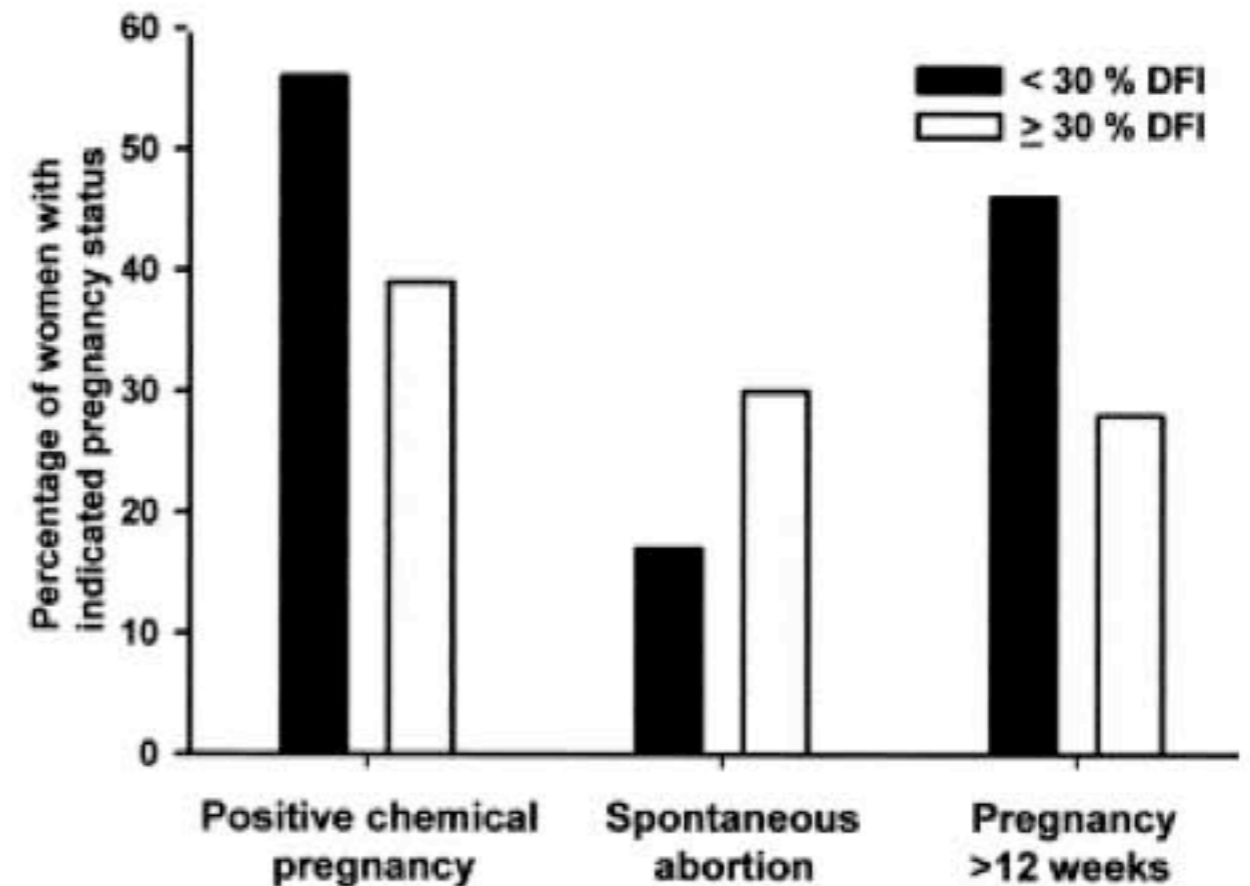
Le pourcentage de fragmentation est augmenté au sein du groupe de patients ayant eu des avortements spontanés récurrents.

Virro et al., Fertil. Steril. (2004).

Pourcentage de couples avec un taux de développement jusqu'au stade blastocyste inférieur à 30%



Taux de grossesse



- Les patients avec un DFI > 30% ont un risque augmenté d'avoir un faible taux de blastocystes (<30%).
- Ces patients ont un taux de grossesse à 12 semaines diminué.

Bungum et al., Hum. Reprod. (2007).

	IIU		FIV		ICSI	
	DFI <30	DFI >30	DFI <30	DFI >30	DFI <30	DFI >30
Taux de grossesse clinique par cycle	24% (76)	3% (2)	34% (110)	29% (18)	37% (56)	48% (35)

- Les chances de succès d'une IIU en cas de forts taux de fragmentation sont faibles.
- Un traitement par ICSI est à recommander.

Gandini et al., Hum. Reprod. (2004).

Une grossesse à terme est possible en présence d'un taux de fragmentation très élevé (DFI >50%, traitement ICSI, 2 grossesses décrites).

Couple de 35 ans, non fumeurs

5 tentatives d'IAC sans succès

2 tentatives d'ICSI:

- 7 transferts:
 - 4 échecs de nidation
 - 1 abortus précoce
 - 2 échecs de développement embryonnaire
- Taux de fécondation normal
- Développement embryonnaire normal jusqu'à J2-J3
- Arrêt de développement à J5

3ème tentative d'ICSI en 2008:

- Résultat du spermogramme:
 - Oligozoospermie sévère (5.6 mio/ml)
 - Asthénozoospermie modérée (mobilité totale 29%)
 - Tératozoospermie sévère (3% de formes normales)
 - Vitalité: 71%
 - Fragmentation (TUNEL): 24%
- Traitement aux anti-oxydants durant 2 mois: spermogramme inchangé (fragmentation 27%)
- ICSI avec IMSI:
 - culture de 4 embryons, arrêt de développement pour 2 embryons
 - transfert d'un blastocyste et d'une morula
- Grossesse clinique

Zini and Libman, Curr. Opin. Urol. (2006).

1. Couples en attente d'une première grossesse ou présentant des fausses-couches récurrentes:
 - Si le taux de fragmentation est élevée, la probabilité d'une grossesse naturelle est fortement réduite.
 - Ces patients devraient considérer une FIVETE ou une ICSI.
2. Couples pour lesquels plusieurs IAC ont été réalisées sans succès:
 - Si le taux de fragmentation est élevé, la probabilité d'une grossesse après IAC est fortement réduite.
 - Ces patients devraient considérer une FIVETE ou une ICSI.
3. Couples présentant des échecs répétés en FIVETE ou ICSI:
 - Les tests de fragmentation ne sont pas toujours révélateurs des chances de succès mais peuvent permettre d'expliquer certains échecs de traitement.
 - Des études montrent que l'ICSI est à recommander par rapport à la FIVETE.
 - Une sélection morphologique minutieuse (IMSI) des spermatozoïdes utilisés pour l'ICSI peut potentiellement permettre d'augmenter les chances de succès.

Questions ouvertes:

- Est-ce qu'un taux de fragmentation élevé augmente les risques d'anomalies génétiques?
- Faut-il déconseiller aux patients ayant un taux de fragmentation très élevé de recourir à la PMA?