



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

## FLORE

# Repository istituzionale dell'Università degli Studi di Firenze

### **Fragmentation and/or decondensation of spermatic DNA: which consequences?**

Questa è la Versione finale referata (Post print/Accepted manuscript) della seguente pubblicazione:

*Original Citation:*

Fragmentation and/or decondensation of spermatic DNA: which consequences? / E. Baldi; M. Muratori; S. Marchiani; L. Tamburrino; C. Fallet. - In: JOURNAL DE GYNECOLOGIE OBSTETRIQUE ET BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION. - ISSN 0368-2315. - STAMPA. - 39:(2010), pp. 14-16.

*Availability:*

The webpage <https://hdl.handle.net/2158/630091> of the repository was last updated on

*Terms of use:*

Open Access

La pubblicazione è resa disponibile sotto le norme e i termini della licenza di deposito, secondo quanto stabilito dalla Policy per l'accesso aperto dell'Università degli Studi di Firenze (<https://www.sba.unifi.it/upload/policy-oa-2016-1.pdf>)

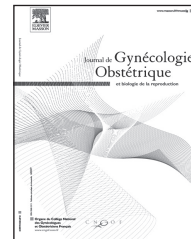
*Publisher copyright claim:*

La data sopra indicata si riferisce all'ultimo aggiornamento della scheda del Repository FloRe - The above-mentioned date refers to the last update of the record in the Institutional Repository FloRe

(Article begins on next page)



Elsevier Masson France  
EM|consulte  
www.em-consulte.com



Choix du spermatozoïde

## Fragmentation et/ou décondensation de l'ADN spermatique : quelles conséquences ?

## Fragmentation and/or decondensation of spermatid DNA: which consequences?

D'après la communication d'E. Baldi,  
en collaboration avec M. Muratori, S. Marchiani et L. Tamburrino

Propos recueillis par C. Fallet

Unité d'andrologie, Université de Florence, Viale Pieraccini 6, 50139 Firenze, Italie

### MOTS-CLÉS

Apoptose ;  
Fragmentation ;  
Stress oxydatif ;  
TUNEL-PI

**Résumé** L'absence de fragmentation et/ou de décondensation de la chromatine est un critère de qualité du spermatozoïde ainsi qu'un facteur prédictif de la fertilité masculine et du succès des techniques d'AMP. La fragmentation de l'ADN est favorisée par de nombreux facteurs qui font encore l'objet de débats. Par ailleurs, de nombreux tests ont été développés pour évaluer la fragmentation : sont-ils tous équivalents ? Une standardisation des différentes méthodes et l'établissement de seuils discriminants fiables sont nécessaires.

© 2010 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

### KEYWORDS

Apoptosis;  
fragmentation ;  
oxidative stress;  
TUNEL-PI

**Abstract** Absence of DNA fragmentation and/or decondensation is a marker of sperm quality and is related to outcome of assisted reproductive techniques: new tests have been set up to determine fragmentation rate.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## Introduction

L'origine exacte de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes n'est pas encore établie. Plusieurs mécanismes

ont été proposés : apoptose lors de la spermatogenèse, production de radicaux libres, altération du compactage de l'ADN [1].

Correspondance : C. Fallet.

Adresse e-mail : christinefallet@hotmail.com (C. Fallet)

## Les causes de la fragmentation de l'ADN

### L'apoptose

L'altération de l'ADN spermatique peut s'expliquer de différentes façons.

L'augmentation de la fragmentation de l'ADN peut notamment faire intervenir le phénomène d'apoptose. C'est ainsi que de nombreuses études ont montré que l'on retrouve dans les spermatozoïdes des marqueurs de l'apoptose, inhibiteurs de l'apoptose (bcl2) ou régulateurs (P53, FAS, caspase) [2] ainsi que la présence de corps apoptiques M540 dans le sperme humain [3].

Mais, ce phénomène d'apoptose n'est cependant pas la seule cause de la fragmentation de l'ADN. Des inconnues demeurent en particulier, concernant la signification des altérations apoptiques. En effet, différentes études montrent qu'il existe une faible corrélation entre les signes d'apoptose et la fragmentation de l'ADN [1], qu'il n'y a pas de corrélation significative entre la fragmentation de l'ADN et les principales caractéristiques ultra-structurales de l'apoptose [4].

De même, entre l'activité caspase dans le sperme et la fragmentation de l'ADN, la corrélation est faible [5]. Par ailleurs, la fragmentation de l'ADN peut également se produire après l'éjaculation [6] ce qui montre bien que le phénomène d'apoptose ne peut être le seul mécanisme conduisant à une fragmentation de l'ADN. Enfin, une étude utilisant le TUNEL a montré que l'altération de l'ADN n'est pas en elle-même, un signe d'apoptose dans le sperme [7].

### Le stress oxydatif

C'est ainsi que le rôle du stress oxydatif a été évoqué.

Il existe en effet une corrélation positive entre la fragmentation de l'ADN et la production de radicaux libres oxygénés [8].

Une récente étude a montré que la présence de 8-hydroxydesoxyguanosine (métabolite de la dégradation de l'ADN par le stress oxydatif) est corrélée à la fragmentation de l'ADN spermatique [9].

### L'altération du compactage de l'ADN

D'autres données mettent en évidence une altération du compactage de l'ADN. L'ADN spermatique fragmenté est pauvre en protamine ou montre un ratio P1/P2 altéré [10] et présente des signes d'immaturité [4].

À l'heure actuelle, l'hypothèse d'une origine multiple de la fragmentation de l'ADN est donc retenue.

## Les techniques d'évaluation

Différentes techniques peuvent être utilisées pour détecter la fragmentation de l'ADN spermatique.

Des méthodes objectives sont présentées ci-dessous.

### Le TUNEL

Il permet de quantifier l'incorporation d'UTP au niveau des cassures de l'ADN. La quantification peut être réalisée par cytométrie de flux et en fluorescence.

### Le COMET

Il s'agit d'une électrophorèse des spermatozoïdes ayant été préalablement lysés en milieu fortement alcalin. L'ADN est révélé par un colorant fluorescent.

### Le SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay)

Des méthodes subjectives : l'Acridine Orange Test, le SCD test (Sperm Chromatin Dispersion) au bleu d'aniline.

## Une nouvelle méthode le TUNEL-PI

Cette méthode a été mise au point par l'équipe de l'Université de Florence [11,12] afin d'éliminer les interférences dues aux corps M540. En effet, la présence de corps M540 (qui présentent une taille et une densité semblables aux spermatozoïdes) dans le sperme de sujets ayant des problèmes de fertilité représente un facteur de confusion dans les études par cytométrie de flux. L'équipe de l'Université de Florence a ainsi associé à la méthode TUNEL une coloration à l'iodure de propidium qui permet de distinguer les corps M450 (qui ne sont pas nucléés) des spermatozoïdes (nucléés).

La fragmentation de l'ADN a ainsi été évaluée chez 75 sujets à la fois par la méthode traditionnelle TUNEL et par la nouvelle méthode TUNEL + coloration à l'iodure de propidium (PI). L'utilisation de cette nouvelle méthode a permis de mettre en évidence deux populations de spermatozoïdes colorés avec le PI selon l'intensité de la coloration : une population à coloration intense et une autre à coloration plus faible. La population à coloration faible entièrement composée d'ADN fragmenté montre une corrélation négative significative entre le pourcentage de fragmentation et la morphologie, la mobilité, la numération et la concentration des spermatozoïdes éjaculés. Dans l'autre population, la fragmentation de l'ADN est indépendante de la qualité du sperme.

Ainsi, il apparaît que la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes n'est pas nécessairement corrélée à des paramètres péjoratifs de numération, de mobilité et même de morphologie. Ces données sont importantes en clinique car elles permettent de bien distinguer les spermatozoïdes qui auraient le moins de chance de féconder un ovocyte.

## Conclusion

Ces différentes données montrent qu'il faut rester prudent dans l'interprétation des résultats. Il est utile de connaître les fourchettes normales des différentes techniques qui ne sont pas équivalentes entre elles.

L'utilisation de ces tests doit passer par une standardisation des protocoles.

D'autres études sont nécessaires pour mieux connaître les causes des altérations de l'ADN spermatique et pour développer des méthodes de sélection des spermatozoïdes indemnes d'altération afin de pouvoir les utiliser en AMP dans certains cas (les couples ayant l'expérience de multiples fausses couches, patient diabétique ou cancéreux).

## Conflit d'intérêts

Le rédacteur n'a déclaré aucun conflit d'intérêts.

E. Baldi : Conférences : invitation en qualité d'intervenant (Ferring).

M. Muratori, S. Marchiani, L. Tamburrino : aucun conflit d'intérêts.

## Références

- [1] Muratori M, Marchiani S, Maggi M, Forti G, Baldi E. Origin and biological significance of DNA fragmentation in human spermatozoa. *Front Biosci* 2006;11:1491-9.
- [2] Sakkas D, Moffat O, Manicardi GC, et al. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod* 2002;8:984-91.
- [3] Marchiani S, Tamburrino L, Maoggi A, Vannelli Go Forti G, Baldi E, Muratori M. Characterization of M 540 bodies in human semen: evidence that they are apoptotic bodies. *Mol Hum Reprod* 2007;13:621-31.
- [4] Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Morretti E, et al. Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl* 2000; 21:903-12.
- [5] Weng SL, Taylor SL, Morshedi M, Schuffner A, Duran EH, Beebe S, et al. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod* 2002;8:984-91.
- [6] Muratori M, Maggi M, Spinelli S, Filimberti E, Forti G, Baldi E. Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. *J Androl* 2003; 24:253-62.
- [7] Manicardi GC, Tombacco A, Bizzaro D, Bianchi U, Bianchi PG, Sakkas D. DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assays. *Histochem J* 1998;30:33-9.
- [8] Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000;15:1338-44.
- [9] Aitken RJ, De Iulii GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, 2009 (published ahead of printing).
- [10] Torregrosa N, Domínguez-Fandos D, Camejo MI, Shirley CR, Meistrich ML, Ballescà JL, Oliva R. Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. *Hum Reprod* 2006;21:2084-9.
- [11] Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Tocci V, Failli P, Forti G, et al. Nuclear staining identifies two population of human sperm with different DNA fragmentation extend and relationship with semen parameters. *Mol Hum Reprod* 2008;23:1035-43.
- [12] Muratori M, Tamburrino L, Tocci V, Costantino A, Marchiani S, Giachini C, et al. Small variations in crucial steps of Tunel assay coupled to flow cytometry greatly affect measures of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2009 [in press].