

Génotoxicité des chimiothérapies et radiothérapies : Quelles sont les conséquences pour le spermatozoïde humain ?

Louis BUJAN¹, Philippe DE MAS²

¹Groupe de recherche en Fertilité Humaine et CECOS Midi-Pyrénées, CHU La Grave, Toulouse

²Service de Génétique médicale, CHU Purpan, Toulouse

RESUME

Le pronostic des cancers de l'homme jeune en âge de procréer s'est considérablement amélioré ces dernières décades grâce aux progrès thérapeutiques. Les chimiothérapies et radiothérapies ont des effets bien connus sur la spermatogenèse. Au delà de l'atteinte quantitative et qualitative de la spermatogenèse, des études réalisées chez l'animal ont pu mettre en évidence des atteintes nucléaires (aneuploïdie, présence d'adduits, fragmentation de l'ADN...) et parfois des atteintes au niveau des générations F1 et F2. Chez l'homme, l'étude des chromosomes des spermatozoïdes après radiothérapie a mis en évidence une augmentation de la fréquence des anomalies chromosomiques. Concernant la chimiothérapie, les premières études utilisaient la technique de fécondation hétérospécifique pour mettre en évidence les anomalies chromosomiques du spermatozoïde. Plus récemment, la technique d'hybridation de sondes chromosomiques fluorescentes (FISH) permet d'étudier plusieurs chromosomes sur un grand nombre de spermatozoïdes. Les résultats des différentes études portant sur des effectifs réduits sont variables en fonction du protocole thérapeutique administré et de la durée séparant le prélèvement de la fin du traitement. Nous avons étudié 5 patients ayant fait un prélèvement de sperme 6 à 17 mois après le protocole de chimiothérapie BEP (Bléomycine, Etoposide, Cisplatine). Nous avons mis en évidence une augmentation du taux de spermatozoïdes présentant une aneuploïdie et une diploïdie. Les résultats de notre étude et de celles du groupe de R. Martin [45, 47] évoquent la possibilité d'un effet transitoire de

la chimiothérapie sur les chromosomes gamétiques. Dans le cadre de la maladie de Hodgkin d'autres études ont mis en évidence l'aspect transitoire de l'effet sur l'aneuploïdie. Au delà de l'atteinte chromosomique, l'action délétère des traitements pourrait avoir pour cible l'ADN du spermatozoïde. Ainsi des études sur des effectifs importants, utilisant d'autres méthodes d'analyse nous paraissent nécessaires. Dans l'attente, il paraît souhaitable de toujours conseiller l'autoconservation de sperme avant les traitements et d'adopter une grande prudence lors du conseil apporté aux patients désirant une grossesse, précocement, après la fin des traitements.

Mots clés : chimiothérapie, radiothérapie, spermatozoïde, aneuploïdie, minisatellites, ADN, effets secondaires, revue

Correspondance :

Dr Louis Bujan - Groupe de Recherche en fertilité Humaine et CECOS Midi-Pyrénées. Hôpital La Grave, TSA 60033, 31059 Toulouse Cedex 9. France - Tel 05.61.77.78.41 - Fax 05.61.77.78.43 - Email bujan.l@chu-toulouse.fr

I. INTRODUCTION

Le pronostic vital des cancers chez l'homme jeune en âge de procréer, s'est considérablement amélioré ces dernières décades grâce aux progrès des thérapeutiques antinéoplasiques. Si ces thérapeutiques sont efficaces sur la cellule cancéreuse, elles ont pour inconvénient d'affecter d'autres types cellulaires, et notamment la spermatogénèse. Ces effets justifient pleinement l'autoconservation de sperme qui doit être pratiquée avant tout traitement chez l'homme en âge de procréer et informé [6, 23, 24]. Les effets délétères de la chimiothérapie et/ou de la radiothérapie sur la production de spermatozoïdes sont maintenant bien connus, entraînant un arrêt de la spermatogénèse qui se traduit par une azoospermie ou une oligospermie sévères transitoires ou parfois définitives. L'intensité de ces effets va dépendre du type d'agent utilisé, de la dose cumulative du principe actif, ou de la dose totale d'irradiation reçue et de son caractère fractionné [13, 19, 22, 35, 49, 58]. La susceptibilité individuelle peut éventuellement interférer sur la normalisation de la spermatogénèse après les traitements ainsi que sur l'état de la fonction spermatogénétique préalable au traitement. Toutefois, la revue de la littérature montre que la dynamique de la restauration de la spermatogénèse après les traitements n'est pas précisément abordée, et que peu de données existent sur les deux premières années après la fin du traitement chez l'homme.

Au-delà de l'action délétère sur la spermatogénèse, entraînant des altérations quantitatives et qualitatives du spermatozoïde, l'action génotoxique de certains de ces agents a pu être mise en évidence chez l'animal entraînant des altérations au niveau du génome du spermatozoïde. L'action d'un agent délétère sur la spermatogénèse peut se traduire 1) par des altérations qualitatives du spermatozoïde entraînant une stérilité ou des anomalies nucléaires du spermatozoïde, 2) par une atteinte des processus de fécondation entraînant une stérilité, 3) par des altérations au niveau du zygote, de l'embryon et éventuellement de l'enfant ainsi que des altérations comme cela a été démontré chez l'animal sur la première et la deuxième génération (Figure 1).

La résultante d'une action délétère des traitements anti-néoplasiques dépendra du type cellulaire atteint, de la sensibilité variable en fonction de l'agent et de l'efficacité des mécanismes des réparations qui seront mis en place au niveau testiculaire. Au niveau des spermatozoïdes cette action délétère peut avoir pour conséquence la présence d'adduits, l'altération de l'ADN avec notamment des fragmentations de l'ADN, une anomalie numérique ou structurale des chromosomes secondaire à des dysfonctionnements du processus méiotique, une mort cellulaire par nécrose ou par mise en jeu du processus apoptotique [53]. Il a été démontré que des spermatozoïdes vivants porteurs de telles anomalies peuvent éventuellement féconder [1] et

donc la potentialité d'altération du développement embryonnaire est envisageable.

Chez l'animal du reste, les études utilisant le Cyclophosphamide, la Procarbazine ou la radiothérapie font état d'atteinte de la spermatogénèse, de la fertilité mais également de conséquences transmissibles aux générations suivantes [7, 8, 9, 10, 11, 37, 64, 65]. Chez l'homme quelques études cliniques suggèrent qu'il n'y a pas d'augmentation de la fréquence des malformations chez les enfants nés de pères ayant eu une chimiothérapie [14, 17, 29, 41, 57, 59]. Malheureusement beaucoup de ces études sont des cas rapportés ou ont des effectifs très réduits, ne permettant pas de détecter une augmentation de risque relatif de 3 à 5 fois [50].

II. ANOMALIES CHROMOSOMIQUES DU SPERMATOZOÏDE

L'étude du contenu chromosomique des spermatozoïdes a pu être envisagée grâce, dans un premier temps, à l'utilisation du test hétérosécifique de Hamster qui permettait de visualiser les chromosomes, et dans un deuxième temps, grâce aux techniques d'hybridations in situ de sondes fluorescentes, qui permettaient d'envisager l'étude du nombre de chromosomes [21, 31, 66] ou la présence de cassures chromosomiques au niveau du spermatozoïde [62].

Concernant la radiothérapie, l'étude des chromosomes des spermatozoïdes, par le test de fécondation hétérosécifique de hamster, réalisée chez neuf patients porteurs de tumeur testiculaire et quatre patients porteurs d'autres pathologies tumorales, traités par radiothérapie et recevant des doses testiculaires de 0,4 à 5 Gy, a permis de mettre en évidence une élévation du pourcentage de spermatozoïdes porteurs d'anomalies chromosomiques pour 8 patients 36 mois après la radiothérapie [43]. Il est à noter dans cette étude (Tableau 1) que d'une part à 12 mois et 24 mois, l'effectif est réduit en raison de la faible fécondance des spermatozoïdes et que d'autre part, peu d'analyses ont été réalisées en pré-radiothérapie. Néanmoins, les auteurs comparant les résultats à 36 mois, et les résultats moyens obtenus sur l'ensemble des analyses, montrent une élévation par rapport au groupe témoin pris en référence. De plus, cette étude a montré qu'il existait une relation entre la dose testiculaire reçue et le pourcentage de spermatozoïdes présentant une anomalie chromosomique ($R = 0,88$; $P < 0,02$).

En ce qui concerne l'effet des chimiothérapies plusieurs études ont été réalisées [15, 27, 28, 38, 39, 44, 45] certaines montrant une augmentation de la fréquence des anomalies chromosomiques, alors que d'autres n'en retrouvaient pas (Tableau 2). Ces études du caryotype du spermatozoïde faisaient appel à la méthode de fécondation hétérosécifique de hamster, qui ne permet l'analyse que sur un faible

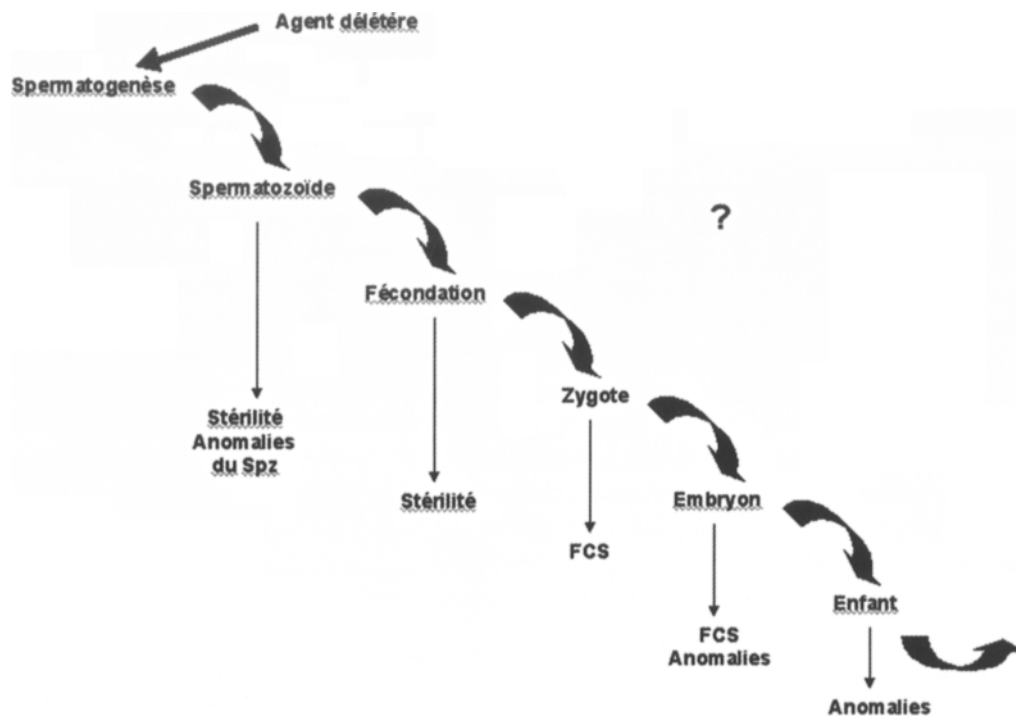


Figure 1 : Les conséquences d'un agent délétère pour la spermatogénèse peuvent se voir à différents niveaux.

Tableau 1 : Radiothérapie et anomalies chromosomiques des spermatozoïdes, d'après Martin et al. [43].

9 patients avec tumeur testiculaire :

doses testiculaires : 0.4 - 3.1 Gy

4 patients avec tumeur non testiculaire:

doses testiculaires : 0.5 - 5.0 Gy

	% anomalies (*)
Pré radiothérapie (RT)	0 (0/9)
Post RT 12 mois n=2	13 (1/8)
24 mois n=3	13 (7/55)
36 mois n=8	21 (18/86)
moyenne	18 (26/149)
Témoins	8.5 (85/1000)

(*) Nombre de caryotypes spermatiques anormaux / nombre étudiés

Dose testiculaire	% anomalies à 36 mois
0.4	6
0.5	15
0.8	16
0.8	20
0.9	46
1.0	67
1.6	25

r = 0.88, p<0.02

nombre de spermatozoïdes, spermatozoïdes qui doivent être capables de féconder pour la réalisation du test. La variabilité des résultats peut s'expliquer par ce biais de sélection, par les différences de traitement et le type de cancer étudié (Tableau 2). Plus récemment s'est développée la technique d'hybridation in situ de sondes chromosomiques fluorescentes (FISH) sur les noyaux du spermatozoïde. L'amélioration de cette technique avec notamment l'hybridation simultanée de plusieurs sondes chromosomiques avec des fluorochromes différents (double et triple marquage), permet de détecter des anomalies numériques de plusieurs chromosomes et d'évaluer la ploïdie des spermatozoïdes en même temps, sur un grand nombre de cellules ou de détecter pour des techniques plus récentes certaines anomalies structurales des chromosomes. Ainsi, une étude réalisée chez 4 patients ayant une chimiothérapie (protocole BEP : Bléomycine, Etoposide, Cisplatine) pour tumeur [46] testiculaire ne montre pas de différence dans la fréquence de l'aneuploïdie des spermatozoïdes avant ou après chimiothérapie (suivi du premier patient : 2 ans ; deuxième patient : 3 ans ; troisième patient : 9 ans ; quatrième patient : 7 ans) (Tableau 3). Il s'agit des mêmes patients qui avaient été étudiés par Martin et al. [45], avec le test hétérospécifique de Hamster, sans montrer d'augmentation des anomalies au niveau des chromosomes des spermatozoïdes. Plus récemment le même groupe [47] a étudié un patient porteur d'une tumeur testiculaire traitée par BEP, mais durant la chimiothérapie, et un an après la fin de la chimiothérapie (Tableau 3). Chez ce patient étudié, donc précocement après la chimiothérapie, une augmentation du taux de spermatozoïdes présentant une aneuploïdie a été mise en évidence.

En cas de maladie de Hodgkin, une augmentation du taux d'aneuploïdie a été rapporté chez neuf patients qui ont été étudiés par deux groupes (Tableau 3). Chez huit patients traités par NOV (Novanthrone, Oncovin, Vimblastine, Prednisone) et une irradiation complémentaire pour maladie de Hodgkin [54], une augmentation de l'aneuploïdie des spermatozoïdes d'un facteur 5 a été mise en évidence durant la chimiothérapie avec une diminution de l'aneuploïdie 100 jours après l'arrêt de la chimiothérapie. Chez un patient traité par Vimblastine et radiothérapie (dose testiculaire cumulée de 0.5Gy) une augmentation de l'aneuploïdie est retrouvée à la fin du traitement et 38 jours après [51].

L'ensemble de ces dernières études pourrait suggérer un effet transitoire de la chimiothérapie ou de la radiothérapie sur l'aneuploïdie des spermatozoïdes.

Pour notre part, nous avons étudié récemment l'aneuploïdie dans les spermatozoïdes de patients traités pour cancer du testicule, 6 à 17 mois après deux à quatre cures de BEP [25]. Il s'agissait de patients suivis au CECOS Midi-Pyrénées dans le cadre de leur autoconservation de sperme, qui étaient volontaires pour réaliser un suivi après la fin de

la chimiothérapie et ont donné leur consentement à l'analyse de leurs spermatozoïdes par FISH. Ne pouvant utiliser les spermatozoïdes pré-thérapeutiques qui étaient conservés en prévention de l'atteinte de la fertilité, nous avons comparé les résultats obtenus chez ces hommes, à 5 hommes appariés sur l'âge, volontaires sains. Le fait que les hommes atteints de cancer du testicule, avant traitement, n'ont pas d'augmentation de l'aneuploïdie par rapport à des hommes témoins sains [2], permet cette comparaison. Nous avons donc utilisé la technique de l'hybridation in situ de sondes centromériques fluorescentes pour les chromosomes, 7, 16, 18, X et Y permettant ainsi l'étude de plusieurs chromosomes sur un très grand nombre de cellules. Sans détailler la technique, la décondensation nucléaire indispensable à l'hybridation est réalisée par du dithiothreitol et du diiodosalicylate de lithium. Une double hybridation est ainsi réalisée sur chaque échantillon de sperme : une hybridation avec les sondes centromériques des chromosomes 7 et 16 et une hybridation avec les sondes centromériques des chromosomes X, Y et 18. Pour chaque hybridation sont analysés 10 000 spermatozoïdes ce qui représente l'analyse de 20 000 spermatozoïdes par échantillon. Cette étude permet de mettre en évidence une anomalie du nombre de chromosomes par spermatozoïde, soit une dysomie, soit une diploïdie (Figure 2). Le fait que nous ayons obtenu des résultats similaires, tant chez les témoins que chez les patients après chimiothérapie, en ce qui concerne le taux de spermatozoïdes diploïdes sur chaque hybridation, conforte la reproductibilité de nos résultats.

Nous avons ainsi montré (Tableau 4) qu'il existait une augmentation significative du pourcentage de spermatozoïdes porteurs d'une disomie 16, 18 et d'une disomie XY. Par ailleurs, notre étude a mis en évidence également, une augmentation de la diploïdie qui est multipliée environ par un facteur 3.

Cette augmentation de l'aneuploïdie met en évidence ainsi une anomalie de la disjonction chromosomique lors de la méiose. Les inhibiteurs de la topoisomérase comme la bléomycine ou l'étoposide peuvent être impliqués dans ce trouble de la disjonction méiotique. Une étude récente [42], chez la souris, a montré que l'étoposide provoquait une augmentation des anomalies des chromosomes au niveau des spermatocytes avec notamment une augmentation, d'un facteur 28, des aberrations chromosomiques au niveau du spermatocyte pachytène et par un facteur 13 au niveau du spermatocyte pré-leptotène. Ces anomalies peuvent être transmises à la descendance comme en témoigne l'augmentation de l'aneuploïdie sur les zygotes obtenus [42].

Si l'on reprend l'ensemble des études concernant l'effet de la chimiothérapie de type BEP sur le spermatozoïde montrant chez l'homme une augmentation de la fréquence des anomalies chromosomiques au niveau du spermatozoïde

Tableau 2 : Anomalies chromosomiques des spermatozoïdes (test hétérosécifique de hamster) et chimiothérapie (- : absence d'effet ; + : effet positif).

	Cancer	n	traitement	temps après traitement	S	Anomalies N
Jenderny et al. 1987 [38]	?	1	BEP+Dact	26 mois	+	+
Genesca et al. 1990 [28]	TGNS	2	PVB ± BEP	2 – 5 ans	+	+
Genesca et al. 1990 [27]	Rabdomyosarcome	1	CYVADIC	5 ans		
	Tumeur d'Ewing	1	VAC	5 ans	+	-
	Tumeur de Wilms	2	RT ± Dact	11 et 18 mois		
Jenderny et al. 1992 [39]	TS	1	PVB	9 mois	-	-
Brandiff et al. 1994 [15]	Hodgkin	3	MOPP	3 à 20 ans	+	+
		3	MOPP+RT			
Martin et al. 1995 [44]	Lymphome	1	MACOP-B	3 ans	-	-
Martin et al. 1997 [45]	TGNS	4	BEP	2 à 13 ans	-	-

Anomalies chromosomiques: S = structurales, N = numériques. TGNS = tumeur germinale non séminomateuse. TS = tumeur séminomateuse. BEP = bleomycine, etoposide, cisplatine. Dact = D-actinomycine. PVB = cisplatine, vinblastine, bleomycine. CYVADIC = cyclophosphamide, adriamycine, vincristine, dicarbazine. VAC = vincristine, adriamycine, cyclophosphamide. MOPP = moutarde d'azote, vincristine, procarbazine, prednisone. MACOP-B = methotrexate, doxorubicine, cyclophosphamide, vincristine, prednisone. RT = radiothérapie.

Tableau 3 : Anomalies chromosomiques des spermatozoïdes (FISH) et chimiothérapie (- : absence d'effet ; + : effet positif).

	Cancer	n	traitement	temps après traitement	anomalies numériques
Martin et al. 1997 [46]	TGNS	4	BEP	2 à 13 ans	-
Robbins et al. 1997 [54]	Hodgkin	8	NOVP	0 jour	+
				100 jours	-
Monteil et al. 1997 [51]	Hodgkin	1	Vinbla. + RT	0 jour	+
				38 jours	+
Martin et al. 1999 [47]	TGNS	1	BEP	0 jour	+
				1 an	+

TGNS = tumeur germinale non séminomateuse. BEP = bleomycine, etoposide, cisplatine. NOVP = novantrone, vincristine, vinblastine, prednisone. Vinbla = vinblastine. RT = radiothérapie.

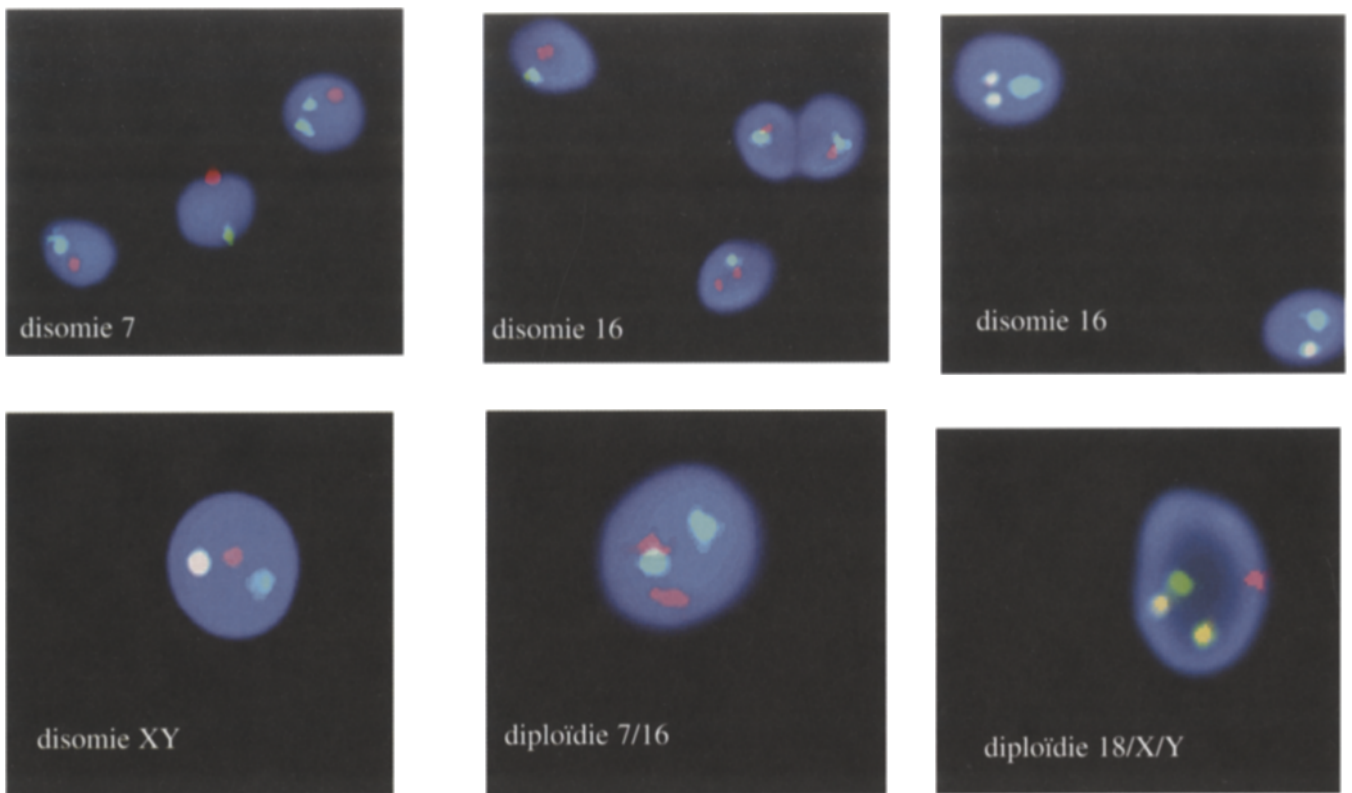


Figure 2 : Hybridation *in situ* de sondes chromosomiques fluorescentes sur le spermatozoïde humain (sondes pour les chromosomes 7, 16, 18, X et Y). Etude de patients ayant eu une chimiothérapie et d'un groupe témoin.

dans les deux premières années et pas d'augmentation entre 2 et 13 ans, la question d'un effet délétère transitoire sur la spermatogénèse se pose.

Pour confirmer cela, il est nécessaire de réaliser des études sur des séries plus importantes, et il serait opportun d'étudier la dynamique de la fréquence de ces anomalies lors de la récupération de la spermatogénèse. Dans l'attente, il semble peut être souhaitable de différer de deux ans, un projet parental ou d'utiliser des paillettes autoconservées avant la chimiothérapie plutôt que du sperme frais dans la première et éventuellement la deuxième année.

III. ANOMALIES INFRACHROMOSOMIQUES

Si la présence d'anomalies chromosomiques au sein du gamète mâle peut être à l'origine d'anomalies chromosomiques dans la descendance, qu'en est-il d'atteintes infrachromosomiques du génome ? On sait actuellement que la qualité du noyau des spermatozoïdes est impliquée dans le développement embryonnaire. Par exemple, l'architecture de la chromatine du spermatozoïde influencerait l'initiation et la régulation de l'activité du génome paternel au début du développement embryonnaire [32]. Dans ce sens, des anomalies du génome paternel ont été décrites lors d'échec du développement embryonnaire [52, 55, 56]. Des altérations

de l'ADN du spermatozoïde ont été également rapportées après exposition à différents agents comme les radicaux libres [30, 36, 60], les toxiques [40, 63] ou l'irradiation [61, 33]. Il a été suggéré que ces altérations seraient dues à des phénomènes d'apoptose au niveau des cellules germinales et testiculaires [3] et récemment des preuves de fragmentation de l'ADN générée par un processus apoptotique ont été observées au niveau des spermatozoïdes éjaculés [12]. Cependant, il ne semble pas licite de réduire les atteintes de l'ADN au processus d'apoptose [26]. En effet si l'on prend l'exemple du protocole BEP, les drogues utilisées sont susceptibles d'entraîner des lésions de l'ADN, la Bléomycine est un agent cytotoxique générant des cassures de l'ADN [16], le Cisplatine est un alkylant qui induit des ponts intra et inter brins ainsi que de volumineux adduits [20, 34], l'étoposide un inhibiteur de la topoisomérase [42].

Plusieurs tests devraient se développer prochainement pour analyser les conséquences des traitements anti-néoplasiques sur le génome du spermatozoïde.

Actuellement deux types d'études ont été réalisés : d'une part, la recherche des mutations dans les séquences minisatellites chromosomiques, et d'autre part, l'étude de la fragmentation de l'ADN du spermatozoïde. Trois études [4, 48, 67] ont recherché des mutations dans les séquences minisatellites chez 15 patients traités par chimiothérapie et/ou radiothérapie (Tableau 5). Chez un patient traité par MOPP

Tableau 4 : Etude de l'aneuploïdie de spermatozoïdes de 5 patients ayant eu une chimiothérapie par BEP et de spermatozoïdes de 5 hommes témoins.

	Patients après Chimiothérapie						Témoins					
	T	P	S	G	B	Moy	Moy	1	2	3	4	5
<i>disomie 7</i>	0,10	0,05	0,04	0,11	0,05	0,070	0,044	0,09	0,03	0,02	0,05	0,03
<i>disomie 16</i>	0,10	0,10	0,08	0,09	0,08	0,090 *	0,046	0,04	0,04	0,06	0,03	0,06
<i>disomie 18</i>	0,06	0,04	0,03	0,06	0,03	0,044 **	0,014	0,01	0,00	0,01	0,02	0,03
<i>disomie X</i>	0,02	0,02	0,03	0,03	0,04	0,028	0,030	0,01	0,05	0,04	0,03	0,02
<i>disomie Y</i>	0,01	0,04	0,02	0,07	0,02	0,032	0,008	0,00	0,00	0,01	0,01	0,02
<i>disomie XY</i>	0,14	0,13	0,15	0,27	0,24	0,186 ***	0,072	0,07	0,08	0,07	0,05	0,09
<i>diploïdie^a</i>	0,29	0,29	0,16	0,11	0,42	0,254 ***	0,094	0,10	0,06	0,10	0,09	0,12
<i>diploïdie^b</i>	0,49	0,24	0,16	0,20	0,28	0,274 ***	0,080	0,07	0,04	0,06	0,13	0,10

Valeurs exprimées en pourcentages.

Comparaison avec groupe témoin : test χ^2 : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

^a : Hybridation chromosomes 7 et 16 ; ^b : hybridation chromosomes 18, X, et Y

pour maladie de Hodgkin il a été mis en évidence, une augmentation de la fréquence des mutations dans les séquences minisatellites et ceci 15 ans après la fin de la chimiothérapie. Bien que la chimiothérapie utilisée dans ce cadre là ait été une chimiothérapie lourde, les auteurs se posaient la question de savoir si cette augmentation ne pouvait pas être en partie liée au vieillissement du patient.

Une seule étude (Tableau 6) réalisée chez un patient porteur d'une leucémie lymphoïde chronique a étudié la fragmentation de l'ADN du spermatozoïde par le test du comet essai [18]. L'étude est difficile à interpréter car le patient a eu une chimiothérapie par sept cycles de fludarabine mais avait eu 9 mois auparavant un cycle de chlorambucil et de plus avait eu une protection par analogues du GnRh durant 6 mois, protection débutée un mois avant la chimiothérapie. Il est apparu au 7^e mois de la chimiothérapie une augmentation du pourcentage de cellules possédant un ADN fragmenté. La question de savoir si le GnRh n'a pas eu une action protectrice se pose, ce patient présentant, au 7^e mois de sa chimiothérapie, 200 millions de spermatozoïdes par ml.

IV. CONCLUSION

L'ensemble des études réalisées à ce jour sont contradictoires mais il semble apparaître un effet des chimiothérapies et radiothérapies sur le nombre de chromosome ou les altérations de l'ADN dans les suites proches du traitement. Le fait que chez l'animal, des effets délétères ont été décrits sur la spermatogénèse mais également sur les générations F1 et F2, le fait que chez l'homme on ait pu mettre en évidence des anomalies de la fréquence de l'aneuploïdie des spermatozoïdes pendant ou dans les suites de la chimiothérapie, doit inciter à la prudence en ce qui concerne les conseils donnés aux couples qui désirent devenir parents, durant les phases de traitement et dans les suites proches du traitement ainsi qu'éventuellement durant les phases de récupération de la spermatogénèse. Il nous apparaît nécessaire de poursuivre les études sur les effets des traitements anti-néoplasiques sur le génome du gamète mâle en utilisant plusieurs outils d'analyse pour identifier ses effets (étude de l'aneuploïdie, de la fragmentation de l'ADN, des mutations dans les séquences minisatellites, recherche d'adduits...). Il est nécessaire de réaliser ces études de manière précoce après la fin de la chimiothérapie ou de la radiothérapie et de manière répétée dans le but d'avoir plusieurs points de surveillance, et de pouvoir dire si les effets sont réversibles et dans quel temps ils sont réversibles.

Dans l'attente, nous reprendrons les réflexions de Arnou et coll. [5] qui, passant en revue les effets géniques et tératogéniques des traitements anticancéreux sur les gamètes et les embryons, suggèrent que les grossesses des patients ayant été traités pour un cancer, soient précisément monitorées et que toute anomalie ou incident soit répertorié. Ils soulignent qu'actuellement il

Tableau 5 : Recherche de mutations dans les séquences minisatellites (- : absence d'effet ; + : effet positif).

	Pathologies	n	traitement	effet
Armour et al. 1999 [4]	glomérulonéphrite	1	cyclophosphamide 2,2g	-
	lymphome	1	Cyclo/Etop/Vin/Doxo + RT	-
Zengh et al. 2000 [67]	Hodgkin	4	NOVP+RT	-
		2	CVPP/ABDIC + RT	-
		1	MOPP	+
		2	ABVD	-
		1	NOVP	-
May et al. 2000 [48]	séminomes	3	RT 0.38 – 0.82 Gy	-

Tableau 6 : Fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes après chimiothérapie, d'après Chatterjee et al. [18].

1 leucémie lymphoïde chronique 7 cycles fludarabine (45,8mg/cycle) 1 cycle de chlorambucil (2mg/j x 15) 9 mois avant GnRh 6 mois, débuté 1 mois avant chimiothérapie					
mois	Spermatozoïdes/ éjaculât	FSH mU/l	LH mU/l	L. Comet µm	M. Comet unit
0	250 x 10 ⁶	8.2	6.7	54.0 ± 1.5	10 ± 1.7
1	10 x 10 ⁶	23.4	19.9	50.1 ± 0.6	6.7 ± 0.2
7	200 x 10 ⁶	11.6	8.2	67.6 ± 0.5 *	14.8 ± 0.2 *
18	160 x 10 ⁶	9.2	8.0	54.0 ± 1.4	7.5 ± 0.1

* différence significative avec valeurs au temps 0.

L. Comet : longueur ; M. Comet : moment de la comète qui est le produit de la migration par le pourcentage d'ADN dans la queue de la comète.

est nécessaire de montrer une extrême prudence lors du conseil à apporter à nos patients.

Remerciements :

Notre étude a bénéficié d'une subvention de l'Association de Recherche contre le Cancer (ARC 9698).

REFERENCES

1. AHMADI A., NG S.C. : Developmental capacity of damaged spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 1999, 14 : 2279-2285.
2. ALVAREZ R., TUSELL L., GENESCA A., MIRO R., GARCIA-DEL-MURO X., EGOZCUE J. : Absence of chromosomal instability of men affected by testicular cancer. *Hum. Reprod.*, 1999, 14 : 247-251.
3. ARAVINDAN G.R., BJORDAHL J., JOST L.K., EVENSON D.P. : Susceptibility of human sperm in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Exp. Cell Res.*, 1997, 236 : 231-237.
4. ARMOUR J.A.L., BRINKWORTH M.H., KAMISCHKE A. : Direct analyses by small PCR of MS205 minisatellite mutation rates in sperm after mutagenic therapies. *Mutat. Res.*, 1999, 445 : 73-80.
5. ARNON J., MEIROW D., LEWIS-RONESS H., ORNOY A. : Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. *Hum. Reprod. Upd.*, 2001, 4 : 349-403.
6. AUGER J., KUNTSMANN J.M., CZYGLIK F., JOUANNET P. : Conservation du sperme avant traitement anticancéreux : une mesure efficace pour préserver les chances de conception future. *Contr. Fertil. Sex.*, 1993, 21 : 749-752.
7. AUROUX M. : Chimiothérapie anticancéreuse chez le mâle : risques pour la descendance. *Andrologie*, 1995, 5 : 465-475.
8. AUROUX M., DULIOUST E. : Cyclophosphamide in the male rat : Behavioral Effects in the Adult Offspring. *Behav. Res.*, 1985, 16 : 25-36.
9. AUROUX M., DULIOUST E., NAWAR N.N.Y., YACOB S.G. : Antimitotic Drugs (Cyclophosphamide and Vinblastine) in the male rat : Deaths and Behavioral Abnormalities in the Offspring. *J. Androl.*, 1986, 7 : 378-386.
10. AUROUX M., DULIOUST E., NAWAR N.N.Y., YACOB S.G., KEMPF E.H., EBEL A.B. : Cyclophosphamide in the male rat : cerebral biochemical changes in progeny. *Biomed. Pharmacother.*, 1990, 44 : 519-523.
11. AUROUX M., DULIOUST E., SELVA J., RINCE P. : Cyclophosphamide in the FO male rat : physical and behavioral changes in three successive adult generations. *Mutat. Res.*, 1990, 229 : 189-200.
12. BACCETTI B., COLLODEL G., PIOMBONI P. : Apoptosis in human ejaculated sperm cells. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 1996, 28 : 587-596.
13. BACHAUD J.M., ALZIEU C., BUJAN L. : Effets de la radiothérapie sur la fonction testiculaire de l'adulte. *Andrologie*, 1995, 5, : 476-485.
14. BLATT J., MULVIHILL J.J., YOUNG R.G., POPLACK D.G. : Pregnancy outcome following cancer chemotherapy. *Am. J. Med.*, 1980, 69 : 828-832.
15. BRANDRIFF B., MEISTRICH M., GORDON L., CARRANO A., LIANG J. : Chromosomal damage in sperm of patients surviving Hodgkin's disease following MOPP (nitrogen mustard, vincristine, procarbazine and prednisone) therapy with and without radiotherapy. *Hum. Genet.*, 1994, 93 : 295-299.
16. BUSCHINI A., ALESSANDRINI C., MARTINO A. et al. : Bleomycin genotoxicity and amifostine (WR-2721) cell protection in normal leukocytes vs. K562 tumoral cells. *Biochem. Pharmacol.*, 2002, 7116 : 1-9.
17. BYRNE J., MULVIHILL J., CONNELLY R. et al. : Reproductive problems and birth defects in survivors of Wilms' tumor and their relatives. *Med. Pediatr. Oncol.*, 1988, 16 : 233-240.
18. CHATTERJEE R., HAINES G.A., PERERA D.M.D., GOLDSTONE A., MORRIS I.D. : Testicular and sperm DNA damage after treatment with fludarabine for chronic lymphocytic leukaemia. *Hum. Reprod.*, 2000, 15 : 762-766.
19. CHEVREAU C., HUGUET F. : Chimiothérapie anticancéreuse et fertilité masculine. *Andrologie*, 1995, 5 : 458-464.
20. COHEN S.M., LIPPARD S.J. : Cisplatin : from DNA damage to cancer chemotherapy. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 2001, 67 : 93-130.
21. COONEN E., PIETERS M., DUMOULIN J. et al. : Nonisotopic in situ hybridization as a method for nondisjunction studies in human spermatozoa. *Molec. Reprod. Develop.*, 1991, 28 : 18-22.
22. COSTABILE R.A. : The effects of cancer and cancer therapy on male reproductive function. *J. Urol.*, 1993, 149 : 1327-1330.
23. CZYGLIK F., AUGER J., ALBERT M., DAVID G. : L'autoconservation du sperme avant thérapeutique stérilisante. *Nouvelle Presse Médicale*, 1982, 11 : 2749-2752.
24. DAUDIN M., BUJAN L. : Place et rôle des CECOS en cancérologie : préservation de la fertilité avant traitement anticancéreux. *Oncologie*, 2000, 2 : 402-412.
25. DE MAS P., DAUDIN M., VINCENT M.C. et al. : Increased aneuploidy in spermatozoa from testicular tumour patients after chemotherapy with cisplatin, etoposide and bleomycin. *Hum. Reprod.*, 2001, 16 : 1204-1208.
26. EVENSON D.P., LARSON K.L., JOST L.K. : Sperm chromatin structure assay : its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J. Androl.*, 2002, 23 : 25-43.
27. GENESCA A., CABALLIN M., MIRO R., BENET J., BONFILL X., EGOZCUE J. : Human sperm chromosomes : long-term effect of cancer treatment. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1990, 46 : 251-260.
28. GENESCA A., MIRO R., CABALLIN M., BENET J., GERMA J., EGOZCUE J. : Sperm chromosome studies in individuals treated for testicular cancer. *Hum. Reprod.*, 1990, 5 : 286-290.
29. GREEN D., ZEVON M., LOWRIE G. : Congenital abnormalities in children of patients received chemotherapy for cancer in childhood or adolescence. *N. Engl. J. Med.*, 1991, 325 : 141-146.
30. GRIVEAU J.F., LELANNOU D. : Effects of antioxydants on human sperm preparation techniques. *Int. J. Androl.*, 1994, 17 : 225-231.
31. GUTTENBACH M., SCHMID M. : Determination of Y chromosome and aneuploidy in human sperm nuclei by non radioactive in situ hybridization. *Am. J. Hum. Genet.*, 1990, 46 : 553-558.
32. HAAF T., WARD D.C. : Higher order nuclear structure in mammalian sperm revealed by in situ hybridization and extended chromatin fibers. *Exp. Cell Res.* 1995, 219 : 604-11.

33. HAINES G.A., HENDRY J.H., DANIEL C.P., MORRIS I.D. : Increased levels of comet-detected spermatozoa DNA damage following *in vivo* isotopic or X-irradiation of spermatogonia. *Mutat. Res.*, 2001, 495 : 21-32.
34. HOOSER S., VAN DIJK-KNIJNENBURG W., WAALKENS-BERENDSEN I. : Cisplatin-DNA adduct formation in rat spermatozoa and its effect on fetal development. *Cancer Lett.*, 2000, 3 : 71-80.
35. HOWELL S.J., SHALET S.M. : Testicular function following chemotherapy. *Hum. Reprod. Update*, 2001, 7 : 363-369.
36. HUGHES C.M., LEWIS S.E.M., McKEVEY-MARTIN V.J., THOMPSON W. : A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Mol. Hum. Reprod.*, 1996, 2 : 613-619.
37. JEGOU B., VELEZ DE LA CALLE J.F., BAUCHE F. : Protective effect of medroxyprogesterone acetate plus testosterone against radiation induced damage to the productive function of male rats and their offspring. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1991, 88 : 8710-8714.
38. JENDERNY J., ROHRBORN G. : Chromosome analysis of human sperm. I. First results with a modified method. *Hum. Genet.*, 1987, 76 : 385-388.
39. JENDERNY J., JACOBI M., RUGER A., ROHRBORN G. : Chromosome aberrations in 450 sperm complements from eight controls and lack of increase after chemotherapy in two patients. *Hum. Genet.*, 1992, 90 : 151-154.
40. JOFFE M., LI Z. : Male and female factors in fertility. *Am. J. Epidemiol.*, 1994, 140 : 921-929.
41. LI F.P., JAFFE M. : Progeny of childhood cancer survivors. *Lancet*, 1974, 2 : 704-714.
42. MARCHETTI F., BISHOP J.B., LOWE X., GENEROSO W.M., HOZIER J., WYROBEK A.J. : Etoposide induces heritable chromosomal aberrations and aneuploidy during male meiosis in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2001, 98, 3952-3957.
43. MARTIN R., HILDEBRAND K., YAMAMOTO J. : An increased frequency of human sperm chromosomal abnormalities after radiotherapy. *Mutat. Res.*, 1986, 174 : 219-225.
44. MARTIN R., RADEMAKER A., LEONARD N. : Analysis of chromosomal abnormalities in human sperm after chemotherapy by karyotyping and fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1995, 80 : 29-32.
45. MARTIN R., ERNST S., RADEMAKER A., BARCLAY L., KO E., SUMMERS N. : Analysis of human sperm karyotypes in testicular cancer patients before and after chemotherapy. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1997, 78 : 120-123.
46. MARTIN R., ERNST S., RADEMAKER A., BARCLAY L., KO E., SUMMERS N. : Chromosomal abnormalities in sperm from testicular cancer patients before and after chemotherapy. *Hum. Genet.* 1997, 99 : 214-218.
47. MARTIN R., ERNST S., RADEMAKER A., BARCLAY L., KO E., SUMMERS N. : Analysis of sperm chromosome complements before, during and after chemotherapy. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1999, 108 : 133-136.
48. MAY C.A., TAMAKI K., NEUMANN R. et al. : Minisatellite mutation frequency in human sperm following radiotherapy. *Mutat. Res.*, 2000, 453 : 67-75.
49. MEIROW D., SCHENKER J. : Cancer and male infertility. *Hum. Reprod.*, 1995, 10 : 2017-2022.
50. MEISTRICH M. : Potential genetic risks of using semen collected during chemotherapy. *Hum. Reprod.*, 1993, 8 : 8-10.
51. MONTEIL M., ROUSSEAU S., CHEVRET E., PELLETIER R., COZZI J., SELE B. : Increased aneuploid frequency in spermatozoa from a Hodgkin's disease patient after chemotherapy and radiotherapy. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1997, 76 : 134-138.
52. MORTIMER D. : The future of male infertility management and assisted reproduction technology. *Hum. Reprod.* 2000, 15 : 98-110.
53. ROBAIRE B. : Mechanisms of action of cyclophosphamide as a male-mediated developmental toxicant. Second international conference on Male-Mediated Developmental Toxicity. Montreal, 2002, *in press*.
54. ROBBINS W., MEISTRICH M., MOORE D. et al. : Chemotherapy induces transient sex chromosomal and autosomal aneuploidy in human sperm. *Nature Genetics*, 1997, 16 : 74-78.
55. SAKKAS D., MARIETHOZ E., St. JOHN J.C. : Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp. Cell Res.*, 1999, 251 : 350-355.
56. SAKKAS D., TOMLINSON M. : Assessment of sperm competence. *Semin. Reprod. Med.*, 2000, 18 : 133-139.
57. SANDERS J., HAWLEY J., LEVY W. : Pregnancies following high dose cyclophosphamide with or without high dose busulfan or total body irradiation and bone marrow transplant. *Blood*, 1996, 87 : 3045-3052.
58. SCHRADER M., MULLER M., STRAUB B., MILLER K. : The impact of chemotherapy on male fertility : a survey of the biologic basis and clinical aspects. *Reprod. Toxicol.*, 2001, 15 : 611-617.
59. SENTURIA Y., PECKHAM C., PECKHAM M. : Children fathered by men treated for testicular cancer. *Lancet*. 1985, II : 766-769.
60. SHEN H.M., ONG C.N. : Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000, 28 : 529-536.
61. SINGH N.P., McCOY M.T., TICE R.R., SCHNEIDER E.L. : A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175 : 184-191.
62. SLOTER E.D., LOWE X., MOORE D.H., NATH J., WYROBEK A.J. : Multicolor FISH analysis of chromosomal breaks, duplications, deletions, and numerical abnormalities in the sperm of healthy men. *Am. J. Hum. Genet.*, 2000, 67 : 862-872.
63. SUN J.G., JURISICOVA A., CASPER R. F. : Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm : correlation with *in vitro* fertilization. *Biol. Reprod.*, 1997, 56 : 602-607.
64. TRASLER J.M., HALES B.F., ROBAIRE B. : Chronic low dose cyclophosphamide treatment of adult male rats : effect on fertility, pregnancy outcome and progeny. *Biol. Reprod.*, 1986, 34, 275-283.
65. VELEZ DE LA CALLE J.F., JEGOU B. : Prevention by a contraception of anti-cancer drug induced sterility and genotoxicity in male rats. *Cancer Res.*, 1990, 50 : 1308-1315.
66. WYROBEK A.J., ALHBORN T., BALHORN R., STANKER L., PINKEL D. : Fluorescence *in situ* hybridization to Y chromosome in decondensed human sperm nuclei. *Molec. Reprod. Develop.*, 1990, 27 : 200-208.

67. ZHENG N., MONCKTON D.G., WILSON G., et al. : Frequency of minisatellite repeat number changes at the MS205 locus in human sperm before and after cancer chemotherapy. *Environ. Mol. Mut.*, 2000, 36 : 134-145.

ABSTRACT

Genotoxicity of chemotherapy and radiotherapy:

What are consequences for human spermatozoa?

Louis BUJAN, Philippe DE MAS

The prognosis of cancer in young men of childbearing potential has been considerably improved over recent decades as a result of therapeutic progress. Chemotherapy and radiotherapy have well known effects on spermatogenesis. Apart from quantitative and qualitative impairment of spermatogenesis, animal studies have also demonstrated nuclear lesions (aneuploidy, presence of adducts, DNA fragmentation, etc.) and sometimes lesions affecting the F1 and F2 generations. Chromosomal studies of human spermatozoa after radiotherapy have demonstrated an increased frequency of chromosomal anomalies. The first studies concerning the effects of chemotherapy used the heterospecific fertilization technique to demonstrate spermatozoal chromosomal anomalies. More recently, the **fluorescence in situ hybridization (FISH)** technique has been used to study several chromosomes on a large number of spermatozoa. The results of various studies based on small sample sizes vary as a function of the therapeutic protocol administered and the time of sperm collection in relation to the end of treatment. We studied 5 patients who provided a semen sample 6 to 17 months after completing the BOE chemotherapy protocol (Bleomycin, Etoposide, Cisplatin). We demonstrated an increased rate of aneuploid and diploid spermatozoa. The results of our study and those reported by R. Martin et al. [45, 47] suggest the possibility of a transient effect of chemotherapy on gamete chromosomes. Other studies, conducted in the context of Hodgkin's disease, have demonstrated the transient nature of the aneuploidy effect. Apart from

the harmful action on chromosomes, treatments could also damage spermatozoal DNA. Studies conducted on larger sample sizes and using other methods of analysis therefore appear to be essential. In the meantime, it appears preferable to systematically propose semen cryopreservation before treatment and to provide very cautious advice to patients desiring a pregnancy soon after completion of treatment.

Key Words : *chemotherapy, radiotherapy, spermatozoa, aneuploidy, minisatellites, DNA, side effects, review*