

# Intérêt de l'étude de l'oxydation de l'ADN des spermatozoïdes par marquage de la 8-oxo-guanine en cytométrie en flux chez l'homme infertile

Nozha CHAKROUN FEKI<sup>1</sup>, Nassira ZRIBI<sup>1</sup>, Henda ELEUCH<sup>2</sup>, Radouane GDOURA<sup>3</sup>, Afifa SELLAMI<sup>1</sup>, Ali BAHLOUL<sup>4</sup>, Adnene HAMMAMI<sup>3</sup>, Jalel GARGOURI<sup>2</sup>, Tarek REBAI<sup>1</sup>, Leila KESKES AMMAR<sup>1</sup>

1 Laboratoire d'Histologie Embryologie, Faculté de Médecine de Sfax,

2 Centre de transfusion sanguine, Sfax,

3 Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Médecine de Sfax,

4 Unité de recherche infertilité masculine UR07US0011, Sfax, Tunisie

## RÉSUMÉ

Dans le sperme, le stress oxydatif est essentiellement dû à une production excessive de dérivés actifs de l'oxygène (DAO) d'origine essentiellement leucocytaire. L'oxydation de l'ADN est due à l'action directe des DAO qui produisent en conséquence plusieurs adduits dont le plus étudié est la 8-oxo-guanine. L'intégrité de l'ADN est essentielle pour la fécondance du spermatozoïde et elle constitue de nos jours un sujet d'intérêt pour les chercheurs et cliniciens dans le monde. Si les moyens d'évaluation de l'intégrité globale de l'ADN spermatique se sont bien développés ces dernières années, les tests d'évaluation du dommage de l'ADN d'origine oxydative sont peu documentés.

L'objectif de ce travail est de faire le point sur les différents tests d'étude de l'intégrité de l'ADN spermatique couramment utilisés selon la littérature, et de présenter les résultats de notre étude sur l'oxydation de l'ADN par marquage de la 8-oxo-guanine en cytométrie en flux chez l'homme infertile.

Notre travail a porté sur 15 échantillons de sperme qui ont fait l'objet d'une analyse spermiologique selon les recommandations de l'OMS, avec une mesure de la concentration des leucocytes par la méthode cytochimique révélant la peroxydase dans les granulations cytoplasmiques. L'étude de l'oxydation de l'ADN a été réalisée grâce à un kit de marquage de la 8-oxo-guanine en cytométrie en flux.

Nous avons montré par l'étude de la régression linéaire une forte corrélation entre l'oxydation de l'ADN et le taux de leucocytes dans le sperme ( $p=0,006$ ,  $\beta=0,7$ ). Un seuil de leucocytes de 250 000/ml de sperme était associé à une augmentation significative de l'oxydation de l'ADN ( $p=0,03$ ).

Nous concluons que la 8-oxo-guanine pourrait être considérée comme un biomarqueur de l'action directe du stress oxydatif sur l'ADN spermatique qui semble être vulnérable à des taux relativement faibles de DAO produits par des leucocytes présents à une concentration largement inférieure au seuil de la leucospermie défini par l'OMS.

*Mots clés* : leucospermie, stress oxydatif, dommage de l'ADN, 8-oxo-guanine, spermatozoïde, infertilité

## I. INTRODUCTION

Durant ces dernières années, l'intégrité de l'ADN spermatique a constitué un sujet d'intérêt pour les chercheurs et les praticiens dans le domaine de la reproduction, essentiellement après le développement des nouvelles techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP), et en particulier l'ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*) qui court-circuite les barrières de la sélection naturelle des spermatozoïdes. Nombreuses sont les études qui ont montré une diminution des taux de fécondation et une altération de la qualité embryonnaire dues à une atteinte de l'intégrité génomique du spermatozoïde. Ces résultats soulèvent la question

Correspondance :

Dr Nozha CHAKROUN FEKI - Laboratoire d'Histologie Embryologie, Faculté de Médecine de Sfax, Route Majida Boulifa, 3028, Sfax, Tunisie - Tel 00(216)74612396 - Email nozhafeki@yahoo.fr

récurrente du risque d'anomalies géniques et génétiques chez les enfants nés par ICSI [38]. Le développement des tests de l'étude de l'intégrité génomique des spermatozoïdes a été remarquable ces dernières années ; mais l'application de ces tests en routine reste difficile à cause de l'absence de standardisation des méthodes d'analyse, d'une part, et de leur coût élevé, d'autre part.

Dans le cadre de l'exploration de l'infertilité masculine, la pratique des tests d'évaluation de l'intégrité de l'ADN se justifie pour des raisons diagnostiques et thérapeutiques ; en effet, mettre en évidence un dommage de l'ADN spermatique, par exemple d'origine oxydative chez l'homme infertile, permet d'un côté d'orienter l'exploration vers la recherche d'une cause sous-jacente du stress oxydatif (inflammation, infection génitale...), et, d'un autre côté, de proposer un traitement adapté avant le recours à l'AMP. A ce jour, les causes des dommages de l'ADN ne sont pas clairement élucidées. Le dommage de l'ADN par oxydation constitue la cause la plus sûre. Les dérivés actifs de l'oxygène, ubiquitaires dans différents systèmes biologiques, agissent directement sur l'ADN spermatique et induisent des oxydations et des fragmentations [1]. Le produit de l'oxydation de l'ADN le plus étudié est la 8-oxo-guanine [29, 36].

Le dommage de l'ADN secondaire à une oxydation a été jusque-là évalué par des techniques laborieuses de chromatographie liquidienne qui quantifient les bases nucléiques modifiées. Récemment, une nouvelle technique de révélation spécifique de la 8-oxo-guanine dans les spermatozoïdes par cytométrie en flux a été rapportée par Meseguer et al. [27].

L'objectif de ce travail est de rapporter des données de la littérature concernant les méthodes les plus utilisées pour l'évaluation de la qualité de l'ADN spermatique, de montrer l'intérêt de la quantification de la 8-oxo-guanine par cytométrie en flux dans l'évaluation de l'impact d'un stress oxydatif sur l'ADN spermatique, et d'étudier la relation entre le dommage type oxydatif de l'ADN spermatique et les paramètres spermatiques chez les hommes infertiles.

## II. ORIGINE DES DOMMAGES DE L'ADN SPERMATIQUE

Si la présence de spermatozoïdes avec ADN fragmenté dans le sperme est un phénomène bien démontré [46], ses causes sont moins élucidées. Leur association avec une baisse de la fertilité chez l'homme est en revanche bien établie [21, 38]. Il a été en effet rapporté que le défaut de protamination est associé à des dommages de l'ADN spermatique et à une diminution de la capacité de la fécondation in vitro dans le modèle animal [8]. Par ailleurs, il a été suggéré que la présence de cassures de l'ADN des spermatozoïdes éjaculés pourrait indiquer une maturation incomplète de ces cellules en différenciation lors de la spermiogenèse [26]. Pendant la spermatogenèse, certains spermatozoïdes à ADN endommagé peuvent échapper au phénomène de mort programmée ('apoptose avortée') et se retrouvent donc dans l'éjaculat [33]. Les causes des dommages de l'ADN spermatique sont en fait nombreuses.

- Chimio- et radio-thérapies : les effets de la chimiothérapie et de la radiothérapie sur l'épithélium germinatif sont moléculaires, doses et durées dépendants. La reprise d'une spermatogenèse normale peut se faire après quelques semaines à quelques années, mais les dommages de l'ADN persistent plus longtemps.
- Tabac et toxines : il a été rapporté que le tabagisme était associé à une baisse de la concentration et de la mobilité des spermatozoïdes, ainsi qu'à une augmentation des formes anormales et des anomalies de la structure chromatinienne spermatique [30]. Les pesticides et la pollution aérienne ont été rapportés comme facteurs associés à une augmentation de l'atteinte de l'intégrité de l'ADN [32, 35].
- Inflammation du tractus génital : les infections et inflammations testiculaires, épидидymaires ou prostatiques sont associées fréquemment à une leucospermie et à des taux élevés de DAO, et en conséquence à des taux élevés de dommages de l'ADN [28].
- Hyperthermie testiculaire : Evenson et al. ont rapporté qu'une fièvre générale était associée à une augmentation du dommage de l'ADN [14]. L'élévation de la température testiculaire par un mode de vie ou des habitudes vestimentaires particuliers serait également associée à une atteinte de l'intégrité de l'ADN.
- Varicocèle : la varicocèle est associée à des taux élevés de DAO dans le sperme et de fragmentation de l'ADN [34]. Ce syndrome, appelé stress testiculaire, semble être associé à une anomalie morphologique assez caractéristique : les restes cytoplasmiques ou gouttelettes cytoplasmiques, source connue de DAO [44]. Le taux de fragmentation de l'ADN diminue significativement après cure de varicocèle [43].

## III. METHODES D'EVALUATION DES DOMMAGES DE L'ADN SPERMATIQUE

Plusieurs tests évaluant la structure de l'ADN sont actuellement valables. L'utilisation de ces tests est de plus en plus fréquente avec le développement des techniques d'AMP, du fait que l'intégrité de l'ADN spermatique joue un rôle important dans la fécondation in vitro.

Le dommage de l'ADN spermatique peut être évalué directement (fragmentation, oxydation) ou indirectement (compaction de la chromatine) (Tableau 1).

### 1. Méthodes directes

- L'analyse unicellulaire sur gel d'électrophorèse (COMET, *Single Cell Gel Electrophoresis Assay*), consiste à faire migrer les fragments d'ADN de noyaux spermatiques sur gel d'électrophorèse révélant une 'comète' d'intensité proportionnelle à l'importance de la fragmentation de l'ADN. L'absence de standardisation méthodologique fait qu'elle ne peut encore être réalisée en routine.
- La méthode TUNEL : (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTPnick end-labelling*) : marquage des extrémités 3'-OH des brins de l'ADN avec la terminale

**Tableau 1 : Principaux tests utilisés pour l'étude de la qualité de l'ADN spermatique.**

Test	Principe	Caractéristiques	Références
Etude de la structure de la chromatine spermatique en cytométrie en flux	Marque l'ADN dénaturé	Méthode indirecte, objective, et assez complexe	[13, 45]
Analyse des protéines nucléaires par électrophorèse sur gel	Détermine le taux des histones et protamines	Méthode quantitative indirecte, très laborieuse	[4, 41]
Etude de la maturité nucléaire par méthode histochimique (coloration au bleu d'aniline)	Etudie la compaction de la chromatine et la protamination	Méthode semi-quantitative indirecte, simple	[12, 17]
Méthode COMET migration sur gel d'électrophorèse de l'ADN nucléaire d'un noyau et analyse d'image	Marque les cassures de l'ADN double brin	Méthode semi-quantitative, directe, objective, complexe	[25, 37]
Méthode TUNEL	Marque les cassures de l'ADN double brin	Méthode semi-quantitative, objective, simple	[10, 20]
Etude de l'oxydation de l'ADN par chromatographie liquidienne	Quantification de la 8-oxo-guanine	Méthode quantitative directe, très laborieuse	[16, 36]
Etude de l'oxydation de l'ADN en cytométrie en flux	Marquage spécifique de la 8-oxo-guanine	Méthode semi quantitative, directe, objective, simple et spécifique	[27]

désoxynucleotidyle transférase ; c'est la méthode la plus utilisée en recherche clinique, elle utilise la cytométrie en flux pour produire des résultats fiables et reproductibles, avec peu de variations inter-essais.

- Test *in situ* de cassures dans l'ADN (*In situ Nick Translation Assay*) : mesure l'incorporation du complexe biotine-dUTP aux cassures simple brin de l'ADN.
- Méthode par chromatographie liquidienne pour la mesure de l'oxydation de l'ADN : la quantification de la 8-oxo-guanine, adduit de l'ADN, par chromatographie liquidienne a été utilisée dans certaines études, mais a été confrontée à des contraintes liées à la lourdeur de la technique ainsi qu'aux difficultés dans l'interprétation des résultats [36]. L'estimation du dommage oxydatif de l'ADN spermatique est possible par une méthode de cytométrie en flux qui marque spécifiquement un adduit de l'ADN oxydé : la 8-oxo-guanine.

## 2. Méthodes indirectes de l'intégrité chromatiniennne (*Sperm Chromatin Structure Assay*, SCSA)

Ces méthodes sont basées sur les marquages, soit par le bleu de toluidine qui détecte les histones et la chromomycine-A 3 (CMA3) qui détecte les défauts de protamination et la faible proportion des ponts dissulfures dans les protamines, soit par les marqueurs de l'ADN telle que l'acridine orange.

## IV. STRESS OXYDATIF ET OXYDATION DE L'ADN

La production des DAO par les spermatozoïdes est un processus physiologique normal et nécessaire pour l'acquisition des capacités fonctionnelles [9]. Un état de déséquilibre entre une production excessive des dérivés actifs de l'oxygène (DAO) et les moyens de défense spécifique, définit le stress oxydatif. Ainsi, les acteurs du stress oxydatif peuvent avoir des effets délétères sur de nombreux constituants des cellules comme les protéines, les lipides ou encore les acides nucléiques.

L'évaluation du stress oxydatif peut être réalisée à différents niveaux : le dosage des molécules biologiques modifiées (telles que les bases ou protéines oxydées) qui peut être réalisé par diverses techniques, et l'appréciation du potentiel anti-oxydant qui peut être faite par la détermination des activités enzymatiques des superoxydes dismutases (SOD), de la glutathion peroxydase (GPX) et des catalases.

Le stress oxydatif représente une cause bien établie de l'infertilité masculine [1]. Dans le sperme, les polynucléaires neutrophiles sont la principale source des DAO [3] ; cependant, certains spermatozoïdes présentant des anomalies structurales ou fonctionnelles peuvent produire des DAO en faibles quantités [19]. La membrane spermatique est une structure très vulnérable aux DAO, vue sa richesse en acides gras poly-insaturés (AGPI). La peroxydation des lipides membranaires entraîne des dommages membranaires qui retiennent sur les capacités fonctionnelles du spermatozoïde, essentiellement la mobilité et la capacité fusiogène [39].

Toutes les autres structures cellulaires sont des cibles potentielles des DAO, essentiellement l'ADN spermatique qui est également vulnérable vis-à-vis d'un stress oxydatif [6] ; enfin, le dommage oxydatif de l'ADN spermatique semble retarder significativement les délais de conception [24].

## V. MATERIEL ET METHODES

### 1. Matériel

Nous avons inclus dans cette étude 15 échantillons de sperme recueillis par masturbation après un délai d'abstinence sexuelle de 3-5 jours, chez 15 hommes explorés pour infertilité du couple.

### 2. Méthodes

#### a) Spermogramme

L'analyse des paramètres (mobilité, vitalité et numération) a été réalisée selon la méthode standardisée de l'OMS [40]. La morphologie a été analysée après coloration de frottis de sperme au Shorr selon la classification de David modifiée par Auger et Eustache [5]. Les polynucléaires neutrophiles (PNN) ont été détectés par la méthode histochimique traditionnelle de mise en évidence de la peroxydase endogène (test à la peroxydase) [40] ; leur concentration a été déterminée à l'aide d'un hémostomètre (cellule de Malassez). Nous avons choisi arbitrairement un seuil de leucospermie de 250 000 PNN/ml pour définir deux groupes : Groupe 1 (PNN<250 000/ml) et Groupe 2 (PNN≥250 000/ml).

#### b) Analyse de l'oxydation de l'ADN spermatique par cytométrie en flux

L'oxydation de l'ADN nucléaire du spermatozoïde a été déterminée par une méthode qualitative qui marque spécifiquement les adduits fixés sur la guanine oxydée, la 8-oxo-guanine utilisant le kit Oxy-DNA® (K assay). Une aliquote de chaque échantillon de sperme contenant  $3 \times 10^6$  spermatozoïdes a été lavée avec du PBS puis fixée et perméabilisée pendant 1 heure par de l'éthanol 70%. Après un lavage au PBS, 50µl de FITC conjuguée ont été ajoutés au culot de spermatozoïdes ; le mélange a été incubé pendant 1 heure à l'obscurité et à température ambiante. Les spermatozoïdes, lavés avec du PBS, ont ensuite été analysés par cytométrie en flux (FACScan cytometer, Becton Dickinson).

Le témoin positif était obtenu en incubant un échantillon de spermatozoïdes lavés avec du PBS pendant 2 heures avec une solution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4 M/mL). Le témoin négatif a été obtenu à partir d'un échantillon de sperme d'homme fertile après une sélection par gradient de densité. Les deux échantillons témoins ont été fixés et perméabilisés puis traités comme décrit précédemment.

### 3. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SPSS (version 13). Pour la comparaison des paramètres quantitatifs, nous avons utilisé le t-test de Student.

La relation entre le pourcentage de spermatozoïdes 8-oxo-guanine positifs et le taux de polynucléaires neutrophiles a été évaluée par régression linéaire après ajustement sur les autres paramètres spermatiques. Un seuil de signification a été considéré pour  $p < 0,05$ .

## VI. RESULTATS

L'âge moyen des patients était de 38 ans avec une durée moyenne d'infertilité de 4 ans. L'abstinence sexuelle était de 3 jours en moyenne (3-5 jours). Le volume moyen des éjaculats était de 3,5 ml avec un pH moyen de 7,6. Les valeurs moyennes des paramètres spermatiques sont présentées dans le **Tableau 2**. Le taux moyen de PNN dans le sperme était de 300 000/ml, un seul patient était leucospermique selon le critère de l'OMS.

### 1. Cytométrie en flux et oxydation de l'ADN

Les profils du marquage de la 8-oxo-guanine obtenus par cytométrie en flux, présentés dans les **Figures 1A et 1B**, correspondent respectivement aux témoins négatif et positif. La **Figure 1C** montre le profil d'un patient infertile.

Dans la population des hommes infertiles étudiée, le taux de spermatozoïdes à ADN oxydé était en moyenne de 13% (**Tableau 2**). Plus des deux tiers des patients (70%) présentaient un taux supérieur à 10% de spermatozoïdes à ADN oxydé.

### 2. Oxydation de l'ADN et paramètres spermatiques

L'analyse de la régression linéaire n'a pas montré d'association entre l'oxydation de l'ADN et les paramètres spermatiques. Cependant, malgré le faible nombre de patients étudiés, nous avons trouvé une corrélation positive très significative entre le taux de leucocytes dans le sperme et l'oxydation de l'ADN spermatique ( $p=0,006$ ), ceci après ajustement aux autres paramètres spermatiques : mobilité, vitalité, morphologie et numération des spermatozoïdes et des cellules rondes (**Tableau 3**).

La comparaison des moyennes du taux des PNN et de l'oxydation de l'ADN entre les groupes 1 et 2 a montré des différences significatives (respectivement  $p=0,002$  et  $p=0,03$ ) (**Tableau 4**).

## VII. DISCUSSION

L'analyse de l'oxydation de l'ADN par cytométrie en flux est une nouvelle technique qui consiste à marquer spécifiquement un adduit de l'oxydation de l'ADN, la 8-oxo-guanine. C'est un test qui semble être sensible, spécifique et reproductible et facilement applicable dans un laboratoire de recherche clinique ou fondamentale [27].

Dans notre étude, malgré le nombre faible d'échantillons de sperme d'hommes infertiles inclus, nous avons montré une relation entre les leucocytes spermatiques et le dommage oxydatif de l'ADN spermatique. Ces résultats reflètent l'impact direct des DAO produits par les leucocytes sur la structure de l'ADN spermatique et vraisemblablement sur son pouvoir fécondant. Ils corroborent ceux publiés par Moskovtsev et al. [28] ainsi que ceux de Erenpreiss et al. [11].

Il est bien établi que les DAO endommagent la structure de l'ADN en modifiant la structure des bases (oxydation, alkylation, réarrangement), en créant des coupures des chaînes simple brin ou double brin et en générant des délétions et des réarrangements chromosomiques [22]. Ces dommages sont impliqués dans les phénomènes de mutagenèse et dans la

**Tableau 2 : Valeurs moyennes ( $\pm$  DS) des paramètres spermatiques, des leucocytes et du dommage oxydatif des patients étudiés (n=15).**

	Moyenne $\pm$ DS	Minimum	Maximum
Age (ans)	38,0 $\pm$ 5,4	29	47
Volume (ml)	3,5 $\pm$ 1,2	2	6
pH	7,6 $\pm$ 0,2	8	8
Mobilité totale (%)	45,0 $\pm$ 7,07	25	55
a (%)	13,6 $\pm$ 6,9	0	25
b (%)	27,0 $\pm$ 4,9	20	35
Vitalité (%)	77,2 $\pm$ 8,9	60	92
Numération (M/ml)	74,7 $\pm$ 42,4	11,7	142,0
Cellules rondes (M/ml)	7,1 $\pm$ 8,4	1,2	34,4
Polynucléaires neutrophiles (M/ml)	0,3 $\pm$ 0,5	0,08	1,9
Morphologie (%)	10,0 $\pm$ 5,5	2	22
Dommage oxydatif (%)	13,9 $\pm$ 6,0	7,75	30,20

M : millions

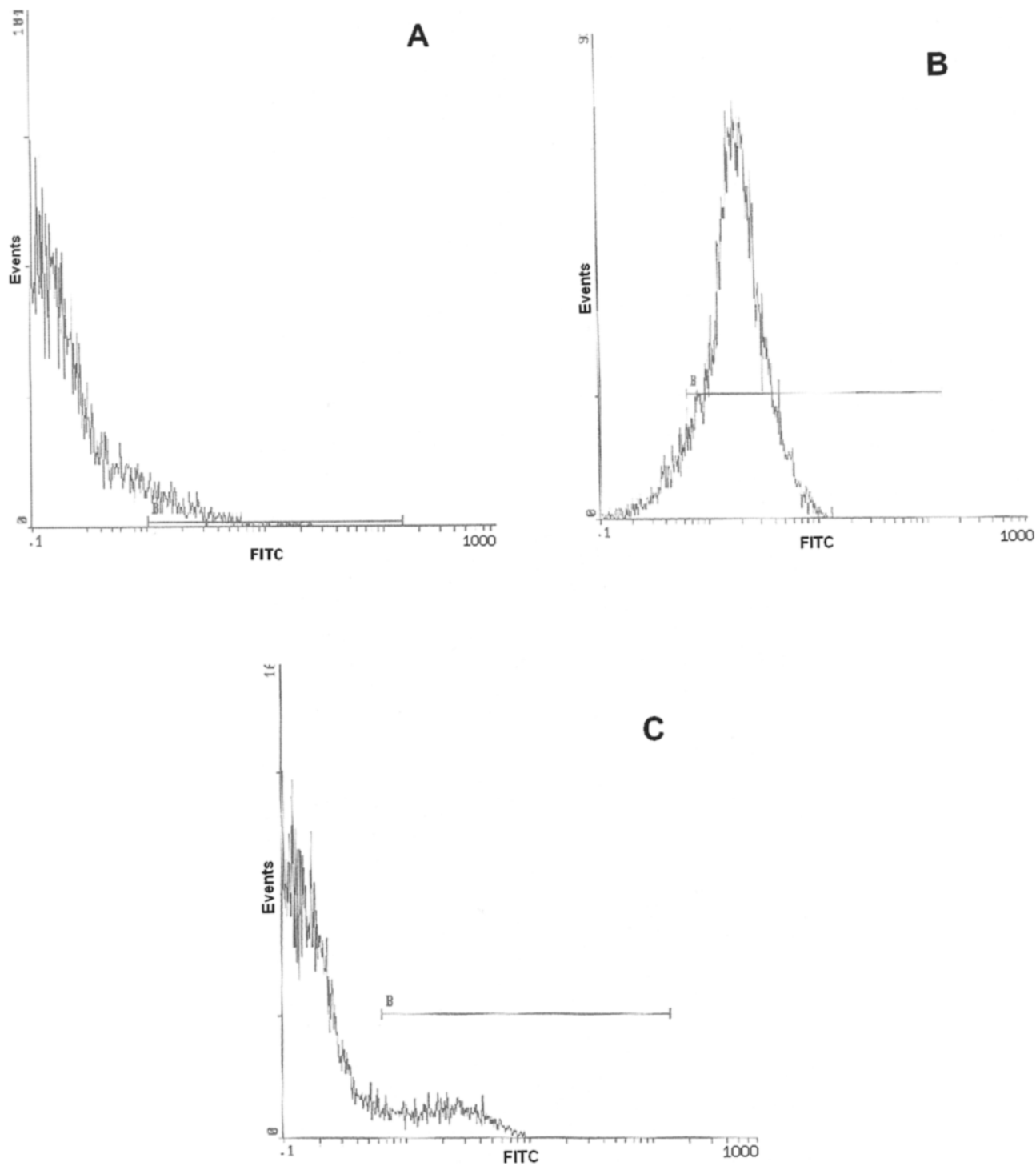
**Tableau 3 : Coefficients de corrélation obtenus (analyse par régression linéaire) entre le dommage oxydatif de l'ADN spermatique et les données du spermogramme chez les 15 patients infertiles.**

8-oxo-guanine	Coefficients de régression standardisés ( $\beta$ )	Signification p
Morphologie normale	0,11	0,65
Vitalité	-0,77	0,46
Mobilité	0,14	0,61
PNN	0,7	0,006

**Tableau 4 : Comparaison des valeurs moyennes des paramètres spermatiques et des taux moyens du dommage oxydatif entre les groupes 1 (PNN < 250 000/ml) et 2 (PNN  $\geq$  250 000/ml).**

	Groupe 1 (n=11) Moyenne $\pm$ DS	Groupe 2 (n=4) Moyenne $\pm$ DS
Volume (ml)	3,5 $\pm$ 1,2	3,4 $\pm$ 0,6
Mobilité totale (%)	43,6 $\pm$ 7,4	48,7 $\pm$ 4,7
a (%)	11,8 $\pm$ 6,4	18,7 $\pm$ 6,3 <sup>a</sup>
b (%)	27,7 $\pm$ 5,1	25,0 $\pm$ 4,0
Vitalité (%)	76,7 $\pm$ 9,3	78,7 $\pm$ 8,9
Numération (M/ml)	68,8 $\pm$ 44,0	91,0 $\pm$ 38,2
Cellules rondes (M/ml)	6,8 $\pm$ 9,4	7,6 $\pm$ 5,8
PNN (M/ml)	0,04 $\pm$ 0,3	0,91 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>
Morphologie normale (%)	9,8 $\pm$ 6,0	10,5 $\pm$ 4,6
Dommage oxydatif (%)	11,9 $\pm$ 4,2	19,1 $\pm$ 7,4 <sup>a</sup>

a : p<0,05, M : millions



**Figure 1 : Profils du marquage de la 8-oxo-guanine obtenus par cytométrie en flux chez les deux témoins et chez un patient.**

**A : profil du témoin négatif ayant un sperme normal et un taux de spermatozoïdes à ADN oxydé < 1% ;**

**B : profil du témoin positif (exposition in vitro à l' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) avec un taux de spermatozoïdes à ADN endommagé > 95% ;**

**C : profil d'un patient infertile avec un taux d'ADN endommagé = 25%.**

mort des cellules (somatiques et germinales). Une étude récente, a montré des corrélations entre l'oxydation de l'ADN, déterminée par marquage de la 8-oxo-guanine en cytométrie de flux, et les paramètres spermatiques (mobilité et concentration spermatiques) ainsi que le taux de fécondation et la qualité embryonnaire [27].

Dans notre étude, le test utilisé pour détecter l'oxydation de l'ADN n'était pas corrélé avec les paramètres spermatiques. Ces résultats corroborent ceux publiés par Oger et al. [29] ; ces auteurs n'ont pas trouvé de corrélation du taux de 8-oxo-guanine avec la numération ni avec le taux de fragmentation de l'ADN déterminé par SCSA. De plus, le taux de 8-oxo-guanine n'était pas associé avec la consommation de tabac, d'alcool ou de caféine [24].

Devant la faible relation de la 8-oxo-guanine avec les paramètres du sperme, ce test pourrait être un outil de diagnostic complémentaire dans l'évaluation de la fertilité masculine liée à un état de stress oxydatif. Selon Loft et al. [24], le taux de 8-oxo-guanine est un bio-marqueur de l'oxydation de l'ADN et des capacités fécondantes des spermatozoïdes.

Dans la littérature, certaines études, ayant utilisé des méthodes d'évaluation non spécifiques de la fragmentation de l'ADN, ont rapporté que les taux de spermatozoïdes avec ADN endommagé sont corrélés à l'infertilité et à la mauvaise qualité du sperme [23, 42]. Cependant, d'autres auteurs ont constaté que malgré les dommages portés par son ADN, le spermatozoïde est capable de féconder et d'activer un ovocyte ; les conséquences du dommage sont plus tardives au cours du développement embryonnaire avec un blocage au stade de 4 à 8 blastomères [2, 15]. Cette anomalie des spermatozoïdes peut provoquer des fausses couches spontanées [7]. En effet, un taux élevé de fragmentation de l'ADN a été rapporté dans les spermatozoïdes d'hommes dont les conjointes avaient un antécédent de fausses couches (inexpliquées) à répétition [7]. La capacité de l'ovocyte à pouvoir réparer l'ADN endommagé du spermatozoïde semble aussi être limitée, et fonction du degré de l'atteinte du génome.

Il semble donc que les dommages de l'ADN spermatique chez des hommes candidats pour l'ICSI pourraient être responsables d'un plus grand risque de transmission de défauts génétiques à la descendance.

Des recherches complémentaires s'avèrent nécessaires afin de déterminer la valeur prédictive des tests d'étude de l'intégrité de l'ADN spermatique dans les cas d'infertilité masculine.

Notre étude soulève un deuxième point important, celui de la leucospermie et de sa signification clinique. Nous avons, en effet, montré que le dommage oxydatif de l'ADN spermatique est significativement plus prononcé à partir de taux de leucocytes dans le sperme de 250 000/ml ; ce taux, largement inférieur au seuil de la leucospermie pathologique proposé par l'OMS qui est de 1 million /ml, soulève la question suivante : faut-il reconsidérer ce seuil standardisé de la leucospermie sachant que des taux de leucospermie inférieurs à 1 million/ml de sperme ont été associés à des infections génitales et à une altération des paramètres spermatiques [18,

31] ? Ces données semblent également indiquer que l'ADN est vulnérable à de faibles quantités de DAO, incitant ainsi la communauté scientifique à entreprendre de nouvelles études plus approfondies, visant à déterminer les valeurs seuils de DAO et de PNN pouvant avoir des conséquences sur les structures et les fonctions spermatiques.

## VIII. CONCLUSION

**Dans cette présente étude, nous avons montré l'intérêt du test d'étude de l'oxydation de l'ADN par révélation spécifique de la 8-oxo-guanine dans les spermatozoïdes par cytométrie en flux, ce produit d'oxydation constituant un puissant biomarqueur de l'effet du stress oxydant sur la qualité du sperme.**

**D'autres études analysant les corrélations des taux de l'oxydation de l'ADN avec le taux de grossesses obtenues naturellement et après FIV, ainsi qu'avec la qualité des embryons et le taux d'implantation et de fausses couches, doivent être conduites, afin de démontrer la valeur prédictive de ce test qui pourrait être considéré comme un outil complémentaire des techniques habituelles d'évaluation de l'intégrité de l'ADN spermatiques.**

**La plupart de ces techniques évaluent de façon globale les anomalies de la compaction de la chromatine, et de l'intégrité de l'ADN ; cependant, le test de l'oxydation de l'ADN fournit en plus de précieux renseignements sur la cause du dommage de l'ADN, et permet ainsi d'orienter le traitement prescrit dans le but d'améliorer l'intégrité de l'ADN spermatique.**

## REFERENCES

1. AGARWAL A., MAKKER K., SHARMA R. : Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility : an update. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2008, 1 : 2-11.
2. AHMADI A., NG S.C. : Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J. Exp. Zool.*, 1999, 4 : 696-704.
3. AITKEN R.J., BUCKINGHAM D.W., BRINDLE J., GOMEZ E., BAKER H.W., IRVINE D.S. : Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma. *Hum. Reprod.*, 1995, 8 : 2061-2071.
4. AOKI V.W., EMERY B.R., LIU L., CARRELL D.T. : Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *J. Androl.*, 2006, 6 : 890-898.
5. AUGER J., EUSTACHE F. : Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. *Andrologie*, 2000, 10 : 358-373.
6. BADOUARD C., MENEZO Y., PANTEIX G. et al. : Determination of new types of DNA lesions in human sperm. *Zygote*, 2008, 1 : 9-13.
7. CARRELL D.T., LIU L., PETERSON C.M. et al. : Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch. Androl.*, 2003, 1 : 49-55.
8. CHO C., JUNG-HA H., WILLIS W.D. et al. : Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biol. Reprod.*, 2003, 1 : 211-217.
9. DE LAMIRANDE E., O'FLAHERTY C. : Sperm activation : role of reactive oxygen species and kinases. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, 1 : 106-115.
10. DOMÍNGUEZ-FANDOS D., CAMEJO M.I., BALLESCÀ J.L., OLIVA R. : Human sperm DNA fragmentation : correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. *Cytometry A*, 2007, 12 : 1011-1018.

11. ERENPREISS J., HLEVICKA S., ZALKALNS J., ERENPREISA J. : Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity : a negative effect in abnormal semen samples. *J. Androl.*, 2002, 5 : 717-723.
12. ESTERHUIZEN A.D., FRANKEN D.R., LOURENS J.G., PRINSLOO E., VAN ROOYEN L.H. : Sperm chromatin packaging as an indicator of in-vitro fertilization rates. *Hum. Reprod.*, 2000, 3 : 657-661.
13. EVENSON D.P., DARZYNKIEWICZ Z., MELAMED M.R. : Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*, 1980, 210 : 1131-1133.
14. EVENSON D.P., JOST L.K., CORZETT M., BALHORN R. : Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever : a case study. *J. Androl.*, 2000, 5 : 739-746.
15. FATEHI A.N., BEVERS M.M., SCHOEVEERS E., ROELEN J., COLENBRANDER B., GADELLA B.M. : DNA damage in bovine sperm cells does not block fertilization but induces apoptosis after the first cleavages. *J. Androl.*, 2006, 2 : 176-188.
16. FRAGA C.G., MOTCHNIK P.A., WYROBEK A.J., REMPEL D.M., AMES B.N. : Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat. Res.*, 1996, 2 : 199-203.
17. FRANKEN D.R., FRANKEN C.J., DE LA GUERRE H., DE VILLIERS A. : Normal sperm morphology and chromatin packaging : comparison between aniline blue and chromomycin A3 staining. *Andrologia*, 1999, 6 : 361-366.
18. GDOURAR., KCHAOU W., AMMAR-KESKES L. et al. : Assessment of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis, and Mycoplasma genitalium in semen and first void urine specimens of asymptomatic male partners of infertile couples. *J. Androl.*, 2008, 2 : 198-206.
19. GOMEZ E., BUCKINGHAM D.W., BRINDLE J., LANZAFAME F., IRVINE D.S., AITKEN R.J. : Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa : correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J. Androl.*, 1996, 3 : 276-287.
20. GORCZYCA W., TRAGANOS F., JESIONOWSKA H., DARZYNKIEWICZ Z. : Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells : analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp. Cell Res.*, 1993, 1 : 202-205.
21. GUERIN J.F., BENCHAIËB M. : Assays for assessment of sperm DNA integrity: relationships with fertility and conceptus quality. *Gynecol. Obstet. Fertil.*, 2004, 9 : 799-802.
22. HALLIWELL B., ARUOMA O.I. : DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.*, 1991, 281 : 9-19.
23. IRVINE D.S., TWIGG J.P., GORDON E.L., FULTON N., MILNE P.A., AITKEN R.J. : DNA integrity in human spermatozoa : relationships with semen quality. *J. Androl.*, 2000, 1 : 33-44.
24. LOFT S., KOLD-JENSEN T., HJOLLUND N.H. et al. : Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy. *Hum. Reprod.*, 2003, 6 : 1265-1272.
25. MCKELVEY-MARTIN V.J., MELIAN., WALSH I.K. et al. : Two potential clinical applications of the alkaline single-cell gel electrophoresis assay : (1) Human bladder washings and transitional cell carcinoma of the bladder ; and (2) Human sperm and male infertility. *Mutat. Res.*, 1997, 2 : 93-104.
26. MCPHERSON S., LONGO F.J. : Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis : DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur. J. Histochem.*, 1993, 2 : 109-128.
27. MESEGUER M., MARTÍNEZ-CONEJERO J.A., O'CONNOR J.E., PELLICER A., REMOHÍ J., GARRIDO N. : The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program : a new model to study a male infertility prognostic factor. *Fertil. Steril.*, 2008, 5 : 1191-1199.
28. MOSKOVITSEV S.I., WILLIS J., WHITE J., MULLEN J.B. : Leukocytospermia : relationship to sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male factor infertility. *Fertil. Steril.*, 2007, 3 : 737-740.
29. OGER I., DA CRUZ C., PANTEIX G., MENEZO Y. : Evaluating human sperm DNA integrity : relationship between 8-hydroxydeoxyguanosine quantification and the sperm chromatin structure assay. *Zygote*, 2003, 4 : 367-371.
30. POTTS R.J., NEWBURY C.J., SMITH G., NOTARIANNI L.J., JEFFERIES T.M. : Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat. Res.*, 1999, 423 : 103-111.
31. PUNAB M., LÖIVUKENE K., KERMES K., MÄNDA.R. : The limit of leukocytospermia from the microbiological viewpoint. *Andrologia*, 2003, 5 : 271-278.
32. RUBES J., SELEVAN S.G., EVENSON D.P. et al. : Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum. Reprod.*, 2005, 10 : 2776-2783.
33. SAKKAS D., SELI E., BIZZARO D., TAROZZI N., MANICARDI G.C. : Abnormal spermatozoa in the ejaculate : abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reprod. Biomed. Online*, 2003, 4 : 428-432.
34. SALEH R.A., AGARWALA., SHARMA R.K., SAID T.M., SIKKA S.C., THOMAS A.J. : Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil. Steril.*, 2003, 6 : 1431-1436.
35. SÁNCHEZ-PEÑA L.C., REYES B.E., LÓPEZ-CARRILLO L. et al. : Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2004, 1 : 108-113.
36. SHEN H., ONG C. : Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, 4 : 529-536.
37. SINGH N.P., MCCOY M.T., TICE R.R., SCHNEIDER E.L. : A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 1988, 1 : 184-191.
38. SPANÒ M., BONDE J.P., HJOLLUND H.I., KOLSTAD H.A., CORDELLI E., LETER G. : Sperm chromatin damage impairs human fertility : The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil. Steril.*, 2000, 1 : 43-50.
39. WILLIAMS A.C., FORD W.C. : Relationship between reactive oxygen species production and lipid peroxidation in human sperm suspensions and their association with sperm function. *Fertil. Steril.*, 2005, 4 : 929-936.
40. WORLD HEALTH ORGANIZATION : Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction. Cambridge, Cambridge University Press, 9th ed., 1999.
41. ZHANG X., SAN GABRIEL M., ZINI A. : Sperm nuclear histone to protamine ratio in fertile and infertile men: evidence of heterogeneous subpopulations of spermatozoa in the ejaculate. *J. Androl.*, 2006, 3 : 414-420.
42. ZINI A., BIELECKI R., PHANG D., ZENZES M.T. : Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil. Steril.*, 2001, 4 : 674-677.
43. ZINI A., BLUMENFELD A., LIBMAN J., WILLIS J. : Beneficial effect of microsurgical varicocelectomy on human sperm DNA integrity. *Hum. Reprod.*, 2005, 4 : 1018-1021.
44. ZINI A., DEFREITAS G., FREEMAN M., HECHTER S., JARVI K. : Varicocele is associated with abnormal retention of cytoplasmic droplets by human spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 2000, 3 : 461-464.
45. ZINI A., FISCHER M.A., SHARIR S., SHAYEGAN B., PHANG D., JARVI K. : Prevalence of abnormal sperm DNA denaturation in fertile and infertile men. *Urology*, 2002, 6 : 1069-1072.
46. ZINI A., LIBMAN J. : Sperm DNA damage : clinical significance in the era of assisted reproduction. *C.M.A.J.*, 2006, 5 : 495-500.



## ABSTRACT

### Detection of oxidative DNA damage by flow cytometry and its association with male infertility

Nozha CHAKROUN FEKI, Nassira ZRIBI, Henda ELEUCH, Radouane GDOURA, Afifa SELLAMI, Ali BAHLOUL, Adnene HAMMAMI, Jalel GARGOURI, Tarek REBAI, Leila KESKES AMMAR

Oxidative stress in semen is essentially due to excessive production of oxygen-reactive species (ORS) essentially derived from leukocytes. DNA oxidation is due to the direct action of ORS which produce several adducts the most extensively studied of which is 8-oxo-guanine. Integrity of DNA is essential for the fertility of sperm and is an important subject of research for scientists and clinicians all over the world. Although evaluation of the global integrity of sperm DNA has considerably developed over recent years, few tests are available to document oxidative DNA damage.

This study was designed to review the various tests of sperm DNA integrity commonly used in the literature and to present the results of our study on DNA oxidation with 8-oxo-guanine labelling by flow cytometry in infertile men.

This study was based on 15 semen samples that were submitted to sperm analysis according to WHO guidelines, with determination of the leukocyte concentration by a cytochemical method revealing peroxidase in cytoplasmic granulations. The DNA oxidation study was performed with 8-oxo-guanine labelling by flow cytometry.

Linear regression analysis showed a strong correlation between DNA oxidation and leukocyte count in the semen ( $p = 0.006$ ,  $r = 0.7$ ). A leukocyte cut-off of 250,000/ml of semen was associated with a significant increase of DNA oxidation ( $p = 0.03$ ).

8-oxo-guanine can therefore be considered to be a biological marker of the direct action of oxidative stress on sperm DNA which appears to be susceptible to relatively low levels of ORS produced by leukocytes present at concentrations well below the limit of leukospermia defined by WHO.

**Key words :** DNA oxidative damage, leukocyte, 8-oxo-guanine, sperm, oxidative stress, infertility