

Polymorphisme du gène du récepteur des androgènes : recherche de mosaïques tissulaires et relation avec l'infertilité masculine

C. RAVEL¹, J.P. SIFFROI^{1,3}, M. NEVES², E. VENDRELY¹, J.P. DADOUNE¹

¹Service d'Histologie-Biologie de la Reproduction-Cytogénétique, Hôpital Tenon, Paris ;

²Laboratoire de Génétique Moléculaire, Hôpital Tenon, Paris ;

³EA 1533 « Génétique de la Reproduction Humaine ».

RESUME

Les androgènes sont des hormones stéroïdes mâles nécessaires à l'établissement et au maintien de la spermatogenèse. Ils agissent par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. Le récepteur des androgènes comporte un domaine N-terminal de transactivation qui a la particularité de présenter un polymorphisme de répétition de triplets CAG codant pour des polyglutamines. Cette région est impliquée dans la maladie de Kennedy, maladie neurodégénérative avec infertilité et défaut de masculinisation. Certaines études récentes ont montré une corrélation entre le nombre de CAG et la fertilité masculine, corrélation qui n'a pas été retrouvée par d'autres équipes. Le but de ce travail a été de préciser si une mosaïque tissulaire entre le sang et le sperme, décrite dans de nombreuses maladies à répétition de triplets, pouvait être retrouvée chez des hommes infertiles et être responsable des discordances observées dans la littérature quant à la relation infertilité - nombre de triplets. La longueur des répétitions CAG des cellules sanguines et germinales (éjaculat, biopsies) a été mesurée chez 36 patients oligo ou azoospermiques et 15 témoins. Une corrélation entre l'augmentation de la taille des répétitions de triplets CAG dans l'exon 1 du gène du récepteur des androgènes et une diminution du nombre total de spermatozoïdes produits par éjaculat a été retrouvée, mais aucune mosaïque tissulaire entre sang et sperme n'a pu être mise en évidence dans la population étudiée.

Mots clés : répétitions de triplets CAG, récepteur des androgènes, infertilité masculine idiopathique.

I. INTRODUCTION

Les androgènes agissent par l'intermédiaire d'un récepteur localisé dans le cytoplasme des cellules cibles. Le récepteur des androgènes (RA) n'a jusqu'à présent pas été retrouvé dans les cellules germinales malgré des études immunohistochimiques très sensibles. Il a été localisé au niveau testiculaire dans les cellules de Leydig, les cellules péricubulaires et dans les cellules de Sertoli mais également au niveau des cellules de l'épididyme, des canaux déférents et des vésicules séminales [17]. Ce récepteur appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires qui comprend notamment les récepteurs des hormones stéroïdes (gluco et minéralocorticoïdes, oestrogènes et progestérone) ainsi que les récepteurs des hormones thyroïdiennes et de l'acide rétinoïque [11]. Sa structure est semblable à celle des autres récepteurs nucléaires et comporte un domaine N-terminal d'activation de la transcription, un domaine central de liaison à l'ADN très conservé au sein de la superfamille des récepteurs stéroïdiens, un domaine de signalisation nucléaire et enfin un domaine C-terminal responsable de la liaison à l'hormone [14].

Le gène du RA est localisé sur le bras long du chromosome X en Xq11-q12. Il s'étend sur environ 90 kb et comporte 8 exons. Plus de 300 mutations ponctuelles ont été décrites sur ce récepteur [8] entraînant le plus souvent un syndrome d'insensibilité aux androgènes ; elles sont responsables d'environ la moitié des cas de pseudohermaphrodisme masculin [15].

Correspondance :

Dr C. Ravel, Service d'Histologie-Biologie de la Reproduction-Cytogénétique, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine, 75020 PARIS. Prix de DEA, XVIII^e Congrès de la Société d'Andrologie de Langue Française, Montpellier, 13-15 décembre 2001.

1. Patients

Les sujets recrutés pour cette étude ont été au nombre de 51, répartis en 19 patients oligozoospermiques modérés, 17 patients oligozoospermiques sévères ou azoospermiques et 15 témoins normospermiques (Tableau 1). Patients et témoins ont été informés du contenu de l'étude et ont signé un consentement éclairé. Les patients ont été recrutés lors d'une consultation pour infertilité masculine. Le critère d'inclusion a été l'existence d'une oligozoospermie inférieure à 20 millions de spermatozoïdes par ml d'origine idiopathique. Les témoins ont été recrutés parmi les couples consultant pour infertilité féminine. Le critère d'inclusion a été la constatation d'une normospermie, c'est à dire plus de 20 millions de spermatozoïdes par ml.

2. Recueil des échantillons biologiques

Un prélèvement de lymphocytes sanguins a été réalisé par ponction veineuse recueillie sur un tube EDTA (5 ml). Un spermogramme a été réalisé selon les indications de l'OMS après une abstinence sexuelle de 3 à 5 jours. L'oligospermie ou l'azoospermie a été confirmée par deux spermogrammes pratiqués à trois mois d'intervalle (l'azoospermie étant définie par l'absence de spermatozoïdes après centrifugation de l'échantillon de sperme). De façon à ne traiter que des cellules germinales, les spermatozoïdes ont été récupérés sur gradient de Percoll™ (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden), ce qui a permis leur séparation en fonction de leur densité.

Un prélèvement de cellules testiculaires a été réalisé chez 8 patients azoospermiques ou oligozoospermiques extrêmes. Le fragment de biopsie testiculaire a été dilacéré puis lavé dans du PBS. Les spermatozoïdes récupérés de cette manière ont été ensuite congelés pour une utilisation ultérieure en ICSI. Par contre, une suspension de cellules testiculaires composée de cellules germinales immatures et de cellules somatiques a pu être utilisée pour notre étude.

Une extraction d'ADN a été réalisée sur les trois types cellulaires : cellules sanguines, spermatozoïdes et cellules testiculaires. L'ADN génomique a ensuite été amplifié par PCR avec des amorces flanquant la région du polymorphisme

Le gène du RA contient une séquence polymorphe de triplets CAG codant pour des polyglutamines au niveau du premier exon. Dans la population normale, le nombre de triplets CAG varie entre 11 et 38. Une expansion de plus de 40 répétitions entraîne une maladie de Kennedy ou atrophie musculaire spino-bulbaire récessive liée à l'X. Cette maladie, liée à la neurodégénérescence des motoneurones, associe une faiblesse musculaire proximale qui apparaît progressivement chez l'homme entre 30 et 40 ans, une oligo ou azoospermie, un défaut de masculinisation, une atrophie testiculaire et une fertilité réduite [10]. D'autres maladies sont dues à une expansion de triplets différents des CAG comme par exemple le syndrome de l'X fragile (CCG), l'ataxie de Friedreich (GAA) ou encore la dystrophie myotonique de Steinert (CTG) [1]. La caractéristique commune de toutes ces maladies est la présence d'expansions de triplets et l'instabilité de ces séquences qui peut être mitotique et méiotique. C'est cette instabilité méiotique, le plus souvent croissante lors de la transmission de la mutation d'une génération à la suivante, qui est à l'origine du phénomène d'anticipation avec sévérité plus marquée et apparition plus précoce des signes de la maladie dans la descendance. A l'inverse, une contraction de la répétition CAG dans le gène du RA est épidémiologiquement associée à une augmentation du risque de cancer de la prostate qui est une tumeur androgéno-dépendante [6].

Des études récentes ont évoqué une association entre l'infertilité masculine idiopathique et l'expansion du nombre de triplets CAG [3, 12, 19]. Néanmoins cette hypothèse a été infirmée par d'autres travaux [2, 7, 9, 16]. Une des raisons de la discordance entre ces travaux, outre des différences possibles dans le mode de recrutement des patients, pourrait être l'existence d'une mosaïque tissulaire dans le nombre des répétitions CAG entre les cellules somatiques sur lesquelles tous les auteurs ont réalisé leurs études, et les cellules germinales. Le but de ce travail a donc été de préciser la corrélation entre infertilité masculine et longueur des triplets CAG d'une part, et de rechercher une éventuelle mosaïque germinale d'autre part en comparant la taille de la zone d'expression CAG entre les cellules somatiques et germinales (spermatozoïdes ou cellules testiculaires).

Tableau 1 : Numération des spermatozoïdes dans les populations étudiées

	Age moyen	Spermatozoïdes/ml	Numération /éjaculat
Témoins	37 ans (28-51)	129x10 ⁶	352,9x10 ⁶
Oligozoospermies modérées	37 ans (27-48)	6,1x10 ⁶	17,2x10 ⁶
Oligozoospermies extrêmes et azoospermies	32 ans (20-46)	0,16x10 ⁶	0,28x10 ⁶

me CAG de l'exon 1 [10]. La taille des échantillons est mesurée par un séquenceur (ABI PRISM, 310 Applied BioSystems Perkin Elmer Norwalk, CT, USA) par une électrophorèse capillaire avec des échantillons couplés à un fluorochrome. La taille du produit d'amplification PCR a été déterminée par référence à un marqueur de taille standard interne (TAMRA GeneScan, 500 PE Applied Biosystems). Les données ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel ABI PRISM GeneScan, Analysis. Pour confirmer la spécificité de la région amplifiée, six échantillons avaient été auparavant entièrement séquencés.

3. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Stat View software (Abacus Concepts, Berkeley, Calif). Les différences entre les groupes de sujets ont été évaluées par le test U de Mann et Whitney. Le coefficient de corrélation sur les rangs de Spearman a été utilisé pour les analyses de régression. L'analyse de variance a été réalisée à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

1. Analyse de la longueur des triplets CAG dans le sang.

L'analyse des répétitions CAG a montré une longueur moyenne de 18,9 triplets chez l'ensemble des 36 patients infertiles, avec une moyenne de 18,2 triplets chez les patients présentant une oligozoospermie modérée et de 19,8 triplets chez les patients oligozoospermiques sévères ou azoospermiques. Dans la population témoin, la moyenne de longueur des CAG a été de 18,3 triplets. La comparaison statistique de ces moyennes, à l'aide du test de Mann et Whitney, n'a pas retrouvé de différence significative entre le nombre de triplets chez les patients infertiles, pris dans leur ensemble, et les témoins ($p = 0,37$). Lorsque la comparaison porte sur les moyennes des sujets présentant une oligozoospermie extrême ou une azoospermie par rapport à celle des témoins, la différence n'est pas non plus significative ($p = 0,18$).

L'appréciation de l'atteinte de la spermatogenèse, mesurée par la concentration de spermatozoïdes par ml, étant relative, nous avons cherché à retrouver d'éventuelles différences statistiques entre nos différentes populations en travaillant sur le nombre total de spermatozoïdes par éjaculat. En effet, la majeure partie du volume d'un éjaculat est originaire des vésicules séminales et de la prostate, deux organes androgéno-dépendants dont le fonctionnement pourrait également être altéré par des anomalies du récepteur des androgènes. Il se peut donc que, chez certains patients, la prise en compte uniquement de la concentration en spermatozoïdes aboutisse à une surestimation de la production réelle de spermatozoïdes en raison d'un volume réduit de l'éjaculat. Sur le nombre relativement faible de

sujets étudiés, en réalisant un test de corrélation sur les rangs de Spearman, il n'existe pas de relation entre le nombre de triplets et le volume de l'éjaculat ($p = 0,09$). Par contre, en utilisant ce dernier test sur la totalité des 51 sujets inclus, une corrélation négative significative a pu être établie entre le nombre total de spermatozoïdes produits par éjaculat et la longueur des répétitions de CAG ($p=0,048$).

La corrélation entre le nombre de triplets CAG dans le gène du récepteur des androgènes et l'infertilité masculine a été initialement suggérée par Tut [19] pour qui les patients ayant de longues séquences polyglutamines dans leur récepteur aux androgènes avaient un risque accru d'altération de leur spermatogenèse. Cet auteur estimait que les patients présentant 28 triplets CAG ou plus avaient un risque 4 fois plus élevé d'infertilité masculine que les témoins. D'autres études sont venues ensuite confirmer ces données [3, 12, 13, 21]. Néanmoins, d'autres travaux n'ont pas retrouvé une telle corrélation [2, 7, 11, 16], les auteurs mettant en avant des différences interethniques dans la longueur des répétitions de triplets. En effet, il est établi aujourd'hui que les Africains d'Amérique ont des répétitions de triplets CAG (18 triplets en moyenne) plus courtes que les Blancs américains (21 triplets en moyenne) ou les Asiatiques (22 triplets en moyenne) [4]. Dans notre étude, la longueur moyenne des triplets CAG est inférieure à celle retrouvée dans la littérature ce qui peut s'expliquer par le fait que près de la moitié des patients inclus (24/51) sont d'origine africaine alors que seulement 25 patients sont d'origine européenne et 2 d'origine asiatique. De plus, en raisonnant non plus en fonction du critère de fertilité mais en fonction des chiffres du spermogramme, Von Eckardstein [20] a montré que la longueur des répétitions de triplets était corrélée à ce deuxième critère plutôt qu'au premier, plus général et donc moins discriminant. D'autre part, la variabilité du spermogramme est plus importante chez les sujets avec faible nombre de CAG que chez ceux à fort nombre de répétitions [20]. Nos propres résultats confirment cette tendance à l'augmentation du nombre de répétitions de triplets chez les sujets ayant les valeurs les plus basses du spermogramme. En effet, bien que les moyennes dans le nombre de CAG ne soient pas significativement différentes entre nos deux populations, différenciées par les concentrations en spermatozoïdes, la longueur des répétitions peut cependant être inversement corrélée au nombre absolu de spermatozoïdes par éjaculat. Nos résultats montrent que ce dernier critère est celui à prendre en compte dans ce genre d'études. Avec une valeur du p limite à 0,09, nous n'avons cependant pas pu retrouver de corrélation entre le nombre de CAG et le volume de l'éjaculat mais, sur une population plus importante, une telle relation pourrait apparaître, tout du moins pour les valeurs hautes du nombre des répétitions de triplets.

Tableau 2 : Distribution des répétitions CAG chez les différents groupes de population étudiés.

	Nb patients	Nb CAG dans le sang	Nb CAG dans le sperme	Ecart-type	Valeurs extrêmes
Témoins	15	18.3	18.3	2.44	16 – 25
Oligozoospermies modérées	19	18.2	18.2	1.782	15 – 21
Oligozoospermies extrêmes et azoospermies	17	19.8	19.8	3.486	15 - 28

2. Recherche de mosaïques tissulaires.

La comparaison des longueurs de répétition des triplets CAG entre les cellules extraites à partir du sang circulant et les spermatozoïdes n'a montré aucune différence de taille (Tableau 2), concluant ainsi à l'absence de mosaïque tissulaire pour ce polymorphisme dans le gène du récepteur aux androgènes, tout du moins dans la population étudiée. Le coefficient de corrélation de Pearson est de 0,997 avec $p < 0,0001$.

Devant l'absence de corrélation nette, dans la littérature, entre la longueur des répétitions de CAG et la fertilité, la recherche d'une éventuelle mosaïque tissulaire pour la taille de ces répétitions, notamment dans la lignée germinale, a été motivée par les données concernant les maladies génétiques à expansion de triplets en général. En effet, concernant le gène du récepteur des androgènes, La Spada [10] a mis en évidence une instabilité méiotique chez les patients atteints de maladie de Kennedy, instabilité plus importante chez les hommes que chez les femmes. Celle-ci reste toutefois modérée, de l'ordre de 1 à 3 triplets en moyenne [22], en comparaison avec l'instabilité méiotique et même somatique observée dans d'autres maladies à expansion de triplets et surtout dans celles impliquant des répétitions de CGG comme l'X fragile. Cependant, même dans les répétitions de CAG, une mosaïque tissulaire peut être observée comme, par exemple, dans le gène de la chorée de Huntington où des différences de taille de répétitions entre le sang et le sperme ont été décrites [5, 18]. Cette mosaïque entraînerait un effet amplificateur pour les générations suivantes, à l'origine du phénomène d'anticipation. Dans notre étude, aucune mosaïque entre sperme et sang n'a été retrouvée, ni chez les patients, ni chez les témoins. En particulier, les cellules testiculaires composées à la fois de cellules somatiques et germinales étudiées chez 8 patients ne montrent aucune différence. Cependant, il se pourrait qu'une telle instabilité méiotique n'apparaisse que dans des gènes présentant un nombre de triplets CAG suffisamment important, comme c'est le cas dans d'autres maladies à expansion de triplets. Sans expliquer les discordances entre les différentes études, la mise en évidence de mosaïques tissulaires permettrait de mieux évaluer le risque de transmission de maladie de Kennedy chez les hommes infertiles traités par ICSI.

IV. CONCLUSION

Bien que réalisée sur un faible nombre de patients, notre étude a permis de mettre en évidence une corrélation entre l'augmentation de la taille des répétitions de triplets CAG dans l'exon 1 du gène du récepteur des androgènes et une diminution du nombre total de spermatozoïdes produits par éjaculat. Par contre, aucune mosaïque tissulaire pour le nombre de ces répétitions n'a pu être constatée entre les cellules sanguines et testiculaires.

Cette étude sera poursuivie de façon à augmenter le nombre de patients et à permettre d'analyser des sujets dont le nombre de triplets dépasse un seuil critique au delà duquel l'instabilité des répétitions est beaucoup plus probable. Chez les patients azoospermiques à qui une biopsie testiculaire sera proposée, des techniques de séparation cellulaire seront réalisées pour isoler les différents types de cellules testiculaires (cellules germinales, cellules de Sertoli, cellules de Leydig) et affiner ainsi la comparaison avec les cellules somatiques.

Les conséquences attendues sont une meilleure connaissance du rôle du récepteur des androgènes dans la spermatogénèse et la possibilité d'offrir aux patients un conseil génétique plus précis quant au risque de transmettre une maladie neurodégénérative à la descendance à travers la pratique de l'ICSI.

Remerciements. Nous remercions le Pr Florent SOUBRIER pour son soutien logistique ainsi que le Dr A. FLAHAULT pour l'aide précieuse qu'il nous a apportées lors des analyses statistiques.

REFERENCES

1. CHOONG C.S., WILSON E.M. : Trinucleotide repeats in the human androgen receptor : a molecular basis for disease. *J. Mol. Endocrinol.*, 1998, 21 : 235-257.
2. DADZE S., WIELAND C., JAKUBICZKA S. et al. : The size of the CAG repeat in exon 1 of the androgen receptor gene shows no significant relationship to impaired spermatogenesis in an infertile caucasoid sample of german origin. *Mol. Hum. Reprod.*, 2000, 6 : 207-214.
3. DOWSING A.T., YONG E.L., CLARK M. et al. : Linkage between male infertility and trinucleotide repeat expansion in the androgen-receptor gene. *Lancet*, 1999, 21 : 354 (9179) : 640-643.

4. EDWARDS A., HAMMOND H.A., JIN L. et al. : Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics*, 1992, 12 : 241-253.
5. GIOVANNONE B., SABBADINI G., DI MAIO L. et al. : Analysis of (CAG)_n size heterogeneity in somatic and sperm cell DNA from intermediate and expanded Huntington disease gene carriers. *Hum. Mutat.*, 1997, 10 : 458-464.
6. GIOVANNUCCI E., STAMPFER M.J., KRITHIVAS K. et al. : The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997, 94 : 3320-3332.
7. GIWERCMAN Y.L., XU C., ARVER S. et al. : No association between the androgen receptor gene CAG repeat and impaired sperm production in swedish men. *Clin. Genet.*, 1998, 54 : 435-436.
8. GOTTLIEB B., LEHVASLAIHO H., BEITEL L.K. et al. : The androgen receptor gene mutations database. *Nucleic Acids Res.*, 1998, 26 : 234-238.
9. HIORT O., HOLTERHUS P.M., HORTER T. et al. : Significance of mutations in the androgen receptor gene in males with idiopathic infertility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000, 85 : 2810-2815.
10. LA SPADA A.R., WILSON E.M., LUBAHN D.B. et al. : Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature*, 1991, 352 : 77-79.
11. LUBAHN D.B., JOSEPH D.R., SULLIVAN P.M. et al. : Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localisation to the X chromosome. *Science*, 1988, 240 : 327-330.
12. MIFSUD A., SIM C., BOETTGER-TONG H. et al. : Trinucleotide (CAG) repeat polymorphisms in the androgen receptor gene : molecular markers of risk for male infertility. *Fertil. Steril.*, 2001, 75 : 275-281.
13. PATRIZIO P., LEONARD D.G., CHEN K.L. et al. : Larger trinucleotide repeat size in the androgen receptor gene of infertile men with extremely severe oligozoospermia. *J. Androl.*, 2001, 22 : 444-448.
14. POUJOL N., SULTAN C. : Action moléculaire des androgènes et relation structure-fonction du récepteur des androgènes. *Médecine/Sciences*, 2000, 16 : 793-802.
15. QUIGLEY C.A., DE BELLIS A., MARSCHKE K.B. et al. : Androgen receptor defects : historical, clinical and molecular perspectives. *Endocrine Reviews*, 1995, 16 : 271-321.
16. RAJPERT-DE MEYTS E., LEFFERS H., PETERSEN J.H. et al. : CAG repeat length in androgen-receptor gene and reproductive variables in fertile and infertile men. *Lancet*, 2002, 359 (9300): 44-46.
17. SUAREZ QUIAN C.A., MARTINEZ-GARCIA F., NISTAL M. et al. : Androgen receptor distribution in adult human. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1999, 84 : 350-358.
18. TELENUS H., KREMER B., GOLDBERG Y.P. et al. : Somatic and gonadal mosaicism of the Huntington disease gene CAG repeat in brain and sperm. *Nat. Genet.*, 1994, 6 : 409-414.
19. TUT T.G., GHADESSY F.J., TRIFIRO M.A. et al. : Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced transactivation, impaired sperm production and male infertility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1997, 82 : 3777-3782.
20. VON ECKARDSTEIN S., SYSKA A., GROMOLL J. et al. : Inverse correlation between sperm concentration and number of androgen receptor CAG repeats in normal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001, 86 : 2585-2590.
21. YOSHIDA K.I., YANO M., CHIBA K. et al. : CAG repeat length in the androgen receptor gene is enhanced in patients with idiopathic azoospermia. *Urology*, 1999, 54 : 1078-1081.
22. ZHANG L., FISCHBECK K.H., ARNHEIM N. CAG repeat length variation in sperm from a patient with Kennedy's disease. *Hum. Mol. Genet.*, 1995, 4 : 303-305.

ABSTRACT

Androgen receptor gene polymorphism: search for tissue mosaicism and relation with male infertility.

C. RAVEL , J.P. SIFFROI , M. NEVES , E. VENDRELY, J.P. DADOUNE

Androgens are male steroid hormones necessary for initiation and maintenance of spermatogenesis. They act via a specific receptor which belongs to the nuclear receptor superfamily. The transactivation N-terminal domain of this receptor is characterized by a CAG repeat polymorphism in the first exon of the gene coding for polyglutamines. An increased CAG repeat length is involved in Kennedy's disease, a neurodegenerative disease associated with infertility and impaired virilization. Some recent studies have shown a correlation between the number of CAG repeats and male fertility. The aim of this study was to define this correlation and to determine whether or not infertile men presented a tissue mosaicism between blood and sperm, as described in several diseases involving CAG repeats. The length of CAG repeats of blood and testicular cells was measured in 36 oligospermic or azospermic patients and 15 controls. An inverse correlation was found between CAG repeat length and total number of ejaculated spermatozoa. However, no tissue mosaicism between blood and sperm was observed in our population.

Key words: *CAG repeat, androgen receptor, idiopathic male infertility.*