

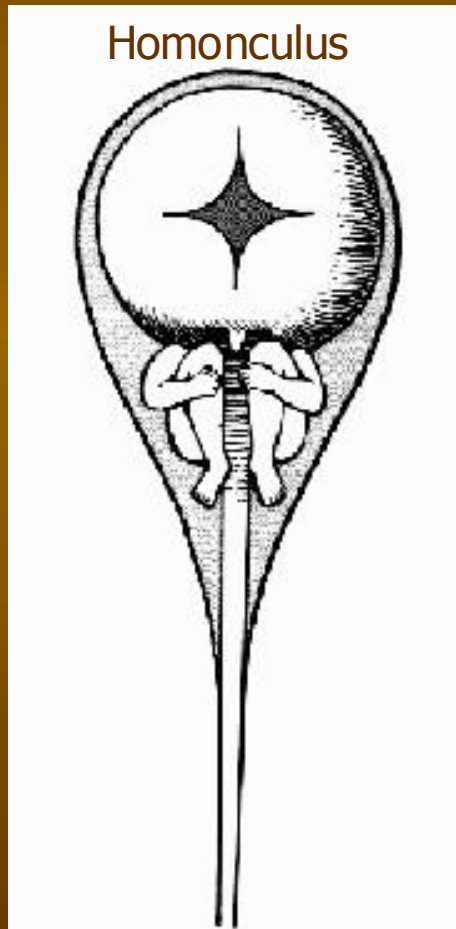
Spermiologie et FCSR

Dr Martine ALBERT

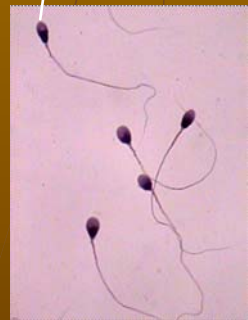
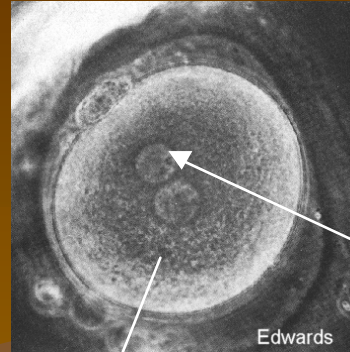
Service de Biologie de la Reproduction, AMP,
Cytogénétique et Génétique Médicale
CHIPS - Poissy

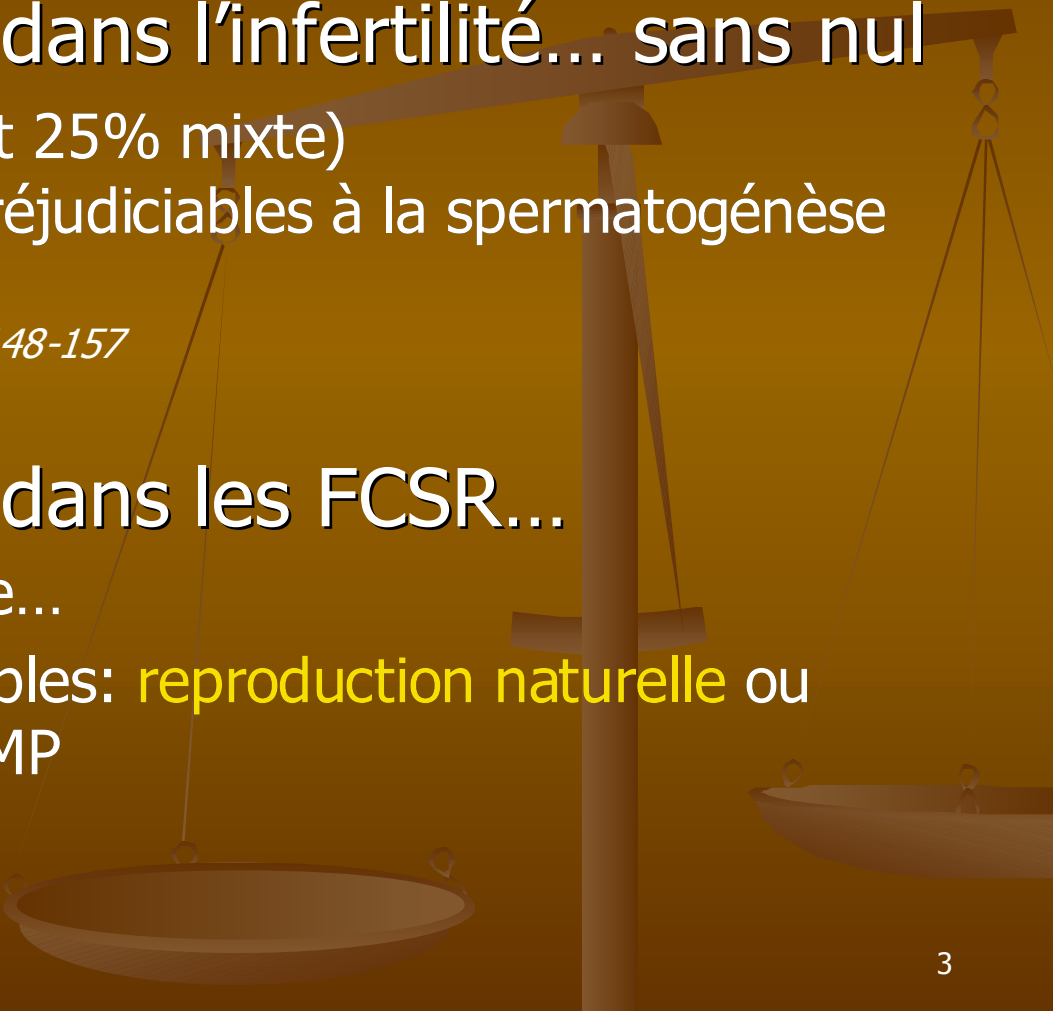
Introduction

« la part du père? »



Hartsoeker 1694



- 
- La part du père dans l'infertilité... sans nul doute (21% isolé et 25% mixte)
nombreux facteurs préjudiciables à la spermatogénèse

Fellous 2003 , Andrologie (13) 148-157

- La part du père dans les FCSR...
beaucoup plus subtile...
deux contextes possibles: **reproduction naturelle** ou
prise en charge en AMP

Facteurs masculins et FCSR...

- Habitus de vie et ATCD
- Age paternel
- Caryotype constitutionnel
- Paramètres spermatiques conventionnels
- Fragmentation de l'ADN spermatique
- Hybridation in situ sur spermatozoïdes
- Morphologie fine des spermatozoïdes
- ???

Habitus de vie, ATCD et FCSR

■ Toxiques professionnels et environnementaux Effets / fertilité + ... / FCS?

- Pesticides en général
- Plomb, Mercure
- Hydrocarbures

■ Tabac et autres addictions

Chez l'homme, plutôt sur la fertilité

■ Chimiothérapie et radiothérapie (abdominale)

Augmentation des anomalies chromosomiques de nombre et de structure

A distance: grande variabilité de « RAS » à persistance à distance?

Effet mutagène : resterait précoce et sur cellules différenciées; risque résiduel faible

→ pas d'augmentation des FCS



Savitz 1994, Am J Ind Med (25) 361-383

Hruska 2000,

Massaad 2002,

CRAT 2006

Age paternel et FCSR?



Si oui...

- A quel âge? (spermatogenèse complète)
- Par quel mécanisme?
- Quelles conséquences?

Effet âge

Le nombre de division avant la production de l'ovocyte

Adapté d'après Human Molecular Genetics

FEMME	Nombre de cellules	Nombre de divisions
5 mois gestation	$6,8 \times 10^6 = 2^{22}$	22
puberté		2
Total		24

	Nombre de cellules	nombre de divisions cellulaires
15	$1,2 \times 10^9$	30
16 jours		1
16 jours		1
9 jours		1
9 jours		1
19 jours		1
21 jours		spermiogenèse
Total de divisions		$30 + 5 + 23n$ ($n = \text{Age} - 15$)

Le nombre de divisions avant la production du spermatozoïde

Division tous les 16 jours soit de l'ordre de 23/an

Un spermatozoïde d'un homme de

<u>25 ans</u>	265 divisions (réplications)
<u>40 ans</u>	610 divisions
<u>60 ans</u>	1070 divisions
<u>95 ans</u>	1875 divisions

Age du père...

- Risque augmenté de **trisomie 21** avec âge paternel
- Augmentation du nombre de **gonosomes** sexuels
- Anomalies de **structure** des chromosomes
- Augmentation de **mutations syndromes AD**

> 40 ans?

> 55 ans?

Bordson 1991, Fertil Steril (56) 397-401

Thepot 1996, Human Reprod (11) 2319-2323

Robbins 1996, Reprod Fertil Dev (7) 799-809

Martin 1987, Am J Hum Genet (41) 484-489

De La Rochebrochard 2005 Rev Epidemiol Sante Publique (53) 47-55.

Anomalies du caryotype constitutionnel et FCSR



Fréquence dans la population générale: 0,7%

Fréquence dans la population infertile: 2 à 20%

Retief, Van Zyl et al. 1984; Bourrouillou, Dastugue et al. 1985; Hens, Bonduelle et al. 1988, etc...

Comment une anomalie chromosomique peut-elle perturber la spermatogénèse?

Quel est le risque pour les conceptions?

Anomalie chromosomique

Anomalie de structure portée par le père (translocation robertsonienne ou translocation réciproque)

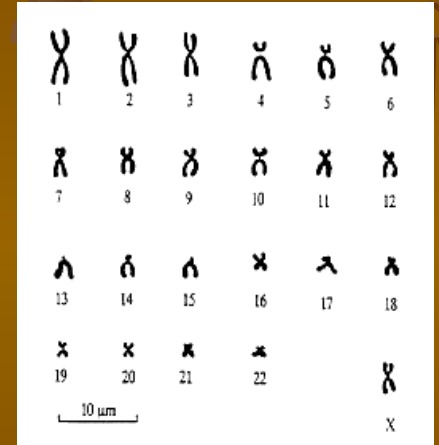
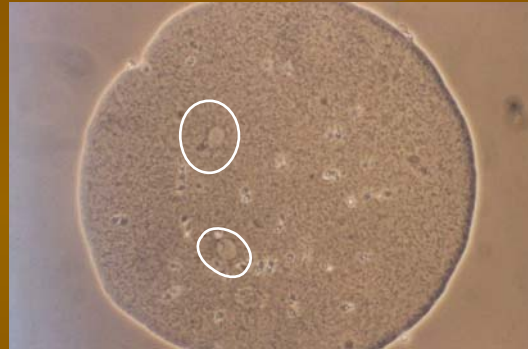
- Retentissement **variable** sur la **spermatogénèse** (et la fertilité), variable d'une anomalie à l'autre et d'un individu à l'autre pour une même anomalie
- Risque de **malségrégation méiotique** des chromosomes concernés et risque interchromosomique

→ **nécessité d'évaluer les modes de ségrégation sur spermatozoïdes en distinguant les gamètes équilibrés ou déséquilibrés**

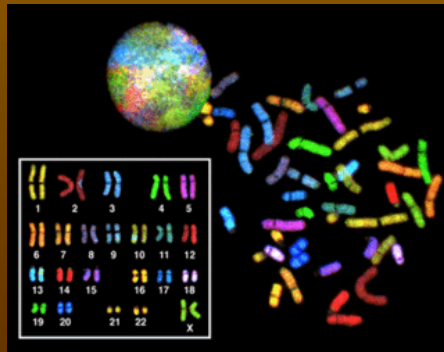


Méthodes d'approche des chromosomes du spermatozoïde

- Test de fécondance hétérospécifique



- Hybridation In Situ fluorescente



Le cas des translocations robertsoniennes

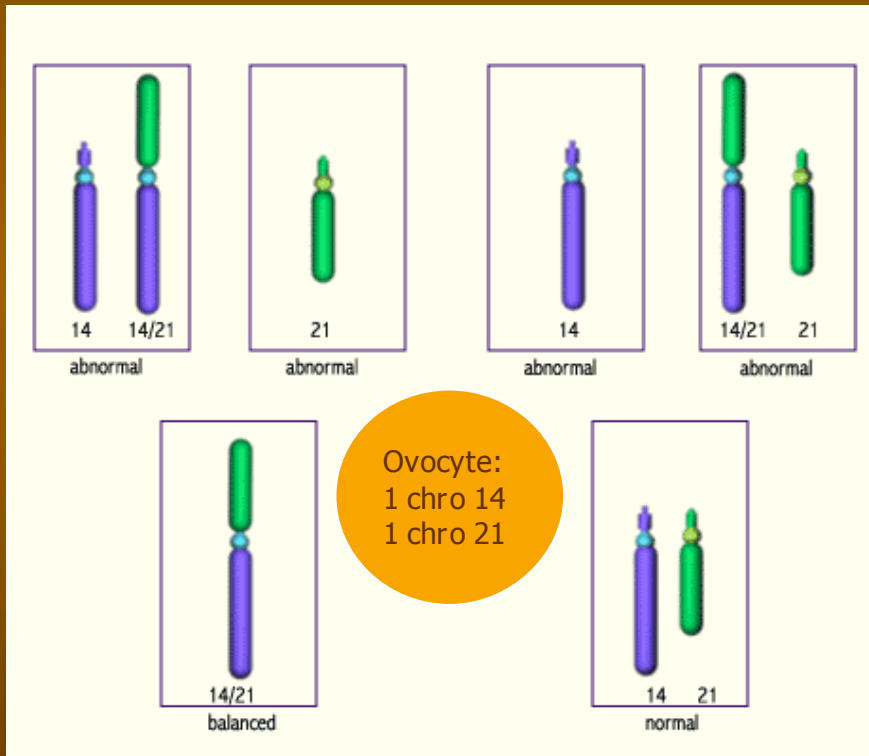
HOPITAL CANTONAL UNIVERSITAIRE GENEVE DIVISION DE GENETIQUE MEDICALE



Groupe « D » Groupe « G »

Le contenu chromosomique des gamètes... et du conceptus dans les t. rob

DESEQUILIBRES / excès ou défaut



Conceptus normal
transloqué

Conceptus normal

Taux de déséquilibres chromosomiques
dans les spermatozoïdes varient de
5 à 25%

Chez l'homme: les plus fréquentes
45,XY t(13;14)

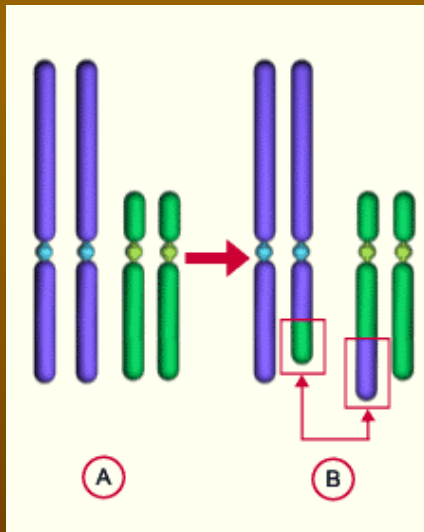
Les risques les plus sévères:
transmettre une trisomie 21 ou 13

Les autres déséquilibres sont
globalement létaux

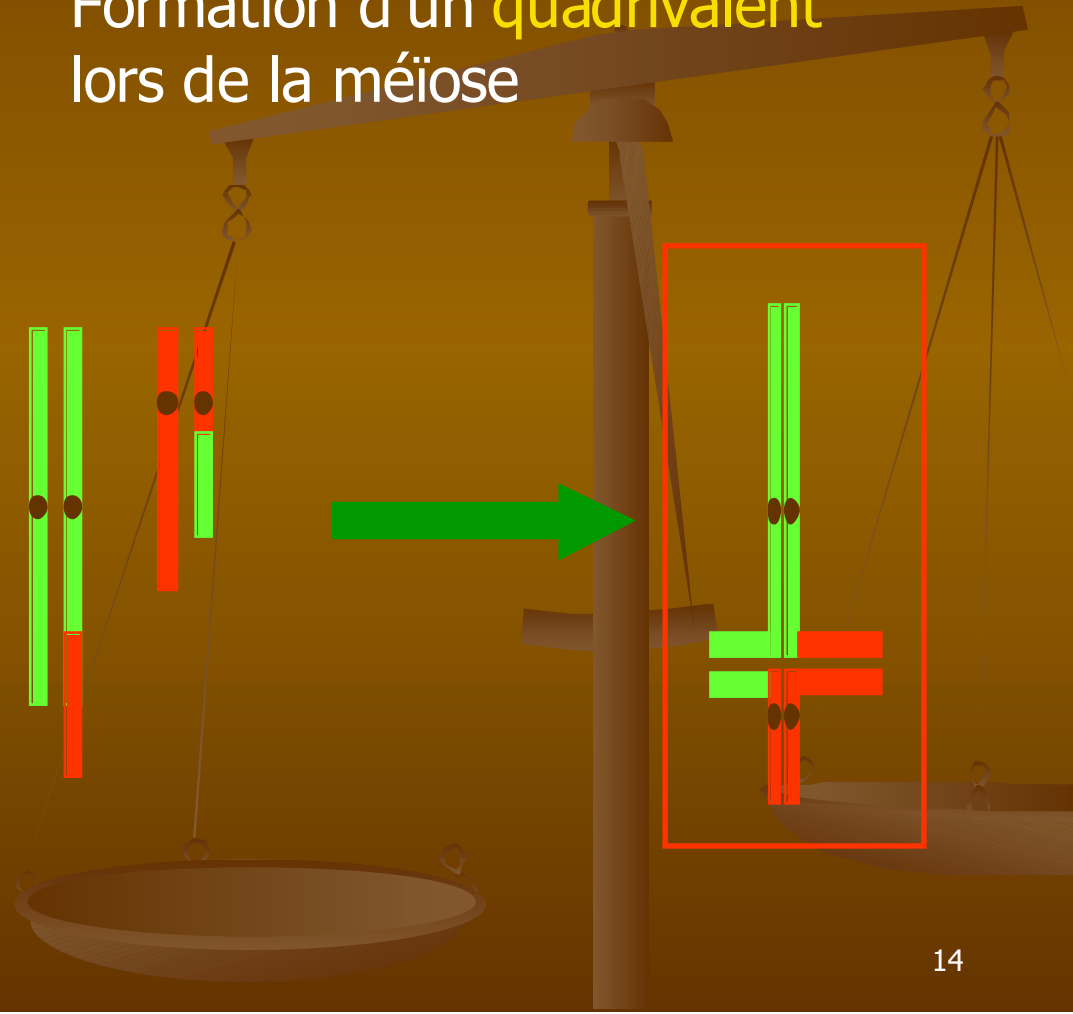
Frydman 2001, Hum Reprod (16) 2274-2277
Moradkhani 2006, Hum Reprod (12) 3193-3198

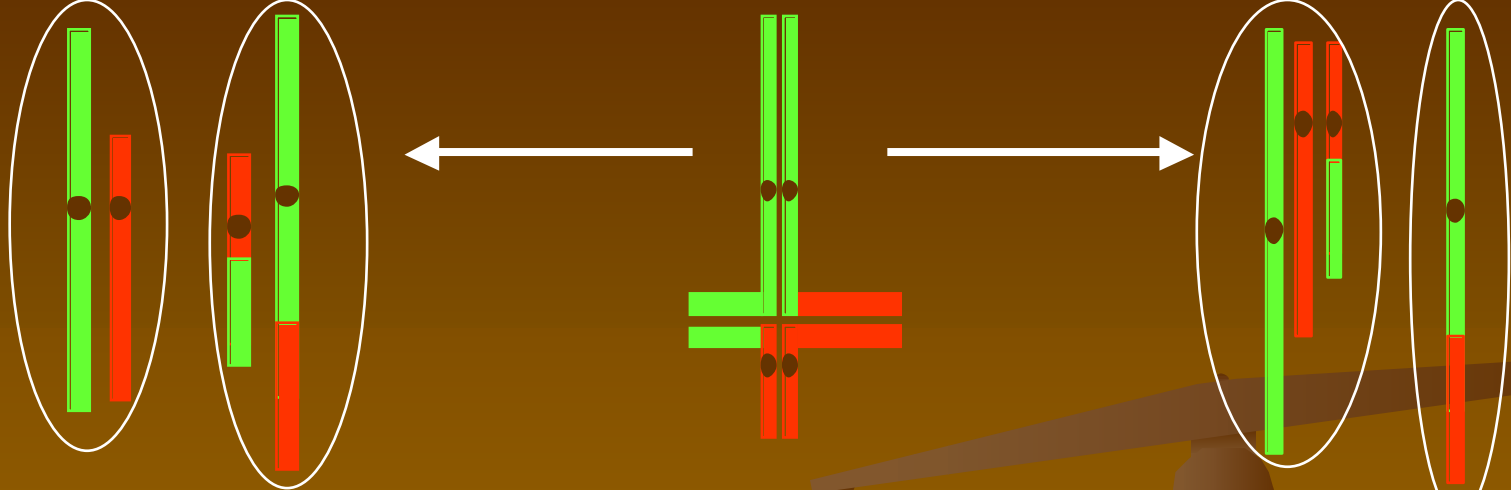
Le cas des translocations réciproques

Cassures chromosomiques

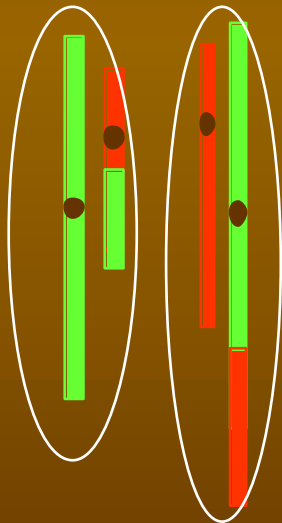


Formation d'un **quadrivalent** lors de la méiose





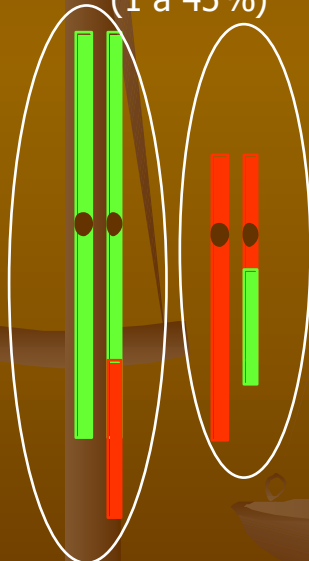
Ségrégation Alterne Normale



Ségrégation Adjacente 1
(5 à 45%)

Selon la translocation, la répartition des différents modes de ségrégation diffère

Ségrégation 3:1
(1 à 45%)



Ségrégation Adjacente 2
(3 à 30%)

Intérêt d'une évaluation en FISH des spermatozoïdes

- Quel est le **taux de déséquilibre** ?
- Ces déséquilibres sont-ils **viables ou non** ?
- Conséquences cliniques importantes
 - Déséquilibre non viable = Echec d'implantation
 - Déséquilibre viable à terme = Enfant avec retard mental et/ou polymalformé
 - Cas intermédiaire = **Fausse couche spontanée**

46,XY,t(3;10)(p14;p12)



Ségrégation	Normale	Anormale			
	Alterne	Adjacentes 1	Adjacentes 2	Autres	Autres
Viable à terme	Normal	Non viable	Non viable	Non Viable	Non Viable
Fréquence	55,0%	30,2%	5,8%	7,4%	1,6%
Fréquence à terme	100%	/	/	/	/

n=1024

Pronostic favorable... embryons viables à terme sont tous équilibrés

Mais... risque de FCS précoces

46,XY,t(17;21)(p10;q10)

Analyse de 38 spermatozoïdes après sélection comme pour une ICSI

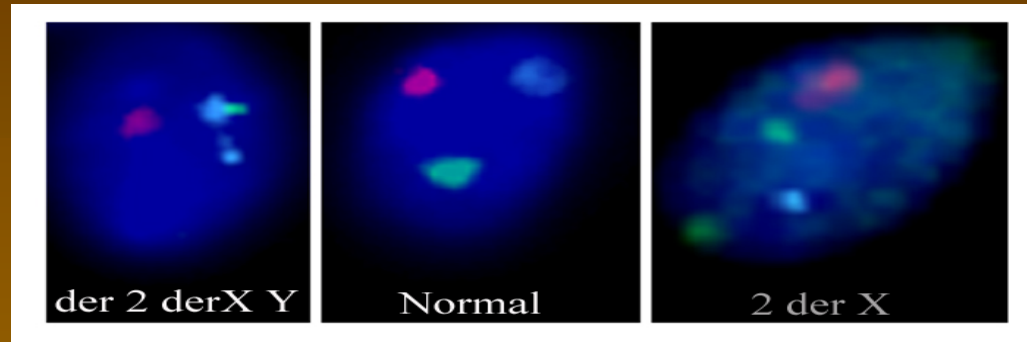
Ségrégation	Normale	Anormale			
	17 + 21 ou der 17 + der 21	Adjacente 1 17 + der 21 ou der 17 + 21	Adjacente 2 17 + der 17 ou 21 + der 21	Autres	der17 + der 21 + 21
Nombre de spz	14	10	0	14	0
Fréquence	37%	26%	0%	37%	0%
Issues	Enfant normal	FCS	FCS	FCS	Enfant trisomique 21

40% de spz normaux

60% de risque de FCS

→ Orientation vers une ICSI avec DPI

46;Y,t(X;2)(p21;p25.3)



Chromosome 2	Normal	Anormal	Normal	Anormal
Gonosomes (X ou Y)	Normal	Normal	Anormal	Anormal
Risque	/	Malformation	Klinefelter ou Turner	Klinefelter ou Turner + Malformation
Fréquence	25%	25%	25%	25%

Pronostic très défavorable... 25% conceptus normaux
 DAN ou ICSI avec DPI ?

Evaluation du taux d'anomalies dans les translocations réciproques

Variable selon les translocations de 10 à 75% de spermatozoïdes déséquilibrés dans la littérature.

Selon notre expérience de 0 à 75%.

Valeur étiologique pour éventuelles FCS antérieures et **pronostique** pour la reproduction naturelle ou l'AMP à venir

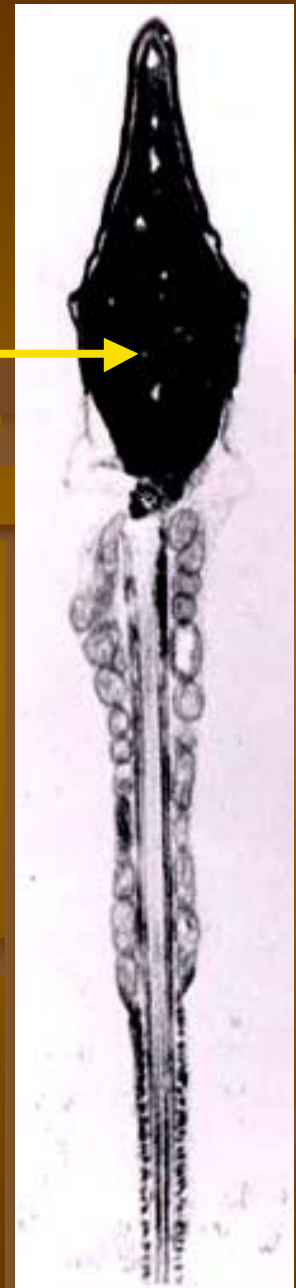
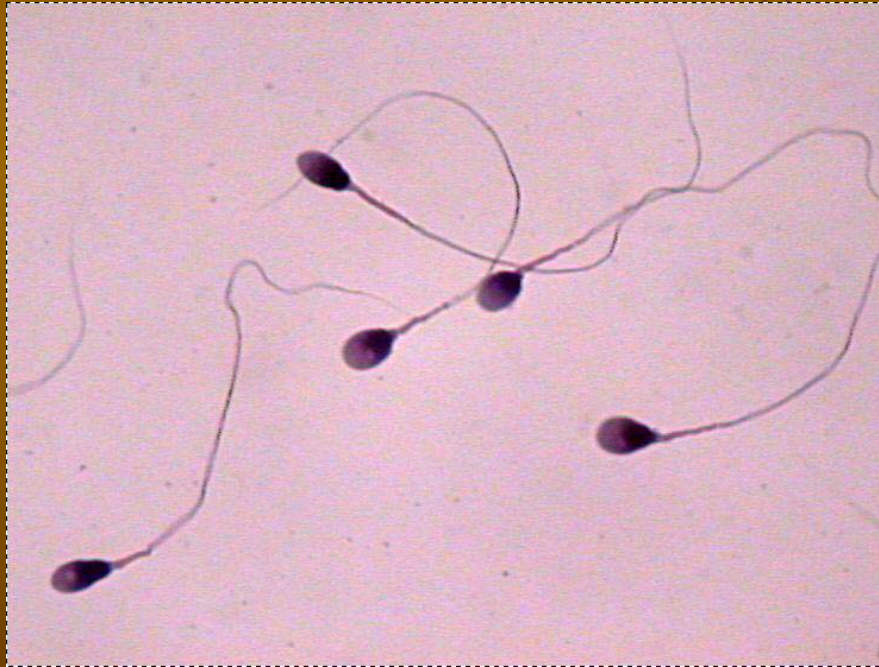
Dans tous les cas de translocation...

Aide au conseil génétique aux patients

- Laisser faire...?
- Diagnostic prénatal précoce? (DPN)
- Discuter une éventuelle prise en charge en AMP (avec DPI?)

La part du spermatozoïde quand le caryotype est normal

Quid du noyau du spermatozoïde???



Paramètres spermatisques conventionnels

NORMES OMS /WHO 1999

(valeurs minimales)

Volume: 2 ml

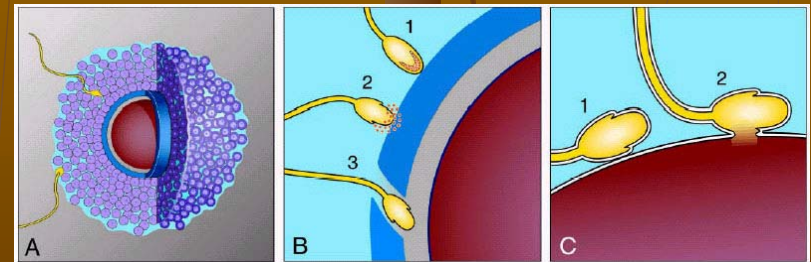
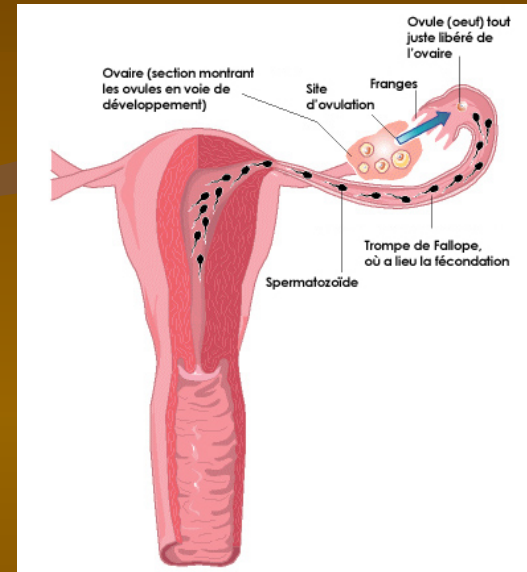
Concentration : 20 millions/ml

Nombre total : 40 millions

Vitalité : 60%

Mobilité a+b : 50% ou a \geq 25%

F. typiques : 30%



→ Aptitude migratoire et fécondante

Paramètres spermatozoïdiques conventionnels et FCSR

- Numération... excessive: ~~polyzoospermie!~~
diminuée: favoriserait les FCS précoces
(+ d'anomalies des gonosomes dans les spzdes)
 - Mobilité (en variable isolée): influe sur délais de conception, peu ou pas sur la survenue de FCS
 - Morphologie: données plus controversées
De manière certaine, la tératospermie induirait plus de FCS dans le cadre de l'AMP (FIV et ICSI)
- Attention aux altérations associées (OAT), qui peuvent néanmoins être féconds naturellement...

La qualité du noyau spermatique (chez sujets à caryotype normal)

- Spermatozoïde vivant mais en cours d'apoptose.... (âge? OAT? Toxiques? etc...)
 - Etude de la **fragmentation de l'ADN**
- Spermatozoïde vivant mais aneuploïde
 - technique de **FISH** avec différentes sondes

Spermatogenèse et apoptose

- **Apoptose = mort cellulaire programmée**
- Phénomène **physiologique** dans les tubes séminifères: élimination active et régulée de cellules âgées, dégradées ou surnuméraires
- Environ **60% des cellules germinales** intra testiculaires ne parviennent pas au stade de spermatozoïde mature
→ rendement spermatogénétique amputé
- **Processus exagéré** chez certains individus, certaines situations, certain microenvironnement testiculaire,...

FCSR et taux de fragmentation de l'ADN spermatozoïdes

- Fragmentation de l'ADN spermatique compromet le **développement embryonnaire post implantatoire** en ICSI
- 24 couples FCSR reproduction naturelle: **taux de fragmentation de l'ADN spermatique augmenté** (38% vs 11,9% dans série de donneurs de sperme)
- Le taux de fragmentation de l'ADN spermatique serait **corrélé au taux d'aneuploïdie** chez patients FCSR

Borini 2006, Hum Reprod (21) 2876-81

Carrell 2003, Obstet Gynecol (101) 1229-1235

Carell 2003, Arch Androl (49) 49-55

FCSR et taux d'aneuploïdie spermatique

Bibliographie riche...

- Globalement consensus sur l'augmentation du taux d'aneuploïdie spermatique chez patients à FCSR
- Taux d'aneuploïdie en rapport avec le nombre de sondes utilisées

- 12 couples FCSR ≥ 2 reproduction naturelle Chro 13, 18, 21, X et Y: **disomie des chromosomes sexuels X 2,2** (0.84 vs 0.37%)
- 48 couples en ICSI Chro 8, 12, 18, X et Y: **(A)** 12 hommes avec taux d'aneuploïdie $< 1,55\%$ et **(B)** 36 $> 1,55\%$ (M=3,25%); Groupe B: taux d'implantation, grossesse clinique diminués et un **taux de FCS augmenté** (38,9 vs 11,1%)
- 20 couples ≥ 3 FCSR : 5 sondes \rightarrow 2 patients avec taux de **diploïdie élevé** (# 15%), 3 avec taux cumulé de disomie augmenté (de 7,8 à 9,5%); parmi eux, 2 ont un **taux global d'aneuploïdie** avec 14 sondes **très élevé** (30 à 34%)

Rubio 1999, J Assist Reprod Genet (16) 253-258

Burello 2003, Hum Reprod (18) 1371-1376

Bernardini 2004, Reprod Biomed Online (9) 312-320

Aujourd'hui : le MSOME....

(Motile Sperm Organellar Morphology Examination)



Possibilité d'examiner un spermatozoïde vivant à **très fort grossissement** (→ Gt x 6.000 à 10.000), dans un but d'observation et/ou de microinjection (IMSI - *Intracytoplasmic Morphologically selected Sperm Injection*)

MSOME, IMSI et FCSR

- Meilleurs taux d'implantation et de grossesse, **taux abaissés de FCS** en ICSI quand spermatozoïde injecté est normal en MSOME **9.7% vs 33.3%** (n= 80 couples)
 - Microinjection de **spermatozoïde vacuolé** diminue le taux de grossesse et augmente le taux de FCS (principalement précoces)
- ➔ Perspectives sur l'analyse **DU** spermatozoïde impliqué dans la conception

Berkovitz 2005, Hum Reprod (20) 185-190

Berkovitz 2006, Reprod Biomed Online (12) 634-638

Berkovitz 2006, Hum Reprod (21) 1787-1790

Hazout 2006, Reprod Biomed Online (12) 19-25.

Perspectives MSOME/IMSI



Peut-on identifier « les » spermatozoïdes qui auraient un ADN spermatique intègre et/ou un génome normal?



Examens spermologiques

Indispensables

- Spermogramme/cytogramme
- Spermoculture
- Etude de la fragmentation de l'ADN
- FISH spzdes si translocation

Souhaitables

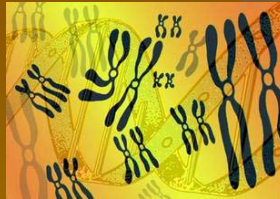
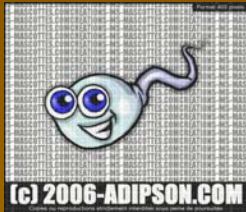
- FISH X/Y, 18
- Augmenter le nombre de sondes si aneuploïdie

Perspectives

- MSOME

Service de Biologie de la Reproduction, AMP, Cytogénétique et Génétique médicale du CHI Poissy Saint Germain

Pr Jacqueline Selva



Secrétariat

- G Fayolle
- J Neuville

Reproduction & AMP

- M Albert
- M Bergere
- I Hammoud

Génétique clinique

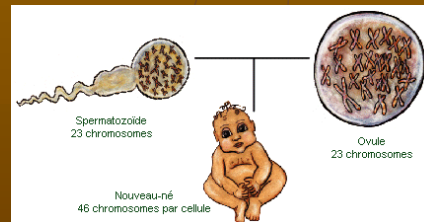
- J Roume

Les internes

C Sabbagh, N Sermondade, MH Chelli

Cytogénétique

- D Molina Gomes
- F Vialard

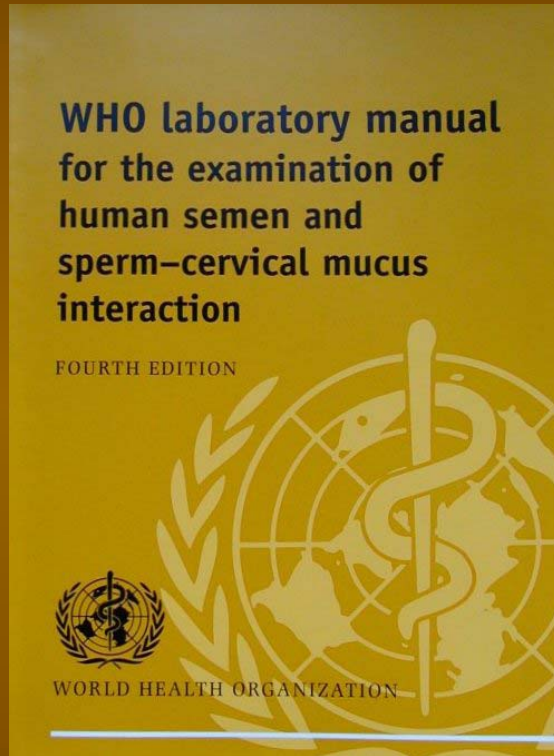


Equipe technique

- L Allard
- F Bru
- P Cavelot
- V Delabroye
- A Escalona
- M Gombault
- V Lebail
- A Martin
- N Raymond



Qu'est-ce qu'un sperme « normal »?



NORMES OMS /WHO 1999

(valeurs minimales)

Volume: 2 ml

Concentration : 20 millions/ml

Nombre total : 40 millions

Vitalité : 60%

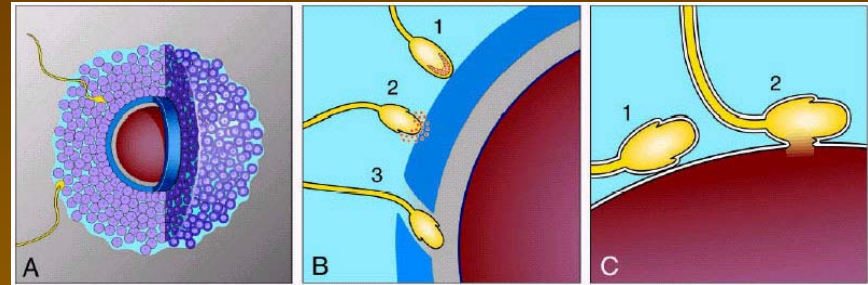
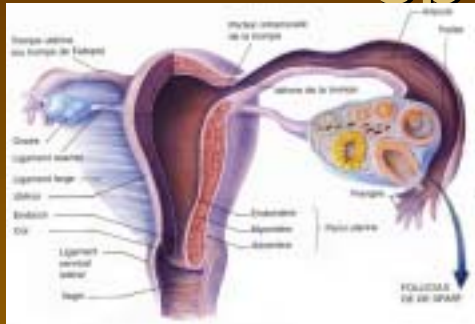
Mobilité a+b : 50% ou a \geq 25%

F. typiques : 30%

Mais encore...

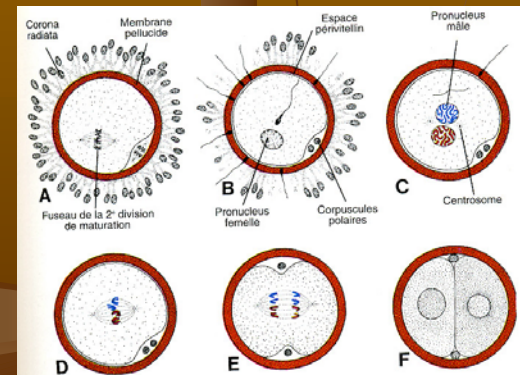
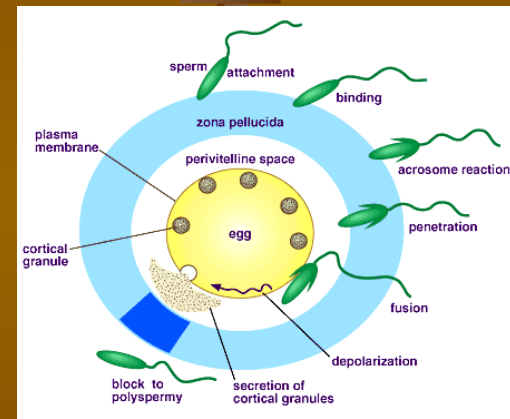
Qu'attend t-on d'un spermatozoïde normal?

Fonctions attendues du spermatozoïde...



Étapes que doit effectuer un spermatozoïde:

1. Migration dans le mucus cervical
2. Progression dans la cavité utérine et la trompe
3. Capacitation
4. Progression dans le cumulus oophorus (A)
5. Reconnaissance et liaison à la zone pellucide (B)
6. Induction de la réaction acrosomique par la ZP
7. Hyperactivation et pénétration de la ZP
8. Liaison et fusion avec la membrane ovocytaire (C)
9. Activation de l'œuf et blocage de la polyspermie
10. Déplacement dans le cytoplasme ovocytaire (D)
11. Décondensation et formation d'un pronucléus
12. Fusion avec le pronucléus féminin



➔ *Aptitude migratoire et fécondante*

Facteurs masculins et FCR (2)

- Paramètres spermatiques conventionnels
Numération et morphologie
- Intégrité membranaire
- Fragmentation de l'ADN
- Spermatozoïdes prélevés chirurgicalement
- Morphologie fine des spermatozoïdes (MSOME)

Bilan Patients

Consultation Génétique

- couples adressés GEMA

Bilan spermiologique

- **28 patients explorés circuit GEMA**

Bilan spermio

28 prélèvements de sperme au laboratoire
spermogramme / spermocytogramme

- 28 spermocultures
- 7 tests de migration survie
- 18 études de la fragmentation de l'ADN spermatique
- Aucune FISH sur spermatozoïde



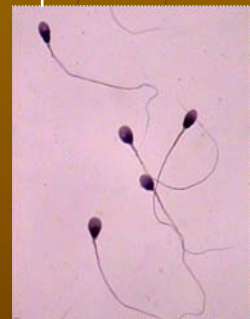
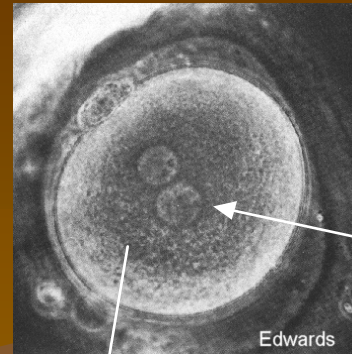
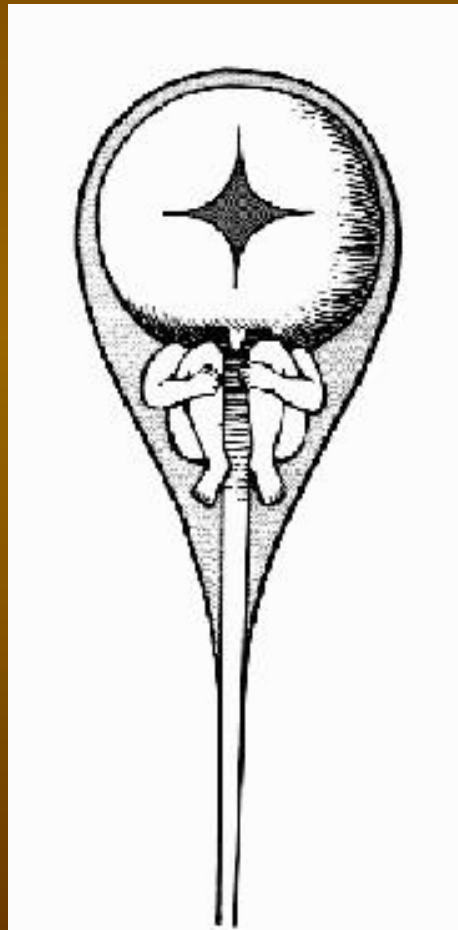
Commentaires

- Paramètres spermogramme
- Numération normales, sauf 2 cas très abaissée
- Mobilité normales ou subnormales
- Par contre, 8/28 ont des atypies +++ $\geq 85\%$

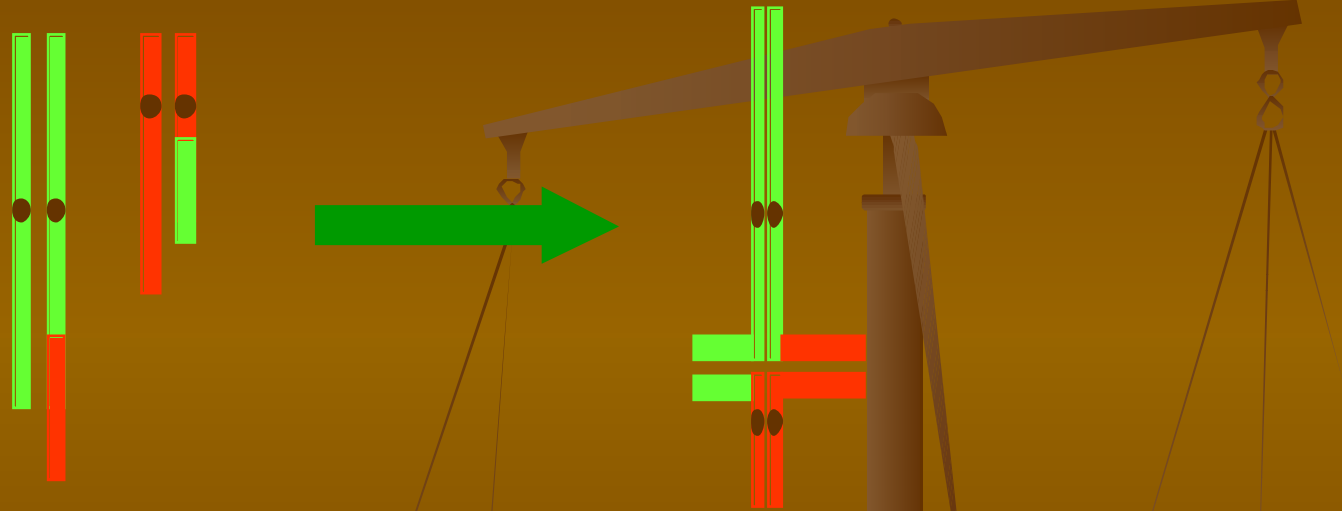
- Fragmentation étudiée chez 18 patients: RAS
- FISH non faite

Introduction

« la part du père? »



La formation du quadrivalent en cas de translocation



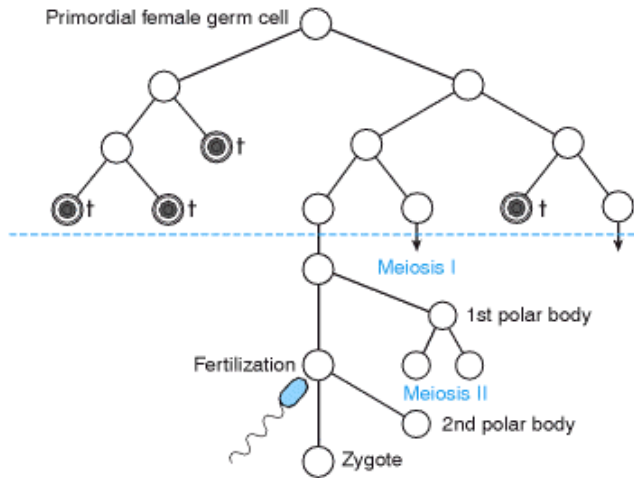
Encombrement ?

Interaction avec la vésicule sexuelle ?

Extension d'inactivation ?

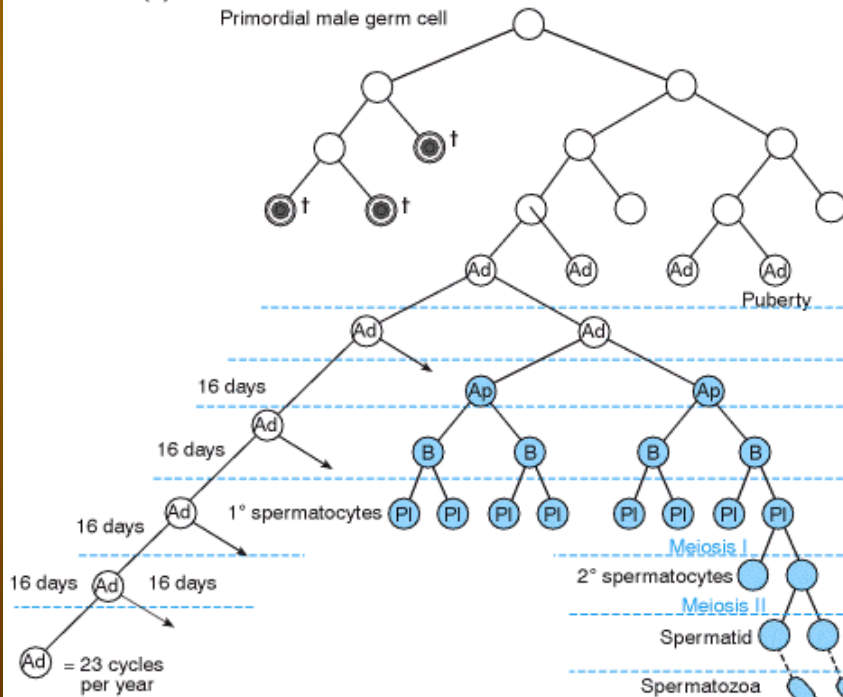
Les remaniements chromosomiques sont-ils tous associés au même risque d'altération de la spermatogénèse ?

(A)



Timetable	Number of	
	cells	divisions
5 months of gestation	6.8×10^6	= 22
Birth	2.6×10^6	
Sexual maturity		
Meiotic divisions		2
Sum total		24

(B)



Timetable	Number of	
	cells	divisions
15 years	1.2×10^9	= 30
	16 days	
	16 days	
	9 days	
	9 days	
	19 days	
	21 days	
Sum total	$\sim 30 + 23n + 5$	

(where n = age in years 15)

Habitus de vie, ATCD et FCSR

■ Toxiques professionnels et environnementaux

Effets variés # fertilité

- Pesticides en général
- Plomb, Mercure
- Hydrocarbures

■ Tabac et autres addictions

Chez l'homme, plutôt sur la fertilité

■ Chimiothérapie et radiothérapie (abdominale)

Augmentation des anomalies chromosomiques de nombre et de structure
A distance: grande variabilité de « RAS » à persistance à distance?
Effet mutagène : resterait précoce et sur cellules différenciées; risque résiduel faible



Savitz 1994, Am J Ind Med (25) 361-383
CRAT 2006

Hruska 2000,

Massaad 2002,

Quel est le risque pour la descendance s'il y a des gamètes ?

Lié à la ségrégation des chromosomes du quadrivalent:

Alterne
Adjacenté 1
Adjacenté 2
3:1
4:0

Porteurs de translocations réciproques

- **Fréquences variables de déséquilibres : de 19% à 81%**
- Ségrégation non aléatoire des déséquilibres
- Production préférentielle de déséquilibres adjacent 1

Pour revue Benet J. et al 2005