

Onzièmes Journées nationales de la FFER (Paris, 11–13 octobre 2006)

## Méthylation du spermatozoïde en Assistance médicale à la procréation (AMP)

### DNA sperm methylation in Assisted Reproductive Techniques

M. Benchaïb<sup>a,\*</sup>, M. Ajina<sup>a</sup>, V. Braun<sup>b</sup>, A. Niveleau<sup>c</sup>, J.-F. Guérin<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> *Département de médecine et biologie de la reproduction, hôpital Édouard-Herriot, place d'Arsonval, 69373 Lyon cedex 03, France*

<sup>b</sup> *Inserm U418, hôpital Debrousse, 29, rue Sœur-Bouvier, 69322 Lyon cedex 05, France*

<sup>c</sup> *Laboratoire de virologie, faculté de médecine, université Joseph-Fourier de Grenoble, avenue Gresivaudan, 38706 La Tronche, France*

Reçu le 17 juillet 2006 ; accepté le 25 juillet 2006

Disponible sur internet le 08 septembre 2006

#### Résumé

Durant ces dernières années, de nombreux tests ont été développés pour étudier les propriétés fécondantes des spermatozoïdes. Cependant aucun d'entre eux n'est suffisant pour obtenir un facteur pronostique. En effet, l'intégrité de l'ADN spermatique est également nécessaire à une fécondation réussie donnant lieu à une grossesse. Elle peut être évaluée par la mesure du niveau de méthylation de l'ADN. En effet, chez les mammifères, la méthylation de l'ADN est impliquée dans de nombreux processus, entre autres, la régulation de l'expression du génome durant le développement embryonnaire. Le but de cette étude est d'évaluer l'impact du niveau de méthylation de l'ADN spermatique dans le succès des fécondations *in vitro* (FIV), en terme de taux de fécondation, de qualité des embryons et de taux de grossesse. L'immunomarquage de la 5-méthylecytosine, puis la quantification par analyse d'images ou en cytométrie en flux, a permis une évaluation objective du niveau de méthylation globale de l'ADN. Nos données montrent que le niveau de méthylation de l'ADN spermatique n'influence ni le taux de fécondation ni la qualité des embryons. En revanche, le taux de grossesse est altéré, si le niveau global de méthylation de l'ADN est inférieur à une valeur seuil. Le niveau de méthylation de l'ADN spermatique représente donc un nouveau paramètre de maturation spermatique.

© 2006 Publié par Elsevier SAS.

#### Abstract

In the last few years, many tests were developed to study the fertilizing properties of the spermatozoa. However none of them was useful to obtain a prognostic factor. Indeed, the integrity of the spermatid DNA is also necessary to a successful fertilization for obtaining a pregnancy. DNA integrity could be evaluated by the measurement of the level of DNA methylation. Indeed, in the mammals, the methylation of the ADN is involved in diverse processes amongst them the regulation of the genome expression during the embryonic development. The objective of this study is to evaluate the impact of the level of methylation of the spermatid DNA in the success of *in vitro* fertilization (IVF), in terms of rate of fertilization, quality of the embryos and rate of pregnancy. The immunostaining of the 5-methylcytosine, then the quantification by image analysis or with flow cytometry, allowed an objective evaluation of the level of total methylation of spermatid DNA. Our data show that the level of DNA methylation influences neither the fertilization rate nor the embryos quality. On the other hand, the rate of pregnancy is decreased if the total level of DNA methylation is lower than a threshold value. The level of spermatid DNA methylation represents a new parameter of spermatid maturation.

© 2006 Publié par Elsevier SAS.

*Mots clés* : Assistance médicale à la procréation (AMP) ; Spermatozoïde ; Méthylation ; Fécondation ; Grossesse

*Keywords* : Assisted Reproductive Techniques (ART); Spermatozoa; DNA methylation; Fertilization; Pregnancy

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [mehdi.benchaib@sante.univ-lyon1.fr](mailto:mehdi.benchaib@sante.univ-lyon1.fr) (M. Benchaïb).

## 1. Introduction

L'épigénétique correspond à des changements héréditaires d'expression des gènes qui se produisent sans changement des bases de l'ADN. L'hérédité épigénétique n'obéit donc pas aux mêmes règles de transmission que l'hérédité génétique. En particulier son support physique peut non seulement être l'ADN, mais également des protéines, de l'ARN et l'interaction entre ces différents éléments. Les modifications épigénétiques influencent l'expression de gène, ce qui explique que toutes les cellules d'une organisation multicellulaire peuvent avoir le même génome, mais présenter des phénotypes différents et constituer des structures complètement différentes. Par conséquent, on peut appréhender l'ensemble des phénomènes épigénétiques comme un système ingénieux permettant d'utiliser sélectivement l'information du génome, en activant ou en inactivant les gènes fonctionnels.

Les phénomènes épigénétiques sont des modifications chimiques des composants de la chromatine. Tous les composants peuvent être modifiés, en ajoutant par exemple un élément par méthylation de l'ADN, ou des histones, par acétylation ou phosphorylation des histones.

La méthylation de l'ADN est impliquée dans des processus divers tels que l'empreinte parentale [1], l'expression du génome [2], l'inactivation du chromosome X [3], et l'expression différentielle de gène [4]. La méthylation de l'ADN est réalisée sur le carbone 5 de la cytosine par des ADN méthyle transférases (DNMT), qui transfèrent un groupe méthyle à partir de la S-adénosyl-1-méthionine.

La famille des DNMT se compose de cinq membres connus : DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L. Seules DNMT1, DNMT3A et DNMT3B ont montré leur activité catalytique. DNMT1 est connue pour être responsable de la maintenance de la méthylation d'ADN dans les cellules somatiques [5]. En revanche, DNMT3A et DNMT3B interviennent dans la méthylation de novo qui établit les nouveaux modèles de méthylation des cellules embryonnaires [5].

La méthylation a lieu au niveau des dinucléotides CG(CpG), dont environ 70 % sont méthylés. Les dinucléotides de CpG sont groupés dans les régions régulatrices des gènes et sont impliqués dans leur expression. En effet, l'hypométhylation d'un gène permet son expression parce que la chromatine est décompactée (euchromatine) et permet la transcription. L'hyperméthylation compacte la chromatine (hétérochromatine) et empêche la transcription.

La méthylation se met en place progressivement lors de la spermatogenèse [6]. Cependant, des modifications de méthylation de l'ADN se produisent également dans le tractus épидидymaire. Il existe donc des modifications épigénétiques tardives [7]. Les gamètes présentent des niveaux de méthylation différents, l'ADN d'ovocyte tend à être hypométhylé tandis que l'ADN spermatique tend à être hyperméthylé [8].

Les étapes de reprogrammation postfécondation du noyau du zygote dépendraient de l'état initial de méthylation des gamètes [9,10]. Cet état de méthylation des gamètes masculins et féminins peut influencer sur l'obtention d'embryons évolutifs

[11]. Ainsi, ce phénomène peut être en cause lors des échecs de fécondation in vitro (FIV) alors qu'aucun élément péjoratif ne semblait présent.

Le but de cette étude est d'évaluer l'impact du niveau de méthylation de l'ADN spermatique en Assistance médicale à la procréation (AMP), en ce qui concerne le taux de fécondation, la qualité des embryons, et le taux de grossesse.

## 2. Patients et méthodes

### 2.1. Patients

Deux groupes de patients ont été sélectionnés selon les techniques de quantification du niveau de méthylation.

### 2.2. Quantification par analyse d'image

Le niveau de méthylation a été quantifié chez 23 patients, classés selon leur spermogramme : normal ( $n = 10$ ), oligozoospermie ( $n = 6$ ) et asthénozoospermie ( $n = 7$ ). Une FIV avec micro-injection a été réalisée pour quatre couples et une FIV classique pour 19 couples.

### 2.3. Quantification en cytométrie en flux

Dans ce cas, 63 couples ont été inclus dans l'étude. Tous les patients avaient un spermogramme normal selon les normes de l'OMS. Pour tous ces couples une FIV classique (sans micro-injection) a été réalisée.

### 2.4. Préparation de sperme pour l'étude de méthylation d'ADN

La détection du niveau de méthylation de l'ADN a été effectuée sur la suspension de sperme restant après l'insémination, celui-ci a été sélectionné par un gradient de Puresperm (Nicadon, Gothemberg, Suède).

### 2.5. Immunomarquage

Deux types d'immunomarquage ont été effectués : un premier réalisé sur étalement cellulaire pour une quantification par analyse d'image, et le second sur des cellules en suspension pour permettre une quantification par cytométrie en flux. Pour le premier protocole la fixation se fait dans un mélange méthanol-acide acétique (Merck, Darmstadt, Allemagne) alors qu'elle se fait avec de l'éthanol (Merck) pour le second protocole. Dans les deux cas, la décondensation et la fragmentation de l'ADN sont réalisées respectivement avec du dithiotreitol (Sigma, Saint Louis, MO, États-Unis) et de l'HCL 6N (Merck). Pour inhiber l'acidité, le borax (Sigma) est utilisé pour le premier protocole et du TRIS (Merck) pour le second protocole. Puis les cellules sont incubées avec l'anticorps anti-5-méthylecytosine, la révélation se fait avec le système streptavidine-peroxydase (UltraVision Kit, LabVision, Fremont, CA,

États-Unis) pour le premier protocole et avec du FITC (Sigma) pour le second protocole.

### 2.6. Quantification

Le niveau de méthylation a été quantifié par analyse d'images (Quantimet 600, Leica, Cambridge, GB), et par cytométrie en flux (FACSCalibur, Becton Dickinson, Mountain View, USA). Dans les deux cas le niveau de méthylation est exprimé en unité arbitraire (u.a.).

### 2.7. Analyse automatisée du mouvement

L'analyse automatisée du mouvement a été réalisée (ATS 20, JC Diffusion International, Granville, France). Seuls les patients ayant eu une quantification de la méthylation par analyse d'images ont pu bénéficier de cette mesure ( $n = 23$ ). Les paramètres suivants ont été mesurés : la vitesse curvilinéaire (VCL), la vitesse en ligne droite (VSL), la linéarité, et l'amplitude du déplacement latéral de la tête (ALH).

## 3. Résultats

### 3.1. Méthylation de l'ADN et caractéristiques spermatisques

Dans le cas d'altération du spermogramme l'analyse d'images montre que le niveau global de méthylation de l'ADN est diminué lors d'une téatospermie (98,9 u.a. lors d'une téatospermie et 121,1 u.a. pour un spermogramme normal,  $p < 0,05$ ). En revanche, il ne semble pas exister de liaison entre le niveau de méthylation et une asthénospermie ou une oligospermie. Cependant, en cas d'altération des caractéristiques spermatisques, la dispersion des valeurs de méthylation est plus importante, la population spermatisque est donc plus hétérogène. Pour les paramètres obtenus lors d'une analyse automatisée du mouvement, aucune corrélation significative n'a été trouvée avec le niveau de méthylation d'ADN ( $r = -0,03$  pour la VCL,  $r = -0,13$  pour la VSL,  $r = -0,13$  pour la linéarité, et  $r = -0,11$  pour l'ALH).

### 3.2. Méthylation et taux de fécondation

Le taux de fécondation ne semble pas être influencé par le niveau de méthylation de l'ADN spermatisque :  $r = -0,1$  (non significatif). Cependant, on note qu'un taux de fécondation haut est associé à un niveau de méthylation haut, et qu'une paucifécondation s'accompagne d'un niveau de méthylation bas.

### 3.3. Méthylation et qualité d'embryons

Aucune liaison entre le niveau de méthylation de l'ADN spermatisque et la qualité d'embryonnaire n'a été trouvée ( $r = -0,08$ , NS). Il n'a pas été possible de mettre en évidence une valeur seuil de méthylation permettant de séparer la popu-

lation étudiée en deux : un groupe avec un taux de bons embryons important et l'autre avec un taux plus bas.

### 3.4. Méthylation et grossesse

Lorsque le niveau de méthylation est séparé en deux classes par une valeur seuil, avec un niveau de méthylation haut, le risque relatif (RR) de la grossesse est égal à 1,38 par rapport à un niveau de méthylation bas ( $p < 0,05$ ). Le taux de grossesse est alors égal à 8,3 % pour un niveau de méthylation bas, et il est de 33,3 % pour un niveau de méthylation haut ( $p < 0,05$ ).

## 4. Discussion

Deux techniques d'immunomarquage et de quantification ont été mises en œuvre pour mesurer la méthylation globale de l'ADN spermatisque. Ce travail nous a permis d'étudier la relation entre le niveau de méthylation de l'ADN spermatisque et les résultats de la FIV.

Nous n'avons pas mis en évidence de relation significative entre le niveau de méthylation et les caractéristiques spermatisques. Cependant en cas de téatospermie, le niveau global de méthylation de l'ADN est diminué. Nous n'avons pas non plus mis en évidence de relation significative entre le niveau de méthylation et le taux de fécondation, ni avec la qualité des embryons obtenus. Ces résultats suggèrent que soit le spermatozoïde est tellement altéré qu'il ne permet pas l'obtention d'une fécondation, soit la fécondation obtenue, le niveau de méthylation intervient de manière peu significative sur la fécondation et sur la qualité morphologique de l'embryon. Afin de confirmer ces hypothèses, il serait intéressant de mesurer le niveau de méthylation lorsqu'aucune fécondation n'est obtenue en fécondation in vitro avec l'utilisation de spermatozoïdes normaux.

Ces techniques nous ont permis de montrer qu'une méthylation globalement faible est défavorable à l'obtention de grossesse, alors qu'une méthylation importante est plus favorable. Ce résultat obtenu pour la première fois chez l'Homme, confirme l'observation de Doerksen [12] réalisée chez le rat. Nous pouvons proposer deux explications à ce résultat. Il est possible que l'hypométhylation du génome spermatisque se traduise par l'activation du génome aux premiers stades de développement embryonnaires et par une division anarchique du zygote. Les embryons issus de ces spermatozoïdes ne seraient pas évolutifs du fait d'un asynchronisme dans l'expression du génome. L'autre hypothèse serait que l'œuf subirait un emballement de son processus de division cellulaire ce qui empêcherait la mise en place de la différenciation cellulaire. En fait tout se passe comme si nous étions confrontés à une rupture de l'équilibre division-différenciation également rencontré dans les processus néoplasiques. Et, en effet, les cellules cancéreuses présentent fréquemment une hypométhylation globale de l'ADN [13].

Cependant, l'augmentation du taux de grossesse lorsque les spermatozoïdes sont hyperméthylés ne peut être attribuée à la seule inactivation des gènes. En effet, une partie importante des

CpG méthylés se situe dans des régions répétées (ALU, L1) [14]. Il se peut donc que ces zones, bien que non traduites, aient un rôle de régulation de l'expression des gènes, en particuliers les gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Cela va dans le sens de l'hypothèse émise par Mayer [11].

L'obtention d'embryons évolutifs est certes sous la dépendance de phénomènes ayant lieu après la segmentation, mais ces phénomènes sont eux-mêmes sous la dépendance d'un fond génétique et épigénétique présent au niveau des gamètes [15]. Nos résultats suggèrent que malgré une reprogrammation épigénétique du pronucléus male après la fécondation, son état initial de méthylation (avant la fécondation) semble important pour l'obtention d'embryons évolutifs.

## 5. Conclusion

Ce travail montre que des altérations du spermogramme peuvent s'accompagner d'altération de la méthylation. Marques [16] avait montré que les spermés présentant des anomalies pouvaient avoir des anomalies dans la mise en place de l'empreinte parentale. L'impact sur le taux de fécondation et l'obtention de grossesse n'avait toutefois pas été étudié. Cependant, notre travail montre que des spermés normaux (selon les normes de l'OMS) peuvent présenter des anomalies du niveau de méthylation global. Ce niveau de méthylation spermatique joue un rôle important dans l'obtention d'embryons évolutifs en AMP. Voilà qui n'est pas sans évoquer les problèmes rencontrés lors du clonage des animaux, où un défaut de méthylation est souvent incriminé dans les échecs de clonage [17]. Reste que le mode de reprogrammation du matériel génétique des pronucléi n'est pas connu, non plus que les mécanismes inhérents à la mise en place de l'empreinte parentale.

Pour compléter ce travail plusieurs pistes sont possibles : par exemple chez la souris, la micro-injection de spermatozoïdes artificiellement déméthylés pourrait être réalisée, et l'observation des résultats : taux de fécondation, taux de grossesse, état des souriceaux, permettrait d'affirmer ou non l'influence de l'hypométhylation sur l'obtention d'embryons évolutifs. Une autre piste serait d'étudier le niveau de méthylation au sein des spermatozoïdes, des gènes impliqués dans le développement précoce de l'embryon et d'établir l'existence d'une liaison ou non entre leur niveau de méthylation et l'obtention de grossesse évolutive. Le même type d'étude serait à réaliser en s'intéressant aux séquences répétées (en particulier les séquences ALU).

La méthylation de l'ADN, ainsi que toutes les modifications épigénétiques, présentent donc un nouveau champ d'investigation du pouvoir fécondant du spermatozoïde.

## Remerciements

Ces travaux ont été possibles grâce à une bourse d'Organon et de l'Egide.

## Références

- [1] Razin A, Cedar H. DNA methylation and genomic imprinting. *Cell* 1994; 77:473–6.
- [2] Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 1993;366:362–5.
- [3] Beard C, Li E, Jaenisch R. Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells. *Genes Dev* 1995;9:2325–34.
- [4] Eden S, Cedar H. Role of DNA methylation in the regulation of transcription. *Curr Opin Genet Dev* 1994;4:255–9.
- [5] Jeltsch A. Molecular enzymology of mammalian DNA methyltransferases. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;301:203–325.
- [6] Narayan G, Raman R. Cytological evaluation of global DNA methylation in mouse testicular genome. *Hereditas* 1995;123:275–83.
- [7] Ariel M, Carey MCJ, Cedar H. Development changes in methylation of spermatogenesis gene include reprogramming in the epididymis. *Nat Genet* 1994;7:59–63.
- [8] Monk M, Boubelik M, Lehnert S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development* 1987;99:371–82.
- [9] Bouniol-Baly C, Nguyen E, Besombes D, Debey P. Dynamic organization of DNA replication in one-cell mouse embryos: relationship to transcriptional activation. *Exp Cell Res* 1997;236:201–11.
- [10] Haines TR, Rodenhiser DJ, Ainsworth PJ. Allele-specific non-CpG methylation of the *Nf1* gene during early mouse development. *Dev Biol* 2001;240:588–98.
- [11] Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. Embryogenesis: demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 2000;403:501–2.
- [12] Doerksen T, Trasler JM. Developmental exposure of male germ cells to 5-azacytidine results in abnormal preimplantation development in rats. *Biol Reprod* 1996;55:1155–62.
- [13] Piyathilake CJ, Henao O, Frost AR, Macaluso M, Bell WC, Johanning GL, et al. Race- and age-dependent alterations in global methylation of DNA in squamous cell carcinoma of the lung (United States). *Cancer Causes Control* 2003;14:37–42.
- [14] Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 1997;13:335–40.
- [15] Shi W, Haaf T. Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. *Mol Reprod Dev* 2002;63:329–34.
- [16] Marques CJ, Carvalho F, Sousa M, Barros A. Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet* 2004;363:1700–2.
- [17] Kremenskoy M, Kremenska Y, Suzuki M, Imai K, Takahashi S, Hashizume K, et al. Epigenetic characterization of the CpG islands of bovine leptin and POU5F1 genes in cloned bovine fetuses. *J Reprod Dev* 2006; 52:277–85.