

Université de Montréal

**Innocuité d'un nouvel agent spermicide (FTDBA) pour  
l'ADN des spermatozoïdes humains**

par

Geneviève Laforest

Sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en sciences biomédicales

avril, 2003

© Geneviève Laforest, 2003



W  
4  
158  
2003  
N.097

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Innocuité d'un nouvel agent spermicide (FTDBA) pour l'ADN  
des spermatozoïdes humains

présenté par :  
Geneviève Laforest

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Michèle Brochu, président-rapporteur  
Gilles Bleau, directeur de recherche  
Eve De Lamirande, membre du jury

## Résumé

Le fluorure de tétradécyl-diméthyl-benzyl ammonium (FTDBA) est un nouvel agent spermicide très puissant. Cet ammonium quaternaire cause une perte irréversible de la mobilité des spermatozoïdes en induisant la nécrose cellulaire et l'inhibition enzymatique.

En cas d'échec de la contraception locale, il y a un risque théorique que l'agent spermicide cause une fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes et cela pourrait être associé à une transmission d'ADN endommagé à l'ovocyte. La présente étude a pour but d'observer l'innocuité du FTDBA pour l'ADN des spermatozoïdes.

Pour y parvenir, les spermatozoïdes de 32 hommes ayant une fertilité démontrée ont été exposés à des doses sublétales de FTDBA établies par la technique Sander-Cramer. La fragmentation de l'ADN a été mesurée par cytométrie en flux, après marquage des extrémités 3'OH de l'ADN via la transférase terminale (« Terminal uridine nick end-labeling » ou TUNEL). L'intégrité de l'ADN a également été évaluée par électrophorèse sous champs pulsés et par une nouvelle technique de marquage radioactif (ATP <sup>35</sup>S) sur des extraits d'ADN.

Par la technique TUNEL, une hausse significative du marquage de l'ADN des spermatozoïdes est observée après exposition au FTDBA ( $p < 0,001$ ). Les substances oxygénées réactives ne seraient pas impliqués dans ce phénomène. Cependant, cette augmentation n'est pas observée par électrophorèse, ni par le marquage radioactif sur des extraits d'ADN.

Le FTDBA n'induit pas de dommages à l'ADN des spermatozoïdes; il permettrait plutôt de détecter des brisures inaccessibles par la technique TUNEL. Il est donc sécuritaire à ce niveau en cas d'échec contraceptif et pourrait servir à rendre la technique TUNEL plus sensible. **Mots-clés** : Fragmentation d'ADN, spermatozoïdes, TUNEL, spermicide.

## Abstract

Tetradecyl-dimethyl-benzyl-ammonium fluoride (TDBAF) is a powerful new spermicide. This fluoride salt of a quaternary ammonium causes irreversible loss of sperm motility by inducing cell necrosis and enzyme inhibition.

In cases of failure of local contraception, there is a theoretical risk that a spermicidal agent might cause sperm DNA strand breaks and be associated with transmission of damaged DNA to the oocyte by a spermatozoon exposed to a sublethal dose. The present study aims to ascertain innocuity in the case of TDBAF.

Spermatozoa from 32 fertile men were exposed to a sublethal concentration of TDBAF, as established by Sander-Cramer assay. The degree of DNA fragmentation was measured by the TUNEL assay where 3'OH termini are labeled using terminal transferase, followed by flow cytometry. DNA integrity was also assessed by pulsed field electrophoresis and by a new enzymatic assay measuring radioactively labeled ( $^{35}\text{S}$ -ATP) purified DNA extracted from TDBAF-exposed spermatozoa.

Using the TUNEL assay, a significantly increase in percent labeled spermatozoa was observed after TDBAF treatment compared to controls ( $p < 0.001$ ). The same result was observed in the presence of antioxidant so reactive oxygen species are not implicated in this phenomenon. However, this increase was not observed upon electrophoresis and radioactive labeling of extracted DNA.

The increase in percent labeled sperm observed by the TUNEL assay most likely results from increased access of the enzyme to its DNA substrate in treated sperm. TDBAF at sublethal concentrations does not induce DNA strand breaks in spermatozoa; in this regard, it can be considered safe for the embryo in cases of failure of local contraception.

**Keywords:** DNA fragmentation, TUNEL, spermatozoa, spermicide.

## Table des matières

<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>IV</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTE DES SIGNES ET ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>XI</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>XV</b>
<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Introduction générale .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Les spermatozoïdes .....</b>	<b>2</b>
1.2.1 La spermatogenèse .....	2
1.2.2 La spermiogenèse.....	6
1.2.3 Maturation des spermatozoïdes.....	9
1.2.4 Les spermatozoïdes matures.....	11
<b>1.3 Les spermicides .....</b>	<b>14</b>
1.3.1 Historique et généralités.....	14
1.3.2 Types et modes d'action des spermicides .....	17
1.3.3 Tests pour évaluer l'activité des spermicides.....	18
<b>1.4 La fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes éjaculés.....</b>	<b>23</b>
1.4.1 Défauts lors de la transition des histones aux protamines.....	23

1.4.2 Processus apoptotique inachevé.....	24
1.4.3 Présence de substances oxygénées réactives (SOR) .....	26
<b>1.5 Techniques de détection des dommages à l'ADN.....</b>	<b>28</b>
1.5.1 Dosage de la 8-hydroxy-2'-désoxyguanine.....	28
1.5.2 Traduction de brèche (« Nick translation »).....	28
1.5.3 Le test comète (« Comet assay »).....	29
1.5.4 « Sperm chromatin structure assay » (SCSA).....	30
1.5.5 Technique TUNEL .....	32
<b>2. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE .....</b>	<b>33</b>
<b>3. ARTICLE SOUMIS À « CONTRACEPTION » .....</b>	<b>35</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>37</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>39</b>
<b>Materials and Methods.....</b>	<b>42</b>
Study participants.....	42
Sample collection .....	42
Determination of the sublethal concentration .....	42
Measurement of sperm DNA fragmentation by the TUNEL assay .....	43
Extraction and isolation of sperm DNA.....	45
Detection of DNA fragmentation by $\alpha^{35}\text{S}$ ATP incorporation in extracted DNA...	45
DNA analysis by regular and pulsed field electrophoresis .....	46
Analysis of sperm chromatin condensation.....	47



Antioxidant treatment and measurement of ROS production .....	47
Statistical analyses.....	48
<b>Results .....</b>	<b>49</b>
Effect of TDBAF on the results of the TUNEL assay .....	49
Effect of TDBAF on ROS production by sperm and other cells in semen .....	50
Assessment of DNA fragmentation by electrophoresis pulsed field.....	51
Measurement of 3'OH termini in isolated DNA from spermatozoa.....	51
Evaluation of sperm chromatin density.....	52
<b>Discussion.....</b>	<b>53</b>
<b>References .....</b>	<b>58</b>
<b>4. DISCUSSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>68</b>
<b>4.1 La technique TUNEL dans l'évaluation d'un agent spermicide .....</b>	<b>68</b>
<b>4.2 Évaluation de la production de substances oxygénées réactives.....</b>	<b>70</b>
<b>4.3 Faiblesses de la technique TUNEL.....</b>	<b>73</b>
4.3.1 Inaccessibilité, in situ, de certaines cassures par la TdT .....	73
4.3.2 Le manque d'uniformité dans la technique TUNEL .....	75
<b>4.4 Preuve de l'innocuité du FTDBA pour l'ADN des spermatozoïdes .....</b>	<b>77</b>
<b>5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>79</b>
<b>6. BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>82</b>

## Liste des tableaux

### Chapitre 1 : Introduction

**Tableau I** : Les différents types de spermicides et leurs modes d'action. .... 20

### Chapitre 3 : Article

**Tableau I**: Median (interquartile range) values of nuclear chromatin density ..... 62

## Liste des figures

### Chapitre 1 : Introduction

<b>Figure 1</b> : Schéma de la spermatogenèse chez l'humain. ....	3
<b>Figure 2</b> : Coupe transversale d'un tubule séminifère. ....	4
<b>Figure 3</b> : Schéma du complexe axonémal de la queue du spermatozoïde. ....	10
<b>Figure 4</b> : Photos en microscopie électronique d'un spermatozoïde mature ainsi que des différentes parties de son flagelle. ....	13
<b>Figure 5</b> : Structures moléculaires du Nonoxynol-9 et du FTDBA. ....	21
<b>Figure 6</b> : Types de résultats obtenus à partir de la technique « Comet assay ». ....	31

### Chapitre 3 : Article

<b>Figure 1</b> : Comparison (mean $\pm$ SD) of the degree of sperm DNA fragmentation as measured by the TUNEL assay in sperm treated with PBS (control) or a sublethal concentration of TDBAF. ....	63
<b>Figure 2</b> : Production of reactive oxygen species by control and TDBAF-treated spermatozoa. ....	64
<b>Figure 3</b> : Pulsed field electrophoresis of isolated sperm DNA. ....	65

**Figure 4:** Sperm DNA fragmentation measured after labeling of isolated DNA from control sperm and sperm exposed the sublethal concentration of TDBAF. .... 66

**Figure 5:** Typical electron microscopic appearance of spermatozoa exposed to PBS or to sublethal concentration of TDBAF. .... 67

## Liste des signes et abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique ou « Deoxyribonucleic acid »
ANOVA	Analyse de la variance ou « Analysis of variance »
Ad	Spermatogonie A sombre
Ap	Spermatogonie A pâle
AP	Phosphatase alcaline ou « Alkaline phosphatase »
ATP	Adénosine triphosphate
CASA	Analyse du sperme assistée par ordinateur ou « Computer-assisted semen analysis »
CFDA	Diacétate de carboxyfluorescéine
CHUM	Centre hospitalier de l'Université de Montréal
CI	Intervalle de confiance ou « Confidence interval »
COMET	Analyse unicellulaire sur gel d'électrophorèse ou « Single cell gel electrophoresis »
CV	Coefficient de variation ou « Coefficient of variation »
DCFH-DA	Dichlorofluorescéine diacétate
DTAB	Bromure de dodécyl-triméthyl-ammonium ou « Dodecyltrimethylammonium bromide »
DTT	Dithiothréitol
<i>e.g.</i>	Par exemple ou « Exempla gracia »

FACS	Cytométrie en flux ou « Fluorescence activated cell sorting »
FAEBS	Fluorure de 4-(2-aminoéthyl)-benzènesulfonyle
FasL	Ligand de Fas ou « Fas ligand »
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine ou « Fluorescein iso-thiocyanate »
FSH	Hormone folliculo-stimulante ou « Follicle stimulating hormone »
FTDBA	Fluorure de tétradécyl-diméthyl-benzyl ammonium ou fluorure de myristalkonium
GC/MS	Chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse
H1	Histone-1
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance ou « High performance liquid chromatography »
ICSI	Injection intracytoplasmique de spermatozoïdes ou « Intracytoplasmic sperm injection »
kb	Kilo-base
MKF	Fluorure de myristalkonium
MTS	Maladie transmise sexuellement
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
PBS	Tampon phosphate salin ou « Phosphated-buffered saline »
PI	Iodure de propidium ou « Propidium iodide »
Pol I	Polymérase 1

SCSA	Analyse de la structure de la chromatine des spermatozoïdes ou « Sperm chromatin structure assay »
SD	Écart-type ou « Standard deviation »
SOR	Substances oxygénées réactives ou « Reactive oxygen species »
TdT	Déoxyribonucléotidyle exotransférase ou « Terminal deoxyribonucleotidyle transférase »
TN	Tampon Tris-NaCl ou « Tris-NaCl buffer »
TP1	Protéine de transition-1 ou « Transition protein-1 »
TP2	Protéine de transition-2 ou « Transition protein-2 »
TUNEL	Marquage des brins d'ADN avec la déoxyribonucléotidyle exotransférase ou « Terminal uridine nick end-labeling »
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
WHO	Organisation mondiale de la santé ou « World health organization »

*Pour Lisette et Claude,  
mes parents que j'adore.*



## Remerciements

Tout d'abord, je tiens particulièrement à remercier le D<sup>r</sup> Gilles Bleau pour toute sa gentillesse, son aide et la confiance qu'il m'a accordée dès le début de mes travaux. Le temps passé dans son laboratoire restera toujours un merveilleux souvenir dans ma mémoire. Merci aussi aux autres personnes de ce laboratoire qui ont rendu ce passage encore plus mémorable; Pascal pour nos discussions très constructives mais pas toujours rassurantes, Karyn pour son sens de l'humour qui m'a souvent fait rire aux larmes, Suzanne pour sa grande gentillesse et Martin qui sait toujours écouter et remonter un moral un peu bas. Vous me manquez.

J'aimerais aussi remercier mes parents et ma sœur qui avec tous leurs encouragements et leur fierté évidente m'ont permis de me rendre là où je suis maintenant. Vous avez mon amour inconditionnel. Il ne faut pas non plus que j'oublie ma Mamie Laforest qui me fournissait des sucres à la crème « énergisants » durant mes périodes intenses d'examens et mon amour pour son support et pour le fait qu'il me rende si heureuse...

Finalement, merci au D<sup>r</sup> Moïse Bendayan pour son aide en microscopie électronique.

# 1. Introduction

## 1.1 Introduction générale

Nous devons aux progrès de la médecine et de l'hygiène la très forte diminution du taux de mortalité infantile et l'augmentation de l'espérance de vie. Paradoxalement, ces deux bienfaits nous ont conduits à une véritable explosion démographique : nous sommes aujourd'hui plus de 6 milliards d'humains sur Terre. La population mondiale s'accroît de quelque 100 millions par an et elle pourrait atteindre les 10 milliards en 2050. Si cet accroissement exponentiel se maintient, toutes les ressources naturelles non renouvelables seront épuisées d'ici quelques générations et les problèmes de pollution et de détérioration du milieu prendront une ampleur effrayante. Même dans les conditions économiques avantageuses des pays dits « développés », une famille nombreuse peut être éprouvante pour la santé des femmes. De là le besoin impérieux de développer de nouvelles méthodes contraceptives financièrement abordables, efficaces et acceptables, particulièrement dans les pays du Tiers-Monde.

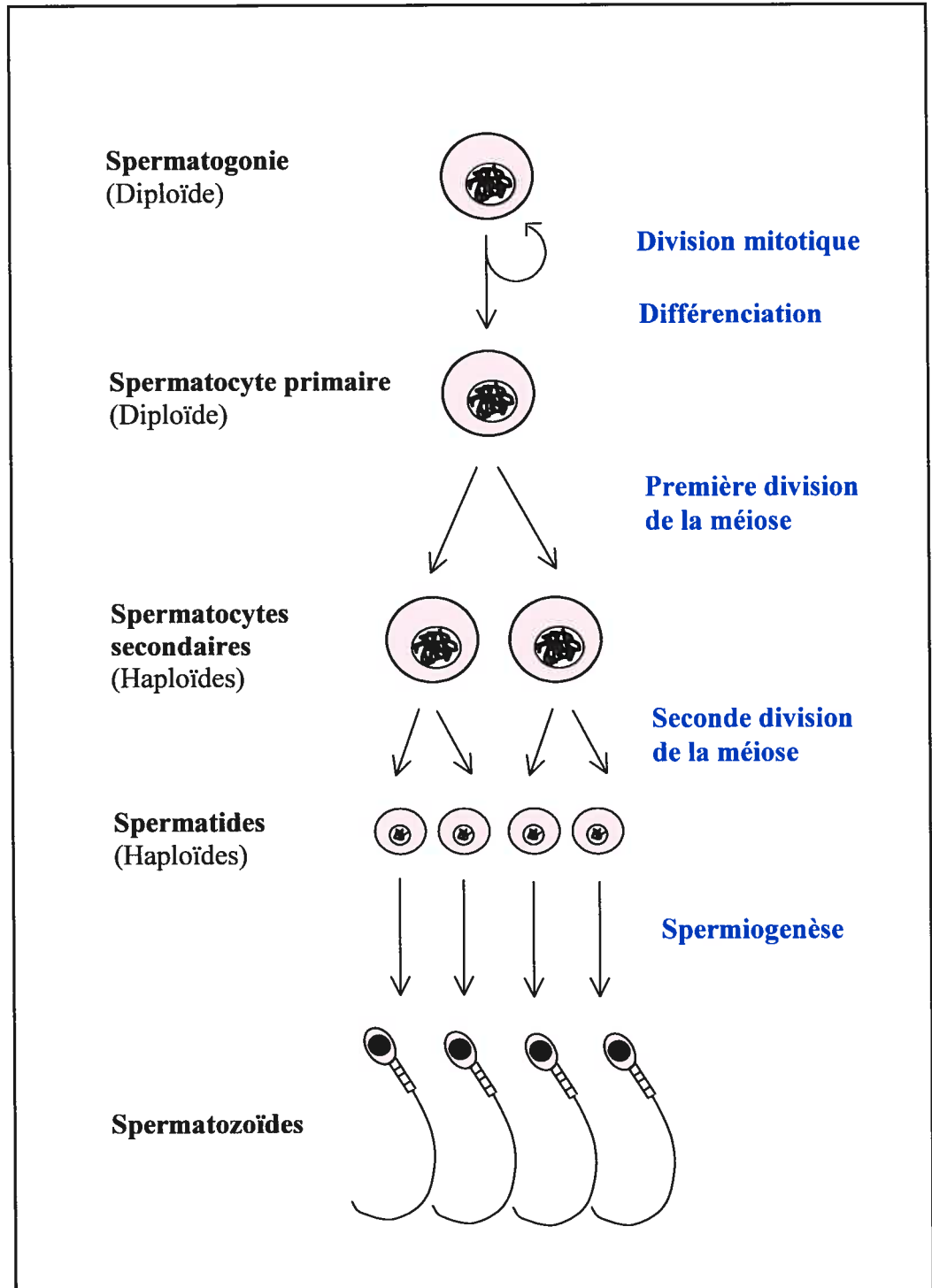
L'amélioration des connaissances sur les spermatozoïdes et les mécanismes de la fécondation a permis de développer de nouvelles méthodes contraceptives ciblant le gamète mâle. Notre laboratoire s'intéresse à un nouvel agent spermicide qui, en plus de son effet contraceptif, est doté d'une puissante activité bactéricide et virucide offrant ainsi un certain degré de protection contre les maladies transmises sexuellement. Ce mémoire explore un aspect relatif à l'innocuité du spermicide pour l'ADN des spermatozoïdes, ceci afin d'éviter tout problème génétique d'origine paternelle en cas d'échec de la contraception.

## **1.2 Les spermatozoïdes**

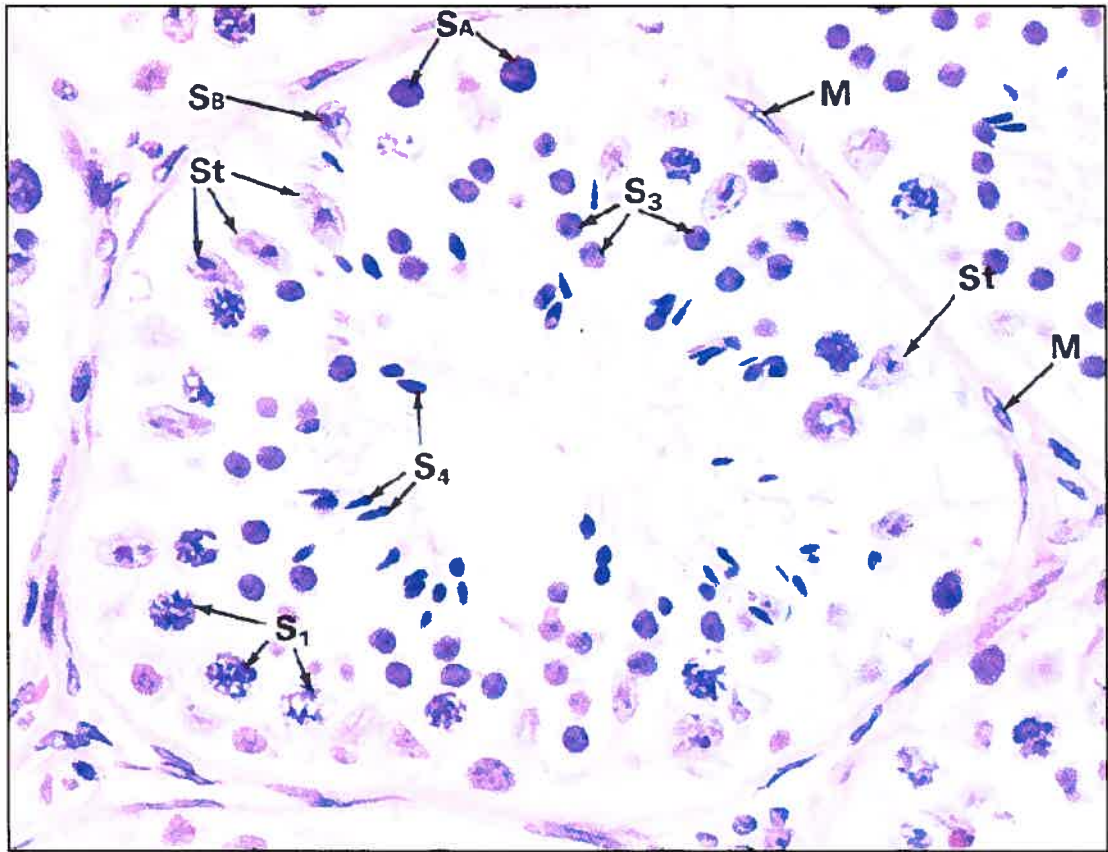
### **1.2.1 La spermatogenèse**

La spermatogenèse est le processus de différenciation cellulaire qui, à partir des cellules souches, assure la production d'environ 6,5 millions de spermatozoïdes par jour par gramme de testicule. Débutant à la puberté, elle se poursuit tout au long de la vie de l'homme, à l'intérieur des tubules séminifères contournés des testicules (Thibault et Levasseur, 2001). Un schéma des principales étapes de la spermatogenèse ainsi qu'une micrographie d'une coupe d'un tubule séminifère sont présentées aux figures 1 et 2.

La spermatogenèse comporte des processus mitotique et méiotique sous l'influence de gènes récemment identifiés, et exprimés dans les cellules de la lignée spermatique. Ils codent pour des protéines régulatrices (cyclines), des phosphatases, des kinases ainsi que des composants nucléaires et cytoplasmiques nécessaires à la division cellulaire (pour une revue récente de la littérature, voir Wolgemuth et coll., 2002). Leur expression est principalement régulée de manière intrinsèque à partir d'un programme génétique déterminant quels gènes seront utilisés, et quand ils le seront. Un système de régulation interactive, surtout attribué aux cellules de Sertoli, est aussi présent et responsable de la synchronisation de la spermatogenèse. De façon indirecte, une régulation extrinsèque s'exerce via le système endocrinien, principalement via la FSH et la testostérone (pour une revue récente de la littérature, voir Eddy, 2002).



**Figure 1:** Schéma de la spermatogenèse chez l'humain.



*(Tiré de Burkitt et coll., 1993)*

**Figure 2 :** Coupe transversale d'un tubule séminifère.

Légende : S<sub>A</sub> : Spermatogonies de type A  
 S<sub>B</sub> : Spermatogonies de type B  
 S<sub>1</sub> : Spermatocytes de premier ordre  
 S<sub>3</sub> : Spermatides  
 S<sub>4</sub> : Spermatozoïdes  
 St : Cellules de Sertoli  
 M : Cellules myoïdes

L'épithélium des tubules séminifères est constitué de trois types de cellules germinales (spermatogonies, spermatocytes, spermatides) et de cellules de Sertoli - de grandes cellules pyramidales s'étendant sur toute la hauteur de l'épithélium séminifère. Les spermatogonies sont les cellules les plus externes et se trouvent directement en contact avec la lame basale de l'épithélium tubulaire, entre les cellules de Sertoli; elles se multiplient par mitose. Une partie des cellules filles, les spermatogonies A sombres (Ad), resteront près de la lame basale afin de perpétuer la lignée de cellules germinales; l'autre partie, les spermatogonies A pâles (Ap) se diviseront par mitose pour constituer des amas de cellules filles reliées entre elles par des ponts cytoplasmiques. Ces spermatogonies Ap se différencieront ensuite en spermatogonies B, qui seront poussées vers la lumière des tubules séminifères où elles se différencieront en spermatocytes de premier ordre.

Les spermatocytes de premier ordre sont de grandes cellules de forme ovale au noyau arrondi, et contenant plusieurs nucléoles. Ils subiront la première division de la méiose (durée d'environ 23 jours) pour former 2 cellules haploïdes plus petites, appelées spermatocytes de deuxième ordre. C'est au cours du stade diplotène de cette première division méiotique que se produisent les chiasmas entre les chromosomes homologues maternels et paternels, phénomène à l'origine d'échanges de matériel génétique.

Les spermatocytes de deuxième ordre ainsi produits entreront rapidement dans la deuxième division de la méiose (durée de 1 jour). Leurs cellules filles haploïdes, désignées spermatides, sont de petites cellules rondes au gros noyau sphérique, situées près de la

lumière du tubule séminifère. Elles se différencieront en spermatozoïdes durant la spermiogenèse. Après leur libération dans la lumière des tubules séminifères (spermiation), les spermatozoïdes seront dirigés vers l'épididyme pour y terminer leur maturation (Thibault et Levasseur, 2001).

### **1.2.2 La spermiogenèse**

La spermiogenèse est définie comme le processus de maturation des spermatides en spermatozoïdes, alors que les spermatides sont encastrés à la partie luminale des cellules de Sertoli (durée d'environ 23 jours). Durant ce processus, des changements majeurs se produisent dans l'architecture cellulaire incluant la perte de cytoplasme (phagocyté par les cellules de Sertoli), la formation de l'acrosome (dérivé de l'appareil de Golgi) ainsi que l'assemblage des structures du flagelle (à partir des centrioles). Surviennent aussi de nombreuses modifications au niveau nucléaire, principalement une condensation de l'ADN. Le noyau passe de la forme sphéroïde à allongée, et on note une baisse de la transcription cellulaire. (Thibault et Levasseur, 2001; Stevens et Lowe, 1997). La transcription des gènes haploïdes impliqués dans ces modifications morphologiques est régulée par une polymérase poly(A) spécifique au testicule (Kashiwabara et coll., 2002).

Dans les cellules somatiques, l'ADN est légèrement condensé et associé à des protéines du type histone; l'ensemble constitue la chromatine. L'ADN est d'abord enroulé

autour d'un octamère d'histones pour former des nucléosomes. La structure de ces complexes nucléo-protéiques est maintenue grâce à des interactions électrostatiques entre les charges positives sur les résidus d'acides aminés des histones et les charges négatives des groupements phosphates de l'ADN. L'adhésion d'une neuvième histone de liaison (H1) au nucléosome permet un enroulement régulier en spirale du filament ADN-protéine formant alors un solénoïde. Ce conditionnement permet de réduire la longueur de l'ADN d'environ 50 fois.

Dans les spermatozoïdes, l'ADN est à ce point condensé qu'il adopte une structure presque cristalline et biochimiquement inerte. Cette extrême compaction, sous forme de structures toroïdales d'environ 60 kb d'ADN, résulte du remplacement des histones par des protamines (Fuentes-Mascorro et coll., 2000). Pour ce faire, les histones sont d'abord acétylées afin de réduire les interactions électrostatiques avec l'ADN et permettre une décondensation. Les histones sont ensuite exposées à des enzymes protéolytiques, remplacées par des protéines de transition (TP1 et TP2), et enfin par les protamines. Ce remplacement, qui se produit à mi-temps de la spermiogenèse (*e.g.* aux étapes 12-13 de l'élongation du spermatide chez le rat), requiert l'activité d'une nucléase endogène (possiblement l'ADN topo-isomérase II) pour créer des brisures simple brin dans l'ADN. Ces cassures sont nécessaires afin d'enlever les torsions de l'ADN et d'aider à la transition « histones-protamines » ainsi qu'à la condensation (McPherson et Longo, 1992-1993). Ces cassures sont finalement réparées par une enzyme non encore identifiée. Une étude récente



propose que les protéines de transition TP1 y joueraient un rôle particulier, possiblement en tant que facteur d'alignement de l'ADN (Caron et coll., 2001).

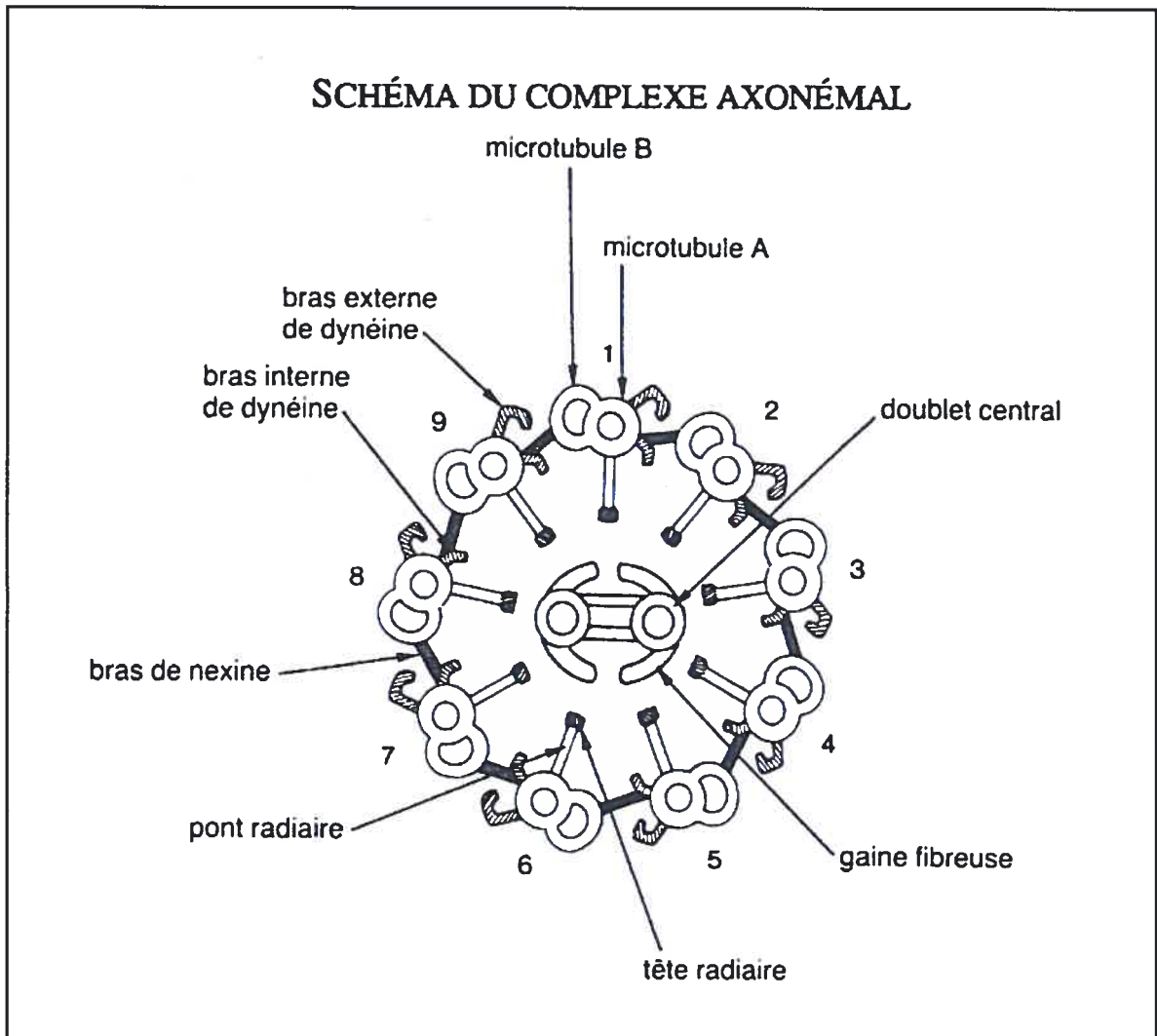
Les protamines ont des masses moléculaires relatives d'environ la moitié de celles des histones; elles sont codées de gènes qui s'expriment seulement dans les cellules germinales. Leur caractère basique (charges positives dues aux résidus arginine et lysine) leur permet d'interagir fortement avec les groupements phosphates de l'ADN, favorisant ainsi une plus grande compaction de la chromatine en diminuant les répulsions électrostatiques. De plus, les protamines contiennent plusieurs résidus cystéine qui généreront des ponts disulfures inter-moléculaires, ce qui contribuera aussi à la compaction de l'ADN (Balhorn, 1982; Eddy, 2002). Cet état de la chromatine assure la protection du génome masculin et une organisation permettant l'expression des gènes spécifiques lors du début de l'embryogenèse (McPherson et Longo, 1992 et 1993).

Théoriquement, l'évolution normale de la lignée germinale devrait produire 16 spermatozoïdes à partir d'une spermatogonie (Thibault et Levasseur, 2001). Cependant, le rendement réel est plus bas, dû à l'apoptose cellulaire nécessaire à l'élimination de cellules anormales et au maintien de l'homéostasie avec les cellules de Sertoli. Ce phénomène sera décrit plus en détail à la section 1.3.2.

### 1.2.3 Maturation des spermatozoïdes

Suite à la spermiation, les spermatozoïdes ne sont ni mobiles ni aptes à féconder : ils doivent séjourner dans l'épididyme afin de compléter leur maturation. Puisqu'ils ne peuvent effectuer de transcription et que leur taux de traduction est presque nul, ils ne peuvent produire les protéines nécessaires à cette maturation, comme le feraient des cellules somatiques. L'acquisition de leurs nouvelles fonctions, par des mécanismes encore mal précisés, résulte donc d'interactions avec des constituants du milieu épидидymaire tels des glycoprotéines, l'acide sialique et la glycéryl-phosphorylcholine (Stevens et Lowe, 1997).

Les spermatozoïdes acquièrent leur aptitude à la mobilité linéaire seulement à la sortie du testicule, après un contact avec les protéines sécrétées par l'épididyme (*e.g.*  $\alpha$ -glucosidase neutre) et les glandes annexes (*e.g.* antigène spécifique de la prostate (de façon indirecte)) (Elzanaty et coll., 2002). La mobilité dépend essentiellement de l'activité du complexe axonémal, présent sur toute la longueur du flagelle des spermatozoïdes, et composé de microtubules de tubuline A et B. Le mouvement résulte des glissements de ces microtubules qui suivent des cycles d'accrochage et de décrochage des bras de dynéine sur les microtubules B adjacents. Un schéma du complexe axonémal est présenté à la figure 3. L'énergie nécessaire au mouvement résulte de l'hydrolyse de l'ATP par la dynéine (ATPase) (Thibault et Levasseur, 2001).



*(Tiré de Thibault et Levasseur, 2001)*

**Figure 3:** Schéma du complexe axonémal de la queue du spermatozoïde.

Durant leur transit dans l'épididyme, les spermatozoïdes subissent aussi une organisation finale de la chromatine suite à l'accroissement du nombre de ponts disulfures entre les protamines, permettant ainsi la réduction définitive du volume du noyau. Ils seront entreposés en dernier lieu dans la partie caudale de l'épididyme et dans l'ampoule des canaux déférents, jusqu'à la prochaine éjaculation (Fuentes-Mascorro et coll., 2000).

#### **1.2.4 Les spermatozoïdes matures**

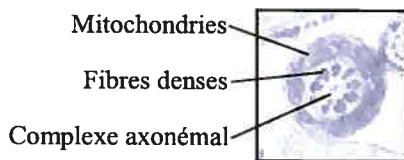
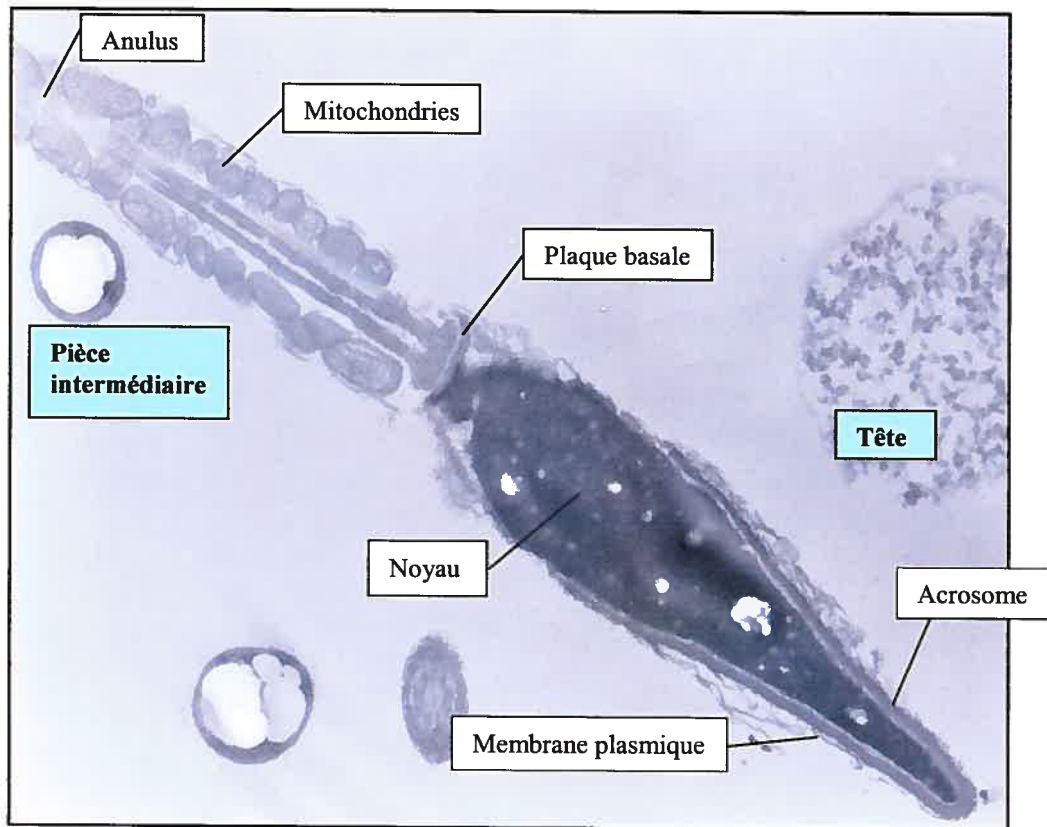
Découverts simultanément en 1678 par Leewenhoek et Hartsoeker, les spermatozoïdes ont d'abord été considérés comme des animalcules vivant dans le sperme et n'ayant aucun lien avec la reproduction. Quelques années plus tard, ces mêmes découvreurs vinrent à penser que chaque spermatozoïde contenait un embryon complet préformé (l'homonculus). Cependant, la plupart des chercheurs de l'époque ne leur attribuaient que peu d'importance. Ce n'est qu'à la fin des années 1700 qu'on a suggéré leur implication dans la fécondation, et seulement en 1896 qu'il a été démontré que le spermatozoïde entrait dans l'ovocyte pour réaliser l'union des 2 noyaux gamétiques cellulaires (revue par Gilbert, 1996).

La fonction et la structure des spermatozoïdes sont maintenant bien connues. Leur observation en microscopie optique montre une tête ovalaire ou aplatie selon l'angle d'orientation, et un flagelle. On peut distinguer le noyau dense recouvert au 2/3 antérieur

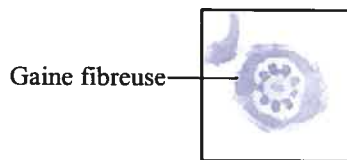
par l'acrosome. Ce dernier libérera les enzymes facilitant la pénétration de la zone pellucide de l'ovocyte lors de la fécondation.

Le flagelle est relié à la tête au niveau du col. Il comprend une pièce intermédiaire contenant une gaine de mitochondries allongées et disposées en spirale autour des fibres denses, une pièce principale et une pièce terminale. L'axonème, essentiellement un long cil spécialisé avec neuf doublets de tubules périphériques et une paire centrale, se prolonge sur toute la longueur du flagelle (Stevens et Lowe, 1997). La figure 4 présente un schéma d'un spermatozoïde mature tel qu'il apparaît en microscopie électronique.

a) Micrographie 10400X de la tête et de la pièce intermédiaire d'un spermatozoïde humain.



b) Micrographie 4400X d'une coupe transversale du flagelle au niveau de la pièce intermédiaire.



c) Micrographie 7100X d'une coupe transversale du flagelle au niveau de la pièce principale.



d) Micrographie 7100X d'une coupe transversale du flagelle à la fin de la pièce principale.

**Figure 4 :** Photos en microscopie électronique d'un spermatozoïde mature ainsi que des différentes parties de son flagelle. (Spermatozoïde témoin, traité au PBS et centrifugé)

### 1.3 Les spermicides

#### 1.3.1 Historique et généralités

Les spermicides sont les plus vieux contraceptifs au monde. En Égypte, on a découvert sur un papyrus datant de 1500 avant J.-C. la recette pour préparer un contraceptif : « mélanger du miel à des excréments de crocodiles et en imbiber un linge que l'on introduit dans le vagin » (Finch et Hugh, 1967). On sait aujourd'hui que l'action des bactéries sur le sucre produit beaucoup d'acide lactique, la diminution du pH causant ainsi la mort des spermatozoïdes.

Les développements de la chimie ont permis la commercialisation de spermicides au cours des années 1930. Après un maximum d'utilisation de cette méthode contraceptive au cours des années 1950, elle a connu une défaveur dans les années 1960 avec l'apparition de la pilule contraceptive (Creinin et Keith, 1994).

Au début des années 1980, l'utilisation des spermicides (nonoxynol-9, diisobutylphénoxy polyéthoxyéthanol, octoxynol, tri-isopropylphénoxydécaéthoxyéthanol) a causé une grande frayeur: quelques publications les ont associés à certaines anomalies congénitales (syndrome de Down, défauts pulmonaires, hypospadias, *etc.*). L'effet délétère pouvait théoriquement s'exercer sur les spermatozoïdes eux-mêmes, sur l'ovocyte via une absorption dans le système sanguin, ou sur l'embryon si la femme continuait à utiliser le spermicide après la fécondation (Jick et coll., 1981; Huggings et coll., 1982). Cependant,

plusieurs études ultérieures ont démontré que les spermicides généralement utilisés dans la population n'étaient nullement impliqués dans des effets indésirables sur le développement de l'embryon ou du fœtus en cas de grossesse accidentelle (Louik et coll., 1987; Einarson et coll., 1990; Linn et coll., 1983).

L'utilisation des spermicides offre de nombreux avantages tels la facilité d'accès (vente libre), un minimum d'effets toxiques, la simplicité d'utilisation, leur propriété lubrifiante et le faible coût. Selon les études et les populations cibles, leur efficacité contraceptive se situe entre 79 et 94% (indice de Pearl moyen: 15,3 grossesses/100 années-femmes) (Creinin et Keith, 1994; Trussell et Vaughan, 1999), les échecs étant surtout attribués à une mauvaise utilisation plutôt qu'à une pauvre activité du spermicide (Lee, 1996). Le fait que cette méthode soit entièrement sous le contrôle féminin représente un autre atout non négligeable : les femmes peuvent ainsi s'assurer d'une certaine protection contre la grossesse et les maladies transmises sexuellement (MTS) dans les cas où le partenaire ne voudrait pas utiliser le condom. Notons toutefois que le condom reste la méthode contraceptive la plus efficace contre les MTS (Courtot et coll., 1994).

Vers la fin des années 1980, ce moyen contraceptif a regagné en popularité suite à des études *in vitro* énonçant ses propriétés bactéricides et virucides contre plusieurs agents pathogènes transmis sexuellement. Par exemple, le nonoxynol-9, l'agent spermicide le plus utilisé dans le monde, dissout la membrane du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Malkovsky et coll., 1988), de *Chlamydia trachomatis* (Judson et coll., 1989), du virus de



l'herpès simplex (Judson et coll., 1989), de *Neisseria gonorrhoeae* (Bolch et Warren, 1973) et aide même à diminuer les risques de cancer du col utérin par son action sur le papillomavirus humain (Celentano et coll., 1987). Le chlorure de benzalkonium, un autre agent spermicide, a aussi la propriété de désactiver le VIH (Wainberg et coll., 1990), ce qui suggère que l'usage de spermicides pourrait aider à prévenir la transmission des MTS.

Par contre, des études récentes montrent qu'une utilisation fréquente de spermicide peut amener une irritation des parois vaginales et de l'exocol, ce qui risque de faciliter la transmission du VIH par le recrutement de cellules du système immunitaire, hôtes de ce virus (*e.g.* lymphocytes T, macrophages) (Fichorova et coll., 2001; Patton et coll., 1999). La concentration en nonoxynol-9 dans les préparations de spermicides disponibles sur le marché est 300 fois plus élevée que celle nécessaire pour tuer les spermatozoïdes; diminuer les doses d'agent actif dans les préparations de spermicides serait primordial pour rendre cette méthode plus sécuritaire (Courtot et coll., 1994).

Plusieurs études cliniques s'intéressant à l'effet protecteur des spermicides contre les MTS se contredisent, probablement dû au fait qu'elles n'utilisent pas les mêmes formes de spermicides et portent sur des populations différentes (éditorial de Richardson, 2002). Par exemple, 2 études ont trouvé un effet protecteur du nonoxynol-9 contre la gonorrhée (Rosenberg et coll., 1987; Kreiss et coll., 1992), 2 autres n'ont constaté aucun effet (Niruthisard et coll., 1992; Roddy et coll., 2002), et une a observé que le spermicide faciliterait ce type d'infection (Richardson et coll., 2001).

### 1.3.2 Types et modes d'action des spermicides

Que les préparations de spermicides soient sous forme de mousse, de crème, de gelée, de suppositoire, de film ou d'éponge contraceptive, elles se composent toujours de l'agent spermicide qui interfère avec l'activité fonctionnelle des spermatozoïdes ainsi que d'un excipient. Ce dernier sert de véhicule à l'agent actif et permet de le maintenir à l'intérieur du vagin. Certains excipients peuvent également contribuer à l'effet contraceptif en empêchant les spermatozoïdes d'entrer en contact direct avec la glaire cervicale (Creinin et Keith, 1994).

Différents types d'agents spermicides peuvent être utilisés comme principe actif en contraception vaginale; les principaux sont présentés au tableau I. Le plus couramment utilisé à travers le monde, le nonoxynol-9, ainsi que le nouveau spermicide que nous avons utilisé dans cette étude, le FTDBA (fluorure de tétradécyl-diméthyl-benzyl ammonium ou fluorure de myristalkonium), font partie de la catégorie des surfactants. Les structures moléculaires de ces deux agents spermicides sont présentées à la figure 5. Ils se caractérisent par une longue chaîne hydrocarbonée capable de pénétrer facilement la portion phospholipidique de la membrane plasmique du spermatozoïde. Cette propriété tensioactive augmente la perméabilité cellulaire et cause un déséquilibre osmotique, provoquant de ce fait même la perte de mobilité du spermatozoïde (Creinin et Keith, 1994). Dans le cas du FTDBA, un surfactant cationique, la partie chargée de la molécule interagit

avec les protéines membranaires, par exemple la protéine G, interaction qui influence la prolifération de nombreuses cellules somatiques (Patarca et Fletcher, 1995).

### 1.3.3 Tests pour évaluer l'activité des spermicides

Avant qu'un spermicide ne soit mis sur le marché, il doit satisfaire à des normes strictes d'efficacité et de sécurité. Les tests *in vitro* sont utilisés afin de vérifier leur efficacité sur les spermatozoïdes. La première méthode standardisée a été le test de Sander-Cramer qui consiste à déterminer si un traitement avec des concentrations décroissantes de spermicide peut tuer ou immobiliser tous les spermatozoïdes d'un échantillon de sperme, et à vérifier que l'immobilisation demeure irréversible après l'ajout de glucose. Si la moindre mobilité persiste, la dilution testée échoue le test spermicide (pour une revue des tests *in vitro* avec spermicide, voir Lee, 1996). Si une substance échoue (à une dilution 1/11) à l'immobilisation complète des spermatozoïdes en moins de 20 secondes, elle n'est pas acceptable en tant qu'agent spermicide, dû à la rapidité avec laquelle les spermatozoïdes pénètrent dans la glaire cervicale et gagnent la sécurité de l'endocol (Green et coll., 2001).

Des avancées technologiques permettent aujourd'hui de mesurer avec précision les caractéristiques des spermatozoïdes suite à une exposition à un spermicide. Ainsi, le CASA « computer-assisted semen analysis » évalue le type de mobilité, l'angle de déplacement latéral de la tête, la numération et la morphologie. Cette technique, basée sur la vidéo-micrographie, rend possible une analyse rapide d'une grande population de

spermatozoïdes. Ce système aide aussi à évaluer la mobilité de façon objective comparativement à l'observation visuelle (Lee, 1996).

La cytométrie en flux permet une analyse rapide de propriétés importantes des spermatozoïdes grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques et de fluorochromes. Par exemple, la viabilité des spermatozoïdes peut être déterminée par l'iodure de propidium (PI), un fluorochrome s'incorporant seulement dans l'ADN des spermatozoïdes morts. En choisissant les fenêtres d'intensité de fluorescence, les résultats sont plus objectifs; de surcroît, en analysant des milliers de cellules en quelques secondes, l'erreur s'en trouve diminuée (Yamamoto et coll., 1998; Lee, 1996).

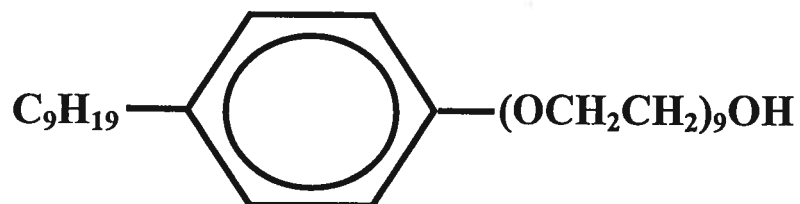
La membrane plasmique des spermatozoïdes doit obligatoirement être fonctionnelle pour que se réalisent la capacitation, la liaison à la zone pellucide de l'ovocyte, ainsi que la réaction acrosomiale. Son intégrité, suite à un traitement par un spermicide, peut être vérifiée à l'aide du test de gonflement hypoosmotique (« hypoosmotic swelling test »). Cette technique est basée sur le fait qu'un spermatozoïde dont la membrane plasmique au niveau du flagelle est non endommagée, permet un passage de l'eau à l'intérieur de la cellule en condition hypoosmotique; ce gonflement implique que le spermatozoïde est intact et fonctionnellement actif. Cette propriété rend donc possible l'évaluation de l'effet d'un spermicide (Lee, 1996).

<b>TYPES DE SPERMICIDES</b>	<b>PRINCIPE D'ACTIVITÉ</b>	<b>EXEMPLES DE COMPOSÉS</b>
<b>Électrolytes</b>	Diminution importante du métabolisme des spermatozoïdes en milieu hypertonique.	Aucun produit commercial
<b>Agents réagissant avec les groupements sulfydryles</b>	Perturbation des fonctions cellulaires par : -oxydation -alkylation des groupements sulfydryles -formation de mercaptides	Acétate de mercure (Koromex, retiré du marché)
<b>Agents bactéricides</b>	Immobilisation des spermatozoïdes.	Chlorure de benzéthonium (Mousse Emco)
<b>Surfactants</b>	Immobilisation suite à l'augmentation de la perméabilité membranaire.	-Nonylphénoxy polyéthoxyéthanol (Nonoxynol-9) -Fluorure de tétradécyl-diméthylbenzyl ammonium (FTDBA ou fluorure de myristalkonium) -Chlorure d'alkylbenzyl diméthylammonium (Chlorure de benzalkonium)

*(Tiré en partie de Creinin et Keith, 1996)*

**Tableau I :** Les différents types de spermicides et leurs modes d'action.

a) Nonoxynol-9 (nonylphénoxy polyéthoxyéthanol)



b) Fluorure de tétradécyl-diméthyl-benzyl ammonium (FTDBA) ou  
Fluorure de myristalkonium (MKF)

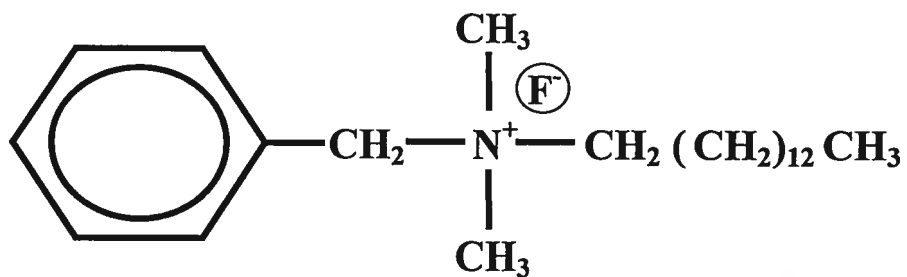


Figure 5 : Structures moléculaires du Nonoxynol-9 et du FTDBA.

L'état de la membrane peut aussi être vérifié par cytométrie en flux en utilisant une combinaison de diacétate de carboxyfluorescéine (CFDA) et de PI. Le CFDA est incorporé dans les cellules dont la membrane est intacte, puis converti par des estérases intracellulaires en un composé fluorescent vert, la carboxyfluorescéine. Donc, les spermatozoïdes dont la membrane est intacte seront verts alors que les autres apparaîtront rouges à cause du marquage par le PI (Pena et coll., 1998).

Les tests *in vivo* sont réalisés pour vérifier le niveau requis de sécurité d'un spermicide avant de passer à l'utilisation humaine. Ils sont basés sur des observations toxicologiques et tératogéniques, après insertion intravaginale des composés à des animaux (*e.g.* primates, rates, lapines) (Chvapil et coll., 1980; Patton et coll., 1999).

## **1.4 La fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes éjaculés**

Trois mécanismes ont été proposés pour expliquer l'existence d'une fragmentation dans l'ADN des spermatozoïdes éjaculés.

### **1.4.1 Défauts lors de la transition des histones aux protamines**

Le premier mécanisme impliquerait un processus anormal de compaction de l'ADN. En effet, la compaction requiert l'activité d'une nucléase endogène pour créer des brisures simple brin dans l'ADN afin de faciliter son déploiement en vue de la protamination et de la condensation, ainsi que celle d'une ligase et de TP1 pour aider à réparer ces cassures (voir les détails à la section 1.2.2). Une maturation nucléaire incomplète durant la spermiogenèse pourrait donc entraîner la persistance de brisures dans l'ADN des spermatozoïdes matures.

De plus, l'extrême compaction de l'ADN des spermatozoïdes procure un certain degré de protection contre les dommages au génome gamétique. Une condensation défectueuse pourrait ainsi causer une susceptibilité accrue de l'ADN aux dommages induits par divers agents telle l'exposition à des toxines environnementales (McPherson et Longo, 1992-1993; Caron et coll., 2001).



### 1.4.2 Processus apoptotique inachevé

Une apoptose incomplète au cours de la spermatogenèse représente une autre source potentielle de brisures dans l'ADN. L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est le processus par lequel les cellules activent un programme intrinsèque de mort afin de se tuer elles-mêmes, de manière contrôlée et sans provoquer de réponse inflammatoire. La plupart des cellules nucléées des mammifères sont capables d'entrer en apoptose en exprimant toutes les protéines nécessaires à la mort cellulaire. Il est tout à fait normal que les cellules germinales des testicules entrent en apoptose continuellement tout au long de la vie d'un homme. Près de 75% des spermatogonies A et 20% des cellules germinales aux stades entre les spermatocytes de premier ordre et les spermatides seraient ainsi éliminées. Au début de la puberté, il se produirait même une vague d'apoptose massive des spermatogonies, indispensable pour le déclenchement et la poursuite d'une spermatogenèse normale (pour une revue récente sur l'apoptose au cours de la spermatogenèse, voir Levy et Seifer-Aknin, 2001).

Un processus apoptotique normal serait déclenché dans les cellules germinales lorsqu'elles sont défectueuses ou que leur nombre excède la capacité des cellules de Sertoli à les supporter. Ces dernières ne se divisant pas, elles ne peuvent supporter qu'un nombre restreint de cellules germinales à la fois. Le nombre de spermatogonies entrant en méiose est donc limité afin de maintenir l'homéostasie : tout surplus se voit éliminé par apoptose. Lorsque le signal de mort cellulaire est donné, le ligand de Fas (FasL), une protéine

exprimée à la surface des cellules de Sertoli, se fixe au récepteur Fas (CD95 ou APO-1) ancré dans la membrane plasmique des cellules germinales. La formation du complexe active la voie de signalisation impliquant les caspases et peut provoquer l'apoptose à tous les niveaux de la spermatogenèse. À ce jour, on ne connaît pas encore les mécanismes moléculaires qui provoquent l'activation du FasL (Sakkas et coll., 1999b; Rodriguez et coll., 1997; Levy et Seifer-Aknin, 2001). D'autres systèmes, tel les proto-oncogènes (*e.g.* : *Bcl-2*), pourraient aussi être à l'origine du déclenchement de l'apoptose (Levy et Seifer-Aknin, 2001).

La fragmentation de l'ADN survient à une phase tardive du processus apoptotique, suite à l'activation d'endonucléases endogènes (Ramos et Wetzels, 2001). C'est pourquoi une apoptose incomplète lors de la spermatogenèse peut amener la présence de fragments dans l'ADN des spermatozoïdes éjaculés. Ce phénomène pourrait être dû à une mauvaise synchronisation entre le processus apoptotique et la spermatogenèse; même si le processus apoptotique est initié, le spermatocyte entre en spermiogenèse alors que l'apoptose se complète. De ce fait, on observe de la fragmentation dans l'ADN des spermatozoïdes éjaculés.

D'autres signes d'un processus apoptotique incomplet sont possibles sous forme d'anomalies dans la chromatine, d'une composition anormale en protamines, ainsi que de rétentions cytoplasmiques (Sakkas et coll., 1999b).

Dans les spermatozoïdes matures, l'apoptose ne peut pas être déclenchée car l'ADN est tellement condensé qu'aucune activité de transcription n'y est possible; les protéines nécessaires à l'apoptose ne peuvent donc pas être formées (Ramos et Wetzels, 2001).

### 1.4.3 Présence de substances oxygénées réactives (SOR)

Un troisième mécanisme veut que les brisures dans l'ADN des spermatozoïdes résultent d'une surproduction de SOR (Twigg et coll., 1998a) par des spermatozoïdes anormaux ou par des leucocytes (Barroso et coll., 2000). Les SOR provenant d'une source externe au sperme pourraient aussi causer des dommages. Ils sont définis comme étant des molécules comportant un ou plusieurs atomes d'oxygène activés soit sous la forme d'un radical (molécule ayant un électron non apparié sur l'orbital externe; *e.g.* anion superoxyde ( $O_2^-$ ), radical hydroxyle ( $HO\cdot$ )) ou d'un peroxyde (*e.g.* peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )) (Punchard et Kelly, 1996).

Le  $O_2^-$  et le  $HO\cdot$  sont impliqués dans de nombreux effets toxiques pour l'ADN. Il a été suggéré qu'ils seraient mutagènes et qu'ils pourraient causer des délétions chromosomiques ainsi que des échanges de chromatides sœurs. Ils pourraient attaquer l'ADN autant au niveau des sucres que des bases azotées. L'atteinte des sucres résulterait en une cassure avec un résidu terminal de sucre fragmenté. Le  $H_2O_2$ , quant à lui, attaquerait surtout les bases de l'ADN, qui sont sensibles au stress oxydatif (Donnelly et coll., 1999). Leur peroxydation pourrait causer des cassures ou du « cross-linking » dans l'ADN et

amener une interruption de la transcription, de la traduction et de la réplication suite à la fécondation (Kodama et coll., 1997).

Les spermatozoïdes sont vulnérables aux SOR puisque leur cytoplasme est pauvre en systèmes enzymatiques protecteurs tels la glutathion peroxydase, la catalase et la superoxyde dismutase (Zini et coll., 1993). De plus, leur membrane renferme beaucoup d'acides gras polyinsaturés, nécessaires à la fluidité (Lopes et coll., 1998a); ils sont donc plus vulnérables car les acides gras polyinsaturés peuvent servir de substrats à la peroxydation des lipides et pourrait ainsi contribuer à l'oxydation de l'ADN (Fraga et coll., 1991).

Il a aussi été démontré que la quantité de SOR capables de causer des dommages significatifs à l'ADN des spermatozoïdes n'est pas suffisante pour endommager leur membrane. Un spermatozoïde peut donc conserver sa capacité à féconder l'ovocyte mais porter des brisures d'ADN directement transmises au zygote (Duru et coll., 2000; Ahmadi et Ng, 1999).

## **1.5 Techniques de détection des dommages à l'ADN**

### **1.5.1 Dosage de la 8-hydroxy-2'-désoxyguanine**

Les dommages oxydatifs à l'ADN des spermatozoïdes peuvent être détectés en dosant, par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ou par chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse (GC/MS), un des 20 principaux produits de l'oxydation de l'ADN : la 8-hydroxy-2'-désoxyguanine (8-OHdG). Cette technique est appliquée à l'étude de différents tissus humains afin d'estimer l'exposition d'un individu à des conditions oxydantes associées au style de vie, aux toxines environnementales, aux prédispositions génétiques et aux maladies dégénératives (Fraga et coll., 1991; Kodama et coll., 1997; Shen et Ong, 2000).

### **1.5.2 Traduction de brèche (« Nick translation »)**

Différentes techniques existent pour détecter la présence de cassures de l'ADN des spermatozoïdes matures éjaculés. Entre autres, il y a la technique de traduction de brèche, mieux connu sous le vocable de « nick translation ». Elle consiste à utiliser l'enzyme ADN polymérase I d'*Escherichia coli* (DNA Pol I) qui catalyse la synthèse de l'ADN dans le sens 5'→3' à partir des désoxyribonucléosides triphosphates et en recopiant la séquence d'une matrice d'ADN. Le désavantage de cette enzyme réside en ce qu'elle dépend d'une

amorce et d'une matrice. Elle ne peut donc pas marquer tous les types d'extrémités de l'ADN, comme les bouts francs par exemple (Sakkas et coll., 1999a).

### **1.5.3 Le test comète (« Comet assay »)**

Le test comète, ou gel électrophorétique sur cellule unique, est une technique visuelle en fluorescence qui peut être utilisée afin de vérifier la présence de cassures double et simple brin dans l'ADN d'un seul spermatozoïde à la fois. Cette technique consiste à emprisonner un spermatozoïde dans l'agarose, à lyser sa membrane et briser sa matrice de protéines. L'ADN est ensuite soumis à un champ électrophorétique et migre pour former une queue ressemblant à une comète (d'où le nom de la technique) sortant de la tête du spermatozoïde. Ensuite, le gel est trempé dans un colorant fluorescent qui se lie spécifiquement à l'ADN, par exemple le bromure d'éthidium. Une traînée d'ADN peut alors être observée sous microscope à fluorescence. D'après la forme et la densité de cette queue, il est possible de déterminer le niveau de fragmentation de l'ADN du spermatozoïde (Collins et coll., 1997; Shen et Ong, 2000). Une représentation de résultats obtenus à l'aide de cette technique est présentée à la figure 6.

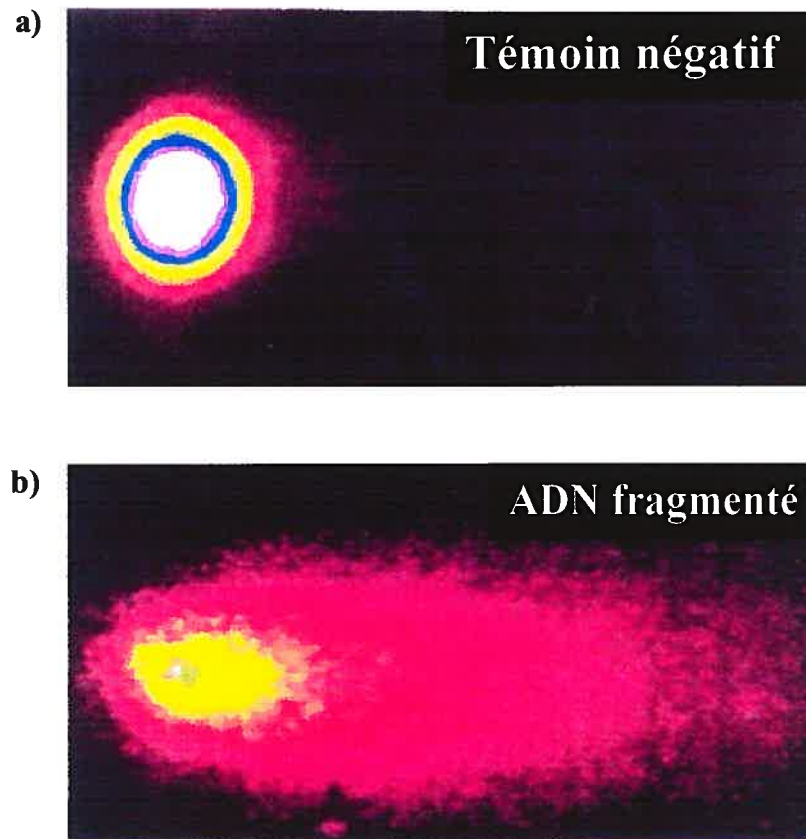
Bien que le test comète soit considéré comme l'un des plus sensibles, des plus simples, des moins coûteux et des plus reproductibles pour la détection de fragments d'ADN, il comporte tout de même le désavantage de n'observer qu'un seul spermatozoïde

alors que nous savons que la population de spermatozoïdes dans un éjaculat est très hétérogène (Sakkas et coll., 1999a).

#### **1.5.4 « Sperm chromatin structure assay » (SCSA)**

Le « sperm chromatin structure assay » (SCSA) mesure la susceptibilité de l'ADN à se dénaturer *in situ* en milieu acide ou à la chaleur, et est efficace pour observer les dommages à l'ADN. Cette technique utilise l'acridine orange, un fluorochrome spécifique à l'ADN. Une structure anormale de l'ADN est quantifiée par cytométrie en flux par l'observation du changement métachromatique de la fluorescence verte (ADN double brin) à rouge (ADN simple brin, dénaturé). Le traitement au milieu acide cause une dénaturation partielle de l'ADN seulement dans les spermatozoïdes qui ont une structure de chromatine altérée ou une fragmentation dans leur ADN. Donc, une fluorescence verte est associée à un bas niveau de fragmentation de l'ADN alors qu'une fluorescence rouge est associée à un niveau modéré ou haut de fragmentation. Ce procédé est souvent utilisé pour vérifier l'effet d'une exposition à un agent toxique (Evenson et Jost, 2000; Gorczyca et coll., 1993).

## Test Comète



(Tiré de [www.caf.wvu.edu/wvafes/cytogeni.htm](http://www.caf.wvu.edu/wvafes/cytogeni.htm), 2000)

**Figure 6:** Types de résultats obtenus à partir de la technique « Comet assay ». En a, un témoin négatif n'ayant pas de fragmentation dans son ADN. En b, une cellule contenant beaucoup de brisures dans son ADN. (Cellules sanguines périphériques humaines)



### 1.5.5 Technique TUNEL

Nous avons choisi d'utiliser la technique TUNEL (terminal uridine nick end-labeling) parce qu'elle semblait la plus appropriée à nos besoins (simple, rapide, reproductible). Cette technique était originellement destinée à la détection de fragments d'ADN résultant de l'apoptose dans les cellules somatiques. Ce n'est que récemment qu'on a commencé à l'utiliser pour la détection de fragments d'ADN dans les spermatozoïdes.

Cette méthode utilise l'enzyme désoxyribonucléotidyle exotransférase (TdT) pour catalyser l'addition de multiples désoxyuridines triphosphates (couplés à des molécules de biotine), à chaque fonction alcool 3'OH de l'ADN simple ou double brins. En présence de magnésium ( $Mg^{+2}$ ), cette enzyme a la propriété de ne pas avoir besoin de matrice pour fonctionner; elle peut donc marquer tous les types d'extrémités 3'OH (bouts francs, extrémités 3'OH rentrantes, *etc.*). Les cassures de l'ADN peuvent ensuite être détectées par cytométrie en flux ou microscopie à fluorescence après avoir ajouté de la streptavidine (couplée à la fluorescéine), laquelle a une affinité extrêmement spécifique et élevée pour la biotine (Sakkas et coll., 1999a; Gorczyca et coll., 1993). Donc, plus le taux de fragmentation est élevé, plus grande sera l'intensité de fluorescence.

## 2. Objectifs de l'étude

Debbasch et coll. (1999) ont observé que l'exposition de cellules conjonctivales en culture à de faibles concentrations d'ammonium quaternaire induit une synthèse de substances oxygénées réactives (SOR) (peroxyde d'hydrogène et d'anion superoxyde). Comme il est maintenant bien établi que les SOR peuvent endommager l'ADN, il devenait donc important de vérifier si le nouvel agent spermicide, le fluorure de tétradécyl-diméthylbenzyl ammonium (FTDBA), pouvait endommager l'ADN des spermatozoïdes suite à une production de SOR.

Dans la littérature, nous n'avons trouvé aucun test *in vitro* permettant de vérifier si les spermicides, en cas d'exposition à une dose sublétales, pouvaient causer des brisures dans l'ADN des spermatozoïdes. Les dommages à l'ADN des spermatozoïdes ne sont pas toujours associés à une baisse de la mobilité ou de la viabilité (Fraga et coll., 1991). Comme il n'y a aucune activité de réparation de l'ADN dans les spermatozoïdes matures, toute lésion induite dans leur ADN se retrouvera à l'intérieur de l'ovocyte lors de la fécondation. Un spermatozoïde porteur d'un ADN ainsi altéré pourrait alors compromettre soit le processus de fécondation, le développement embryonnaire et fœtal ou encore augmenter les risques de maladies génétiques et même de cancers infantiles (Sakkas et coll., 1999a; Fraga et coll., 1991). Quelque 60% des grossesses issues d'un échec de la contraception étant menées à terme, il devient crucial de s'assurer que l'utilisation de spermicides ne comporte aucun risque pour les futurs enfants (Creinin et Keith, 1994).

L'objectif principal de notre étude était de vérifier si l'exposition des spermatozoïdes à une dose sublétales de FTDBA peut causer une fragmentation de leur ADN. Nos échantillons de sperme provenaient d'hommes affirmant avoir déjà induit une grossesse.

Les résultats obtenus par la technique TUNEL indiquant une augmentation du degré de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes exposés au FTDBA, nous avons poursuivi

- les objectifs :
- 1) d'analyser la fragmentation par électrophorèse de l'ADN,
  - 2) de mesurer la fragmentation par une technique enzymatique sur l'ADN purifié,
  - 3) de visualiser en microscopie électronique l'état de condensation du noyau des spermatozoïdes traités au FTDBA,
  - 4) de déterminer si le FTDBA peut induire la formation de substances oxygénées réactives par les spermatozoïdes.

### **3. Article soumis à « Contraception », juin 2003**

#### **INNOCUITY OF TETRADECYL-DIMETHYL-BENZYL AMMONIUM FLUORIDE ON THE DNA OF SPERMATOZOA**

G. Laforest, M. Sergerie and G. Bleau

Département d'Obstétrique-Gynécologie, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Hôpital Saint-Luc, Montréal, Québec, Canada.

This study was supported by a grant from Philip Morris External Research Program and by Centre de recherche du CHUM – Hôpital Saint-Luc, Montréal, Québec, Canada.

G.L. received a studentship from Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ).

Reprint requests : Gilles Bleau, Ph.D.  
Centre de recherche du CHUM  
Hôpital Saint-Luc  
264, boul. René-Lévesque est  
Montreal, Québec, Canada H2X 1P1  
Tel: 514-890-8000 (35820)  
FAX: 514-412-7314  
E-mail: [REDACTED]

**Abstract**

Tetradecyl-dimethyl-benzyl-ammonium fluoride (TDBAF) is a powerful new spermicide. This fluoride salt of a quaternary ammonium causes irreversible loss of sperm motility by inducing cell necrosis and enzyme inhibition.

In cases of failure of local contraception, there is a theoretical risk that a spermatozoon exposed to a sublethal concentration of spermicide might suffer DNA strand breaks, with transmission of damaged DNA to the oocyte. The present study aims to ascertain innocuity of TDBAF in this regard.

Spermatozoa from 32 fertile men were exposed to a sublethal concentration of TDBAF, individually determined by a modified Sander-Cramer assay. The degree of DNA fragmentation was measured by the TUNEL assay (labeling of 3'OH termini using terminal transferase), followed by flow cytometry. DNA integrity was also assessed by pulsed field electrophoresis of purified sperm DNA, as well as its enzymatic radioisotopic ( $\alpha^{35}\text{S}$  ATP) labeling. Production of reactive oxygen species (ROS) was measured by chemiluminescence.

With the TUNEL assay, a significant increase in sperm labeling was observed after TDBAF treatment compared to controls ( $p < 0.001$ ), suggesting increase DNA fragmentation. Antioxidants (vitamin E or superoxide dismutase) failed to prevent this increase, and TDBAF did not stimulate ROS production by normal spermatozoa.

Pulsed field electrophoresis showed no evidence of increased DNA fragmentation in TDBAF-treated sperm. Likewise, enzymatic labeling of purified DNA demonstrated equal numbers of 3'OH termini in control and TDBAF-treated sperm.

As shown by electron microscopy, TDBAF at sublethal concentration causes sperm chromatin decondensation. In the TUNEL assay, this phenomenon allows easier access of terminal transferase to its DNA substrate, thus explaining the apparent increase in DNA fragmentation in the presence of TDBAF.

In conclusion, the use of TDBAF as a spermicide does not place progeny at increased risk of abnormalities should pregnancy occur. Concerning the TUNEL assay, we propose that pretreatment of spermatozoa with TDBAF allows a more accurate measure of sperm DNA fragmentation.

**Keywords:** DNA fragmentation, TUNEL, spermatozoa, spermicide.

## Introduction

Whether used alone or as adjunct to physical barriers, spermicides remain key elements in the armamentarium of local contraception. Because of their powerful effect on spermatozoa, surfactants, of which Nonoxynol-9 is the prototype, rapidly became the most widely used spermicidal agents [1]. They act first by disrupting the phospholipid bilayer of the plasma membrane, thus increasing in cell permeability conducive to osmotic imbalance and irreversible loss of sperm motility [2].

Benzalkonium chloride, a cationic detergent with a wide and powerful microbicidal activity, has also been used as a spermicidal drug in various countries for more than 30 years. This compound is known for its lack of toxicity at recommended doses. Because of the urgent need to develop new spermicides that combine high contraceptive efficacy and protective effect against sexually transmitted diseases, especially HIV infection, quaternary ammoniums are regaining in popularity. In this regard, we recently tested the fluoride salt of the C-14 homologue of benzalkonium, namely tetradecyl-dimethyl-benzyl ammonium fluoride (TDBAF). Preliminary results and those presented herein demonstrated powerful spermicidal as well as bactericidal and virucidal activities.

The safety of spermicides is a critical issue. On this regard, reports in the early 1980 raised concern that the use of Nonoxynol-9 during the periconception period could be associated with adverse fetal outcomes. This could have significant impact since



contraception with spermicidal agents fails in 6 to 21% of cases. The possibility of fertilization by a damaged spermatozoon or an effect of the spermicide on the oocyte or developing embryo after absorption in blood has been invoked. More recent large population studies as well as a meta-analysis failed to find such an association [3,4].

In the case of quaternary ammoniums, absorption by the vaginal epithelium and an effect on oocyte/embryo through the systemic route is not an issue since these compounds are not absorbed [5]. However, there remains a possibility of an adverse effect resulting from fertilization by a damaged sperm exposed to a sublethal concentration of the spermicide.

Recently, Debbasch *et al.* (1999) [6] reported that quaternary ammoniums can stimulate the production of reaction oxygen species (ROS) by cultured conjunctival cells, associated with chromatin condensation due to apoptosis. In the case of spermatozoa, it was shown that ROS formation can cause a significant increase in sperm DNA fragmentation [7,8,9]. Furthermore, DNA damage could be associated with paternal transmission of genetic defects to the embryo and resulting fetus [10].

In light of possible detrimental effects on spermatozoa, we sought to determine whether sperm exposed to a sublethal concentration of spermicide, with TDBAF as model compound, undergo DNA fragmentation as a result of ROS formation. The integrity of sperm DNA was assessed by TUNEL assay, pulsed field electrophoresis as well as by a new enzymatic method to measure the incorporation of a radioactive nucleotide in isolated

sperm DNA. The results of these studies were further explained by measuring ROS formation by a chemiluminescence assay and by electron microscopy evaluation of sperm chromatin condensation of spermatozoa treated with TDBAF.

## **Materials and Methods**

### *Study participants*

Participants in this study were healthy volunteers of proven fertility, aged between 22 and 45 years old. Before participating in this project, each subject signed an informed consent form approved by the Ethics Committee of the Hospital Center.

### *Sample collection*

Semen samples were collected by masturbation into sterile polypropylene containers (Sarstedt, Montreal, Canada) at the Andrology Laboratory, after 2-5 days of sexual abstinence. After a 30-minute liquefaction period at 37°C, a standard clinical semen analysis was performed according to the World Health Organization criteria [11] to determine sperm concentration, motility and morphology.

### *Determination of the sublethal concentration*

The sublethal concentration of TDBAF (Aromapharm Ireland Ltd.) was determined by a modification of the Sander-Cramer assay [1,12]. Serial dilutions (1/50, 1/60,... to 1/260) of TDBAF were prepared starting from a 0.1% stock solution of the compound

(2.84 mM); stock solution and dilutions were made with Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4). A 50  $\mu$ L aliquot of each dilution was mixed with to 10  $\mu$ L of semen and incubated at 37°C for 10 minutes. For each semen sample, the sublethal concentration was determined corresponding to the first dilution of TDBAF that allowed sperm motility (progressive or non-progressive motility). Once the sublethal concentration was found, a volume of semen corresponding to 10 million spermatozoa was mixed with this sublethal concentration (semen to dilution ratio was maintained at 1:5, v:v) for different time periods of 10 seconds, 2, 4, 6, 10, 20 and 30 minutes. In parallel, control spermatozoa were exposed to PBS, under similar conditions. After each time period, the spermatozoa were fixed during 30 minutes in 1% formalin, washed in PBS and stored at 4°C until analysis.

*Measurement of sperm DNA fragmentation by the TUNEL assay*

The degree of sperm DNA fragmentation that was measured by labeling 3'OH termini using a modified terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin end labeling technique (TUNEL), essentially as described previously [13,14]. In brief, fixed spermatozoa were incubated for 10 minutes in 100  $\mu$ L of TdT buffer containing 1 M sodium cacodylate, 150 mM Tris (pH 7.4), 25 mM  $\text{CoCl}_2$ , 1.25 mg/mL bovine serum albumin (BSA) and 0.1% Triton X-100 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO). After centrifugation (10 000 g for 4 min), TdT buffer was removed, and replaced with 100  $\mu$ L of TdT buffer containing 3  $\mu$ mol of biotin 16-deoxyuridine

triphosphate, 10 U of TdT (Roche Diagnostics, Laval, Canada), and Triton X-100 at a final concentration of 0.1%. The sperm suspension was incubated at 37°C for 60 minutes. After one washing with TN buffer (30 mM Tris, pH 7.4, 300 mM NaCl), the spermatozoa were treated with 100 µL of staining AP buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl) containing 1% streptavidin conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) (Canadian life technology, Toronto, Canada), followed by incubation at 37°C in the dark for 60 min. After another centrifugation (10 000 g for 4 min), the supernatant was removed and the pellet resuspended in 1ml of AP buffer. DNA fragmentation was measured using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) equipped with a 15 mW argon-ion laser for excitation.

Light-scattering and fluorescence data were obtained at a fixed gain setting in logarithmic mode. Debris were gated-out based on forward scatter versus side scatter dot plot, by drawing a region enclosing the sperm population of interest; 10 000 cells were analyzed in each sample. The mean fluorescence intensity of spermatozoa in each sample was determined. For negative controls, TdT was omitted from the reaction mixture. For positive controls, the spermatozoa were pretreated with 200 U of deoxyribonuclease (Dnase I, RNase-free) (Roche Diagnostics) for 45 minutes at 37°C before labeling.

### *Extraction and isolation of sperm DNA*

The method for the isolation of sperm DNA was a modification of guanidinium thiocyanate method described by Hossain *et al.* [15]. A volume of sperm suspension (about 400  $\mu$ L, control or TDBAF-treated sperm) corresponding to 20 million spermatozoa was mixed with 5 mL of PBS followed by centrifugation at 943 g for 10 minutes. The sperm pellet was lysed in 2.5 mL of a lysis buffer containing 6 M guanidinium thiocyanate, 30 mM sodium citrate (pH 7.0), 0.5% sarkosyl, 0.20 mg/mL proteinase K and 0.3 M  $\beta$ -mercaptoethanol, and incubated at 55°C for 3-4 hours. Two volumes of isopropyl alcohol were then added directly to the lysate and the tube was gently inverted until the DNA fibers formed a visible ball. The DNA was recaptured with a Pipeteman, washed twice in 70% ethanol, dissolved in approximately 200  $\mu$ L of water over a 24-hour period, and the quality and concentration of extracted DNA assessed by absorbance at 260 and 280 nm.

### *Detection of DNA fragmentation by $\alpha^{35}\text{S}$ ATP incorporation in extracted DNA*

The degree of DNA fragmentation was also assessed on isolated DNA by enzymatic labeling of 3'OH termini using TdT, and with  $\alpha^{35}\text{S}$  ATP as radioactive substrate. Four  $\mu$ g of isolated DNA were incubated in a medium containing 10  $\mu$ L TdT buffer 5X (1 M potassium cacodylate, 125 mM tris-HCl, 1.25 mg/mL bovine serum albumin), 5  $\mu$ L 25 mM  $\text{CoCl}_2$ , 15  $\mu$ Ci  $\alpha^{35}\text{S}$  ATP (ICN Biochemicals, Toronto, Canada) and 25 U of TdT; the final

volume was adjusted to 50  $\mu\text{L}$  with water. The reaction mixture was incubated overnight at 37°C.

Unreacted  $\alpha^{35}\text{S}$  ATP was removed first by chromatography on MicroSpin G-25 columns (Amersham Pharmacia biotech, Baie d'Urfee, Canada). Secondly, remaining traces of unincorporated  $\alpha^{35}\text{S}$  ATP were eliminated by precipitation: 150  $\mu\text{L}$  of t-RNA (0.25 mg/mL t-RNA in 0.1 M sodium pyrophosphate) were added to the DNA fraction of G-25 columns, precipitated with 200  $\mu\text{L}$  of 25% trichloroacetic acid (TCA) and placed on ice for 10 minutes. Finally, the precipitate was recovered by filtration on SMWP 5  $\mu\text{m}$  filters (Millipore, St-Laurent, Canada) and washed sequentially with 10 mL of 10% TCA and 10 mL of 95% ethanol. Filters were then transferred into scintillation vials containing 5 mL of scintillation cocktail (ICN biochemicals) to measure radioactivity on a LS-1801 Beckman counter. As negative controls, TdT was omitted from the reaction mixture; strongly positive controls were DNA samples pretreated with combined 40 U EcoR1 and 40 U BamH1 (New England Biolabs, Mississauga, Canada) for 1 hour at 37°C prior to radioactive labeling.

#### *DNA analysis by regular and pulsed field electrophoresis*

DNA from control and TDBAF-treated sperm was isolated as described above and analyzed for the presence of small fragments using regular electrophoresis in 0.8% agarose.

Isolated sperm DNA was also tested for the presence of large fragments using pulsed field electrophoresis (CHEF-DR III, Bio-Rad, Mississauga, Canada). Separation was achieved in 1% molecular biology certified agarose (Mandel Scientific Cie Ltée, Côte de Liesse, Canada) at 14°C, with switch time of 1-6 seconds, at an angle of 120° and voltage gradient of 6 V/cm during 11 hours. For each sample, between 1 and 6 µg of DNA were loaded.

#### *Analysis of sperm chromatin condensation*

Chromatin aspect and density were investigated using transmission electron microscopy of spermatozoa fixed for 30 minutes with 4% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate at 4°C. Spermatozoa were washed twice in 0.2 M sodium cacodylate and stored at 4°C until processing for electron microscopy by usual techniques. Chromatin densities were compared on photomicrographs using the program Mesurim 2.4 (Université d'Amien, France).

#### *Antioxidant treatment and measurement of ROS production*

Attempts at preventing ROS formation were performed by adding 5 units of vitamin E to 500 µL of semen, or superoxide dismutase (SOD, Sigma Chemical Co., St Louis, MO) at 0.1 mg/mL before treatment of sperm with TDBAF. Control and TDBAF-treated sperm were then analyzed by the TUNEL assay as described above.



ROS production was measured by chemiluminescence assay in the presence of luminol using a Turner Designs (TD-20/20) luminometer. In addition to semen samples from fertile men, we also tested ejaculates from patients consulting for infertility, that contained leukocytes. For these assays, washed sperm (with HEPES-balanced saline buffer (HBS: 130 mM NaCl, 4 mM KCl, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 14 mM fructose, and 10 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) adjusted to pH 8.0 [16])) were suspended at 10x10<sup>6</sup>/mL in HBS, containing 0.5 mM luminol (from stock solution in dimethylsulfoxide). Chemiluminescence was monitored over 2 minutes to obtain a baseline signal. TDBAF was then added at final concentrations corresponding those used by Debbasch *et al.* [6] (0.01%, 0.001%, 0.0001%) and the counts were recorded for a further 2 or 10 minutes.

### *Statistical analyses*

Sigmastat 2.0 (Jandel Corporation, San Raphael, CA, USA) was used for data analysis. Differences in degree of DNA fragmentation between control and TDBAF-treated sperm was evaluated using paired t-test. As the other data were not distributed normally, a non-parametric approach was favored. The Kruskal-Wallis test was used to compare the degree of DNA fragmentation at different times of exposure to TDBAF or PBS. Sperm nucleus density was compared using Mann-Whitney rank sum test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

### *Effect of TDBAF on the results of the TUNEL assay*

The TUNEL assay was used to detect any increase in sperm DNA fragmentation as a result of exposure of sperm to a sublethal concentration of TDBAF. Results obtained early in this study indicated an effect of the spermicide on the main outcome *e.g.* increased sperm fluorescence intensity. A time course experiment demonstrated that the effect of TDBAF was already maximal after 10 seconds of exposure of sperm to the sublethal concentration of TDBAF: results at other time points (2, 4, 6, 10, 20 and 30 minutes) did not differ significantly ( $p = 0.798$ , results not shown). Thus, unless otherwise stated, 10 minutes of treatment was retained in all subsequent experiments.

A significant increase in the intensity of fluorescent labeling (mean  $\pm$  SD) was observed by the TUNEL assay when spermatozoa were exposed to sublethal concentration of TDBAF for 10 minutes ( $29.5 \pm 18.2$ ) compared to control sperm treated with PBS ( $22.4 \pm 14.4$ ) (figure 1:  $p < 0.001$ ). Higher concentrations of TDBAF produced greater increases in fluorescence intensity (results not shown).

*Effect of TDBAF on ROS production by sperm and other cells in semen*

We first set out to determine whether this increase in fluorescence labeling, possibly attributable to DNA fragmentation, could result from ROS production. Theoretically, if TDBAF interacts with spermatozoa to induce ROS production, then vitamin E or SOD added to semen prior treatment with TDBAF should, at least in part, prevent this effect. In fact, the same increase in DNA labeling was observed in the presence of these ROS scavengers (n = 8, data not shown).

Chemiluminescence measurements failed to show any effect of TDBAF on ROS production by spermatozoa after 2 or 10 minutes exposure (n = 8, figure 2). In infertility patients where the ejaculates contained leukocytes and or immature spermatogenic cells, high levels of ROS production were observed, orders of magnitude above ROS generation by normal spermatozoa. Where leukocytes were present, TDBAF at the extremely low concentration of 0.0001% caused a modest but significant increase in ROS production ( $p < 0.001$ ); at higher concentrations (0.01%), TDBAF caused a dramatic decrease in ROS production (n = 2, figure 2).

*Assessment of DNA fragmentation by pulsed field electrophoresis*

We then decided to test whether the increase in fluorescent labeling by TUNEL assay caused by TDBAF treatment truly represents an increase in DNA fragmentation, be it single or double strand breaks. To this purpose, sperm DNA was isolated and analyzed.

Agarose gel electrophoresis under usual conditions (0.8% agarose) did not reveal any additional small MW fragments in TDBAF-treated compared to control spermatozoa (n = 3, results not shown). Since this method does not exclude the possibility of additional larger DNA fragments, isolated sperm DNA was subjected to pulsed field electrophoresis (Figure 3). Again, no additional fragments or loss of large fragments were detected in TDBAF-treated sperm compared to control (n = 16).

*Measurement of 3'OH termini in isolated DNA from spermatozoa*

We developed an enzymatic-radioisotopic method to quantitatively measure sperm DNA fragmentation using isolated DNA. Here, radioactive counting of  $\alpha^{35}\text{S}$  ATP incorporation catalyzed by TdT includes all forms of free 3'OH (e.g. single and double strand breaks). We did not observe any significant difference in DNA labeling between TDBAF-treated and control sperm (figure 4: p = 0.475; n = 11).

*Evaluation of sperm chromatin density*

Electron microscopy (see figure 5 for representative results) revealed important changes in the appearance of sperm chromatin upon treatment of sperm with TDBAF: the chromatin is more granular and less condensed than in control spermatozoa. Quantitative assessment of chromatin density revealed a statistically significant decrease in density, corresponding to nuclear chromatin decondensation (table I).

## Discussion

Despite unique protective barriers (*e.g.* nuclear envelope, highly condensed quasi-crystalline chromatin, relative dehydration), the DNA of spermatozoa is nevertheless vulnerable to damages such as ROS-induced fragmentation [7,8,9]. While seminal plasma is rich in enzymes and compounds with antioxidant properties, the spermatozoa themselves have lost most of these systems during spermiogenesis. In addition, their plasma membrane contains a high proportion of polyunsaturated fatty acids, an important substrate for ROS [17]. Due to its lack of DNA repair mechanism [18], any damage to the genome of the fertilizing male gamete is inevitably transmitted to the zygote and could be associated with congenital abnormalities in offspring [10]. Fortunately, the fertilized oocyte is equipped to repair DNA [19,20], but only up to a certain level. It thus becomes of utmost importance to ensure that, in cases of failure of local contraception, spermicides do not cause DNA damage.

In our first series of experiments we observed that a sublethal concentration of TDBAF seemed to increase sperm DNA fragmentation as measured by the TUNEL assay. The mere fact that this apparent DNA fragmentation reached a maximum within seconds after the addition of TDBAF practically excluded an effect via endonucleases.

If DNA fragmentation was really taking place, then an underlying mechanism involving ROS production seemed more likely. Hence, oxidative stress is known to induce DNA strand breaks in spermatozoa [21], and Debbasch *et al.* (1999) [6] reported that quaternary ammoniums can induce ROS production by cultured conjunctival cells [6]. Attempts at preventing DNA fragmentation by scavenging ROS activity with SOD and vitamin E were unsuccessful. If ROS had been produced, then at least a partial effect of SOD was to be expected since this enzyme was shown to decrease malondialdehyde formation by spermatozoa [22]. One possibility for lack of effect is that ROS could be produced intracellularly only, and SOD would not have access to the site of their generation; however, this is unlikely since TDBAF is known to disrupt the sperm plasma membrane and to permeabilize the cell. Vitamin E is a potent lipophilic chain-breaking scavenger with *in vitro* activity on human sperm [23], it should also have decreased DNA fragmentation if ROS had been involved. The lack of effect of these two antioxidants indicates that TDBAF modifies the results of the TUNEL assay by a mechanism other than ROS formation.

This was directly demonstrated by measuring ROS production by TDBAF-treated spermatozoa. Unstimulated normal spermatozoa produce extremely low levels of ROS; this was confirmed in this study where control spermatozoa yielded a low chemiluminescence signal in the presence of luminol. Addition of TDBAF at sublethal concentration did not increase the signal; lower concentrations of TDBAF (*e.g.* 0.0001%) were also ineffective. This lack of response is at variance with the results of Debbasch *et al.* (1999) [6] who

reported significant increase in ROS production by conjunctival cells treated with 0.0001% benzalkonium chloride.

In order to resolve this issue, we also tested semen samples from patients consulting for infertility. As expected in cases where the ejaculate contained polymorphonuclear cells, an extremely high basal level of ROS production was observed. The addition of TDBAF at 0.0001% caused a small but statistically significant increase in chemiluminescence signal. In contrast, TDBAF at 0.01% and above rapidly and efficiently inhibited ROS production. Our results with semen samples containing polymorphonuclear cells are in line with those of Debbasch et al. (1999) [6] on conjunctival cells, with respect to both the stimulatory effect on ROS production by benzalkonium chloride at low concentration and the inhibition at high concentration. While the difference in response to TDBAF between somatic cells and spermatozoa can readily be explained on the base of differences in cell types, an additional inhibitory effect by fluoride ion (in TDBAF) can not be excluded: this anion is a potent inhibitor of several enzyme (*e.g.* enolase, NADPH oxydase) [24,25].

These negative results led us to explore the possibility that the detergent could increase labeling of spermatozoa in the TUNEL assay by making the 3'OH termini in DNA more available to the enzyme terminal transferase. Such an effect would represent a physico-chemical mechanism operating within the time frame of seconds after exposure of sperm to the TDBAF. As shown in figure 5 and table I, electron microscopic evidence for such a phenomenon was obtained: TDBAF at sublethal concentration caused changes in



chromatin structure, making it more granular and decondensed. In the case of conjunctival cells, low concentrations of benzalkonium chloride instead induce nuclear condensation as a result of activation of an apoptotic process [6]. Clearly, the response of spermatozoa to low concentrations of TDBAF proceeds through a completely different mechanism.

In order to circumvent the limitations of the TUNEL assay resulting from extensive chromatin compaction in mature spermatozoa, we concentrated on the analysis of isolated DNA from TDBAF-treated and control spermatozoa. In contrast to somatic cells, spermatozoa are resistant to conventional DNA extraction procedures [26], mainly because of the highly condensed state of the chromatin resulting from the replacement of histones by protamines [27]. The use of a modified guanidinium thiocyanate method [15] yielded high quality DNA (O.D. 260/280 ratio; size of isolated DNA).

When isolated sperm DNA was analyzed by pulsed field electrophoresis, no evidence of increased fragmentation was found in DNA of spermatozoa treated with TDBAF, compared to controls. The usual gel electrophoresis of DNA also failed to show any increase in small fragments in TDBAF-treated sperm. Additional proof of DNA integrity was obtained by direct radioenzymatic labeling of isolated sperm DNA: prior treatment of spermatozoa with sublethal concentration of TDBAF did not increase DNA labeling compared to controls.

From a technical point of view, our results uncovered a pitfall in the TUNEL assay as applied to spermatozoa: in many semen samples, this technique underestimates the true level of 3'OH termini. We have shown that treatment with TDBAF decondenses the chromatin and increases membrane permeability, both mechanisms are probably responsible for increased efficiency of TdT enzyme to more completely label preexisting 3'OH termini. We propose that pretreatment of spermatozoa with TDBAF would allow a more accurate measurement of the degree of sperm DNA fragmentation by the TUNEL assay.

In conclusion, we demonstrated that a sublethal concentration of TDBAF does not induce DNA fragmentation in human spermatozoa. In this regard, utilization of this spermicide does not place the progeny at increased risk of genetic abnormality should pregnancy occur as a result of failure of local contraception. However, TDBAF causes changes in chromatin structure, it remains to be determined whether this could represent a risk factor. Furthermore, our results seem to indicate that pretreatment of spermatozoa with TDBAF allows a more accurate measurement of the true level of sperm DNA fragmentation by the TUNEL assay.

## References

- [1] Lee CH. Review: in vitro spermicidal tests. *Contraception* 1996; 54: 131-147.
- [2] Creinin, M. and Keith, L.G. *Fertility Control (2nd edn)*, Editors: Corson SL., Derman RJ. and Tyrer LB., Goldin Publisher, London, Canada, 1994, Chapter 17.
- [3] Linn S., Schoenbaum S.C., Monson R.R., Rosner B., Stubblefield P.G. and Ryan K.J. Lack of association between contraceptive usage and congenital malformations in offspring. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1983; 147: 923-928.
- [4] Einarson T.R., Koren G., Mattice D. and Schechter-Tsafiriri O. Maternal spermicide use and adverse reproductive outcome: a meta-analysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1990; 162: 655-660.
- [5] Zufferey M.M. Real and false risks of local contraception: spermicides and the diaphragm. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)*. 1985; 14: 359-363.
- [6] Debbasch C., de Saint Jean M., Pisella P.J., Rat P., Warnet J.M. and Baudouin C. Quaternary ammonium cytotoxicity in a human conjunctival cell line. *J. Fr. Ophtalmol.* 1999; 22: 950-958.
- [7] Duru Kemal N., Morshedi M. and Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 2000; 74: 1200-1207.
- [8] Aitken R.J., Gordon E., Harkiss D., Twigg J.P., Milne P., Jennings Z. and Irvine D.S. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 1998; 59: 1037-1046.
- [9] Lopes S., Sun J.G., Jurisicova A., Meriano J. and Casper R.F. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* 1998; 69: 528-532.

- [10] Sakkas D., Uner F., Bizzaro D., Manicardi G., Bianchi PG., Shoukir Y. and Campana A. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum. Reprod.* 1998; 13: 11-19.
- [11] World Health Organization (1992) WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Spermatozoa-Cervical Mucus Interaction, 3rd edn, Cambridge University Press, New York.
- [12] Sander, E.V. and Cramer, S.D. A practical method for testing the spermicidal action of chemical contraceptives. *Human Fertil.* 1941; 6: 134-137.
- [13] Sun J.G., Jurisicova A. and Casper R.F. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol. Reprod.* 1997; 56: 602-607.
- [14] Sergerie M., Ouhilal S., Bissonnette F., Brodeur J. and Bleau G. Lack of association between smoking and DNA fragmentation in the spermatozoa of normal men. *Hum. Reprod.* 2000; 15: 1314-1321.
- [15] Hossain A.M., Rizk B., Behzadian A. and Thorneycroft I.H. Modified guanidinium thiocyanate method for human sperm DNA isolation. *Mol. Hum. Reprod.* 1997; 3: 953-956.
- [16] de Lamirande E and Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl.* 1992; 13: 368-78.
- [17] Aitken R.J. and Clarkson J.S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1987; 81: 459-469.

- [18] Van Loon A.A., Den Boer P.J., Van der Schans G.P., Mackenbach P., Grootegoed J.A., Baan R.A. and Lohman P.H. Immunochemical detection of DNA damage induction and repair at different cellular stages of spermatogenesis of the hamster after in vitro or in vivo exposure to ionizing radiation. *Exp. Cell. Res.* 1991; 193: 303-309.
- [19] Sakkas D., Mariethoz E., Manicardi G., Bizzaro D., Bianchi P.G. and Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev. Reprod.* 1999; 4: 31-37.
- [20] Matsuda Y. and Tobari I. Chromosomal analysis in mouse eggs fertilized in vitro with sperm exposed to ultraviolet light (UV) and methyl and ethyl methanesulfonate (MMS and EMS). *Mutat. Res.* 1988; 198: 131-144.
- [21] Hughes C.M., Lewis S.E., McKelvey-Martin V.J. and Thompson W. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Mol Hum Reprod.* 1996; 2: 613-619.
- [22] Kobayashi T, Miyazaki T, Natori M, Nozawa S. Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. *Hum Reprod.* 1991 ; 6: 987-991.
- [23] Brezezinska-Slebodzinska E, Slebodzinski AB, Pietras B, Wieczorek G. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biol Trace Elem Res.* 1995 ; 47: 69-74.
- [24] Guminska M. et Sterkowicz J. Effect of sodium fluoride on glycolysis in human erythrocytes and Ehrlich ascites tumour cells in vitro. *Acta. Biochim. Pol.* 1976; 23: 285-291.
- [25] Diatchuk V., Lotan O., Koshkin V., Wikstroem P. and Pick E. Inhibition of NADPH oxidase activation by 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride and related compounds. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 13292-13301.

- [26] Bahnak B.R., Wu Q.Y., Coulombel L., Drouet L., Kerbiriou-Nabias D. and Meyer D. A simple and efficient method for isolating high molecular weight DNA from mammalian sperm. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16: 1208.
- [27] Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J. Cell. Biol.* 1982; 93: 298-305.

**Table I:** Median (interquartile range) values of nuclear chromatin density

Subjects	Magnification	FTDBA concentration					
		Control		Sublethal		High-lethal	
		Density	n	Density	n	Density	n
A	4.4 K	45.2 (11.1)	41	37.9 (11.2) <sup>a</sup>	25	--	
	7.1 K	40.5 (6.0)	57	35.9 (15.4) <sup>b</sup>	47	--	
B	4.4 K	35.9 (10.8)	18	--		20.3 (11.7) <sup>a</sup>	15
	7.1 K	40.1 (11.3)	20	39.9 (8.3) <sup>c</sup>	23	--	
C	4.4 K	42.5 (6.0)	50	42.9 (5.3) <sup>c</sup>	23	--	
	7.1 K	48.0 (5.1)	23	--		45.3 (19.4) <sup>b</sup>	12

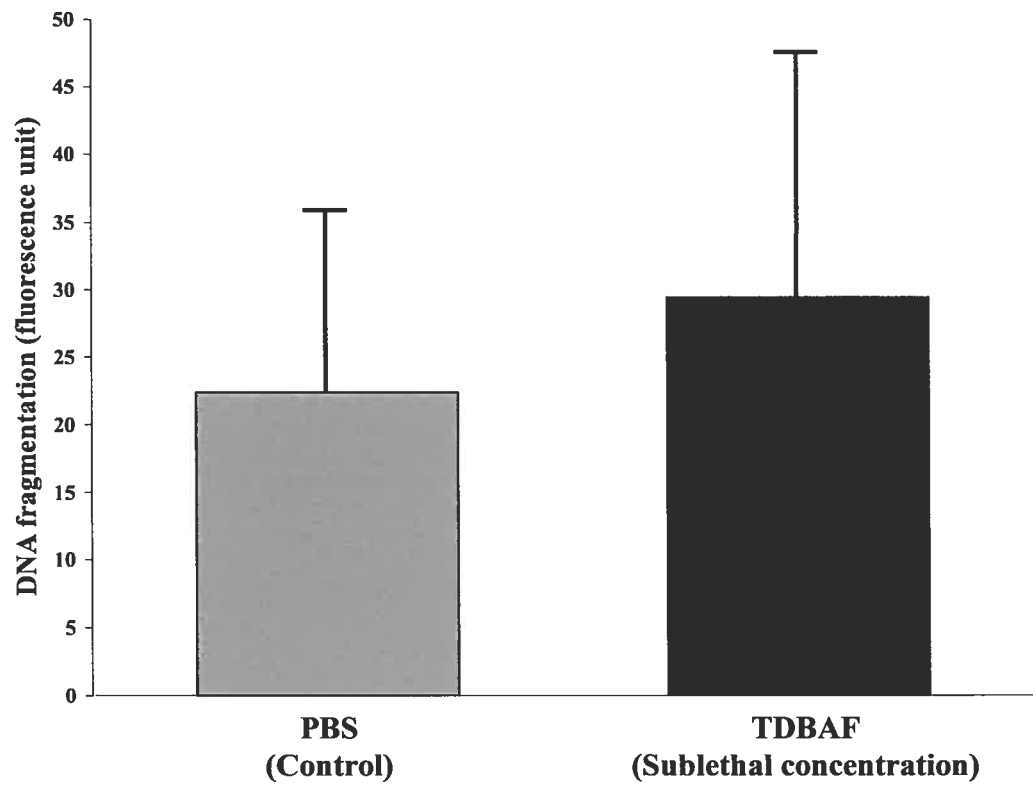
<sup>a</sup>Significantly different from control value,  $p < 0.001$ .

<sup>b</sup>Significantly different from control value,  $p < 0.05$ .

<sup>c</sup>Non-Significantly different from control value.

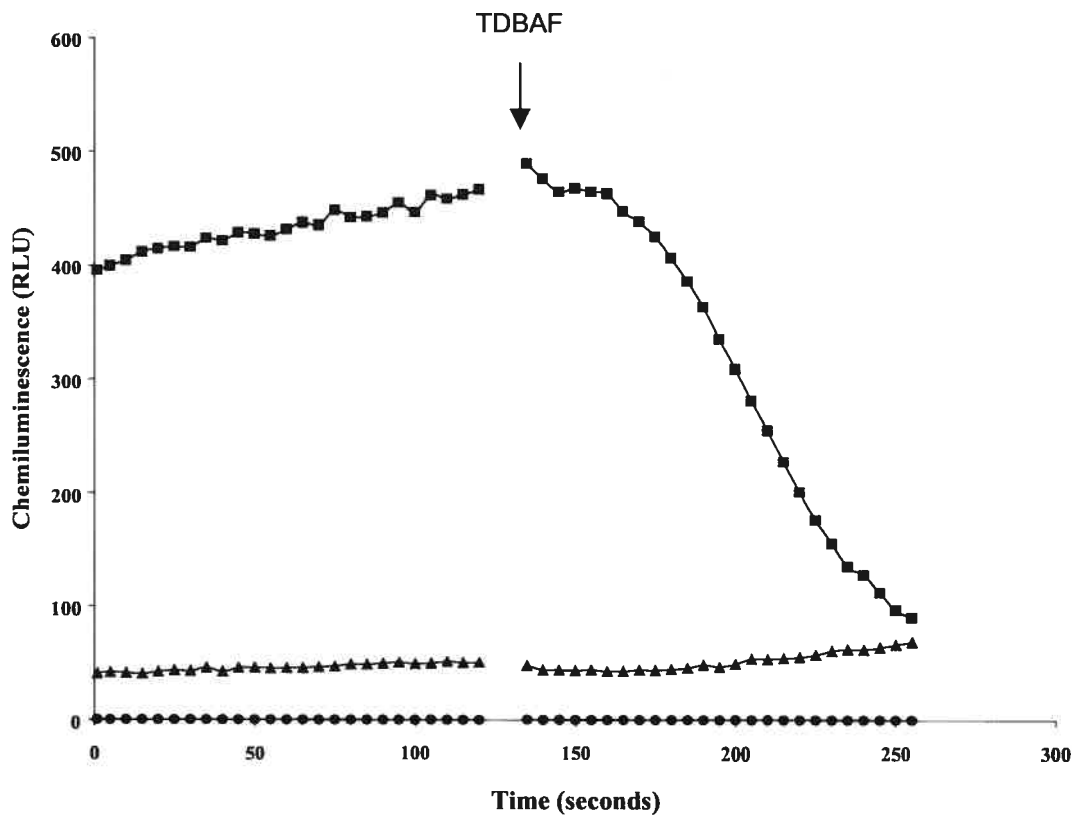
n: number of measures of chromatin density on different spermatozoa.

High-lethal: concentration of 0.0167%.



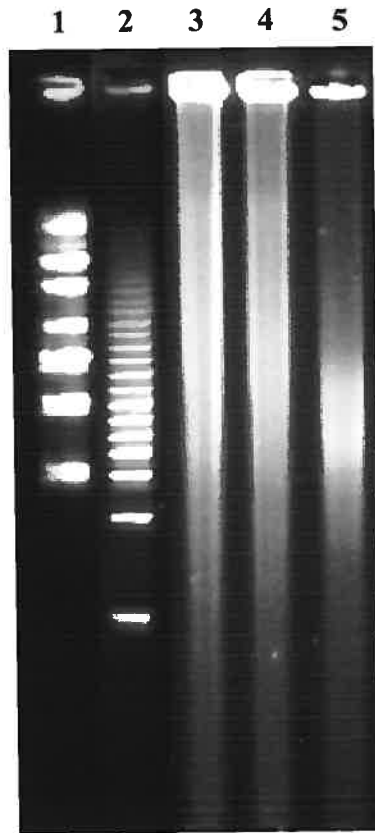
**Figure 1:** Comparison (mean  $\pm$  SD) of the degree of sperm DNA fragmentation as measured by the TUNEL assay in sperm treated with PBS (control) or sublethal concentration of TDBAF. ( $p < 0.001$ ,  $n = 32$ )



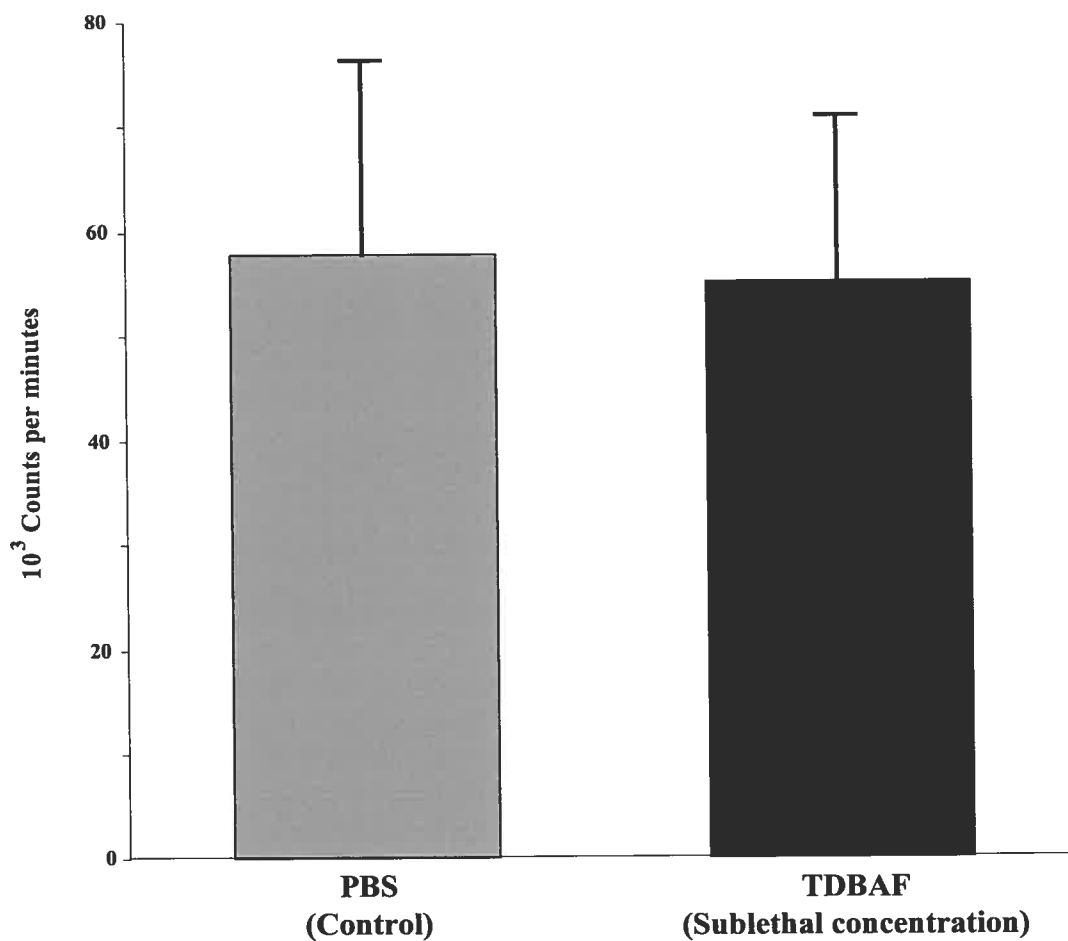


**Figure 2:** Production of reactive oxygen species by control and TDBAF-treated spermatozoa. (RLU = Relative light unit)

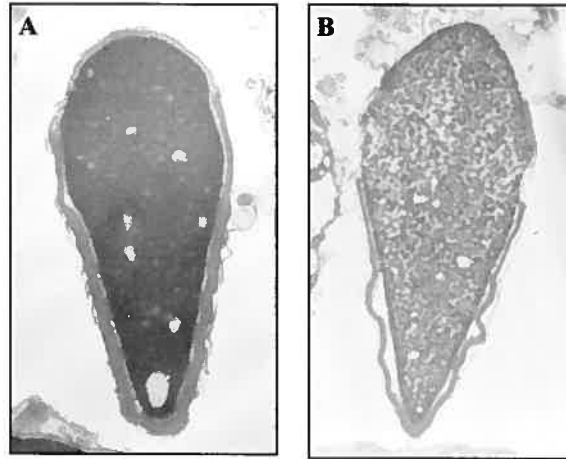
- = Subject 1:  $10^7$  spermatozoa exposed to 0.01% TDBAF
- = Subject 2:  $10^7$  spermatozoa along with  $5 \times 10^5$  PMN exposed to 0.01% TDBAF
- ▲ = Subject 2:  $10^6$  spermatozoa along with  $5 \times 10^4$  PMN exposed to 0.0001% TDBAF



**Figure 3:** Pulsed field electrophoresis of isolated sperm DNA. Lane 1: high MW markers (size range: 15-300 kb), lane 2: low MW markers (4.9-120 kb), lane 3: DNA from sperm exposed to PBS, lane 4: DNA from sperm exposed to a sublethal concentration of TDBAF, lane 5: DNA sheared by repeated aspiration into a syringe (26G needle). ( $A_{260}/A_{280}$  ratio = 1.6)



**Figure 4:** Sperm DNA fragmentation measured after labeling of isolated DNA from control sperm and sperm exposed to sublethal concentration of TDBAF (n = 11). (Mean  $\pm$  SD; p = 0.475, not significant).



**Figure 5:** Typical electron microscopic appearance of spermatozoa exposed to A) PBS or to B) sublethal concentration of TDBAF (Magnification 7100X). Changes in chromatin granularity and density were observed.

## 4. Discussion générale

### 4.1 La technique TUNEL dans l'évaluation d'un agent spermicide

La technique TUNEL consiste à marquer, grâce à l'enzyme désoxyribonucléotidyle exotransférase (TdT), les groupements terminaux 3'OH de l'ADN générés par la fragmentation. Comme mentionné dans l'introduction, cette technique était originellement destinée à la détection de fragments d'ADN résultant de l'apoptose dans les cellules somatiques. En effet, lors d'une des dernières étapes de l'apoptose, des endonucléases coupent l'ADN en fragments d'environ 180 à 200 paires de bases (Levy et Seifer-Aknin, 2001). Ce n'est que récemment que plusieurs laboratoires ont commencé à utiliser cette approche afin de détecter la fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes (Gorczyca et coll., 1993).

Nous avons modifié cette méthode de marquage afin d'évaluer l'innocuité d'un nouvel agent spermicide, le FTDBA, pour l'ADN des spermatozoïdes. Plusieurs tests *in vitro* existent pour vérifier l'efficacité des spermicides (Lee, 1996), mais à notre connaissance, aucun ne détermine s'ils peuvent endommager l'ADN des spermatozoïdes. La technique de marquage TUNEL a donc été appliquée à des spermatozoïdes exposés à une dose sublétales de FTDBA, le but était de déterminer si l'agent spermicide risquait de causer des dommages à l'ADN de spermatozoïdes alors que ceux-ci restaient mobiles et possiblement aptes à féconder un ovocyte. Nous savons que certaines lésions simple brin de

l'ADN des spermatozoïdes peuvent être réparées dans le cytoplasme de l'ovocyte mature fécondé (Matsuda et coll., 1989), cependant la capacité de réparation de l'ovocyte peut se voir dépassée si le nombre de lésions excède un seuil. La transmission d'un matériel génétique endommagé peut entraîner de sérieuses conséquences pour l'embryon ou le fœtus. En effet, des bris dans l'ADN peuvent amener des mutations dans les gènes suppresseurs de tumeurs ainsi que dans les gènes impliqués dans le développement (Marnett et coll., 2000). De plus, il est connu que des spermatozoïdes dont l'ADN est endommagé peuvent, dans certain cas, réussir à féconder l'ovocyte; notons que le taux de développement embryonnaire diminue avec l'augmentation du degré de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes (Ahmadi et NG, 1999).

Lorsque nous avons appliqué la technique de marquage TUNEL à des spermatozoïdes exposés à une dose sublétales de FTDBA, nous avons observé une hausse significative du marquage de l'ADN comparativement aux témoins traités seulement avec du tampon physiologique (PBS). Deux possibilités pouvaient être envisagées pour expliquer ce résultat. Soit que l'exposition au FTDBA provoque une production de SOR pouvant causer une fragmentation de l'ADN, soit que le spermicide, en décondensant la chromatine, permette de détecter plus complètement les brisures déjà existantes.

## 4.2 Évaluation de la production de substances oxygénées réactives

Afin de détecter une production de SOR lors du contact d'un ammonium quaternaire avec la membrane de cellules conjonctivales, l'équipe de Debbasch (1999) a utilisé 2 sondes fluorogènes ayant la propriété de devenir fluorescentes lorsqu'en contact avec des SOR: le diacétate de dichlorofluorescéine (DCFH-DA) dont la forme estérifiée devient fluorescente lorsqu'elle réagit avec le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), et l'hydroéthidine qui devient fluorescente lorsqu'elle réagit avec l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ).

Afin de déterminer si le FTDBA provoquait aussi une production de SOR par les spermatozoïdes, nous avons plutôt opté pour une technique de détection utilisant le luminol qui, une fois oxydé, forme un composé intermédiaire responsable d'une émission de photons pouvant être détectés à l'aide d'un luminomètre. Dans la littérature, il s'agit du procédé le plus couramment utilisé pour détecter la production de SOR (anion superoxyde, et peroxyde d'hydrogène) par les spermatozoïdes. Il permet de mesurer la production intra et extra cellulaire, ce qui rend cette technique extrêmement sensible. (Aitken et coll., 1992; Kobayashi et coll., 2001; Vernet et coll., 2001).

Aux mêmes concentrations d'ammonium quaternaire que celles utilisées par Debbasch et son équipe (1999), nous n'avons observé aucune production de SOR par les spermatozoïdes exposés au FTDBA. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que nous n'utilisons pas les même cellules. De plus, nous n'employons pas le même type

d'ammonium quaternaire, ce qui peut affecter les résultats. Dans leurs travaux, Debbasch et coll. ont testé plusieurs types d'ammonium quaternaire (chlorure de benzalkonium à longueurs de chaînes variables, cétrimide et bromure de benzodécinium) et n'ont pas noté la même production de SOR pour chacun. Le FTDBA est donc un type d'ammonium quaternaire n'amenant pas de production de SOR par les spermatozoïdes aux concentrations testées. Ceci infirme l'hypothèse voulant que la hausse du marquage par TUNEL soit due à l'induction de fragments par le FTDBA, suite à une production de SOR.

Cependant, il faut noter que les échantillons de sperme contenant des leucocytes montrent une forte production de SOR. L'addition d'une très faible concentration de FTDBA (0,0001%), dans un premier temps diminue, puis augmente légèrement cette production. Les concentrations sublétales (0,0046% à 0,0166%; moyenne  $\pm$  écart-type:  $0.0079 \pm 0.0025\%$ ) que nous avons testées dans nos travaux utilisant la technique TUNEL étant toutes supérieures à 0,0001% de FTDBA, il n'y avait donc aucune production de SOR susceptible d'induire des dommages à l'ADN. Lors de l'utilisation du spermicide comme contraceptif, il est peu probable que le FTDBA se retrouve dilué à une concentration aussi faible que 0,0001% au niveau vaginal lors du coït.

À de plus fortes concentrations (0,001% et 0,01%), le FTDBA a plutôt pour effet de diminuer la production de SOR, probablement en tuant les leucocytes responsables de cette production. De plus, il est connu que l'anion fluor a la capacité d'inhiber plusieurs types d'enzymes telle l'énolase, essentielle à la glycolyse (Guminska et Sterkowicz, 1976). Sans



la glycolyse et sans milieu contenant du pyruvate (ce qui est le cas pour nos spermatozoïdes lavés), le cycle de Krebs n'est plus opérant, ce qui enlève une source importante de production de SOR au niveau des mitochondries. Le fluorure de 4-(2-aminoéthyl)-benzènesulfonyle (FAEBS) est aussi reconnu pour son inhibition de la NADPH oxydase (Diatchuk et coll., 1997). Peut-être que le FTDBA a aussi cet effet inhibiteur sur cette enzyme productrice de  $O_2^{\cdot-}$ .

### 4.3 Faiblesses de la technique TUNEL

#### 4.3.1 Inaccessibilité, *in situ*, de certaines cassures par la TdT

Un des problèmes liés à l'utilisation de la technique TUNEL appliquée aux spermatozoïdes concerne l'état extrêmement condensé de l'ADN, résultat du remplacement des histones par les protamines. Ceci implique que les fragments d'ADN situés dans les replis de la chromatine seraient probablement moins accessibles à l'enzyme TdT. Si tel est le cas, les résultats s'en trouvent alors plus ou moins sous-estimés selon le degré de compaction de l'ADN des spermatozoïdes.

Le FTDBA pourrait avoir pour effet de décondenser l'ADN des spermatozoïdes, ce qui permettrait à la TdT d'accéder à un plus grand nombre de cassures. Ce phénomène expliquerait la hausse du marquage observée lorsque les spermatozoïdes sont préalablement exposés au FTDBA, rendant la technique TUNEL plus sensible. À cet égard, notons que le bromure de dodécyl-triméthyl-ammonium (DTAB), un autre surfactant cationique, a la propriété de déplier l'ADN (Bathaie et coll., 1999). De manière analogue, Twigg et coll. (1998b) ont d'abord exposé les spermatozoïdes au dithiothréitol (DTT) avant le marquage par « nick translation »; ce composé a la propriété de réduire les ponts disulfures intra et inter-moléculaires de la chromatine, relâchant ainsi sa structure. L'enzyme ADN polymérase I a donc un accès plus facile aux cassures de l'ADN.

Debbasch et coll. (1999) ont par contre observé une condensation de la chromatine de cellules conjonctivales lors d'une exposition à de faibles concentrations d'ammonium quaternaire, phénomène résultant, selon ces auteurs, de l'apoptose induite par le détergent.

Nous avons donc vérifié en microscopie électronique l'effet du FTDBA sur la densité de la chromatine des spermatozoïdes. Contrairement à l'équipe de Debbasch (1999), nous avons observé une décondensation de l'ADN chez trois sujets fertiles.

Cette différence entre nos résultats et ceux de Debbasch et coll. (1999) peut encore une fois s'expliquer par une différence dans les types cellulaires utilisés. Contrairement aux cellules conjonctivales, les spermatozoïdes matures ont leur ADN tellement condensé qu'il leur est impossible de produire les protéines nécessaires à l'apoptose. De plus, il serait difficile de condenser la chromatine des spermatozoïdes normaux plus qu'elle ne l'est déjà. Toutefois, la cause de cette décondensation demeure inconnue pour le moment; peut-être que le FTDBA a la capacité de diminuer l'interaction des protamines avec l'ADN (compétition). Conséquemment, il se produirait une décondensation au niveau de la chromatine. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que le FTDBA est un ammonium quaternaire conservant toujours sa charge positive quelles que soient les conditions de pH du milieu (voir figure 5b de l'introduction). Sa structure lui confère une très grande affinité pour l'ADN chargé négativement. Pour leur part, les protamines sont riches en résidus lysine et arginine dont les  $pK_a$  (dans la protéine) avoisinent 9 à 10. À forte concentration,

l'affinité du FTDBA, de par sa charge, pour l'ADN pourrait donc dépasser celle entre les protamines et l'ADN.

L'augmentation du marquage TUNEL dans les spermatozoïdes traités au FTDBA pourrait aussi résulter de son puissant effet détergent : il pourrait perméabiliser les membranes cellulaires et les structures entourant le noyau, facilitant ainsi la diffusion de la TdT et/ou de son substrat. À cette fin, nous utilisons déjà le Triton-X100; il n'est pas exclu que le FTDBA puisse fonctionner encore mieux.

#### **4.3.2 Le manque d'uniformité dans la technique TUNEL**

Certains laboratoires utilisent la microscopie à fluorescence dans l'évaluation de la fragmentation de l'ADN, une méthode beaucoup moins précise et laissant place à l'interprétation (Baccetti et coll., 1996; Duru et coll., 2001; Gandini et coll., 2000; Host et coll., 2000; Lopes et coll., 1998b). Pour les laboratoires utilisant la cytométrie en flux (Gorczyca et coll., 1993; Sailer et coll., 1995; Sergerie et coll., 2003 (non publié)), l'erreur est grandement diminuée. Cependant il existe différentes méthodes de sélection des populations de cellules analysées et le seuil à partir duquel la fluorescence est considérée positive diffère, ce qui influence les pourcentages de fragmentation obtenus. C'est pourquoi nous avons utilisé l'intensité moyenne de fluorescence plutôt que le pourcentage de fragmentation.

Nous avons choisi de cibler la population de spermatozoïdes dans laquelle nous croyons que se trouvent les spermatozoïdes de meilleure qualité, en se basant sur leur taille et leur complexité. Notons que les paramètres de lecture en cytométrie en flux étant les mêmes pour les spermatozoïdes témoins et ceux traités au FTDBA, la comparaison des résultats est donc valable car elle vise les mêmes populations de spermatozoïdes.

#### 4.4 Preuve de l'innocuité du FTDBA pour l'ADN des spermatozoïdes

Pour s'assurer que le FTDBA ne causait pas de brisures dans l'ADN, nous avons développé deux nouvelles techniques d'analyse de l'ADN des spermatozoïdes. En isolant l'ADN, ceci nous libérait de la contrainte due à la condensation de la chromatine.

Les techniques d'isolement de l'ADN diffèrent d'un tissu à l'autre et tiennent compte des propriétés particulières des cellules et des contaminants qui doivent être éliminés. Le cas des spermatozoïdes est de loin le plus compliqué, surtout à cause de la structure compacte de sa chromatine. Les techniques d'isolement conventionnelles ne fonctionnent tout simplement pas pour ce type de cellules. Il nous fallait également une technique abîmant au minimum l'ADN car notre but premier était d'y vérifier la présence de cassures dans des spermatozoïdes exposés ou non au FTDBA. La technique d'extraction décrite par Hossain et coll. (1997) rencontrait toutes ces exigences.

Après l'extraction, nous avons utilisé l'électrophorèse en champs pulsés (permettant la migration de très grands fragments d'ADN) afin de comparer les profils de fragmentation de l'ADN de spermatozoïdes traités ou non au FTDBA. Nous n'avons observé aucune différence entre l'ADN dans ces 2 groupes.

Dans une autre approche pour évaluer l'intégrité de l'ADN, nous avons développé une technique de marquage de l'ADN extrait des spermatozoïdes. Nous avons utilisé la même enzyme que pour la technique TUNEL, soit la TdT, mais avec l'ATP <sup>35</sup>S comme

substrat. Comme l'ADN est extrait et dissous, il est plus facile pour l'enzyme d'atteindre toutes les extrémités 3'OH libres. En comptant la radioactivité incorporée, il devenait possible de comparer le marquage de l'ADN des spermatozoïdes exposés au FTDBA comparativement aux témoins non exposés.

Contrairement aux résultats obtenus par la technique TUNEL, nous n'avons observé aucune hausse significative du marquage de l'ADN des spermatozoïdes traités au FTDBA, ce qui prouve que l'agent spermicide ne cause pas de brisures à l'ADN mais que plutôt il permet de mieux détecter par la technique TUNEL les fragments déjà existants.

Nos résultats indiquent qu'il serait approprié de rendre la technique TUNEL plus sensible en traitant préalablement les spermatozoïdes avec ce détergent. Quant à la nouvelle technique de marquage radioactif de l'ADN des spermatozoïdes, nous croyons qu'il sera nécessaire d'améliorer sa reproductibilité et de développer un standard interne, par exemple trois échantillons de sperme congelés ayant des taux faibles, moyens et élevés de fragmentation de l'ADN. Ceci permettrait d'évaluer des échantillons de sperme de patients avec un minimum d'erreur intra- et inter-essai et de définir un seuil au-dessus duquel l'ADN est considéré gravement endommagé.

## 5. Conclusion et perspectives

Au départ, notre hypothèse était que l'exposition de spermatozoïdes à une dose sublétales d'un agent spermicide, le FTDBA, causait de la fragmentation à leur ADN suite à une production de SOR. Il devenait important de vérifier cette possibilité car une fécondation par un spermatozoïde ainsi altéré risque d'amener des défauts génétiques d'origine paternelle chez la progéniture. Cette hypothèse nous venait du fait que Debbasch et coll. (1999) avait observé une production de SOR suite à l'exposition de cellules conjonctivales à des ammoniums quaternaires. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons d'abord utilisé une technique bien connue de détection des extrémités 3'OH de l'ADN, la technique TUNEL. Afin de valider nos interprétations, 2 nouvelles méthodes de détection des fragments de l'ADN ont été utilisées, soit l'électrophorèse et le marquage radioactif. La détection de SOR a été effectuée par chimiluminescence et la microscopie électronique à permis de déterminer l'effet du FTDBA sur la condensation de la chromatine.

Nos résultats démontrent que le FTDBA ne cause pas de brisures dans l'ADN des spermatozoïdes, ni aucune production de SOR. Les analyses effectuées laissent plutôt croire que cet agent spermicide permet une meilleure détection des fragments qui seraient habituellement inaccessibles par la technique TUNEL. Les images en microscopie électronique illustrent bien la décondensation de la chromatine suite à l'exposition des spermatozoïdes au FTDBA.

Nos données impliquent l'innocuité de l'agent spermicide pour l'embryon ou le fœtus en cas de grossesse accidentelle malgré son utilisation : il n'endommage pas l'ADN des spermatozoïdes, cependant, il semble rendre la chromatine plus granulaire et



décondensée. Des tests supplémentaires devraient être effectués pour s'assurer que ces changements structuraux ne sont pas nuisibles à l'embryon ou au fœtus en cas de fécondation. Du point de vue méthodologique, le FTDBA permettrait une plus grande sensibilité de la technique TUNEL, devenue populaire dans les laboratoires de recherche en reproduction. Il serait aussi intéressant de vérifier si l'ajout de DTT (réducteur des ponts disulfures), en plus du FTDBA, permet une accessibilité accrue aux extrémités 3'OH.

Plus d'un homme sur 25 souffre d'infertilité. Cette « maladie » n'entraîne pas de décès, mais elle peut tout de même amener des troubles psychologiques sérieux chez l'homme atteint (Czyba, 1993). Il est donc important que la recherche s'y intéresse. La technique TUNEL améliorée par le FTDBA serait donc appropriée dans la détection du taux réel de spermatozoïdes ayant de l'ADN fragmenté, et cela chez les conjoints de couples éprouvant de la difficulté à concevoir. Cela pourrait peut-être aider à trouver la cause de certains avortements spontanés à répétitions ou d'une infertilité jusque là inexplicée. Cette nouvelle technique plus sensible pourrait également être utilisée avant l'ICSI pour aider à préciser la qualité des spermatozoïdes. Comme cette méthode de reproduction assistée contourne presque toutes les voies de sélection naturelle, il est très important de savoir si les spermatozoïdes utilisés possèdent un ADN en bon état. Les embryons issus de ces fécondations seraient alors moins à risque de voir leur développement compromis.

Depuis peu, nous avons entamé des travaux sur le FTDBA similaires à ceux présentés dans ce mémoire, mais en recrutant cette fois des hommes ayant de la difficulté à induire une grossesse chez leurs conjointes. Des résultats préliminaires suggèrent que les spermatozoïdes de sujets consultant la clinique de fertilité sont plus sensibles à l'action du FTDBA que ceux provenant de sujets fertiles. Ceci pourrait devenir un moyen d'identifier les patients infertiles à cause d'un défaut de condensation de la chromatine des spermatozoïdes.

## 6. Bibliographie

Aitken R.J., Buckingham D.W. et West K.M.

Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. *J. Cell. Physiol.* 1992 ; 151(3) : 466-477.

Ahmadi A. et Ng S.C.

Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 1999 ; 284(6) : 696-704.

Baccetti B., Collodel G. et Piomboni P.

Apoptosis in human ejaculated sperm cells. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 1996 ; 28(4) : 587-596.

Balhorn R.

A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J. Cell. Biol.* 1982 ; 93(2) : 298-305.

Barroso G., Morshedi M. et Oehninger S.

Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 2000 ; 15(6) : 1338-1344.

Bathaie S.Z., Moosavi-Movahedi A.A. et Saboury A.A.

Energetic and binding properties of DNA upon interaction with dodecyl trimethylammonium bromide. *Nucleic. Acids. Res.* 1999 ; 27(4) : 1001-1005.

Bolch O.H. Jr. et Warren J.C.

In vitro effects of Emko on *Neisseria gonorrhoeae* and *Trichomonas vaginalis*.  
Am. J. Obstet. Gynecol. 1973 ; 115(8) : 1145-1148.

Burkitt H.G., Young B. et Heath J.W.

Wheater's functional histology (3<sup>rd</sup> edition).  
Éditeurs : Churchill Livingstone. Angleterre, 1993, 407p.

Caron N., Veilleux S. et Boissonneault G.

Stimulation of DNA repair by the spermatidal TP1 protein.  
Mol. Reprod. Dev. 2001 ; 58(4) : 437-443.

Celentano D.D., Klassen A.C., Weisman C.S. et Rosenshein N.B.

The role of contraceptive use in cervical cancer: the Maryland Cervical Cancer  
Case-Control Study.  
Am. J. Epidemiol. 1987 ; 126(4) : 592-604.

Chvapil M., Eskelson C.D., Stiffel V., Owen J.A. et Droegemueller W.

Studies on Nonoxynol-9. II. Intravaginal absorption, distribution, metabolism and  
excretion in rats and rabbits.  
Contraception. 1980 ; 22(3) : 325-339.

Collins A.R., Dobson V.L., Dusinska M., Kennedy G. et Stetina R.

The comet assay: what can it really tell us?  
Mutat. Res. 1997 ; 375(2) : 183-193.

Creinin, M. et Keith L.G.

Fertility control (2<sup>nd</sup> edition).

Éditeurs : Corson S.L., Derman R.J. et Tyrer L.B., Goldin Publishers. London, Ontario, 1994, 237-246.

Courtot A.M., Nikas G., Gravanis A. et Psychoyos A.

Effects of cholic acid and 'Protectaid' formulations on human sperm motility and ultrastructure.

Hum. Reprod. 1994 ; 9(11) : 1999-2005.

Czyba J.C.

Approche psychologique de l'homme infécond et stérile.

Rev. Prat. 1993 ; 43(8) : 979-980.

Debbasch C., de Saint Jean M., Pisella P.J., Rat P., Warnet J.M. et Baudouin C.

Cytotoxicité des ammoniums quaternaires sur une lignée de cellules conjonctivales humaines.

J. Fr. Ophtalmol. 1999 ; 22(9) : 950-958.

Diatchuk V., Lotan O., Koshkin V., Wikstroem P. et Pick E.

Inhibition of NADPH oxidase activation by 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride and related compounds.

J. Biol. Chem. 1997 ; 272(20) : 13292-13301.

Donnelly E.T., McClure N. et Lewis S.E.

The effect of ascorbate and alpha-tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa.

Mutagenesis. 1999 ; 14(5) : 505-512.

Duru N.M., Morshedi M. et Oehninger S.

Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa.

Fertil. Steril. 2000 ; 74(6) : 1200-1207.

Duru N.K., Morshedi M.S., Schuffner A. et Oehninger S.

Cryopreservation-Thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation.

J. Androl. 2001 ; 22(4) : 646-651.

Eddy E.M.

Male germ cell gene expression.

Recent. Prog. Horm. Res. 2002 ; 57 : 103-128.

Einarson T.R., Koren G., Mattice D. et Schechter-Tsafiri O.

Maternal spermicide use and adverse reproductive outcome: a meta-analysis.

Am. J. Obstet.Gynecol. 1990 ; 162(3) : 655-660.

Elzanaty S., Richthoff J., Malm J. et Giwercman A.

The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility.

Hum. Reprod. 2002 ; 17(11) : 2904-2911.

Evenson D. et Jost L.

Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment.

Methods Cell. Sci. 2000 ; 22(2-3) : 169-189.

Fichorova R.N., Desai P.J., Gibson F.C. 3<sup>rd</sup> et Genco C.A.

Distinct proinflammatory host responses to *Neisseria gonorrhoeae* infection in immortalized human cervical and vaginal epithelial cells.

Infect. Immun. 2001 ; 69(9) : 5840-5848.

Finch B.E. et Hugh A.

Contraception through the Ages.

Éditeurs : Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, 1967.

Fraga C.G., Motchnik P.A., Shigenaga M.K., Helbock H.J., Jacob R.A. et Ames B.N.

Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1991 ; 88(24) : 11003-11006.

Fuentes-Mascorro G., Vergara-Onofre M., Mercado E., Hernandez-Perez O. et Rosado A.

Participation of DNA structure on sperm chromatin organization.

Arch. Androl. 2000 ; 45(1) : 61-71.

Gandini L., Lombardo F., Paoli D., Caponecchia L., Familiari G., Verlengia C., Dondero F.  
et Lenzi A.

Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa.

Hum. Reprod. 2000 ; 15(4) : 830-839.

Gilbert SF.

Biologie du développement (traduction de la 4<sup>e</sup> édition américaine).

Éditeurs : De Boeck université. 1996, 892p.

Gorczyca W., Traganos F., Jesionowska H. et 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 ; 207(1) : 202-205.

Green T.R., Fellman J.H. et Wolf D.P.

Human spermicidal activity of inorganic and organic oxidants. *Fertil. Steril.* 2001 ; 76(1) : 157-162.

Guminska M. et Sterkowicz J.

Effect of sodium fluoride on glycolysis in human erythrocytes and Ehrlich ascites tumour cells in vitro. *Acta. Biochim. Pol.* 1976 ; 23(4) : 285-291.

Host E., Lindenberg S., Kahn J.A. et Christensen F.

DNA strand breaks in human sperm cells: a comparison between men with normal and oligozoospermic sperm samples. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 1999 ; 78(4) : 336-339.

Host E., Lindenberg S. et Smidt-Jensen S.

The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2000 ; 79(7) : 559-563.

Huggins G., Vessey M., Flavel R., Yeates D. et McPherson K.

Vaginal spermicides and outcome of pregnancy: findings in a large cohort study. *Contraception.* 1982 ; 25(3) : 219-30.



Jick H., Walker A.M., Rothman K.J., Hunter J.R., Holmes L.B., Watkins R.N., D'Ewart D.C., Danford A. et Madsen S.

Vaginal spermicides and congenital disorders.

JAMA. 1981 ; 245(13) : 1329-1332.

Judson F.N., Ehret J.M., Bodin G.F., Levin M.J. et Rietmeijer C.A.

In vitro evaluations of condoms with and without nonoxynol 9 as physical and chemical barriers against Chlamydia trachomatis, herpes simplex virus type 2, and human immunodeficiency virus.

Sex. Transm. Dis. 1989 ; 16(2) : 51-56.

Kashiwabara S., Noguchi J., Zhuang T., Ohmura K., Honda A., Sugiura S., Miyamoto K., Takahashi S., Inoue K., Ogura A. et Baba T.

Regulation of spermatogenesis by testis-specific, cytoplasmic poly(A) polymerase TPAP.

Science. 2002 ; 298(5600) : 1999-2002.

Kobayashi H., Gil-Guzman E., Mahran A.M., Sharme R.K., Nelson D.R., Thomas A.J. Jr. et Agarwa A.

Quality control of reactive oxygen species measurement by luminol-dependent chemiluminescence assay.

J. Androl. 2001 ; 22(4) : 568-574.

Kodama H., Yamaguchi R., Fukuda J., Kasai H. et Tanaka T.

Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients.

Fertil. Steril. 1997 ; 68(3) : 519-524.

Kreiss J., Ngugi E., Holmes K., Ndinya-Achola J., Waiyaki P., Roberts P.L., Ruminjo I., Sajabi R., Kimata J., Fleming T.R, Anzala A., Holton D. et Plummer F.

Efficacy of nonoxynol 9 contraceptive sponge use in preventing heterosexual acquisition of HIV in Nairobi prostitutes.

JAMA. 1992 ; 268(4) : 477-482.

Lee C.H.

Review: in vitro spermicidal tests.

Contraception. 1996 ; 54(3) : 131-147.

Levy R. et Seifer-Aknin I.

Place de l'apoptose au cours de la spermatogenèse et dans le sperme éjaculé : relations avec la fécondation.

Ann. Biol. Clin. 2001 ; 59(5) : 531-543.

Linn S., Schoenbaum S.C., Monson R.R., Rosner B., Stubblefield P.G. et Ryan K.J.

Lack of association between contraceptive usage and congenital malformations in offspring.

Am. J. Obstet. Gynecol. 1983 ; 147(8) : 923-928.

Lopes S., Jurisicova A., Sun J.G. et Casper R.F.

Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa.

Hum. Reprod. 1998a ; 13(4) : 896-900.

Lopes S., Sun J.G., Jurisicova A., Meriano J. et Casper R.F.

Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection.

Fertil. Steril. 1998b ; 69(3) : 528-532.

Louik C., Mitchell A.A., Werler M.M., Hanson J.W. et Shapiro S.

Maternal exposure to spermicides in relation to certain birth defects.

N. Engl. J. Med. 1987 ; 317(8) : 474-478.

Malkovsky M., Newell A. et Dalglish A.G.

Inactivation of HIV by nonoxynol-9.

Lancet. 1988 ; 1(8586) : 645.

Marnett L.J.

Oxyradicals and DNA damage.

Carcinogenesis. 2000 ; 21(3) : 361-370.

Matsuda Y., Seki N., Utsugi-Takeuchi T. et Tobar I.

X-ray- and mitomycin C (MMC)-induced chromosome aberrations in spermiogenic germ cells and the repair capacity of mouse eggs for the X-ray and MMC damage.

Mutat. Res. 1989 ; 211(1) : 65-75.

McPherson S.M. et Longo F.J.

Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids.

Mol. Reprod. Dev. 1992 ; 31(4) : 268-279.

McPherson S.M. et Longo F.J.

Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids.

Eur. J. Histochem. 1993 ; 37(2) : 109-128.

Niruthisard S., Roddy R.E. et Chutivongse S.

Use of nonoxynol-9 and reduction in rate of gonococcal and chlamydial cervical infections.

Lancet. 1992 ; 339(8806) : 1371-1375.

Patarca R. et Fletcher M.A.

Effects of benzalkonium salts on eukaryotic and microbial G-protein-mediated processes and surface membranes.

Crit. Rev. Oncog. 1995 ; 6(3-6) : 327-356.

Patton D.L., Kidder G.G., Sweeney Y.C., Rabe L.K. et Hillier S.L.

Effects of multiple applications of benzalkonium chloride and nonoxynol 9 on the vaginal epithelium in the pigtailed macaque (*Macaca nemestrina*).

Am. J. Obstet. Gynecol. 1999 ; 180(5) : 1080-1087.

Pena A.I., Quintela L.A. et Herradon P.G.

Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry.

Theriogenology. 1998 ; 50(8) : 1211-1220.

Punchard N.A. et Kelly F.J.

Free radicals: A practical approach.

Éditeurs : Punchard N.A. et Kelly F.J. Oxford, 1996, 310p.

Ramos L. et Wetzels A.M.M.

Low rates of DNA fragmentation in selected motile human spermatozoa assessed by the TUNEL assay.

Hum. Reprod. 2001 ; 16(8) : 1703-1707.

Richardson B.A.

Nonoxynol-9 as a vaginal microbicide for prevention of sexually transmitted infections: it's time to move on.

JAMA. 2002 ; 287(9) : 1171-1172.

Richardson B.A., Lavreys L., Martin H.L. Jr., Stevens C.E., Ngugi E., Mandaliya K., Bwayo J., Ndinya-Achola J. et Kreiss J.K.

Evaluation of a low-dose nonoxynol-9 gel for the prevention of sexually transmitted diseases: a randomized clinical trial.

Sex Transm. Dis. 2001 ; 28(7) : 394-400.

Roddy R.E., Zekeng L., Ryan K.A., Tamoufe U. et Tweedy K.G.

Effect of nonoxynol-9 gel on urogenital gonorrhea and chlamydial infection: a randomized controlled trial.

JAMA. 2002 ; 287(9) : 1117-1122.

Rodriguez I., Ody C., Araki K., Garcia I. et Vassalli P.

An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis.

EMBO J. 1997 ; 16(9) : 2262-2270.

Rosenberg M.J., Rojanapithayakorn W., Feldblum P.J. et Higgins J.E.

Effect of the contraceptive sponge on chlamydial infection, gonorrhea, and candidiasis. A comparative clinical trial.

JAMA. 1987 ; 257(17) : 2308-2312.

Sailer B.L., Jost L.K. et Evenson D.P.

Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay.

J. Androl. 1995 ; 16(1) : 80-87.

Sakkas D., Mariethoz E., Manicardi G., Bizzaro D., Bianchi P.G. et Bianchi U.

Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa.

Rev. Reprod. 1999a ; 4(1) : 31-37.

Sakkas D., Mariethoz E. et St John J.C.

Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway.

Exp. Cell. Res. 1999b ; 251(2) : 350-355.

Sergerie M., Laforest G., Bissonnette F. et Bleau G.

Sperm DNA fragmentation in fertile men as measured by terminal uridine nick end-labeling assay: a longitudinal study.

Soumis à Human Reproduction.

Shen H. et Ong C.

Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility.

Free Radic. Biol. Med. 2000 ; 28(4) : 529-536.

Stevens A. et Lowe J.

Histologie humaine (traduction de la 2<sup>e</sup> édition anglaise).

Éditeurs : De Boeck université. 1997, 408p.

Thibault C. et Levasseur M.-C.

La reproduction chez les mammifères et l'homme.

Éditeurs : Ellipses. Paris, 2001, 928p.

Trussell J. et Vaughan B.

Contraceptive failure, method-related discontinuation and resumption of use: results from the 1995 National Survey of Family Growth.

Fam. Plann. Perspect. 1999 ; 31(2) : 64-72, 93.

Twigg J., Fulton N., Gomez E., Irvine D.S. et Aitken R.J.

Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants.

Hum. Reprod. 1998a ; 13(6) : 1429-1436.

Twigg J.P., Irvine D.S. et Aitken R.J.

Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection.

Hum. Reprod. 1998b ; 13(7) : 1864-1871.

Vernet P., Fulton N., Wallace C. et Aitken R.J.

Analysis of reactive oxygen species generating systems in rat epididymal spermatozoa.

Biol. Reprod. 2001 ; 65(4) : 1102-1113.

Wainberg M.A., Spira B., Bleau G. et Thomas R.

Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 in tissue culture fluid and in genital secretions by the spermicide benzalkonium chloride.

J. Clin. Microbiol. 1990 ; 28(1) : 156-158.

Wolgemuth D.J., Laurion E. et Lele K.M.

Regulation of the mitotic and meiotic cell cycles in the male germ line.

Recent Prog. Horm. Res. 2002 ; 57 : 75-101.

Yamamoto T., Mori S., Yoneyama M., Imanishi M. et Takeuchi M.

Evaluation of rat sperm by flow cytometry: simultaneous analysis of sperm count and sperm viability.

J. Toxicol. Sci. 1998 ; 23(5) : 373-378.

Zini A., de Lamirande E. et Gagnon C.

Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa.

Int. J. Androl. 1993 ; 16(3) : 183-188.



