AIX-MARSEILLE UNIVERSITE FACULTE DE MÉDECINE DE MARSEILLE

ECOLE DOCTORALE 251: Sciences de l'Environnement







Examinateur

THÈSE

Présentée publiquement le16 Septembre 2014

Par Madame Anaïs RICOU-BERTHELOT

Pour obtenir le titre de Docteur en Sciences de l'université d'Aix-Marseille,

Spécialité : Environnement et Santé

RISQUE GENOTOXIQUE ET OVOCYTES.

Etude sur modèle souris de la génotoxicité des cryoprotecteurs et

des protocoles de vitrification ovocytaire.

Membres du Jury de la Thèse :

- Pr Bruno SALLE, Université Claude Bernard, Lyon (France)______Rapporteur
- Pr Fabien ECTORS, Université de Liège (Belgique)_____Rapporteur
- Pr Thierry TATONI, Aix-Marseille université (France) _____ Examinateur
 Dr Jeanne PERRIN, Aix-Marseille université (France) _____ Examinatrice
- Dr Ludovic LE HEGARAT, ANSES (France)
- Dr Blandine COURBIERE, Aix-Marseille université (France)_____Directrice de Thèse

RESUME

La toxicologie génétique (ou génotoxicologie) est une discipline qui vise à détecter des facteurs chimiques ou physiques interagissant (directement ou non) avec l'ADN des cellules somatiques et / ou germinales et qui, en l'absence de réparation fidèle, sont susceptibles de provoquer des mutations géniques et/ou chromosomiques. Le test des comètes est un test court de génotoxicité simple, reproductible et rapide pour étudier la survenue de lésions primaires de l'ADN. Il s'agit d'une technique micro-électrophorétique très sensible permettant la mise en évidence des lésions de l'ADN de cellules eucaryotes individuelles exposées à des agents génotoxiques. En présence de cassures de l'ADN, les fragments d'ADN ainsi formés migrent plus rapidement que l'ADN intact lors de l'électrophorèse, donnant aux noyaux cellulaires l'aspect de comètes. La cryoconservation des ovocytes matures par vitrification est en plein essor dans le monde, avec à la clé de nombreuses applications: alternative à la congélation d'embryons en FIV, préservation de la fertilité avant traitement gonadotoxique, développement du don d'ovocyte. La vitrification consiste à transformer un liquide en un état vitreux et utilise des agents cryoprotecteurs (CP) à haute concentration, notamment : le diméthylsulfoxyde (DMSO), l'éthylène glycol (EG) et le 1, 2 propanediol (PrOH). Plusieurs centaines de naissances d'enfants en bonne santé ont été décrites de par le monde. Néanmoins peu d'études cliniques ce sont intéressées aux effets à long terme de cette technique en particulier au plan génétique. Une étude préliminaire de notre équipe, avait testé la génotoxicité des 3 CP précédemment cités, grâce à un modèle toxicogénétique validé sur lignées cellulaires d'ovaire de hamster (CHO). Alors que le DMSO et l'EG n'induisaient pas de lésions significatives de l'ADN, le PrOH avait une activité génotoxique (test des comètes) mais induisait aussi des mutations chromosomiques (test de numération des micronoyaux), et ce même à faible concentration. Ces résultats ont imposé la poursuite des tests de génotoxicité des CP en les appliquant à l'ovocyte.

L'objectif de ce travail a été dans un premier temps de développer et de valider une technique de test des comètes sur ovocyte de souris, puis d'utiliser ce test pour évaluer la génotoxicité du PrOH sur les ovocytes de souris qu'il soit employé seul ou inclus dans les solutions de vitrifications commercialisées pour la cryoconservation d'ovocytes humains.

Mots clefs : Ovocyte, test des comètes, souris, lésions de l'ADN, vitrification, cryoprotecteurs, génotoxicité, 1, 2 propanediol, PrOH

TABLE DES MATIERES

LIST	'E DES	ILLUSTRATIONS	4
LIST	E DES	ABREVIATIONS	5
INTR	RODUC	TION	6
			0
ANA	LYSE H	SIBLIOGRAPHIQUE	8
1.	Princi	pes de Toxicologie génétique	9
2.	Limite	s des tests de génotoxicité classiques pour l'étude de la cellule germinale	~~ !
	fémini	ne	_13
3.	Princi	pe de cryoconservation ovocytaire	_13
4.	Cryoce	onservation des ovocytes matures par vitrification	15
5.	Etude	de la génotoxicité des cryoprotecteurs utilisés à haute concentration pou	ır
	les tecl	nniques de vitrification sur cellules somatiques	_16
OBJI	ECTIFS	S DE L'ETUDE	17
			_
ЛЛАГ	ואדסאי		10
	ICKICI	LS ET METHODES	_19
1.	Réact	ifs	_20
2.	Anima	aux	20
3.	Proto	cole de superovulation	_20
4.	Recue	eil des ovocytes	_21
5.	Prépa	ration des ovocytes et exposition aux agents	
	chimi	ques et physiques testés	_23
6.	Test d	le comètes en version alcaline	25
	a.	Principes généraux du test des comètes sur cellules somatiques eucaryotes	·
	b.	Coloration et acquisition des images	
	c.	Analyse statistique et interprétation des données du test des comètes	

TEST DES COMETES ET OVOCYTES DE SOURIS	30
1. Différences cytologiques et génétiques entre cellules somatiques et ovocytes	s 31
2. Adaptation technique du test des comètes à l'ovocyte	32
3. Validation du test des comètes sur ovocyte de souris	34

4. Publication 1 (1)

Comet assay on mouse oocytes: an improved technique to evaluate genotoxic risk on female germ cells. » Fertility and Sterility 2011; 95(4):1452-1457.

APPLICATION PRATIQUE EN BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION : Etude de la génotoxicité des cryoprotecteurs utilisés pour la vitrification ovocytaire 48

- 1. Evaluation de la génotoxicité du PrOH
 50
- **2.** Publication 2 (2) _____52

Assessment of 1, 2-propanediol (PrOH) genotoxicity on mouse oocytes by comet assay. Fertility and Sterility 2011; 96(4):1002-1007.

- 3. Evaluation de la génotoxicité des protocoles de vitrification ovocytaires, avant vitrification et après réchauffement _____66
- 4. Publication 3 (3) ______69

Genotoxicity assessment of mouse oocytes by comet assay before vitrification and after warming with three vitrification protocols. » Fertility and Sterility 2013; 100(3):882–888.

DISCUSSION GENERALE		
1. Limites des tests de génotoxicologie applicables à l'ovocyte	86	
2. Mécanismes de réparation des lésions de l'ADN par l'ovocyte	87	
3. Avantages et inconvénients du test des comètes sur ovocyte		
dans l'évaluation des toxiques	89	
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	90	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	94	
PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THESE	100	
1. Articles parus dans des revues à comité de lecture	101	
a. Revues internationales		
b. Revues nationales		
2. Communications orales nationales	101	
3. Communications affichées	102	
a. Congrès internationaux		
b. Congrès nationaux		

36

ANNEXES	_103
Annexe 1 : Avis du comité régional d'éthique sur l'expérimentation animale	_104
Annexe 2 : Article : Genotoxicity risk assessment and oocytes:	_105
Basis of genetic toxicology and application in reproductive science. Gynécologie Obstétrique	Fertil.
2013;41: 44–547.	
Annexe 3 : Article Evaluating methods of mouse euthanasia on the oocyte quality:	109
cervical dislocation versus isoflurane inhalation. Lab. Anim. 2012;46(2):167-9. Epub 2012 Apr	17.
Annexe 4 : Poster ESHRE 2013	_111
Annexe 5 : Poster ESHRE 2011	_112
Annexe 6 : Poster Congrès EDSE 2013	_113
Annexe 7 : Poster FFER 2012	_114
Annexe 8 : Poster 1 FFER 2010	_115
Annexe 9 : Poster 2 FFER 2010	_116

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Exemple d'acquisition d'images après test des comètes sur cellules somatiques.	_11
Figure 2 : Principe du test des micronoyaux: Lésion chromosomique au cours de la mitose après exposition de cellules somatiques à un agent génotoxique.	_12
Figure 3 : Formules chimiques des CP utilisés dans les techniques	
de congélation et de vitrification.	_14
Figure 4 : Vue globale de la cavité péritonéale de souris après déplacement du tube digestif.	_21
Figure 5 : Tractus génital de souris isolé.	_22
Figure 6 : Complexes cumulo-ovocytaires en microscopie inversé grossissement x 200.	_23
Figure 7 : Etape de décoronisation ovocytaire.	_24
Figure 8 : Aspect ADN obtenue après test des comètes	
sur ovocytes de souris et coloration à l'IP.	_27
Figure 9 : Ovocyte mature en métaphase II, après décoronisation.	_31
Figure 10 : Evaluation des lésions de l'ADN induites par le PrOH sur cellules CHO.	_49
Figure 11 : Schéma d'étude de la génotoxicité du PrOH sur ovocytes de souris.	_50
Figure 12 : ovogenèse et mécanismes de réparation de l'ADN actifs	
au cours du cycle cellulaire.	88

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN: Acide Désoxyribo Nucléique

BaP: Benzo[a]pyrène

BET: bromure d'éthidium

CHO: cellules Ovariennes de Hamster Chinois

CP : cryoprotecteur

CSB: cassures simple brin

DMSO : diméthylsulfoxyde

EG : éthylène glycol

EDTA: éthylène diamine tétra acétique

FSH: Follicle Stimulating Hormone

H₂O_{2:} peroxyde d'hydrogène

hCG: human Chorionic Gonadotropin

HSV: High Security Vitrification

INRS : Institut national de recherche et de sécurité

IP: Iodure de Propidium

LH: luteinizing hormone

LMP: Low Melting Point

MMC: Mytomycine C

MMS: Méthyl méthane sulfonate

NMP: Normal Melting Point

OTM: Olive Tail Moment

PBS: Phosphate Buffer Saline

PMSG: Pregnant Mare Serum Gonadotropin

PROH: 1, 2 propanediol

RSA: rayonnement solaire artificiel

TUNEL assay: TdT-mediated-dUTP nick end labeling assay

VF : vitrification

INTRODUCTION

La toxicologie génétique ou génotoxicologie est une discipline qui vise à détecter des facteurs chimiques ou physiques interagissant (directement ou non) avec l'ADN des cellules somatiques et / ou germinales et qui, en l'absence de réparation fidèle, sont susceptibles de provoquer des mutations géniques et/ou chromosomiques (4–6).

Le test des comètes est un test court de génotoxicité simple, reproductible et rapide pour étudier la survenue de lésions primaires de l'ADN. Il s'agit d'une technique microélectrophorétique très sensible permettant la mise en évidence des dommages et des altérations subis par l'ADN (cassures de brin, sites labiles alcalins et sites incomplets de réparation) de cellules eucaryotes individuelles exposées à des agents chimiques ou physiques génotoxiques. En présence de cassures de l'ADN, les fragments d'ADN ainsi formés migrent plus rapidement que l'ADN intact lors de l'électrophorèse, donnant aux noyaux cellulaires l'aspect de comètes (7,8).

L'application de ce test aux cellules germinales permettrait de compléter des tests de toxicologie génétiques réalisés en première intention sur des cellules somatiques vise à évaluer l'impact d'une exposition à des environnements potentiellement mutagènes qui pourraient constituer un risque pour la fertilité ou pour la descendance des individus exposés (9). Devant l'absence de tests de génotoxicologie adaptés à la cellule germinale féminine, notre équipe a développé l'application du test des comètes sur ovocytes de souris.

Notre travail a comporté 3 parties : **1.** la mise au point du test de comètes sur ovocyte de souris, **2.** son application pratique en biologie de la reproduction avec l'étude de la génotoxicité des cryoprotecteurs utilisés à haute concentration pour la vitrification des ovocytes, **3.** l'étude de la génotoxicité de trois solutions cryoprotectrices inclus dans trois kits de vitrification commercialisés pour la vitrification des ovocytes humains.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Principes de Toxicologie génétique :

La toxicologie génétique ou génotoxicologie est une discipline qui vise à détecter des facteurs chimiques ou physiques interagissant (directement ou non) avec l'ADN des cellules somatiques et / ou germinales et qui, en l'absence de réparation fidèle, sont susceptibles de provoquer des mutations géniques et/ou chromosomiques. Ces mutations géniques et chromosomiques sont susceptibles d'initier un processus cancérogène lorsqu'elles ont lieu sur des cellules somatiques. En cas d'atteinte des cellules germinales, l'effet génotoxique risque d'entrainer une toxicité vis-à-vis de la reproduction (reprotoxicité) et/ou un risque théorique de transmission des mutations à la descendance (4–6).

Les objectifs des différents tests de génotoxicité sont d'une part d'identifier des agents génotoxiques, mais également de déterminer leurs modes d'action moléculaires et cellulaires (bioactivation, nature des interactions avec l'ADN, modifications de bases, cassures de brins, pontages, intercalations, substitutions, addition ou délétion de paires de bases, cassures chromatidiennes ou chromosomiques, pertes de chromosomes entiers...) (5).

Différents tests et stratégies associatives de tests de génotoxicité ont été développés pour évaluer le risque de survenue des trois types de dommages génétiques responsables de pathologies humaines: les mutations géniques (modifications d'une ou de quelques paires de bases dans un seul gène), les mutations chromosomiques de structure (translocations et inversions consécutives à des cassures double-brins directes ou indirectes) et les mutations aneugènes (qui induisent une perte de chromosomes entiers) (10).

Les lésions primaires de l'ADN peuvent être évaluées par le test des comètes, ou par la détection de différents types d'adduits; les mutations géniques par le test d'Ames et le « Mouse lymphoma assay », les lésions chromosomiques clastogènes et aneugènes par le test des aberrations chromosomiques ou le test des micronoyaux (11).

La plupart des stratégies réglementaires visant à autoriser la mise sur le marché de produits chimiques et leur condition d'emploi recourent à la combinaison d'un test de mutations géniques sur cellules procaryotes, d'un test in vitro de mutation chromosomiques sur cellules de mammifères, et d'un test de mutation chromosomiques in vivo sur la moelle osseuse de rongeurs (12). Si les résultats de ces tests sont négatifs, l'agent ne sera pas considéré comme génotoxique (4,10,12).

Deux tests de génotoxicité sont actuellement très employés, le test des comètes et le test des micronoyaux.

Le test des comètes est un test de génotoxicité relativement rapide qui met en évidence des dommages de l'ADN (cassures de brin, sites labiles alcalins et sites incomplets de réparation) de cellules eucaryotes individuelles suite à une exposition à des agents génotoxiques in vitro ou in vivo. Du fait de sa grande sensibilité, le test des comètes est actuellement l'un des plus utilisés et il peut être réalisé sur un grand nombre de types cellulaires (7,8). Les cassures d'ADN peuvent être directement induites par l'agent génotoxique, consécutives au stress oxydatif induit par l'agent, ou encore la conséquence de la mise en œuvre de systèmes de réparation de l'ADN.

Le principe de ce test repose sur une technique de micro-électrophorèse: en présence de cassures de l'ADN, les fragments d'ADN formés migrent plus rapidement que l'ADN intact, donnant à l'ADN cellulaire l'aspect de comètes. La tête de la comète contient l'ADN intact tandis que la queue renferme les fragments d'ADN cassés ayant migrés (figure 1) (8).





La migration par électrophorèse se fait de gauche à droite. La tête de la comète contient l'ADN intact et la queue de comète, les fragments d'ADN cassés ayant migrés. Coloration au Bromure d'éthidium, grossissement X 250.

(D'après Mélanie Aye 2009, Aix Marseille Université).

Le test des micronoyaux permet de mettre en évidence la présence d'anomalies chromosomiques de nombre ou de structure, consécutives à l'action d'agents génotoxiques, sur des cellules en culture. Les micronoyaux se définissent comme des entités nucléaires indépendantes du noyau principal et présentes dans le cytoplasme des cellules en interphase. Ils sont constitués de fragments de chromosomes (effet clastogène) ou de chromosomes entiers perdus (effet aneugène) par le noyau cellulaire au cours de la mitose (figure 2) (13,14). Les taux de micronoyaux ont été évalués en recherchant la présence d'entités nucléaires indépendantes du noyau dans 1000 cellules binucléées par essai. Figure 2 : Principe du test des micronoyaux: Lésion chromosomique au cours de la mitose après exposition de cellules somatiques à un agent génotoxique. (15)



Effet aneugène : perte de chromosomes entiers.

Effet clastogène : perte de fragments de chromosomes.

2. Limites des tests de génotoxicité classiques pour l'étude de la cellule germinale féminine.

Le test des comètes est appliqué couramment aux spermatozoïdes dans le cadre de la recherche en biologie de reproduction (7,16,17). Le test des micronoyaux n'est réalisable que sur des cellules en division il n'est donc pas applicable aux cellules germinales. Concernant l'étude de la génotoxicité chez l'ovocyte, on retrouve dans la littérature quelques tests d'évaluation de la fragmentation de l'ADN comme le « TUNEL assay » (18,19) qui est un test d'évaluation de l'apoptose et non des lésions d'ADN d'une cellule vivante. Il n'existe pas de tests de génotoxicologie validés permettant d'évaluer les potentialités mutagènes sur l'ADN ovocytaire.

3. Principe de cryoconservation ovocytaire.

La congélation des ovocytes matures a longtemps été une technique mal maîtrisée, en comparaison avec la congélation des spermatozoïdes et des embryons. La congélation lente a été la technique initialement décrite. La première naissance humaine a été obtenue en 1986 (20). Cependant, avec la congélation lente, le taux de naissances par ovocytes congelés était bas, de l'ordre de 5 % (21,22). L'ovocyte mature en métaphase II est très sensible à la congélation du fait de ces caractéristiques morphologiques. Il s'agit de la plus grande cellule de l'organisme (110-150 μ m) mais également la cellule contenant le plus d'eau du fait de la surface cytoplasmique (en comparaison à l'embryon dont la surface totale est identique à celle de l'ovocyte mais dont la surface de cytoplasme est moindre du fait du clivage cellulaire) (23).

La vitesse de refroidissement est un des éléments essentiels du succès de la cryoconservation ovocytaire. Si la vitesse de refroidissement est trop lente, des cristaux de glace se forment dans le milieu extracellulaire il devient hypertonique et attire l'eau intracellulaire.

Mme Anaïs Ricou-Berthelot.

La déshydratation intracellulaire est alors létale pour la cellule. Lorsque la vitesse de refroidissement est trop rapide, des cristaux de glace se forment dans l'espace intracellulaire. Ils provoquent la destruction des structures cellulaires internes telles que les membranes ou le cytosquelette (24).

Ainsi, en cryobiologie, l'obstacle principal à surmonter pour assurer la survie des cellules est la formation de cristaux de glace (25). Pour limiter la formation de cristaux de glace les techniques de cryoconservation requièrent l'emploi d'agents cryoprotecteurs (CP) (26). Les CP comme le diméthylsulfoxyde (DMSO), l'éthylène glycol (EG) et le 1, 2-propanediol (PrOH) sont des composés chimiques naturels ou de synthèse (figure 3). Ces CP intracellulaires contiennent des groupements électronégatifs qui vont former des ponts hydrogènes avec les molécules d'eau (27).

Figure 3 : Formules chimiques des CP utilisés dans les techniques de congélation lente et de vitrification.



4. Cryoconservation des ovocytes matures par vitrification.

La vitrification consiste à transformer un liquide en un état vitreux ou amorphe, sans passer par une phase cristalline grâce à l'utilisation de cryoprotecteurs à haute concentration (7.5% et 15%) et à des vitesses de refroidissement élevées. La vitrification permet donc de conserver un échantillon biologique sans qu'il y ait eu formation de cristaux de glace. Les CP pénètrent rapidement dans les cellules et augmentent la viscosité des milieux intra et extracellulaires ; ce qui permet l'exposition des cellules à des vitesses de refroidissement très élevées. Il n'y a plus de phénomène de cristallisation, mais on assiste à une vitrification des liquides intra et extracellulaires et une stabilisation de l'état vitreux, sans effet délétère pour la cellule (24).

Du fait de ses excellents résultats en terme de survie ovocytaire après réchauffement, la vitrification est une technique de cryoconservation qui a révolutionné la biologie de la reproduction, en particulier pour la cryoconservation des ovocytes matures (28–30)

La vitrification des ovocytes humains matures a de nombreuses applications en médecine de la reproduction : alternative à la congélation des embryons dans les procédures de fécondation in vitro (31), préservation de la fertilité avant la mise en route d'un traitement anticancéreux gonadotoxique (32), création de « banques » d'ovocytes à usage sociétal et pour les patientes à risque d'insuffisance ovarienne prématurée (33).

La première naissance humaine après vitrification d'ovocytes a été rapportée en 1999 (34). Depuis plusieurs centaines de naissances d'enfants en bonne santé ont été décrites dans le monde (35–38,29). Néanmoins peu d'études cliniques ce sont intéressées aux risques mutagènes potentiels et à leurs conséquences éventuelles à long terme sur la descendance (39). Les conséquences à long terme de l'utilisation de fortes concentrations de cryoprotecteurs entrant directement au contact des chromosomes ovocytaires ne sont pas connues. Même si la technique de vitrification a montré une meilleure conservation des ovocytes que la congélation lente (36), il n'est pas exclu que cette technique génère des

Mme Anaïs Ricou-Berthelot.

dommages génétiques dont les conséquences pourraient se révéler plusieurs années après la naissance pouvant se traduire par une reprotoxicité ou mutagenèse et cancérogenèse chez les individu issus d'ovocytes vitrifiés.

5. Etude de la génotoxicité des cryoprotecteurs utilisés à haute concentration pour les techniques de vitrification sur cellules somatiques.

Notre équipe a mené un travail préliminaire d'évaluation de la génotoxicité in vitro des 3 CP utilisés le plus fréquemment en vitrification d'ovocytes humains : DMSO, EG et PrOH sur des lignées de cellules somatiques (40). Deux tests classiques de toxicologie génétique ont été réalisés: le test des micronoyaux et le test des comètes sur les cellules somatiques. Nous avons choisi d'utiliser comme modèle d'étude expérimental une lignée cellulaire de cellules CHO-K1 (ATCC, USA), correspondant à des cellules d'ovaires de hamster chinois. Ce modèle expérimental a été validé sur le plan international pour les études de génotoxicité (41). Les cellules CHO sont des cellules relativement stables au cours des mitoses successives et ont une capacité illimitée de divisions cellulaires. Le but a été de détecter, après exposition aux cryoprotecteurs, des évènements aneugènes c'est-à-dire liés à une altération structurale des chromosomes et des évènements aneugènes, liés à un changement du nombre de chromosomes. Cette étude a montré que le DMSO et l'EG n'induisaient pas de cassures de l'ADN et n'exerçaient ni activité clastogène ni aneugène sur les cellules CHO. En revanche, le PROH induisait in vitro des lésions de l'ADN et des cassures chromosomiques à partir d'une concentration de 5%.

Nous avons ainsi émis l'hypothèse que le PrOH était génotoxique pour les cellules CHO. Cependant, bien que ce modèle cellulaire et que ces tests soient largement utilisés en toxicologie génétique pour évaluer les risques génotoxiques des agents chimiques ou physiques, il nous était impossible d'extrapoler nos résultats à l'ovocyte.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Notre travail de recherche a comporté trois parties :

- La première partie avait pour objectif principal de mettre au point et de valider le test des comètes sur ovocyte mature de souris. Pour valider ce test, nous avons évalué les lésions de l'ADN provoqués par trois agents génotoxiques connus et couramment employés en génotoxicologie: le rayonnement solaire artificiel (RSA), le methylmethanesulfonate (MMS), et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en comparaison à des groupes de contrôles négatifs, par le test des comètes ex-vivo, sur des ovocytes de souris CD1.

- Dans la deuxième partie, nous avons évalué la génotoxicité du 1,2-propanediol sur l'ovocyte par l'application du test des comètes sur ovocytes de souris. Pour cela, nous avons testé 3 solutions de PrOH à différentes concentrations 5%, 7.5% et 15%, pour deux durées d'exposition longues (1 heure et 2 heures) tel qu'il est établi en matière de recherche en toxicologie et deux durées d'exposition courtes (1 minute et 5 minutes) tels que sont employés les cryoprotecteurs dans le cadre des protocoles de vitrification.

- La **troisième et dernière partie de notre travail** a eu pour but d'évaluer la génotoxicité de trois solutions inclues dans **trois kits de vitrification** commercialisés pour la vitrification des ovocytes humains. Deux solutions étaient composées d'EG et de DMSO et une solution contenait de l'EG et du PrOH. Nous avons réalisé le test des comètes à deux étapes de la procédure de vitrification ovocytaire : immédiatement après exposition des ovocytes aux solutions d'équilibration et après vitrification, réchauffement et réhydratation des ovocytes.

MATERIELS ET METHODES

1. Réactifs

Tous les réactifs utilisés ont été fournis par Sigma-Aldrich Chemie S.a.r.l. (Saint-Quentin Fallavier, France).

2. Animaux

La souris est un animal déjà utilisé en recherche dans le domaine de la médecine de la reproduction du fait de sa qualité de fertilité spontanée, de la simplicité et de l'efficacité des protocoles de stimulation ovarienne (42). Nous avons travaillé avec des souris femelles prépubères (de 4 à 5 semaines) souche CD1 (Laboratoire Charles River, L'Arbresle, France). L'ensemble de ce travail de recherche reçu l'agrément du comité régional d'éthique sur l'expérimentation animale N° : 3-4112009.

3. Protocole de superovulation

Deux gonadotrophines étaient successivement injectées en intra- péritonéal pour induire une super-ovulation :

- La "PMSG" (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) qui se substitue à la FSH (Follicle Stimulating Hormone) pour induire le recrutement et la maturation folliculaire.

- L'hCG (Human Chorionic Gonadotropin) qui se substitue qui se substitue à la LH (luteinizing hormone) pour la maturation folliculaire finale et le déclenchement de l'ovulation.

Chez la souris, pour obtenir une super ovulation les injections de PMSG et d'hCG doivent être faites à 46-48 heures d'intervalle et l'ovulation se produit 10 à 13 heures après l'injection d'hCG. Le prélèvement des ovocytes est effectué 16 h après l'injection d'hCG. Le protocole établi pour cette étude était le suivant :

J1 : PMSG 10 UI/ 100 μl en Intrapéritonéal à 15H J3 : hCG 5UI/ 100μl en Intrapéritonéal à 17H J4 : Prélèvement à 9h00

4. Recueil des ovocytes

Après euthanasie première des souris, par une dislocation cervicale (43), nous avons prélevé les oviductes situés à la partie distale de la corne utérine, au contact du bord externe de l'ovaire (figure 4-5). Sous loupe binoculaire dans une boite de pétri, contenant 1.5 ml de milieu M2, l'oviducte était sectionné à l'aide d'un trocart et les complexes cumuloovocytaires étaient extraits par pression douce. Le paquet ovocytaire était alors pipeté et placé dans le premier puits de stockage de 200µl de M2. Cette manipulation a été réalisée pour l'ensemble des oviductes prélevés

Figure 4 : Vue générale de la cavité péritonéale de souris après déplacement du tube digestif.



(D'après Valin G. 2010 Université de Rennes)

Mme Anaïs Ricou-Berthelot.

Figure 5 : Tractus génital de souris isolé.



(D'après Valin G. 2010 Université de Rennes)

5. Préparation des ovocytes et exposition aux agents chimiques et physiques testés.

Une fois tous les complexes cumulo-ovocytaires (figure 6) extraits et placés dans le plot de stockage, l'étape de décoronisation était réalisée. Cette étape consistait à séparer les ovocytes des cellules folliculaires afin d'obtenir des ovocytes individualisés (étape de décoronisation).

Figure 6 : Complexes cumulo-ovocytaires en microscopie inversé grossissement x 200.



Les complexes cumulo-ovocytaire étaient incubés durant 10 minutes dans un plot de Hyaluronidase à 10mg/ml. Les ovocytes étaient ensuite rincés dans les 3 puits successifs de milieu M2 puis pipetés individuellement à l'aide d'une pipette Stripper (Medicult MXL3-STL + Embouts Medicult MXL3-125) de façon à séparer mécaniquement chaque ovocyte des cellules folliculaires (figure 7 a, b, c). Enfin les ovocytes décoronisés étaient replacés à température ambiante dans la boite de stockage contenant le M2.

Figure 7 : Etape de décoronisation ovocytaire.

- a: Stripping des ovocytes sous loupe binoculaire.
- b : Pipetage de l'ovocyte par stripper après action de la Hyaluronidase.
- c : Ovocyte décoronisé dans la pipette Stripper.







6. Test de comètes en version alcaline.

a. Principes généraux du test des comètes sur cellules somatiques eucaryotes

La version alcaline de ce test selon la méthode décrite par Singh et al. (44), modifiée par De Méo et al. (45) et Decome et al. (46) est celle utilisée couramment par notre équipe. Les différentes étapes de ce test sur cellules somatiques eucaryotes sont décrites ci-après et ont servi de base au test des comètes que nous avons ensuite développé sur les ovocytes de souris. Une préparation préalable de lames de microscope (Thermo Scientific Superfrost plus, Braunschveig, Allemagne) est nécessaire à la parfaite adhérence du gel. Celles-ci sont recouvertes d'une fine couche d'agarose Normal Melting Point (NMP, Promega, France) à 1,8% préparé dans du PBS (tampon phosphate de Dubelco sans calcium ni magnésium) et maintenu à 50°C dans un bain-marie. Les lames sont ensuite séchées à température ambiante pendant une durée minimale de 24 h. Le jour du test, 85 µl d'agarose NMP à 0,8 % (préparé dans une solution de PBS sans calcium ni magnésium) sont déposés sur la lame et aussitôt recouverts d'une lamelle (24 x 32 mm). Cette couche d'agarose est solidifiée grâce à son maintien à 4°C pendant 5 min environ. Les cellules eucaryotes (ex : cellules CHO) après exposition à un agent génotoxique sont rincées avec du PBS, puis récoltées grâce à une solution de trypsine/EDTA (Eurobio, France) ajoutée dans les puits pendant 5 minutes à 37°C. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée à 1200 g pendant 5 min. Le culot cellulaire est mis en suspension dans 75 µl d'agarose Low Melting Point (LMP, Sigma Aldrich) à 0,5 % (préparé dans une solution de PBS sans calcium ni magnésium, maintenu à 37°C dans un bain-marie), puis déposé sur la lames et aussitôt recouvert d'une lamelle (24 x 32 mm). Après solidification, une troisième couche de 75 µl d'agarose LMP est déposée sur la lame et aussitôt recouverte d'une lamelle (24 x 32 mm) et placée sur un plan glacé pour solidification durant 5 minutes. Après retrait de la lamelle, la lame est immergée dans une solution de lyse (2,5 M de NaCl, 100 mM d'EDTA, 10 mM de Tris, 1 % de N-lauroyl sarcosine, 1% triton X100, 10% DMSO, pH 10 ; Sigma Aldrich) pendant 120 minutes à 4°C à l'obscurité. Après cette étape de lyse, la lame est immergée dans une cuve d'électrophorèse horizontale (FISHER, type 3) contenant du tampon d'électrophorèse (1 mM EDTA, 300 mM NaOH, pH > 13). La dénaturation de l'ADN est effectuée pendant 20 min à 25°C. L'électrophorèse est ensuite réalisée pendant 20 min (25 V, 300 mA). La lames est rincée 3 fois pendant 5 min avec du tampon Tris (0,4 M, pH 7,5), déshydratée par trempage dans une solution de méthanol absolu pendant 3 min et séchée pendant 12 h à température ambiante.

b. Coloration acquisition des images

La coloration de l'ADN a été effectuée à l'aide de 40 µl d'une solution d'Iodure de Propidium (IP) diluée à 0,1 ml/mg (47), en remplacement du bromure d'éthidium (BET), pour des raisons de sécurité sanitaire par l'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS). L'IP est comme le BET un intercalant de l'ADN, donc potentiellement génotoxique et carcinogène. A la différence du BET, l'IP ne pénètre pas dans les cellules vivantes et est donc recommandé en première intention par l'INRS à la place du BET, si cela ne modifie pas les résultats souhaités (fiche toxicologique FT 236 INRS 2010). Les lames ont été observées au microscope à fluorescence Olympus BX-60 (Olympus Rungis, France) avec un grossissement de 200. Ce microscope est muni d'un objectif x 20 UV. Un filtre dichroïque permet d'obtenir une longueur d'onde d'excitation comprise entre 510–550 nm et une longueur d'onde d'émission de 590 nm. Ce microscope est relié à une caméra CDD de haute sensibilité (Sony Tokyo, Japon). Les images digitales ont été collectées par Visilog software version 6.7 (Noesis SA, Saint Aubin, France) (figure 8).

Aix Marseille Université

Figure 8 : Aspect ADN obtenue après test des comètes sur ovocytes de souris et coloration à l'IP.





1. ADN intact aspect de sphère

2. ADN lésé aspect de comète

La migration par électrophorèse se fait de gauche à droite. La tête de la comète contient l'ADN intact et la queue de comète, les fragments d'ADN cassés ayant migrés. Grossissement X 200

c. <u>Analyse statistique et interprétation des données</u>

Le logiciel Fenestra Komet (version 5.5 et 6.0, Kinetics Imaging, Liverpool, UK), conçu pour le test des comètes, a permis de calculer 35 paramètres. Parmi ceux-ci, l'Olive Tail Moment (OTM) qui est défini comme le produit du pourcentage d'ADN réparti dans la queue de la comète par la distance entre les barycentres de la tête et de la queue de la comète (48) a été le paramètre quantitatif utilisé.

OTM =% ADN dans la queue x distance entre les barycentres (unités arbitraires)

L'interprétation statistique des résultats a été réalisée par l'OTM ². Bauer et al. (49) ont montré que les OTM suivent une distribution selon une fonction ² avec un profil asymétrique à faibles doses et une distribution tendant vers une loi normale de forme gaussienne pour les fortes doses. Ils ont proposé d'inclure ces paramètres mathématiques dans l'analyse afin de faciliter la description des résultats par des méthodes statistiques. Nous avons donc procédé en plusieurs étapes successives :

- Après avoir mesuré les 50 valeurs d'OTM, 40 classes d'OTM ont été définies dans l'intervalle entre les OTM minimal et maximal. L'utilisation du témoin positif comme standard interne a servi à calibrer les réponses. Les fréquences normalisées de distribution des OTM ont ensuite été calculées par rapport aux classes normalisées déterminées précédemment.

- A partir de ces fréquences normalisées, une régression non linéaire a été réalisée selon la fonction χ^2 dont la formule est présentée ci-après :

$$P(\chi^{2}) = \frac{(\chi^{2})^{\frac{n}{2}-1} * e^{-\frac{1}{2}\chi^{2}}}{2^{\frac{n}{2}} * \Gamma\left(\frac{n}{2}\right)}$$

Avec Γ (n/2) = fonction gamma

$$\Gamma\left(\frac{n}{2}\right) = \int_{0}^{t} e^{-t} * t^{-\frac{n}{2}} dt$$

- A l'aide du logiciel TableCurve 2D, le degré de liberté "n" a été calculé et exprimé sous la forme $OTM\chi^2$, qui est directement reliée à la fonction χ^2 et sert de paramètre pour évaluer le taux de cassures simple brin (CSB).

Les taux de dommages et d'altérations subis par l'ADN obtenus pour les diverses concentrations testées ont été comparés à ceux du témoin négatif par un test du ². Le test a été considéré positif si une relation dose-réponse a pu être obtenue entre les valeurs d'OTM χ^2 et les concentrations testées et si au moins une de ces concentrations a induit une augmentation statistiquement significative (P <0,01) des OTM χ^2 par rapport au témoin négatif.

TEST DES COMETES SUR OVOCYTES

DE SOURIS

Mme Anaïs Ricou-Berthelot.

1. Différences cytologiques et génétiques entre cellules somatiques et ovocytes.

L'ovocyte est la plus grosse cellule chez le mammifère, le diamètre moyen chez la femme est de $120\mu m$ (50) et de 70 μm chez la souris tandis que les cellules somatiques mesurent, par exemple pour les cellules CHO, 13 μm de diamètre. L'ovocyte possède une enveloppe externe glycoprotéique appelé zone pellucide. A la différence d'une cellule somatique diploïde, l'ovocyte est une cellule germinale, qui contient la moitié des chromosomes de la mère, cet ADN n'est pas contenu dans un noyau mais disposé dans le cytoplasme de la cellule au niveau du fuseau méiotique métaphasique. Chez le mammifère, l'ovocyte mature n'a pas terminé sa méiose et est bloqué en métaphase II, ainsi il contient *n* chromosomes à 2 chromatides, l'ADN restant est contenu dans le globule polaire situé dans l'espace périvitellin (figure 9).





O : Ovocyte décoronisé, p : espace perivitellin, f : premier globule polaire, z : zone pellucide

Il n'est éthiquement pas possible d'obtenir des ovocytes humains matures pour la recherche. Nous avons cherché un modèle animal qui permet de se rapprocher au mieux de l'ovocyte humain. L'ovocyte de souris, nous a semblé être le meilleur compromis en termes d'éthique, de faisabilité et validité des tests. En effet, alors que chez la femme, en dehors de tout protocole de stimulation ovarienne, un seul ovocyte est émis à chaque ovulation, chez la souris, un cycle spontané entraine l'émission de 7 à 10 ovocytes. Le protocole de superovulation utilisé nous a permis de recueillir en moyenne 15 ovocytes matures de bonne qualité par animal. D'autre part, l'ovocyte de souris présentent de nombreuses similitudes morphologiques et fonctionnelles avec l'ovocyte humain (42,51,52) ce qui nous a amené à ce choix.

Le protocole de recherche a été préalablement expertisé et validé par le comité régional d'éthique sur l'expérimentation animale des Bouches du Rhône et a obtenu l'agrément N° : 3-4112009 (Annexe 1).

2. Adaptation technique du test des comètes à l'ovocyte

Après quelques essais pour essayer de réaliser sur ovocytes le test des comètes décrit précédemment sur cellules eucaryotes somatiques (45), nous nous sommes rendus compte que le protocole habituel n'était pas applicable tel quel à l'ovocyte (données non publiées). Les modifications suivantes ont donc permis d'obtenir une efficacité et une reproductibilité de ce test :

 Pour des raisons éthiques visant à limiter le nombre de souris sacrifiées, le test des comètes, habituellement réalisé sur plusieurs milliers de cellules somatiques, a dû être adapté pour permettre l'utilisation de 30 à 40 ovocytes par lame.

- Les différentes couches d'agarose ont été amincies avec le dépôt d'une goutte de 50µl au lieu de 85µl pour l'agarose NMP et 75 µl pour l'agarose LMP, chaque goutte d'agar étant recouverte par une lamelle 22 x 32 mm.
- D'autre part, la deuxième couche d'agarose LMP a été supprimée pour permettre une meilleure lecture. Avec la technique à 3 couches, seuls 20% des ovocytes étaient retrouvés à la lecture contre 100% pour la technique à 2 couches. Les lames étaient ensuite placées à 4°C durant 30 minutes pour une solidification optimale de l'agar. Après cette période de refroidissement les lamelles étaient délicatement retirées et les lames placées, à plat, dans le tampon de lyse pour une durée de 120 minutes. Le reste de la procédure n'a pas nécessité d'autres modifications du protocole décrit précédemment.

Nous avons commencé par étudier le résultat du test des comètes réalisé ex vivo sur deux groupes d'ovocytes matures de souris CD1.

Un groupe d'ovocytes témoin négatif (T-), incubé dans un milieu de culture neutre, adapté au type cellulaire (milieu M2) à température ambiante. Un groupe d'ovocytes témoin positif (T+), exposé au rayonnement solaire artificiel (RSA) durant 4 minutes à 12J/cm² (=290-800 nm). Les conditions d'exposition au RSA correspondaient à une activité génotoxique connue et utilisées au sein de notre laboratoire comme témoin positif pour les tests de génotoxicité sur cellules somatiques (53).

Par ailleurs une des particularités de l'ovocyte par rapport aux cellules somatiques est l'existence de la zone pellucide (figure 9). Il s'agit d'une enveloppe glycoprotéique englobant l'ovocyte et son globule polaire elle est impliqué dans de nombreux mécanismes de protection de l'ovocyte et la fécondation (51) mais correspond en termes de composition chimique à une membrane cellulaire classique. L'ensemble des membranes cellulaires sont lysées lors du bain des lames dans le tampon de lyse réalisé avant la phase d'électrophorèse. Pourtant, dans les quelques articles ayant décrit précédemment le test des comètes sur ovocytes, les ovocytes étaient dépellucidés avec de l'acide tyrode (54). Par soucis de cohérence vis-à-vis de la littérature, nous avons souhaité nous assurer de l'absence de modification de l'effet des agents génotoxiques et de la migration de l'ADN en cas de réalisation du test des comètes sur ovocyte non dépellucidés ; les conditions de réalisation du test des comètes, citées précédemment, ont donc été réalisée à la fois sur un groupe d'ovocytes non dépellucidés (ZP+) et sur ovocytes dépellucidés (ZP-).

Toutes ces conditions expérimentales ont été réalisées sur 3 groupes de 40 ovocytes, à trois reprises.

Le test des comètes réalisé sur les groupes de témoins négatifs (T-) n'a pas retrouvé de lésions statistiquement significatives de l'ADN. Pour les groupes d'ovocytes exposés au RSA (T+) les lésions de l'ADN étaient significatives.

Aucune différence de migration des fragments d'ADN n'a été observée entre les groupes ZP+ et ZP-.

3. Validation du test des comètes sur ovocyte de souris.

Après cette première étape de mise au point du test des comètes sur ovocytes matures de souris, nous avons réalisé une étape de validation cette procédure sur ovocytes non dépellucidés. Nous avons effectué le test des comètes adapté aux ovocytes de souris dans différentes conditions expérimentales.
Nous avons donc testé l'action de 3 agents génotoxiques connus : le rayonnement solaire artificiel (=290-800 nm) (53,55), le Methylmethanesulfonate (à 2 concentrations : 50 et 100 μ M) (56) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, 250 μ Mol) (57,58) en comparaison à un groupe de témoin négatif. L'ensemble de ces tests a été réalisé à 3 reprises sur 3 groupes distincts de 40 ovocytes.

Un faible niveau de lésions d'ADN spontanées a été observé dans le groupe témoin négatif. RSA, MMS et H₂O₂ ont entraîné une augmentation significative des lésions de l'ADN en comparaison avec celles retrouvées dans le groupe témoin négatif (p<0.001***).

Ce travail a fait l'objet de la publication suivante qui expose en détail la méthodologie, les résultats et la discussion.

Berthelot-Ricou A, Perrin J, Di Giorgio C, De Meo M, Botta A, Courbiere B. Comet assay on mouse oocytes: an improved technique to evaluate genotoxic risk on female germ cells. Fertility and Sterility 2011; 95:1452

PUBLICATION 1

Comet assay on mouse oocytes: an improved technique to evaluate genotoxic risk on female germ cells.

A Berthelot-Ricou, J Perrin, C Di Giorgio, M De Meo, a Botta, B Courbiere. Fertility and Sterility. 2011; 95(4):1452-1457.

TECHNIQUES AND INSTRUMENTATION

Comet assay on mouse oocytes: an improved technique to evaluate genotoxic risk on female germ cells

Anais Berthelot-Ricou, M.D.,^a Jeanne Perrin, M.D., Ph.D.,^{a,b} Carole Di Giorgio, Ph.D.,^a Michel De Meo, Ph.D.,^aAlain Botta, M.D., Ph.D.,^a and Blandine Courbiere, M.D., Ph.D.^{a,c}

^a Laboratoire de Biogenotoxicologie et Mutagenese Environnementale, Federation de Recherche CNRS 3098 ECCOREV Universite de la Mediterran ee Aix-Marseille II, Facultes de Medecine et Pharmacie, Marseille, France; ^b CECOS-Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Pr Grillo, AP-HM La Conception, Marseille, France; and ^c Service de Gynecologie-Obstetrique, Centre d'Assistance medicale a la Procreation, Pr Gamerre, AP-HM La Conception, Marseille, France

Objective: To develop and validate an efficient comet assay on mouse oocytes without depellucidation.

Design: In vitro experiments using a murine model.

Setting: Biogenotoxicology research laboratory in Aix-Marseille II University, France.

Animal(s): CD1 prepubescent female mice.

Intervention(*s*): DNA lesions in oocytes were evaluated by the alkaline comet assay. After oocyte retrieval, we first studied the effect of zona pellucida (ZP) on comet morphology. For this study, we applied the comet assay to mature oocytes with and without ZP after exposure to simulated sunlight irradiation (SSI) compared with negative controls. Next, non depellucidated mouse oocytes were exposed to three well-known genotoxic agents (SSI, methylmethanesulfonate [MMS], and hydrogen peroxide [H₂O₂]) and compared with negative controls. Images of oocytes were analyzed with Komet software.

Main Outcome Measure(s): DNA damages were quantified and expressed as olive tail moment (OTM), defined as the product of the tail length and the fraction of total DNA in the tail. OTM 2 were calculated from OTM; they corresponded to the degrees of freedom (n) of each OTM distribution obtained from at least 50 oocytes. OTM 2 is an indicator of DNA lesions. The test was considered positive and statistically significant when OTM 2 increased in oocytes compared with the medium-only control cells.

Result(*s*): There was no difference in comet aspect between oocyte groups with and without ZP. The three genotoxic agents significantly increased DNA damages as compared with the control groups. The OTM ² values were (mean \pm SD): 2.1 \pm 0.07, 7.73 \pm 0.35, 3.35 \pm 0.15, and 12.4 \pm 0.51 in control, SSI, MMS, and H₂O₂ groups, respectively.

Conclusion(s): Comet assay on non depellucidated mouse oocytes is a rapid and easy test. This assay would be useful to assess the genotoxicity on female germ cells of chemicals, drugs, or environmental pollutants and the efficiency of antioxidant molecules. (Fertil Steril[®] 2011; 95:1452–7. © 2011 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Mice, oocytes, comet assay, germ cells, genotoxicity, DNA damages

The comet assay is a simple and rapid genotoxicity test for evaluating DNA damages in eukaryotic cells (1). This microelectrophoretic technique, also called the single-cell gel electrophoresis assay, is used to visualize denatured DNA fragments migrating out

Received July 13, 2010; revised September 1, 2010; accepted September 14, 2010; published online October 27, 2010. A.B-R. has nothing to disclose. J.P. has nothing to disclose. C.D.G. has nothing to disclose. M.D.M. has nothing to disclose. A.B. has nothing to disclose. B.C. has nothing to disclose. Supported by a grant from the Agence de la Biomedecine, France and by two fellowships for the first author from Association pour le Developpement des Recherches Biologiques et Medicale au Centre Hospitalier de Marseille (ADEREM) and Fond d'aide àla Recherche (FARO) Schering-Plough, France. requests: Blandine Courbiere, M.D., Ph.D., Reprint Centre d'Assistance Medicaleà la Procréation, AP-HM La Conception, 147 Bd Baille, 13005 Marseille, France (E-mail: <u>blandine.courbiere@ap-hm.fr).</u>)

of the cell nucleus during electrophoresis. The image obtained is a "comet" with a distinct head consisting of intact DNA and a tail containing relaxed DNA loops or broken pieces of DNA (2). Because of the sensitivity of the comet assay for detecting a broad spectrum of primary DNA lesions (3-5), its applicability to various tissues and special cell types, and its requirement for cancers at the individual level. genotoxic small numbers of cells per sample (5-7), it has gained popularity as a standard technique to assess the genotoxic activity of potential carcinogenic agents in a wide range of somatic cells. However, whereas genotoxicity in somatic cells results in degenerative disorders and events occurring in germ cells (spermatozoa and oocytes) may lead to chromosome abnormalities in future generations (1, 8). On this basis, the necessity of assessing the genotoxic effects of exogenous pollutants on germline cells has been highlighted by the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (9).

Although the comet assay has been applied successfully to human sperm in the context of male infertility and ART, female germ cells have been poorly investigated and few techniques have been developed for genotoxic risk assessment in oocytes. The mouse is the most commonly mammalian model in reproductive research for obtaining oocytes (10). It would therefore be useful to develop the comet assay on mouse oocytes to assess the genotoxicity of chemicals, drugs, and environmental pollutants.

In this study, we evaluated the DNA-damaging activity of three well-known genotoxic agents (simulated sunlight irradiation [SSI], methylmethanesulfonate [MMS], and hydrogen peroxide $[H_2O_2]$) (11–13), compared with controls, by the ex vivo comet assay on CD1 mouse oocytes.

MATERIALS AND METHODS

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) unless stated otherwise.

Animals

Prepubescent female CD1 mice (Charles River Laboratory, L'Arbresle, France) were housed in a temperature- and light-controlled room, with free access to food and water.

Institutional Review Board

Institutional Review Board approval (no. 3-24112009) was obtained after submission to the National Ethics Committee on Animal Experimentation. All experimental protocols and animal handling procedures were approved by The National Ethics Committee on Animal Experimentation.

Source of Oocytes

Mice were injected intraperitoneally with 0.1 mL of 10 IU pregnant mare serum gonadotropin. Three days later, they received an injection of 0.1 mL of 5 IU of hCG. Sixteen hours later, the mice were killed by lethal anesthesia, and the oviducts were collected. Intact cumulus masses were released from excised oviducts and incubated with hyaluronidase (10 mg/mL). An average of 15 mature oocytes was released for each mouse. The mature mouse oocytes (metaphase II oocytes) were recognized by the presence of a first polar body, and only these oocytes were included in the study.

Impact Test of Zona Pellucida on Mouse Oocytes in the Comet Assay

To determine the impact of zona pellucida (ZP) in the comet assay we tested non depellucidated oocytes (ZP+) and depellucidated oocytes (ZP-). The comet assay was performed on both ZP+ and ZP- control oocytes and on ZP+ and ZPoocytes exposed to SSI (12 J/cm² for 4 minutes). In depellucidated oocytes, ZP was digested by acidic Tyrode's solution and washed three times in M2 medium before SSI exposure.

Exposure conditions

The experiments were performed on non depellucidated oocytes. Three positive controls with well-known genotoxic agents were included to validate the sensitivity of the assay—SSI (12 J/cm²), MMS (50 and 100 μ M), and H_2O_2 (250 μ M). All oocyte groups were incubated after retrieval in M16 medium for 1 hour at 37°C, 5% CO₂. For the SSI group (290–800 nm), oocytes were irradiated after the 1 hour incubation in M16 medium at 37°C in 5% CO₂. For the MMS group, oocytes were mixed with 50 or 100 µM MMS solution and incubated for 1 hour at 37°C, 5% CO₂. For the H₂O₂ group, oocytes were placed in 250 µM H₂O₂ solution for 5 minutes at 4°C in the dark after the 1 hour incubation in M16 medium. For each set of experiments, the control group consisted of oocytes incubated for 1 hour in M16 medium. For each condition, at least 40 oocytes were treated, and all conditions were replicated three times.

Alkaline Comet Assay

The alkaline comet assay was performed as described by Tice et al. (6), with some modifications to adapt the method for oocytes. Cytologic microscope slides were first covered with high–melting-point agarose (1.6% in PBS) and dried overnight at 20°C. A 50 mL drop of normal–melting-point agarose (0.8% in PBS) at 50°C was loaded on a slide and covered with a coverslip.

A 50 mL drop of low-melting- point agarose (0.5% in PBS) at 37°C was put on the precoated slide. Oocytes were then placed in the agarose droplet and covered with a coverslip.

Slides were lysed in a freshly prepared detergent solution (containing 2.5 M NaCl; 100 mM Na² EDTA; 10 mM Tris- HCl, pH 10; 1% Triton X-100; and 10% DMSO), for 120 minutes at 4°C. DNA unwinding was performed with an alkaline solution (1 mM Na2EDTA, 300 mM NaOH) for 20 minutes at 20°C in a 1-L electrophoresis horizontal unit. Next. electrophoresis was conducted for 20 minutes (25 V, 300 mA) in the same buffer solution. After the electrophoretic run, the slides were neutralized three times with 0.4 M Tris-HCl (pH 7.5), rinsed with ultrapure water, dipped into 100% methanol (HPLC grade purity solvent), and dried over- night at 20°C. Staining was performed with propidium iodide solution (0.1 mg/mL), and the slides were examined with an Olympus BX-60 (Olympus, Rungis, France) fluorescence microscope at 200 magnification, equipped with a highly sensitive color digital camera (Sony, Tokyo, Japan): band-pass filter, 510-550 nm; long-pass filter, 590 nm. Digital pictures were collected with Visilog software version 6.7 (Noesis SA, Saint Aubin, France).

Main Outcome Measures

For each condition, all the oocyte images were analyzed with Komet software (version 5.5, Nottingham, United Kingdom). DNA damages were expressed as olive tail moment (OTM; arbitrary units), defined as the product of the tail length and the fraction of total DNA in the tail (6).

Statistical Analysis

The calculated OTM values were distributed into 40 classes between the minimal and the maximal OTM values. A nonlinear regression analysis was performed on the normalized distribution frequencies using a chi-square function. The calculated degree of freedom (n) was named OTM 2 and was considered as an indicator of DNA damages (14). The comet assay was considered positive when at least one exposure condition induced a significant increase in OTM 2 (P<0.01) compared with the medium only control group.

RESULTS

Figure 1 shows the aspects of ZP+ and ZP– oocytes. No DNA migration could be observed in the control groups, indicating that both ZP+ and ZP– cells were remained intact. No difference was observed between ZP+ and ZP– oocytes after SSI (same migration of DNA fragments in the two ZP groups), indicating that depellucidation had no effect on the comet assay. Figure 2 shows the aspects of comets observed in control oocyte groups and in oocytes exposed to genotoxic agents. Control mouse oocytes showed a low basal level of DNA damage; no DNA fragment migration was observed, and a low OTM ² (2.1±0.07, near the minimal OTM ², interpretable) was calculated. H₂O₂ induced the highest level of DNA damage on oocytes compared with SSI or 50 μ M MMS (image not shown). The 100 μ M MMS solution exposure induced the maximal rate of DNA damage, with the migration of all DNA out of the cell after electrophoresis, leading to an image aspect called ghost cell (Fig. 2D).

Figure 3 shows that SSI, MMS, and H_2O_2 induced a significant increase in DNA lesions as compared with the control group; OTM ² values reflect the control, SSI, 50 µM MMS, and H_2O_2 groups, respectively: 2.1±0.07, 7.73±0.35, 3.35±0.15, and 12.4±0.51 (P<0.001). The DNA damage obtained with the 100 µM MMS solution was too drastic to calculate the OTM ².

FIGURE 1

Examples images of comet assay on mouse oocytes with and without ZP. (A) Mouse oocyte with ZP; negative control, no DNA migration. (B) Mouse oocyte without ZP; negative control, no DNA migration. (C) Mouse oocyte with ZP exposed in vitro to SSI at 12 J/cm² for 4 minutes: DNA migration. (D) Mouse oocyte without ZP exposed in vitro to SSI at 12 J/cm² for 4 minutes: DNA migration. (D) Mouse oocyte without ZP exposed in vitro to SSI at 12 J/cm² for 4 minutes: bNA migration. The direction of electrophoresis was from left to right, and the comet tail containing the DNA fragments was stained by propidium iodide 0.1 mg/mL. Scale bar, 100 μ m; magnification, X 200.



Berthelot-Ricou. Comet assay on mouse oocytes. Fertil Steril 2011.

DISCUSSION

In this study, the comet assay was successfully applied to ex vivo mammalian oocytes. This technique has been described in murine and bovine oocytes (15–17). In those reports, oocyte ZP was chemically digested by proteinase or acidic Tyrode's solution. Our results showed no difference between ZP+ and ZP– oocytes, both in the control group and in oocytes exposed to SSI. This finding may be explained by the fact that the lysis solution used in the comet assay may digest ZP, which is a glycoprotein matrix (18), like all cell membranes. Furthermore, it may be hypothesized that depellucidation by chemical procedure could induce additional stress and affect the genotoxic effect on DNA oocytes.

FIGURE 2

Examples of different aspects of DNA damage as detected by the comet assay on mouse oocytes. (A) Control group: intact oocyte after comet assay process. (B) Oocyte exposed in vitro to SSI (12 J/cm²) for 4 minutes: moderate DNA damage. (C) Oocyte exposed in vitro for 5 minutes to H_2O_2 (250 μ M): major DNA damage. (D) Oocyte exposed in vitro for 1 hour to methylmethanesulfonate (100 μ M). Maximal DNA damage, with the aspect called ghost cell. The direction of electrophoresis was from left to right, and the comet tail containing the DNA fragments was stained by iodide propidium 0.1 mg/mL. Scale bar, 100 μ m. Magnification, X 200.



Berthelot-Ricou. Comet assay on mouse oocytes. Fertil Steril 2011.

We believe that this chemical exposure need not be applied to oocytes, which would save time and improve feasibility. Indeed, the comet assay applied to the ZP+ oocytes did not induce cell stress, as shown by the low DNA damage levels in the control groups. However, its sensitivity was good, with highly significant differences (P<0.01) between the OTM² values of the control groups and those obtained after oocyte exposure to the three well-known genotoxic agents. SSI, MMS, and H₂O₂ are three well-known genotoxic agents widely used in genotoxic research assays as positive controls. These three agents were chosen because of their different genotoxic mechanisms. SSI was used to expose cells to UVA irradiation (340-400nm), which induces DNA damages through the production of reactive oxygen species (ROS). Oxidative stress and tissue injury can occur when ROS formation exceeds the biologic defense capacity (19). The exposure of oocytes to 12 J/cm^2 corresponded to a standard program developed in our laboratory for the assessment of UVA irradiation genotoxicity (20, 21).

MMS is the classical positive control for the comet assay, as recommended by Kirkland et al. (22). MMS is classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as a group 1 carcinogen, corresponding to in vivo genotoxins and DNA-reactive, mutagenic carcinogens that should be detected as positive in vitro mammalian cell tests (i.e., true positives). In our previous study on the genotoxicity of cryoprotectants (23), a 60 μ M MMS solution was the positive control. In the present study, concentrations of 50 and 100 μ M were chosen to better estimate the effects of MMS on mouse oocytes. The 100 μ M MMS solution induced strong DNA damage that was probably cytotoxic for oocytes. The 50 μ M MMS solution was far less active. It induced a significant DNA increase of OTM ² and was shown to be deprived of toxicity in Chinese hamster ovaries after a 24 hour incubation period (23).

 H_2O_2 is believed to cause DNA strand breaks after conversion to the hydroxyl radical (24). H_2O_2 exposure was performed according to the protocol developed for the comet assay in human leukocytes by Miranda-Vilela et al. (13).

The comet assay in mouse oocytes offers the possibility to have lots of female germ cells. Mouse oocytes are morphologically remarkably similar to human oocytes: mouse follicular oocyte complexes (25) and zona pellucida composition and functionality (18) are near those of humans. However, little work has been done comparing mouse and human DNA. Some assays have shown that mouse oocytes are more susceptible to chemical alterations (26). Consequently, we have to be cautious when extrapolating results from mice to humans.

Nevertheless, because of the difficulty to obtain human oocytes, the comet assay performed on mature mouse oocytes could be useful as a screening model in different fields of reprotoxicity research, especially for studying the direct genotoxicity of chemicals and protocols used in ART (e.g., culture medium, cryoprotectant), or the indirect genotoxicity from drugs and from environmental pollutants. There is growing interest in the possible effects of environmental pollutants on human reproduction. Pesticides such as organochlorine (dichlorodiphenyltrichloroethane) -widely used in a large variety of agricultural fertilizers, household insecticide sprays, human parasitic medications, and animal parasiticidal solutions-have been associated with an increased rate of abnormal bovine oocyte maturation in vitro (27, 28). Environmental exposure to toxic metals such as mercury, cadmium, and lead canals to play a significant role in human oocyte maturity or fertilization (29). Although numerous articles have addressed DNA damages caused by environmental pollution in male germ cells, no direct and specific assay has been developed for the assessment of pollutant genotoxicity on female cells. germ

FIGURE 3

Calculated OTM 2 of various samples. Cont, control; SSI, exposure to simulated sunlight irradiation (12 J/cm²); MMS, exposure to methylmethanesulfonate (50 μ M); H₂O₂, exposure to hydrogen peroxide (250 μ M); Dotted line, statistical significance (P<0.001).



A recent article by Khan et al. (30) studied the impact of hexachlorocyclohexane (HCH) and its potential mutagenic isomers on the male germ line. Results showed that HCH exposure led to spermatogenic failures caused by DNA damage. In another assay, Evenson et al. (31) used the sperm chromatin structure assay to study DNA fragmentation caused by environmental toxicants. Finally, much has been proposed for the development and validation of new methods for detecting the effects of environmental contaminants or pharmaceutical agents on germ cell DNA damage and human fertility (32).

In this context, the comet assay performed on mouse oocytes may be considered as a possible in vivo model to evaluate the genotoxic risk on female germ cells of environmental pollutants (e.g., exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from cigarette smoking, diesel exhaust particles, occupational exposure to pesticides) or the efficiency of environmental antioxidant molecules.

In conclusion, our team is the first to develop and validate an ex vivo comet assay on non depellucidated mouse oocytes. It is a rapid, easy, and sensitive method to assess genotoxicity risk on female germ cells.

Acknowledgment: The authors thank Marc Feurstein's team (Centre de Formation et de Recherches Experimentales Medico-Chirurgicales, Marseille) and Virginie Tassistro for technical assistance; Anne Gillet and Emilie Corbin (from CIML Marseille-Luminy) for advice concerning superovulation; and Gary Burkhart for correcting the English translation.

REFERENCES

- Speit G, Vasquez M, Hartmann A. The cornet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. Mutat Res 2009;681:3–12.
- Horváthová E, Dusinská M, Shaposhnikov S, Collins AR, DNA damage and repair measured in different genomic regions using the cornet assay with fluorescent in situ hybridization. Mutagenesis 2004;19:269–76.
- Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. Mutagenesis 2003;18:45–51.
- Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhler S, Speit G. The in vivo cornet assay: use and status in genotoxicity testing. Mutagenesis 2005;20:245–54.
- Burlinson B, Tice R, Speit G, Agurell E, Brendlerschwaab S, Collins A, et al. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. Mutat Res 2007;627:31–5.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/ comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ Mol Mutagen 2000;35:206–21.

Comparison of the level(s) of DNA damage using Comet assay in bovine oocytes subjected to selected vitrification methods. Reprod Domest Anim 2009;44:653–8.

- Wassarman PM, Litscher ES. The multifunctional zona pellucida and mammalian fertilization. J Reprod Immunol 2009;83:45–9.
- Petersen AB, Gniadecki R, Vicanova J, Thorn T, Wulf HC. Hydrogen peroxide is responsible for UVA-induced DNA damage measured by alkaline cornet assay in HaCaT keratinocytes. J Photochem Photobiol B 2000;59:123–31.
- Botta C, Di Giorgio C, Sabatier A, De Méo M, Effects of UVA and visible light on the photogenotoxicity of benzo[a]pyrene and pyrene. Environ Toxicol 2009;24:492–505.
- Botta C, Di Giorgio C, Sahatier A, De Méo M. Genotoxicity of visible light (400-800 nm) and photoprotection assessment of ectoin, L-ergothioneine and mamnitol and four sunscreems. J Photochem Photobiol B 2008;91:24–34.
- Kirkland D, Kasper P, Müller L, Corvi R, Speit G. Recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of the

- Faust F, Kassie F, Knasmüller S, Boedecker RH, Mann M, Mersch-Sundermann V. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. Mutat Res 2004;566: 209–29.
- Morita T, Hayashi M, Nakajimu M, Tanaka N, Tweatx DJ. Morikawa K, et al. Practical issues on the application of the GHS classification criteria for germ cell mutagens. Regul Toxicol Pharmacol 2009;55:52–68.
- Peterson PJ, Mokhtar MB, Chang C, Krueger J, Indicators as a tool for the evaluation of effective national implementation of the Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). J Environ Manage 2010;91: 1202–8.
- Ozgunen KT, Erdogan S, Mazmanoglu N, Pamuk I, Logoglu G, Ozgunen T. Effect of gonadotrophin dose on oocyte retrieval in superovulated BALB/c mice. Theriogenology 2001;56;435–45.
- Kumaravel TS, Jha AN. Reliable Cornet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. Mutat Res 2006;605:7–16.
- Kirkland D, Kasper P, Müller L, Corvi R, Speit G. Recommended lists of genotoxic and non-genotoxic performance of new or improved genotoxicity tests: a follow-up to an ECVAM workshop. Mutat Res 2008;653:99–108.
- Aye M, Di Giorgio C, De Meo M, Botta A, Perrin J, Courbiere B. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. Food Chem Toxicol 2010;48: 1905–12.
- Duthie SJ, Collins AR, The influence of cell growth, detoxifying enzymes and DNA repair on hydrogen peroxide-mediated DNA damage (measured using the comet assay) in human cells. Free Radic Biol Med 1996;22:717–24.
- Huang I, Griffin J, Emery B, Jones K, Peterson C, Carrell D. Mathematical regression analysis of the follicular-oocyte complex shows remarkable similarity for the mouse, hamster and human. Fertil Steril 2005;84:S399.
- Gook DA, Osborn SM, Johnston WI, Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. Hum. Reprod 1993;8: 1101–9.

chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity tests: A follow-up to an ECVAM workshop. Mutat Res 2008;653: 99–108.

- Miranda-Vilela AL, Alves PC, Akimoto AK, Lordelo GS, Gonçalves CA, Grisolia CK, et al. Gene polymorphisms against DNA damage induced by hydrogen peruxide in leukocytes of healthy humans through cornet assay: a quasi-experimental study. Environ Health 2010;9:21.
- Bauer E, Recknagel RD, Fiedler U, Wollweber L, Bock C, Greulich KO. The distribution of the tail moments in single cell gel electrophoresis (cornet assay) obeys a chi-square (chi²) not a gaussian distribution. Mutat Res 1998;398:101–10.
- Huang JYJ, Chen HY, Park JYS, Tan SL, Chian R. Comparison of spindle and chromosome configuration in in vitro- and in vivo-matured mouse oocytes after vitrification. Fertil Steril 2008;90: 1424–32.
- Men H, Monson RL, Parrish JJ, Rutledge JJ. Detection of DNA damage in bovine metaphase II oocytes resulting from cryopreservation. Mol Reprod Dev 2003;64:245–50.
- Stachowiak EM, Papis K, Kruszewski M, Iwaneńko T, Bartlomiejczyk T, Modliński JA.
- Alm H, Torner H, Tiemann U. Effect of environmental pollutants on maturation of bovine oocytes in vitro. Theriogenology 1995;43:157.
- Alm H, Tomer H, Tiemann U, Kanitz W. Influence of organochlorine pesticides on maturation and postfertilization development of bovine oocytes in vitro. Reprod Toxicol 1998;12:559–63.
- Bloom MS, Parsons PJ, Steuerwald AJ, Schisterman EF, Browne RW, Kim K, et al. Toxic trace metals and human oocytes during in vitro fertilization (IVF). Reprod Toxicol 2010;29:298–305.
- Khan FH, Ganesan P, Kumar S. Y Chromosome microdeletion and altered sperm quality in human males with high concentration of seminal hexachlorocyclohexane (HCH). Chemosohere 2010;80:972–7.
- Evenson DP, Wixon R. Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). Toxicol Appl Pharmacol 2005;207:532–7.
- Barratt CLR, Aitken RJ, Björndahl L, Carrell DT, de Boer P, Kvist U, et al. Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications–a position report. Hum Reprod 2010;25:824–38.

APPLICATION PRATIQUE EN BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION :

Étude de la génotoxicité des cryoprotecteurs utilisés pour

la vitrification ovocytaire.

Après avoir mis au point et validé la technique du test des comètes sur ovocyte de souris, nous avons décidé de poursuivre nos travaux concernant l'évaluation de le génotoxicité des cryoprotecteurs utilisé en biologie de la reproduction. Les travaux antérieurs réalisés dans notre équipe sur cellules somatiques CHO avaient mis en évidence avec le test des comètes des lésions de l'ADN induites par le PrOH (figure 10a) ainsi qu'un effet clastogène et/ou aneugène par le test de numération des micronoyaux (figure 10b) (40). En revanche, le DMSO et l'EG n'avaient pas induit d'augmentation significative des lésions de l'ADN ni d'effet clastogène ou aneugène sur cette lignée cellulaire.

Figure 10 : Evaluation des lésions de l'ADN induites par le PrOH sur cellules CHO. (D'après Aye et al. 2010(40))



b: Test de numération des micronoyaux

* : P 0,05, ** : P 0,01, *** : P 0,001 ; ligne en pointillés : P = 0,05

a : Test des comètes

100

80

60

40

20

Index de prolifération (%)

Suite à ces résultats, impossibles à extrapoler pour les ovocytes, il nous a paru indispensable de poursuivre nos travaux sur un modèle cellulaire plus proche de l'ovocyte humain afin d'estimer le risque génotoxique de l'exposition des ovocytes aux agents cryoprotecteurs utilisés à haute concentration lors de la vitrification. Dans un souci éthique d'éviter au maximum le sacrifice de souris, nous avons considéré que l'étude de la génotoxicité du DMSO et l'EG sur ovocytes n'était pas prioritaire, car aucun dommage direct à l'ADN significatif n'avait été observé après plusieurs heures d'incubation des cellules CHO avec ces cryoprotecteurs (40). Nous avons centré notre étude sur la génotoxicité du PrOH sur les ovocytes de souris puis la génotoxicité des solutions cryoprotectrices commercialisées et employées en vitrification d'ovocytes humains.

1. Evaluation de la génotoxicité du PrOH

Nous avons utilisé des ovocytes matures de souris CD1 décoronisés, non dépellucidés. Trois groupes d'ovocytes (n= 40) ont été exposés à 3 concentrations différentes de PrOH (5%, 7.5%, 15%). Chaque concentration a été testée à 3 reprises avec 4 durées d'exposition au PrOH : 2 durées d'exposition longues (1 heure et 2 heures) tel qu'il est établi en matière de recherche en toxicologie et 2 durées d'exposition courtes (1 minute et 5 minutes) tels que les cryoprotecteurs sont employés dans le cadre des protocoles de vitrification (figure 11).





Mme Anaïs Ricou-Berthelot.

Aix Marseille Université

L'exposition des ovocytes au PrOH a été comparée avec à des témoins négatifs (milieu de culture M16 pour les durées d'exposition longues et M2 pour les durée d'exposition courtes) et à des témoins positifs exposés à des génotoxiques connus : le rayonnement solaire artificiel (RSA) pour les expositions longues et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pour les expositions courtes.

Après exposition des ovocytes aux solutions de PrOH à 7,5 et 15 %, nous avons observé une augmentation statistiquement significative des lésions primaires de l'ADN, en comparaison au groupe d'ovocytes témoins négatifs, à la fois pour les durées d'exposition longues (1 et 2 h) et courtes (1 et 5 min).

Nous avons aussi observé une corrélation entre concentration d'exposition, durée d'exposition et lésions primaires de l'ADN.

Ces résultats doivent être interprétés avec précaution car les ovocytes ont été exposés au PrOH seul et en l'absence de gradients de concentration, ce qui est conforme aux protocoles classiques de génotoxicologie mais qui ne correspondait pas aux protocoles de vitrification utilisé en biologie de la reproduction.

Ce travail a fait l'objet de la publication suivante qui expose en détail la méthodologie, les résultats et la discussion.

Berthelot-Ricou A, Perrin J, Di Giorgio C, De Meo M, Botta A, Courbiere B. Assessment of 1,2-propanediol (PrOH) genotoxicity on mouse oocytes by comet assay. Fertility and Sterility 2011; 96:1002–7.

Mme Anaïs Ricou-Berthelot.

PUBLICATION 2

Assessment of 1, 2-propanediol (PrOH) genotoxicity on mouse oocytes by comet assay.

Berthelot-Ricou A, Perrin J, Di Giorgio C, De Meo M, Botta A, Courbiere B. Fertil Steril. 2011; 96:1002-1007.

REPRODUCTIVE BIOLOGY

Assessment of 1, 2-propanediol (PrOH) genotoxicity on mouse oocytes by comet assay

Anais Berthelot-Ricou, M.D., ^a Jeanne Perrin, M.D., Ph.D., ^{a, b} Carole di Giorgio, Ph.D., ^a Michel de Meo, Ph.D., ^a Alain Botta, M.D., Ph.D., ^a and Blandine Courbiere, M.D., Ph.D., ^a .

^a Laboratoire de Biogenotoxicologie et Mutagenese Environnementale, Federation de Recherche CNRS 3098 ECCOREV, Facultes de Medecine et Pharmacie, Universite de la Mediterranee, ^b CECOS–Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Pr. Grillo, AP-HM La Conception, and ^c Pole de Gynecologie-Obstetrique et Reproduction, Pr. Gamerre, AP-HM La Conception, Marseille, France

Objective: To assess the genotoxicity of 1, 2-propanediol (PrOH) on mouse oocytes by comet assay.

Design: In vitro assay using murine model.

Setting: Biogenotoxicology research laboratory.

Animal(s): CD1 female mice.

Intervention(s): Three 40 oocyte groups were exposed to different PrOH concentrations (5%, 7.5%, and 15%). Each concentration was tested during both long and short exposures (1–2 hours and 1–5 minutes) in comparison with control groups. DNA damage was evaluated by a single-cell gel electrophoresis assay, also called "comet assay" and analyzed with Komet software.

Main Outcome Measure(s): DNA damage was quantified as Olive tail moment (OTM). Interpretation was done on OTM with the use of 2 .

Result(s): High PrOH concentrations (7.5% and 15%) induced significant DNA damage on mouse oocytes. The OTM ² values were 4.16±0.40 and 6.80±0.4 with 7.5% PrOH at 1 and 2 hours, respectively, 24.35 ± 1.60 with 15% at 1 hour, and for 2h at 15% the DNA damage was too drastic to calculate OTM ². After 1 and 5 minutes, the OTM ² values were, respectively, 5.19 ± 0.26 and 6.06 ± 0.42 with 7.5%, and 7.53 ± 0.33 and 16.81 ± 0.67 with 15%.

Conclusion(s): High concentrations of PrOH (7.5% and 15%) induced significant DNA damage on mouse oocytes, whatever the exposure duration. These results should be interpreted with caution, because additional data are needed to evaluate PrOH genotoxicity and DNA oocyte reparation after exposure to high PrOH concentrations. (Fertil Steril[®]2011; 96:1002–7. ©2011 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: 1, 2-Propanediol, PrOH, cryoprotectant, mouse, oocytes, genotoxicity, DNA damage, comet assay

The cryopreservation of spermatozoa or embryo is widely performed in reproductive medicine. However, oocytes are more difficult to cryopreserve, because they are the largest cells in the body and are very sensitive to ice crystals formed during freezing (1). There are two main techniques for cryopreserving cells or tissues: standard

"slow" freezing, or vitrification by rapid cooling (2, 3). For slow cooling, an optimal cooling rate specific to a given cell line is used, but this process induces intracellular ice crystals that can be harmful. Vitrification traps all the aqueous solutions in an amorphous, so-called vitreous solid phase, preventing any ice crystal

Received November 16, 2010; revised June 30, 2011; accepted July 19, 2011; published online September 3, 2011. A.B.R has nothing to disclose. J.P has nothing to disclose. C.d.G has nothing to disclose. M.d.M has nothing to disclose. A.B has nothing to disclose. B.C has nothing to disclose. Supported by a grant from the Agence de la Biomedecine, France, and a study grant to A.B.R from the Association pour le Developpement des Recherches Biologiques et Medicales au Centre Hospitalier Regional de Marseille and Schering Plough.

Reprint requests: Blandine Courbiere, M.D., Ph.D., Pôle de Gynecologie–Obstetrique et Reproduction, AP-HM La Conception, 147 Bd. Baille, 13005 Marseille, France

(E-mail: blandine.courbiere@ap-hm.fr).

formation (4). Oocyte cryopreservation by vitrification has improved survival cell rates after thawing (5, 6). This improvement is due to rapid cooling, in combination with a high concentration (7.5%)and 15%) of cryoprotectants to give an efficient glassforming mixture with water (7). At high concentration, cryoprotectants, such as dimethylsulfoxide (DMSO) (8), ethyleneglycol (EG) (9), and 1, 2-propanediol (PrOH) (10), rapidly penetrate into cells, create hydrogen bonds with H₂O molecules, and transform all the aqueous solutions into a vitreous solid phase, without any ice crystal formation (7). Since 1999, vitrification-cryopreservation has led to several hundred live births with reassuring obstetrical and perinatal outcomes (2, 11-14). However, little is known about the possible long-term con- sequences on human live births after oocyte vitrification, and Edgar and Gook highlighted the lack of well controlled clinical trials (15). In our previous work (16), we studied the genotoxicity of DMSO, EG, and PrOH on mammalian somatic proliferating cell lines (Chinese hamster ovary [CHO]), a validated and commonly used model in genetic toxicology (17). Our results showed that DMSO and EG long exposures were not genotoxic for such mammalian cells. On the other hand, long exposure to PrOH induced in vitro DNA damage on CHO cells (16).

These results suggested that PrOH may cause long-term adverse effects in eukaryotic cells. Moreover, some studies assessed the effects of PrOH on mouse oocytes after slow freezing and observed that PrOH caused significantly more zona pellucida hardening and cellular degeneration, and led to proteome alterations, which could result in a higher risk of aneuploidy than vitrification techniques using DMSO and EG (18, 19). Indeed, although genotoxicity in somatic cells can lead to degenerative disorders and cancers at the individual level, genotoxic events occurring in germ cells may lead to chromosome abnormalities in future generations (20, 21). Additional studies of PrOH genotoxicity therefore seem to be necessary on germinal cells with short exposure to PrOH in vitrification protocols.

We previously described a comet assay on non depellucidated mouse oocytes (22). The comet assay, or single-cell gel electrophoresis assay, is a simple and rapid genotoxicity test to observe and quantify DNA damage and to assess the genotoxic activity of potential carcinogenic agents in a wide range of cells (23). The principle underlying the- comet assay is that denatured DNA fragments can be measured migrating out of the cell nucleus during electrophoresis. The image obtained is a "comet" with a distinct head consisting of intact DNA and a tail containing relaxed DNA loops or broken pieces of DNA (24). Although the comet assay has been successfully applied to human sperm in the context of male infertility and assisted reproduction technologies (ART) (25), female germ cells have been poorly investigated, and few techniques exist for genotoxic risk assessment in oocytes.

The aim of the present study was to test the genotoxicity of PrOH with comet assay on mouse oocytes. Our first objective was to assess the genotoxicity of PrOH after long exposures, as in classic genotoxicity assays (16). Our second objective was to test PrOH genotoxicity after short exposures in the same experimental conditions as in human oocyte vitrification protocols.

MATERIALS AND METHODS

PrOH was from Fisher Scientific, and all other chemicals were from Sigma, unless stated otherwise.

Animals

Prepubescent (<4 weeks old) female CD1 mice (Charles River Laboratory) were housed in a temperature- and light-controlled room with free access to food and water. All experimental protocols and animal handling procedures were reviewed and approved by the National Ethics Committee on Animal Experimentation (IRB 3-4112009). The mice were injected intraperitoneally with pregnant mare serum gonadotropin (10 UI/100 mL). Three days later, they received an additional injection with hCG (5 UI/100 mL). On day 4, the mice were killed by lethal anesthesia, and oviducts were collected. Intact cumulus masses were released from excised oviducts and incubated with hyaluronidase (10 mg/mL).

Only metaphase II mouse oocytes were included in this study.

PrOH Exposure Conditions

Oocyte were separated into different groups (n=40 oocytes for each group) and exposed to different PrOH concentrations (5%, 7.5%, and 15%). Each condition was replicated three times.

Long exposure of oocytes to PrOH: this kind of exposure corresponded to exposure conditions tested in classical genotoxicity assays. Three oocyte groups were exposed to 5%, 7.5%, or 15% PrOH solutions and incubated at 37°C, 5% CO₂, in M16 medium, for 1 hour and three other groups, for 2 hours. A positive control oocyte group was incubated at 37°C, 5% CO₂, in M16 medium for 2 hours or 1 hour and irradiated with sunlight simulated at 12 J/cm² for 4 minutes. A negative control oocyte group was incubated only at 37°C, 5% CO₂, in M16 medium for 1 hour and 2 hours.

Short exposure of oocytes to PrOH These exposures were those used in human oocyte vitrification protocols. Three oocyte groups were exposed to PrOH solutions added to M2 medium for 1 minute and three other groups for 5 minutes at room temperature. A positive control oocyte group was incubated in a 250 μ mol/L H₂O₂ solution for 5 minutes at 4°C in the dark. A negative control oocyte group was placed in M2 medium for 1 minute and 5 minutes.

Positive Control Samples

Simulated sunlight irradiation

Irradiation experiments were carried out with a solar simulator Suntest CPS+ apparatus (Atlas Material Testing Technology) equipped with a xenon arc lamp (1,100 W) and special glass filters restricting transmission of light to UVA-visible light (320–800 nm). This apparatus is currently used to assess the in vitro protective activity of sunscreens on DNA of somatic cells. The oocyte exposure to 12 J/cm² corresponded to a standard program developed in our laboratory for the assessment of UVA irradiation genotoxicity (26). The irradiation dose corresponded approximately to 30 minutes of sun irradiation.

H₂O₂ solution

 H_2O_2 causes DNA strand breaks after conversion to the hydroxyl radical. H_2O_2 exposure was performed according to the protocol developed for the comet assay in human leukocytes by Miranda-Vilela et al. (27). In our previous study, H_2O_2 was shown to induce high levels of DNA damage, detected by comet assay in oocytes, and was therefore used as a positive control (22).

Comet Assay

The alkaline comet assay was performed as described by Tice et al. (28) and adapted to oocytes (22). Cytologic microscope slides were first covered with high-melting-point agarose and dried overnight at ambient temperature.

After oocyte treatment, a drop of normal-meltingpoint agarose was first loaded on a slide, and then a drop of low-melting-point agarose was put on the precoated slide. Then oocytes were placed in the agarose droplet. Slides were lysed in a detergent solution (containing 2.5 mol/L NaCl; 100 mmol/L Na2 EDTA; 10 mmol/L Tris-HCl, pH 10; 1% Triton X-100; and 10% DMSO), for 2 hours at 4°C. DNA unwinding was carried out with an alkaline solution (1 mmol/L Na2EDTA, 300 mmol/L NaOH) for 20 minutes at room temperature in a 1-L electrophoresis unit. Then, electrophoresis was conducted for 20 minutes (25V, 300 mA) in the same buffer solution. After the electrophoretic run, the slides were neutralized with 0.4 mol/L Tris-HCl (pH 7.5), rinsed with ultrapure water, dipped into 100% methanol (highperformance liquid chromatography-grade- purity solvent), and dried overnight at room temperature. Staining was performed with 40 µL propidium iodide solution

(0.1 mg/mL), and the slides were examined with an Olympus BX-60 (Olympus Rungis) fluorescence microscope at 200 magnification, equipped with a highly sensitive CCD color digital camera (Sony; band-pass filter 510–550 nm, long-pass filter 590 nm). Digital pictures were collected with Visilog software.

Main Outcome Measures

For each condition, all of the oocyte images were analyzed by the validated Komet software (version 5.5; Andor Bioimaging). DNA damage was expressed as Olive tail moment (OTM, arbitrary units) (25), which is the association of tail length and percentage of DNA contained in tail.

Statistical Analysis

The calculated OTM values were distributed into 40 classes between the minimal and the maximal OTM values. A nonlinear regression analysis was performed on the normalized distribution frequencies using a ² function with TableCurve 2D (version 5.0; Jandel Scientific Software). OTM ² values were calculated from the OTM values. They corresponded to the degrees of freedom (n) of each OTM distribution obtained from 50 oocytes. OTM ² is an indicator of DNA lesions (29).

The test was considered to be positive and statistically significant at P<0.01 when OTM 2 increased in oocytes compared with the medium only control cells and when a dose response relationship could be established between the OTM 2 and the concentrations of PrOH

FIGURE 1

Comparison of DNA damage images as detected by the comet assay on mouse oocytes, obtained after long exposure (1 and 2 hours at 37° C, 5% CO₂) to 1, 2-propanediol (PrOH) at 5%, 7.5%, and 15% concentrations. cont = negative control group; SSI = positive control group, exposed to simulated sunlight irradiation (12 J/cm²). The direction of electrophoresis was from left to right, and the comet tail containing the DNA fragments was stained by propidium iodide at 0.1 mg/mL. Images obtained after comet assay process; scale bar 100 μ m. Magnification x 200.



RESULTS

We observed a significant correlation between PrOH concentration, duration of exposure, and DNA damage on CD1 mouse oocytes. Figure 1 shows the aspect of oocytes after long exposure to PrOH at 5%, 7.5%, and 15% concentrations after the comet assay. The control CD1 mouse oocytes showed a low basal level of DNA damage, qualitatively with no DNA fragment migration and quantitatively with an OTM 2 at 2.09 ± 0.07 , the near minimal interpretable OTM². After long exposure, PrOH 15% solution induced the maximal rate of DNA damage, with all DNA out of the cell after electrophoresis. The aspect after image acquisition is called "ghost cell" (Fig. 1E and J).

The long-exposure OTM 2 values were 2.09±0.07 for the negative control group and 5.23 0.27 for the simulated sunlight irradiation (SSI) group (positive control). After 1 hour of PrOH exposure, the OTM 2 values were 2.09±0.09 at 5%, 4.16± 0.40 at 7.5%, and 24.35±1.60 at 15%. After 2 hours of PrOH exposure, the OTM 2 values were 2.76±0.16 at 5% and 6.80±0.4 at 7.5%; at 15% the DNA damage was too drastic to calculate OTM 2 .

All these results were statistically significant except the 1hour 5% exposure condition (Fig. 2).

Figure 3 shows the aspect of oocyte comet assay after short exposure to PrOH at 5%, 7.5%, and 15%. The short-exposure OTM ² values were 2.09±0.07 for the negative control group and 9.30±0.41 for the H₂O₂ positive control group. After 1 minute of PrOH exposure, the OTM ² values were 2.25 ± 0.24 at 5%, 5.19 ± 0.26 at 7.5%, and 7.53 ± 0.33 at 15%. After 5 minutes, the OTM ² values were 2.51 ± 0.12 at 5%, 6.06 ± 0.42 at 7.5%, and 16.81 ± 0.67 at 15%. All these results were statistically significant except the 1-minute 5% exposure condition (Fig. 4).

DISCUSSION

In this study, we show that high concentrations of PrOH (7.5% and 15%) induced significant DNA damage on mouse oocytes, whatever the exposure duration.

Comet Assay and DNA Damage Detection

The comet assay is a short-term genotoxicity test that allows visualizing DNA fragments by fluorescent microscopy (28). All intracellular proteins are eliminated by the lysis step at pH 10. At the end of electrophoresis, after staining with propidium iodide, only DNA is visible and comet shapes are formed with DNA fragments. Finally, the absence of intracellular constituents other than DNA is shown by the capacity of DNA fragments to migrate in slides treated with positive control samples (SSI or H_2O_2). Indeed, DNA damage may be due to both genotoxicity and apoptosis. That is why the viability of cells is verified before or during the assay.

Comparison Between Effects of PrOH on Mouse Oocytes Versus Somatic CHO Cells

In a previous work, the cytotoxic activities of DMSO, EG, and PrOH were assessed in CHO cells by the colorimetric determination of cell viability with the use of the oxidation-reduction indicator WST-1. PrOH has been shown to be non-cytotoxic at the concentrations tested (5%, 7.5%, and 15%) for exposure times <3 hours (16). Then we assessed the genotoxic activities of DMSO, EG, and PrOH on CHO cells with the comet assay. DMSO and EG did not induce direct genotoxic effects on CHO cells with the comet assay. DMSO and EG did not induce direct genotoxic effects on CHO cells, but PrOH induced DNA damage on CHO cells. As a consequence, we considered that DMSO and EG, which caused no direct genotoxicity were less detrimental for oocyte vitrification than PrOH.

In the present study, we assessed direct PrOH genotoxicity on oocytes to compare the genotoxic effects observed in somatic CHO cells versus female germ cells. Our results showed that high concentrations of PrOH (7.5% and 15%) induced significant DNA damage on mouse oocytes, whatever the exposure duration. This genotoxic effect was not significant for the 5% PrOH concentration. Surprisingly, the 15% PrOH concentration induced a strong genotoxic effect after only 5 minutes' exposure. This genotoxic effect was higher than that of H_2O_2 (OTM ²) 16.81±0.67 vs. 9.30±0.41) and lower at 1 minute $(OTM ^{2} 7.53 \pm 0.33 \text{ vs. } 9.30 \pm 0.41)$. There are several studies on the adverse effects of vitrification on oocytes, e.g., on meiotic spindle configuration (30). However, to our knowledge, no real genotoxic assay has been performed on oocytes. Martinez-Burgos et al. assessed DNA integrity of oocytes after slow freezing and vitrification by the terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay (31). They concluded that the DNA integrity of cryopreserved oocytes was not altered. Their oocyte vitrification protocol used DMSO and EG as cryoprotectants, not PrOH (5). Additionally, the TUNEL assay is an enzymatic labeling protocol for the detection of the early stage of DNA fragmentation in apoptotic cells (32). Although that assay is used to detect DNA damage,

its sensitivity is much lower than that of the comet assay, which is intended to detect DNA lesions originating from subtoxic genotoxic events (33, 34). Indeed, the amount of DNA strand breaks in apoptotic cells is so large that the degree of cell labeling in the TUNEL assay is an adequate discriminator between apoptotic and necrotic cells. However, the TUNEL assay is not a genotoxicity assay and does not allow discriminating low genotoxic impacts in viable cells. Our results are not contradictory with those of the TUNEL assay, but they are different because of the different level of DNA damage assessment. Moreover, given the excellent results of cell survival and fertilization, it seems logical that vitrification induces a low level of apoptosis (assessed by TUNEL). The question raised in the present study is the possible long-term adverse effect caused by genotoxic events occurring in germ cells, which may lead to gene mutations or chromosome abnormalities in the offspring (20).

FIGURE 2

Calculated Olive tail moment (OTM) 2 of various samples for oocyte long exposure to 1, 2-propanediol (PrOH) at 5%, 7.5%, and 15% concentrations. ***High statistical significance (P<.001); ns = no statistical significance.



FIGURE 3

Comparison of DNA damage images as detected by the comet assay on mouse oocytes, obtained after short exposure (1 and 5 minutes at room temperature) to 1, 2-propanediol (PrOH) at 5%, 7.5%, and 15% concentrations. Theg = negative control group; H_2O_2 = positive control group exposed for 5 minutes to H_2O_2 (250 µmol/L) at 4°C. The direction of electrophoresis was from left to right, and the comet tail containing the DNA fragments was stained by propidium iodide at 0.1 mg/mL. Images obtained after comet assay process; scale bar 100 µm. Magnification x 200.



FIGURE 4

Calculated Olive tail moment (OTM) 2 of various samples, for oocyte short exposure to 1, 2-propanediol (PrOH) at 5%, 7.5%, and 15% concentrations. Cont= negative control group; H₂O₂ = positive control group exposed for 5 minutes to H₂O₂ (250 µmol/L) at 4°C. **Statistical significance (P<.01); ***high statistical significance (P<.001); ns= no statistical significance.



Comparison of Human Oocyte Vitrification Protocols Used in ART

Because the long-term effects of exposure to high concentrations of cryoprotectants are unknown, oocyte vitrification is still not allowed in France. We decided to describe our preliminary results on PrOH assays, because PrOH is used in some protocols to vitrify oocytes (14, 35) and embryos (36). However, most internationally published oocyte and embryo vitrification studies did not use PrOH but used EG and DMSO mixture (37–39).

In light of our previous results, vitrification with DMSO and EG appears to us to be a safe method, even at high concentrations (16).

Larman et al. (18) published very interesting results about the effects of PrOH on mouse oocyte physiology. They showed that PrOH causes a protracted increase in intracellular calcium, which induces cellular degeneration and parthenogenetic activation, indicating a severe effect on oocyte viability. Using calcium-free media, the cytotoxic effect of PrOH was eliminated, suggesting that the rise in calcium levels led to cell degeneration. In the present study, M2 and M16 media contained 0.25 g/L of calcium chloride, so it is possible that oocyte physiology was affected after PrOH incubation. Nevertheless, to our knowledge, oocyte vitrification kits (cooling and thawing solutions) used in human ART are not calcium free (14, 40). Therefore, even if it appears to be of interest to study the effect of cryoprotectant in calcium-free medium, this does not correspond to the reality of current clinical practice.

One and 5-minute 15% PrOH exposures correspond to the durations used in vitrification methods for ART, in which concentrations of cryoprotectants >10% v/v are incorporated into the cooling and warming vitrification media (14, 35). In some protocols of vitrification, oocytes are equilibrated for 5 minutes in 7.5% EG and PrOH equilibration solution and then transferred into a vitrification solution containing 15% EG and PrOH for 1 minute before freezing at -196°C (12, 35). PrOH at low concentration (5%) in slow freezing protocols has been shown to induce some physiologic oocyte changes, such as perturbation of the intracellular calcium flux (41), genetic damage (proteome alterations in mouse oocyte) (19), and DNA damage on mouse blastocysts (42).

A recent study comparing PrOH and EG vitrification methods in matured buffalo oocytes revealed that vitrification with PrOH caused significantly increased morphologic damage (zona pellucida crack, oocyte shrinkage and splitting) and oocytes displaying DNA damage compared with EG vitrification protocol (43).

additional data are needed on PrOH germ cell genotoxicity and oocyte DNA repair potencies after high-concentration PrOH exposure. Moreover, the genotoxicity of different vitrification solutions and vitrification protocols also need to be assessed.

Limits of the Mouse Oocyte Model for Predicting DNA Damage in Human Oocytes

We have to be cautious about the results of the present study. Mouse oocyte DNA is not identical to that of human oocytes. Gook et al. (44) compared mouse and human oocytes cryopreserved by slow freezing using PrOH and found opposing results, with a poor morphologic survival rate of 4% for mouse oocytes versus a 64% survival rate for human oocytes. Few studies have investigated differences between mouse and human DNA. Mouse oocytes might be more sensitive to chemical effects, and human DNA repair systems might be more effective. In the present study, we did not explore DNA kinetic reparation, which could restore DNA integrity after incubation in culture medium. Nevertheless, oocytes are metaphase II-blocked cells, and because the mechanisms of DNA repair are activated in prophase and stopped in metaphase in somatic cells, little is known about DNA repair capacities of oocytes. DNA repair may be effective just after fertilization and resumption of cell cycle.

Given the precautions needed when extrapolating data from mouse model to humans,

Acknowledgments: The authors thank Marc Feuerstein, M.D., Michel Skandalovski, Brigitte Billon (Centre de Formation et de Recherches Experimentales Medicochirurgicales, Marseille), and Jocelyne Pompili for their technical assistance and Anne Gillet and Emilie Corbin (from CIML Marseille-Luminy) for advice on mouse superovulation.

REFERENCES

1. Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovar- ian tissue. Theriogenology 2000; 53:59–72.

2. Kuleshova LL, Lopata A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. Fertil Steril 2002;78:449–54.

3. Boldt J. Current results with slow freezing and vitrification of the human oocyte. Reprod Biomed Online 2010 Dec 13. [Epub ahead of print]

 Pegg DE. Principles of cryopreservation. Methods Mol Biol 2007;368:39–57.

5. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. Reprod Biomed Online 2005;11: 300–8.

 Fadini R, Brambillasca F, Renzini MM, Merola M, Comi R, de Ponti E, et al. Human oocyte cryopreservation: comparison between slow and ultrarapid methods. Reprod Biomed Online 2009;19:171–80.

7. Jain JK, Paulson RJ. Oocyte cryopreservation.

Fertil Steril 2006;86:1037-46.

8. Paynter SJ, Cooper A, Gregory L, Fuller BJ, Shaw RW. Permeability characteristics of human oo- cytes in the presence of the cryoprotectant dimethyl- sulphoxide. Hum Reprod 1999;14:2338–42.

9. Mullen SF, Li M, Li Y, Chen Z-J, Critser JK. Human oocyte vitrification: the permeability of metaphase II oocytes to water and ethylene glycol and the appliance toward vitrification. Fertil Steril 2008;89:1812–25.

10. Paynter SJ, O'Neil L, Fuller BJ, Shaw RW. Membrane permeability of human oocytes in the presence of the cryoprotectant propane-1,2-diol. Fertil Steril 2001;75:532–8.

11. Lucena E, Bernal DP, Lucena C, Rojas A, Moran A, Lucena A. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. Fertil Steril 2006;85:108–11.

12. Noyes N, Porcu E, Borini A. Over 900 oocyte cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies. Reprod Biomed Online 2009;18:769–76.

13. Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, Antinori S. Cryotop vitrification of human oocytes re- sults in high survival rate and healthy deliveries. Re- prod Biomed Online 2007;14:72–9.

14. Chian R-C, Huang JYJ, Tan SL, Lucena E, Saa A, Rojas A, et al. Obstetric and perinatal outcome in 200 infants conceived from vitrified oocytes. Reprod Biomed Online 2008;16:608–10.

15. Edgar DH, Gook DA. How should the clinical efficiency of oocyte cryopreservation be measured? Re- prod Biomed Online 2007;14:430–5.

16. Aye M, di Giorgio C, de Mo M, Botta A, Perrin J, Courbiere B. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitri- fication: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. Food Chem. Toxicol 2010;48: 1905–12.

17. Aardema MJ, Snyder RD, Spicer C, Divi K, Morita T, Mauthe RJ, et al. SFTG international collaborative study on in vitro micronucleus test III. Using CHO cells. Mutat Res 2006;607:61–87.

 Larman MG, Katz-Jaffe MG, Sheehan CB, Gardner DK. 1,2-Propanediol and the type of cryopreservation procedure adversely affect mouse oocyte physiology. Hum Reprod 2007;22:250–9.

 Katz-Jaffe MG, Larman MG, Sheehan CB, Gardner DK. Exposure of mouse oocytes to 1,2propanediol during slow freezing alters the proteome. Fertil Steril 2008;89:1441–7.

20. Morita T, Hayashi M, Nakajima M, Tanaka N, Tweats DJ, Morikawa K, et al. Practical issues on the application of the GHS classification criteria for germ cell mutagens. Regul Toxicol Pharmacol 2009;55:52–68

21. Speit G, Vasquez M, Hartmann A. The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. Mutat Res 2009;681:3–12.

22. Berthelot-Ricou A, Perrin J, di Giorgio C, de Meo M, Botta A, Courbiere B. Comet assay on mouse oocytes: an improved technique to evaluate genotoxic risk on fe- male germ cells. Fertil Steril 2011;95:1452–7.

23. Speit G, Hartmann A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. Methods Mol Biol 2006;314:275–86.

24. Horvathova E, Dusinska M, Shaposhnikov S, Collins AR. DNA damage and repair measured in different genomic regions using the comet assay with fluorescent in situ hybridization. Mutagenesis

2004;19:269-76. us J, Lewis SEM. Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predic

 Simon L, Lutton D, McMan tor of male infertility and in vitro fertilization success. Fertil Steril 2011;95:652–7.
Botta C, di Giorgio C, Sabatier A-S, de Meo M. Effects of UVA and visible light on the photogenotoxic- ity of benzo[a]pyrene and pyrene. Environ Toxicol 2009;24:492–505.

27. Miranda-Vilela AL, Alves PC, Akimoto AK, Lordelo GS, Gonçalves CA, Grisolia CK, et al. Gene polymorphisms against DNA damage induced by hydrogen peroxide in leukocytes of healthy hu- mans through comet assay: a quasi-experimental study. Environ Health 2010;9:21.

28. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/ comet assay: guidelines for in vitro and in vivo ge- netic toxicology testing. Environ Mol Mutagen

2000;35:206-21.

29. Bauer E, Recknagel RD, Fiedler U, Wollweber L, Bock C, Greulich KO. The distribution of the tail moments in single cell gel electrophoresis (comet assay) obeys a chi-square (chi²) not a gaussian distribution. Mutat Res 1998;398:101–10.

 Huang JYJ, Chen H-Y, Tan S-L, Chian R-C. Effect of choline-supplemented sodium-depleted slow freezing versus vitrification on mouse oocyte meiotic spindles and chromosome abnormalities. Fertil Steril 2007;88:1093–100.

31. Martinez-Burgos M, Herrero L, Megias D, Salvanes R, Montoya MC, Cobo AC, et al. Vitrifica- tion versus slow freezing of oocytes: effects on mor- phologic appearance, meiotic spindle configuration, and DNA damage. Fertil Steril 2011;95:374–7. 32. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. Hepatology 1995;21:1465–8.

Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhler S, Speit G. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. Mutagenesis 2005;20:245–54.

34. Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler- Schwaab SY, Collins AR, et al. Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: results of the In Vivo Comet Assay Workgroup. Mutat Res 2007;627:31–5.

35. Cao Y-X, Xing Q, Li L, Cong L, Zhang Z-G, Wei Z-L, et al. Comparison of survival and embryonic develop- ment in human oocytes cryopreserved by slow- freezing and vitrification. Fertil Steril 2009;92:1306–11.

36. Balaban B, Urman B, Ata B, Isiklar A, Larman MG, Hamilton R, et al. A randomized controlled study of human day 3 embryo cryopreservation by slow freez- ing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. Hum Reprod 2008;23:1976–82.

37. Elnahas A, Alcolak E, Marar EA, Elnahas T, Elnahas K, Palapelas V, et al. Vitrification of human oocytes and different development stages of embryos: an overview. Mid East Fertil Soc J 2010;15:2–9.

 Smith GD, Serafini PC, Fioravanti J, Yadid I, Coslovsky M, Hassun P, et al. Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. Fertil Steril 2010;94:2088–95.

39. Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, Bontis I, et al. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and metaanalysis. Fer- til Steril 2008;90:186–93.

40. Selman H, Angelini A, Barnocchi N, Brusco G, Pacchiarotti A, Aragona C. Ongoing pregnancies af- ter vitrification of human oocytes using a combined solution of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. Fertil Steril 2006;86:997–1000.

41. Larman MG, Sheehan CB, Gardner DK. Calcium- free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. Reproduction 2006;131: 53–61.

42. Kader A, Agarwal A, Abdelrazik H, Sharma RK, Ahmady A, Falcone T. Evaluation of post-thaw DNA integrity of mouse blastocysts after ultrarapid and slow freezing. Fertil Steril 2009;91:2087–94.

43. Sharma GT, Dubey PK, Chandra V. Morphological changes, DNA damage and developmental compe- tence of in vitro matured, vitrified-thawed buffalo (Bubalus bubalis) oocytes: a comparative study of two cryoprotectants and two cryodevices. Cryobiolgy 2010;60:315–21.

44. Gook DA, Osborn SM, Johnston WI. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2- propanediol and the configuration of the meiotic spindle. Hum Reprod 1993;8:1101–9.

3. Evaluation de la génotoxicité des protocoles de vitrifications ovocytaires, avant vitrification et après réchauffement

Notre équipe a poursuivi ce travail par l'évaluation de la génotoxicité de trois kits commercialisés et utilisés pour la vitrification des ovocytes humains. Deux kits comportaient des solutions contenant de l'EG et du DMSO et un kit comportait des solutions contenant de l'EG et du PrOH.

Nos objectifs ont été :

[1] d'évaluer la génotoxicité des kits de vitrification immédiatement après l'exposition successive des ovocytes aux solutions d'équilibration et vitrification (appliquées selon les recommandations du fabricant) et avant refroidissement par l'azote liquide, puis

[2] d'appliquer le test des comètes après vitrification des ovocytes, stockage dans l'azote liquide, réchauffement et incubation à 37 °C des ovocytes de souris pendant 3 heures après réchauffement .

Les trois solutions testées étaient :

- Kit 1 : Kit de vitrification ORIGIO[®] (Limonest France) contenant des solutions visant à une exposition croissante de PrOH et EG jusqu'à des concentrations de 15%.
- Kit 2 : Kit de vitrification IRVINE Scientific[®] (Santa Ana, California, USA) contenant des solutions visant à une exposition croissante de DMSO et EG jusqu'à des concentrations de 15%.
- Kit 3 : Kit de vitrification KITAZATO[®] (Dibimed[®], Valence Espagne) contenant des solutions visant à une exposition croissante de DMSO et EG jusqu'à des concentrations de 15%.

L'exposition aux solutions 1 et 2 contenant EG et DMSO ainsi que la vitrification avec ces solutions, suivi du réchauffement n'induisaient de lésions significatives de l'ADN ovocytaire chez souris.

En revanche, la solution 3 contenant PrOH et EG induisait une augmentation significative de lésions de l'ADN ovocytaire que ce soit avant refroidissement ou après réchauffement.

Après avoir associés des tests à court terme de toxicologie génétique sur un modèle cellulaire validé dans ce domaine à un test des comètes sur ovocytes de souris, **nous pouvons émettre l'hypothèse que le PrOH a une action génotoxique directe à haute concentration à la fois sur les cellules somatiques (CHO) et sur les ovocytes de souris.** Nos résultats sont cohérents avec ceux d'autres études qui rapportent aussi des effets délétères du PrOH. Larman et al. ont retrouvé chez la souris des modifications des flux de calcium intracellulaire et une activation parthogénétique en cas de vitrification ovocytaire avec du PrOH, ce qui altérait sévèrement la viabilité cellulaire (59,60). L'étude de Sharma et al. a comparé deux méthodes de vitrification d'ovocytes de bovins avec une solution contenant de l'EG et une solution contenant du PrOH (61), et avait montré une augmentation significative d'anomalies morphologiques (fracture de la zone pellucide, ovocytes clivés involués) ainsi que des lésions de l'ADN dans le groupe des ovocytes vitrifiés avec du PrOH. Hu et al. ont comparé l'effet de deux protocoles de vitrification d'ovocytes de bovins (DMSO + EG Versus PrOH + EG) sur la configuration du fuseau méiotique, la méthylation de l'ADN, ainsi que sur les processus d'apoptose et de fragmentation de l'ADN.

Les taux d'apoptose et d'hyperméthylation étaient significativement plus élevés dans le groupe d'ovocytes vitrifiés par EG + PrOH en comparaison au groupe témoin négatif (ovocytes frais) et au groupe d'ovocytes vitrifiés par EG + DMSO.

Le PrOH entrainerait non seulement un excès de mort cellulaire mais également une vulnérabilité des ovocytes non apoptotiques du fait de l'augmentation de la méthylation de l'ADN (62).

Ce travail a fait l'objet de la publication suivante qui expose en détail la méthodologie, les résultats et la discussion :

Berthelot-Ricou A, Perrin J, Di Giorgio C, De Meo M, Botta A, Courbiere B. Genotoxicity assessment of oocyte vitrification protocols by comet assay on mouse oocytes. Fertility and Sterility 2013; 100:882-8.

PUBLICATION 3

Genotoxicity assessment of mouse oocytes by comet assay before vitrification and after warming with three vitrification protocols.

Berthelot-Ricou A, Perrin J, Di Giorgio C, De Meo M, Botta A, Courbiere B. Fertility and Sterility. 2013; 100: 882–888.

REPRODUCTIVE SCIENCE

Genotoxicity assessment of mouse oocytes by comet assay before vitrification and after warming with three vitrification protocols

Anais Berthelot-Ricou, M.D.,^{a,b} Jeanne Perrin, M.D., Ph.D.,^{a,c} Carole di Giorgio, Ph.D.,^e Michel de Meo, Ph.D.,^e Alain Botta, M.D., Pharm.D., Ph.D.,^a and Blandine Courbiere, M.D., Ph.D.,^{a,d}

^A Biogenotoxicologie, Sante Humaine & Environnement UMR 6116, IMBE, Aix-Marseille Universite, FR CNRS 3098, ECCOREV, Marseille; ^b Department of Gynecology, Obstetrics, CHU La Reunion, CH Felix Guyon, Saint Denis, Reunion Island; ^cCECOS Reproduction laboratory, Department of Gynecology, Obstetrics, and Reproduction, AP-HM La Conception, Marseille, and ^d Department of Gynecology, Obstetrics, and Reproduction, Gynepole, AP-HM La Conception, Marseille; and ^cIMBE, Laboratory of Environmental Mutagenesis, Faculty of Pharmacy Marseille, France

Objective: To assess the genotoxicity of three oocyte vitrification protocols. **Design**: Murine assay.

Setting: Biogenotoxicology research laboratory.

Animal(s): CD1 female mice.

Intervention(s): Three mouse oocyte groups were exposed to three commercialized human oocyte vitrification protocols. Protocols 1 and 2 contained dimethyl sulfoxide and ethylene glycol (EG), and protocol 3 contained EG and 1, 2-propanediol (PrOH). DNA damage was first evaluated by comet assay after oocyte exposure to the three different equilibration and vitrification solutions. Comet assay was also performed after full vitrification and warming procedure and compared with a negative control group (oocytes stored in medium culture only) and a positive control group (oocytes exposed to hydrogen peroxide just before comet assay).

Main Outcome Measure(s): DNA damage was quantified as Olive tail moment (OTM). Statistical analysis consisted of a Shapiro-Wilk test. Then, median protocol OTM was compared with the negative control group with the Mann-Whitney U test. The difference was considered to be statistically significant if the P value was < .05.

Result(s): In both parts of our study, protocols 1 and 2 did not induce significant DNA damage, whereas protocol 3 induced statistically higher DNA damage compared with the negative control group.

Conclusion(s): Vitrification protocols containing PrOH induced significant DNA damage on mouse oocytes, both before cooling and after warming. Therefore, for the moment, we prefer vitrification techniques without PrOH while we await more studies on PrOH toxicity and long-term evaluation. (Fertil Steril®2013; 100:882–8. © 2013 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Oocyte vitrification, DNA damage, cryoprotectants, comet assay, genotoxicity
Oocyte cryopreservation, as an alternative to emergency IVF, may be used to preserve the fertility of women with malignant diseases who must undergo gonadotoxic therapies (1-3), particularly if no parental project is ongoing. Oocyte cryopreservation may also enable oocyte donation for women with ovarian failure or premature ovarian syndrome, for those who hyperstimulation have responded poorly to ovarian stimulation (4), or for oocyte banking for social reasons. Oocyte cryopreservation is widely used in assisted reproduction technologies (ART) as a solution to the ethical problems associated with the embryo cryopreservation (5). Metaphase II oocyte cryoconservation by vitrification has for the two last decades, been at the forefront of research in ART. Because the oocyte is the largest mammalian cell,

Received December 17, 2012; revised April 21, 2013; accepted May 17, 2013; published online June 10, 2013.

A.B.-R. has nothing to disclose. J.P. has nothing to disclose. C.d.G. has nothing to disclose. M.d.M. has nothing to disclose. A.B. has nothing to disclose. B.C. has nothing to disclose. Supported by a grant from Agence de la Biomedecine. Reprint requests: Blandine Courbiere, M.D., Ph.D., Department of Gynecology, Obstetrics, and Reproduction, AP-HM La Conception, 147 bd Baille, 13005 Marseille, France (E-mail: blandine. courbiere@ap-hm.fr). it has been difficult to cryopreserve with the use of the classic slow freezing protocol, owing to its sensitivity to ice crystal formation because of the cytoplasmic volume and its water charge (6). Although slow freezing technique has improved, the implantation potential of these cryopreserved oocytes was not satisfying, with pregnancy rates of 3.2%-13.2% (7-10) owing to cytologic injuries during cryopreservation processes (11) and meiotic spindle disruption (12). Nevertheless. mature oocyte vitrification techniques that associate very high cooling rates and high cryoprotectants concentrations have been shown to avoid the formation of ice crystals and to improve oocyte survival rate after thawing (odds ratio [OR] 2.46, 95% confidence interval [CI] (1.82-3.32) and fertilization rate (OR 1.50, 95%) CI 1.07-2.11) (13). Since 1999, vitrificationcryopreservation has led to several hundred live births with reassuring obstetrical and perinatal outcomes (14-17). The main problem raised by vitrification is the possible toxic effects, such as DNA damage, because of the use of high concentrations of intracellular cryoprotectants.

Mme Anaïs Ricou-Berthelot.

Whether it is safe in the long term to use oocyte and embryo vitrification for children who were born with this method of cryopreservation is

still unknown. Indeed, DNA damage in germ cells may promote genotoxic events, which lead chromosome can to abnormality which can be transmitted to the progeny (18). Classification criteria for cell chemical germ mutagens was published by the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals; the comet assay has the be a useful for potential to tool investigating germ cell genotoxicity (19). Briefly, the comet assay is a simple and short test of genotoxicity that allows the detection of primary DNA damage in single cells (20). Cell membranes are lysed, protein bonds are split, and the DNA is unwound at alkaline pH. During a short period of electrophoresis, broken strands of DNA are drawn out and a cell with damaged DNA gives the appearance of a "comet": The head of the comet contains undamaged DNA, which does not migrate with electrophoresis in the specific experimental conditions, and the comet tail contains damaged DNA

pieces, which migrate freely (21).

In previous studies, our team assessed the genotoxic effect of three cryoprotectants widely used in vitrification: dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG), and propylene glycol (PrOH). In vitro exposure to PrOH induced significant DNA damage in somatic cells (22). In a second study, we assessed genotoxicity of PrOH on mature mouse oocytes by a previously adapted oocyte comet assay (23). We have shown that high concentrations of PrOH (7.5% and 15%) induced significant DNA damage on mouse oocytes, whatever the duration of exposure (24).

The aim of the present study was to assess, with the use of the alkaline comet assay, the genotoxic effects on mature oocytes of three oocyte vitrification protocols used in human ART. The genotoxic effects were assessed on metaphase II (MII) oocytes. DNA damage was first evaluated by comet assay after of the exposure oocytes to the three different equilibration and vitrification solutions. Then, comet assay was performed after the full vitrification and warming procedure and compared with control groups.

Mme Anaïs Ricou-Berthelot.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Oocyte equilibration-vitrification solutions and thawing solutions (ES-VS and TS) of kit 1 were purchased from Irvine Scientific, ES-VS and TS of kit 2 were purchased from Kitazato Biopharma, and ES-VS and warming solution (WS) of kit 3 were purchased from Origio. All other chemicals were from Sigma, unless stated otherwise. Vitrification closed- device Cryotips were from Irvine Scientific.

Animals

Prepubescent <4-week-old female CD1 mice (Harlan Laboratories) were housed in a temperature and light-controlled room, with free access to food and water. All experimental protocols and animal handling procedures were reviewed and approved by Local Ethics Committee on Animal Experimentation (no. 3-4112009).

Source of Oocytes

A total of 94 mice (30 for the first and 64 for the second part of the study) were injected intraperitoneally with 0.1 mL 10 IU pregnant mare serum gonadotropin. Three days later they received an additional injection with 0.1 mL 5 IU hCG.

Sixteen hours later, the mice were killed by cervical dislocation (25) and oviducts collected. Intact cumulus masses were released from excised oviducts and incubated with hyaluronidase (10 mg/mL) for 10 minutes. With this protocol, an average of 15 mature oocytes were released from each mouse. After collection, all oocytes were placed into M2 medium at room temperature for 1 hour. For this study, the mature mouse oocytes were selected if a first polar body was present.

M2 and M16 media are common for oocyte storage and in vitro culture of preimplantation stage embryos. M2 medium is recommended by the manufacturer Sigma Aldrich for manipulation of mouse oocytes and embryos at ambient temperature. It was used in the first part of the study for incubation of oocytes before exposure to kits and for incubation of matched negative control samples. M16 medium is recommended for manipulation and storage of mouse oocytes and embryos at 37°C.

For part one of the study, three different oocyte groups were exposed to the three different ES and VS present in commercial kits. One group was kept for negative control (represented by 30 oocytes stored in the M2 medium at room temperature), and another for positive control (30 oocytes stored in the M2 medium at room temperature and exposed to hydrogen peroxide $[H_2O_2]$ just before comet assay).

For part two of the study, we performed the complete vitrification procedure on fresh mouse according to the manufacturer's oocytes instructions for each kit. We used the same steps for the equilibration and vitrification studies as described for part one of the study, and at the end of the exposure to vitrification solutions (<1 minute for each protocol), oocytes were loaded into each closed-device Cryotip. One oocyte group was used for negative control (represented by 30 fresh oocytes not vitrified and warmed, stored in the M16 medium at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air for 3 hours), and another for positive control (30 fresh oocytes stored in the M16 medium at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 in air for 3 hours and exposed to H_2O_2 just before comet assay).

All of these experiments were replicated three times.

Alkaline Comet Assay on Mouse Oocytes

The alkaline comet assay was described by Tice et al. (26) and adapted to mouse oocytes by Berthelot-Ricou et al. (23). After exposure to the different conditions, each group of 30 oocytes was placed into normal-meltingpoint agarose (0.8% in phosphate-buffered solution [PBS]) loaded on a cytologic saline microscope slide (previously covered with 1.6% high-melting-point agarose in PBS) and covered with low-melting-point agarose (0.5% in PBS) at 37°C. Slides were lysed in a freshly prepared detergent solution (containing 2.5 mol/L NaCl, 100 mmol/L Na₂EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl [pH 10], 1% Triton X-100, and 10% DMSO), for 2 hours at 4°C. DNA unwinding was carried out with an alkaline solution (1 mmol/L Na2EDTA and 300 mmol/L NaOH) for 20 minutes at room temperature in L horizontal а 1 electrophoresis unit. Then electrophoresis was conducted for 20 minutes (25 V, 300 mA) in the same buffer solution. After the 20 minutes of electrophoresis, the slides were neutralized with 0.4 mol/L Tris-HCl (pH 7.5), rinsed with ultrapure water, dipped into 100% methanol (high-performance liquid chromatographygrade purity solvent), and dried overnight at room temperature.

Slides were stained with 40 µL propidium iodide solution (0.1 mg/mL) and examined with use of an Olympus BX-60 the fluorescence microscope at 200 magnification, equipped with a highly sensitive CCD color digital camera (Sony): band-pass filter 510-550 nm, long-pass filter 590 nm. Digital pictures were collected with the Komet software (version 6.0; Andor Bioimaging).

The alkaline comet assay was conducted for each protocol: part one of the study: immediately at the end of exposure of the oocytes to the vitrification solution (<1 minute); part two of the study: on intact MII oocytes at the end of the 3 hour recovery in M16 medium after oocyte vitrification and warming; on negative control oocyte groups; and on positive control oocyte groups.

Part One: Oocyte Exposure to Equilibration and Vitrification Solutions

For each oocyte exposure to ES-VS, we applied the manufacturer's protocol designed for human oocytes. The exact composition of the solutions included in the kit was communicated by the pharmaceutical laboratory only for kit 1.

The first part of the study involved 30 mice. We collected 450 MII oocytes.

One group of 30 oocytes was subjected to every exposure conditions (kit 1, kit 2, kit 3, negative control, and positive control). This experiment was repeated three times.

Oocyte exposure to kit 1 equilibration and vitrification solutions. The ES contained 7.5% EG + 7.5% DMSO, 20% (v/v) Dextran Serum Supplement (DSS), and 0.5 mol/L sucrose. The VS contained 15% EG + 15% DMSO, 20% (v/v) DSS, and 0.5 mol/L sucrose. We applied the manufacturer's equilibration and vitrification solution exposure protocol exactly. First we prepared the different microdrops of ES and VS in a Petri dish. Oocytes were placed for 1 minute on the first microdrop of HEPESbuffered medium with protein adapted to mouse oocyte (M2 medium), then the first ES drop (ES1) was merged with an M2 drop by making a wide bridge with a tip between ES1 and M2, until the drops merged to allow spontaneous mixing for 2 minutes. Then we similarly merged the second ES drop (ES2) with the previous mix and again al- lowed spontaneous mixing for 2 minutes. The oocytes were then transferred from merged drops to the third ES drop (ES3) and incubated for 3 minutes.

We observed that the mouse oocytes resumed their original volume within 3 minutes in drop 3. Finally we transferred the oocytes to the VS drop for <1 minute.

Oocyte exposure to kit 2 equilibration and vitrification solutions. The ES contained 7.5% EG + 7.5% DMSO and the VS 5% EG + 15%DMSO. The successively oocytes were gradient а progressive of exposed to equilibration solution for 3 minutes, 3 minutes, and 9 minutes and then placed in vitrification solution for < 90 seconds.

Oocyte exposure to kit 3 equilibration and vitrification solutions. The ES contained 7.5% EG + 7.5% PrOH and the VS 15% EG + 15% PrOH. We placed 1 mL each of ES and VS in separate wells. The oocytes were transferred into the equilibration well for 5 minutes and then transferred in minimum volume into the vitrification well for <1 minute.

Part Two: Liquid Nitrogen Storage, Thawing, and Oocyte Rehydration

Part two of the study involved 64 mice. We collected 960 MII oocytes. In three successive experiments, 771 oocytes were vitrified with the three kits and 189 oocytes were used for negative and positive control groups.

In the second part of the study, we performed the complete vitrification procedure on fresh mouse oocytes according to the manufacturer's instructions for each kit. We used the same steps for equilibration and vitrification as described in the first part of the study. At the end of the exposure to the VS (<1 minute for each protocol), oocytes were loaded into each closeddevice Cryotip. The straw was sealed and immediately plunged into liquid nitrogen at 196°C for storage. The same closed device was used for all three vitrification protocols, so that the only difference was the composition of the solutions and duration of exposure.

For warming, each Cryotip was removed from liquid nitrogen and immediately put into a 37°C water bath for 10 seconds, and then the extremity of the Cryotip was cut. Oocytes vitrified with protocols 1, 2, and 3 were rehydrated with the use of the corresponding thawing kits, according to the manufacturers' instructions.

Mme Anaïs Ricou-Berthelot.

Rehydration protocol with kit 1. After warming, the oocytes were placed in a thawing solution (HEPES-buffered solution of Medium-199 containing gentamicin sulfate (35 mg/mL), 1.0 mol/L sucrose, and 20% (v/v) DSS) at 37°C for 1 minute. Then the oocytes were successively transferred to the dilution solution drops at room temperature (HEPES-buffered solution of Medium-199 containing gentamicin sulfate (35 mg/mL), 0.5 mol/L sucrose, and 20% (v/v) DSS) for 3 minutes, and three 2 minute washing solution baths (HEPES-buffered solution of Medium-199 containing gentamicin sulfate (35 mg/mL) and 20% (v/v) DSS).

Rehydration protocol with kit 2. After thawing, the oocytes were placed in a thawing solution at 37°C for 1 minute, and then transferred to a dilution solution at room temperature for 3 minutes and in two successive washing solution drops for 5 minutes and 1 minute.

Rehydration protocol with kit 3. After thawing, the oocytes were placed in a WS at 37°C for 3 minutes, then successively in 2 drops of dilution solution at room temperature and 2 drops of washing solution, for 3 minutes for each of these four steps.

Oocyte recovery step. After each rehydration protocol, the oocytes were transferred to

preequilibrated M16 medium with 20% (v/v)

protein supplement (or 12 mg/mL), for recovery during 3 hours at 37° C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air.

Morphologic and Survival Oocyte Evaluation

After the 3 hours recovery step, the oocytes were examined under inverted microscope to assess survival rate for each kit. Oocytes were classified into 2 groups: atretic and intact oocytes. The survival rate was defined as the ratio of intact oocytes to total oocytes.

Oocyte Control Groups

Negative control. In part one of the study, the negative control oocyte group consisted of 30 fresh oocytes placed in M2 medium at ambient temperature just after hyaluronidase exposure. In part two of the study, the negative control oocyte group consisted of 30 fresh oocytes (neither vitrified nor warmed) stored at 37° C and 5% CO₂ in M16 medium for 3 hours just after hyaluronidase exposure.

Positive control. The positive control oocyte group was the same as the negative control oocyte group, but just before comet assay they were incubated in a 250 μ mol/L H₂O₂ solution (known genotoxic agent) for 5 minutes at 4°C in the dark (23).

Main Outcome Measures

Slide and statistical analysis were performed blind. For each condition, the oocyte images were analyzed by Komet software (version 6.0).

DNA damage was quantified and expressed as Olive tail moment (OTM), defined as the product of the percentage of the DNA in the tail and the distance between the center of the head and the tail (26).

Statistics

Statistical analysis was performed with the use of Statgraphics Plus (version 5; Sigma Plus) and consisted of a normality (Shapiro-Wilk) test for each protocol. Then the median OTM (calculated on the distribution of 50% of the software oocvtes obtained after Komet analysis), with interquartile range (IQR) for each protocol, was compared with the median OTM of the medium only control culture with the use of the non-parametric statistical hypothesis test, the Mann Whitney U test. The difference in median values between groups was greater than would be expected by chance and considered to be statistically significant if the P value was < .05.

RESULTS

Part One: Comet Assay after Mouse Oocyte Exposure to Equilibration and Vitrification Solutions

The comet assay performed at the end of the exposure to ES and VS from kits 1 and 2 containing EG and DMSO, did not reveal significant oocyte DNA damage compared with the negative control group, with median OTMs of, respectively, 0.910 (IQR 0.27-3.69; P<.001) and 7.760 (IQR 2.54–20.06; P= .074) versus 5.51 (IQR 3.04–9.7). In contrast, exposure to kit 3 solutions containing PrOH and EG induced statistically increased DNA damage compared with the negative control group (median OTM 15.87, IQR 9.95–22.71; P<.001; Fig. 1; Table 1).

Part Two: Comet Assay after Vitrification, Liquid Nitrogen Storage, Thawing, and Rehydration

A total of 771 vitrified oocytes were analyzed. After warming, the oocyte survival rates were 86%, 79.6%, and 32.8% for protocols 1, 2, 3, respectively (P<.05; Table 2). The comet assay was performed on intact oocytes after thawing. We showed that protocols 1 and 2 did not induce significant DNA damage whereas protocol 3 induced statistically higher levels of DNA damage compared with the negative control group.

The median OTMs were 7.23 (IQR 2.51–14.2; P= .243), 5.74 (IQR 3.135–10.98; P=.479), and 9.81 (IQR 4.06–34.78; P= .002) versus 5.425 (IQR 2.55–10.45), respectively (Table 1; Fig. 2).



Alkaline comet assay on mouse oocyte after exposure to equilibration and vitrification solutions according to protocols 1, 2, and 3. Olive tail moment (OTM): product of the percentage of the DNA in the tail and the distance between the center of the head and the tail. Neg Cont: negative control oocyte group in M2 medium at ambient temperature just after hyaluronidase exposure. Pos Cont: positive control oocyte group incubated in a 250- μ mol/L H₂O₂ solution for 5 minutes at 4 °C in the dark. P1, P2, and P3: oocyte groups exposed to equilibration and vitrification solutions according to protocols 1, 2, and 3.

Berthelot-Ricou. Genotoxicity of vitrification protocols. Fertil Steril 2013.

TABLE 1

Statistical analysis of comet assays on mouse oocytes performed after exposure to equilibration and vitrification solutions and after oocyte vitrification and thawing.

Group	n	Median	25%	75%	t	n (small)	n (big)	U^{a}	P value
Part one: NC	comet assay 54	y after oocyte e 5.515	quilibration a 3.043	nd vitrification 9.697	solution exposure				
EP1	74	0.910	0.270	3.688	4,622.500	54	74	858.500	<.001 ^b
EP2	57	7.760	2.540	20.065	2,720.500	54	57	1,235.500	.074
EP3	91	15.870	9.950	22.710	2,364.500	54	97	879.500	<.001 ^b
Part two:	comet assay	y after oocyte v	itrification and	d thawing					
NC	74	5.425	2.550	10.455					
RP1	65	7.230	2.510	14.240	4,827.000	65	74	2,128.000	.243
RP2	29	5.740	3.135	10.980	1605.000	29	74	976.000	.479
RP3	49	9.810	4.060	34.780	3,627.000	49	74	1,224.000	.002 ^b

Note: OTM values from 50% oocytes were obtained after Komet software analysis; normality (Shapiro-Wilk) test failed; P<.050. NC = negative control group stored (part one) in M2 medium at ambient temperature just after hyaluronidase exposure and (part two) in M16 medium at 37 °C and 5% CO₂; EP1, EP2, EP3 = exposure to equilibration and vitrification solutions of protocols 1, 2, and 3; RP1, RP2, RP3 = thawing, rehydration, and 3-hour recovery in protocols 1, 2, and 3. ^a Mann-Whitney U statistic.

^b Statistical significance at P<.05.

Berthelot-Ricou. Genotoxicity of vitrification protocols. Fertil Steril 2013.

DISCUSSION

In this study, we show that mouse oocyte vitrification protocols with solutions containing PrOH induce significant DNA damage compared with negative control samples after two steps of the protocol: exposure to ES-VS and after vitrification-warming. In contrast, oocvte vitrification with solutions containing no PrOH do not induce significant DNA damage compared with negative control samples. Previous studies have shown PrOH toxicity in cells. For instance, analysis of the mouse MII oocyte at different stages of the slow freezing protocol revealed a negative impact of PrOH exposure on oocyte physiology:

significantly more zona pellucida hardening, cellular degeneration, and proteome alteration which could result in a higher risk of aneuploidy and DNA damage than slow freezing with the use of DMSO and EG (27–30).

Buffalo oocyte vitrification with PrOH caused significantly more morphologic and DNA with EG damage compared vitrification protocols (31). DNA fragmentation following PrOH exposure also oocyte has been demonstrated by Huang et al. on mouse oocytes (32). Two hypotheses could explain DNA fragmentation. First, damage could be caused by accumulation of reactive oxygen species, which are responsible for oxidative stress and associated with alterations of genomic and proteomic expressions in oocytes.

The second hypothesis is direct toxicity of the cryoprotectants, particularly related to chemical composition, concentration, and exposure time. According to our results on the genotoxicity assessment of cryoprotectants on Chinese hamster ovary cells and mouse oocytes, PrOH seems to induce direct toxic effects on DNA (22, 24). In the present study, we observed a statistically lower oocyte survival rate after vitrification with protocol 3, containing PrOH (32.6%), than with the two other protocols which did not contain PrOH. The equilibration step recommended by the kit 3 manufacturer's protocol may be too short. Indeed, the permeability of PROH is lower than other cryoprotectants, and therefore intracellular cryoprotection is lower if insufficient time is left to protect the intracellular part. Nevertheless, even in protocol 3, the comet assay was performed on intact oocytes, not on atretic oocytes. Consequently, DNA lesions observed by comet assay on vitrified-thawed oocytes with protocol 3 were assessed on intact oocytes, which could be fertilized.

Recently, Hu et al. studied the effect of two oocyte vitri- fication protocols on bovine oocytes. The first contained DMSO and EG and the second PrOH and EG. That study assessed spindle configuration, global DNA methylation status, apoptosis, and DNA fragmentation after vitrification and after slow freezing protocols (33). The apoptosis rate was $44.1\% \pm 4.0\%$ in the PrOH group versus 9.6% ±0.6% in fresh oocytes, and for all other parts of this study, damage in the PrOH-vitrified oocyte group was statistically higher than in the fresh oocyte control group and DMSO-vitrified oocyte group. The authors concluded that DMSO was better for preserving oocyte cellular and nuclear integrity. The PrOH method makes oocytes more vulnerable to increased DNA methylation, which may be directly associated with imprinting disorders.

TABLE 2

Oocyte morphologic analysis with inverted microscope.

	n	MII, n (%)	Atretic, n (%)
Protocol 1	207	178 (86)	29 (14)
Protocol 2	250	199 (79.6)	51 (20.4)
Protocol 3	314	103 (32.8)	211 (67.2)

Note: Warned ocrysterwers analyzed after 3 hours for recrisely in preequilibrated M16 medium with 20% (W) protein supplement (or 12 mg/mL) at 3/1C. In a humidified atmosphere of 5% CC2 in air.

Berthelat-Ricou: Genotoxicity of vitrilitation protocols. Fertil Steril 2013.



Alkaline comet assay on mouse oocyte after vitrification, liquid nitrogen storage, and thawing according to protocols 1, 2, and 3. Olive tail moment (OTM): product of the percentage of the DNA in the tail and the distance between the center of the head and the tail. Neg Cont: negative control oocyte group incubated in M16 medium at 37°C and 5% CO₂ for 3 hours just after hyaluronidase exposure. Pos Cont: positive control oocyte group incubated in a 250- μ M H₂O₂ solution for 5 minutes at 4°C in the dark. P1, P2, and P3: oocytes vitrified with protocols 1, 2 and 3 and rehydrated with the corresponding thawing kits according to each manufacturer's instructions.

Berthelot-Ricou. Genotoxicity of vitrification protocols. Ferbi Steril 2013.

However, neither our study nor Hu's work explored the kinetics of DNA repair after >3 hours of oocyte recovery. Little is known about that; mature oocytes are in the MII cell cycle, but in somatic cells the DNA repair systems are effective during the active phase of the cell cycle (prophase, inter- phase), not during the metaphase. DNA repair could appear when the cell cycle resumes, that is to say after fertilization. Moreover we have to be cautious about our results because mouse oocytes might be more sensitive to chemical effects.

Mouse oocyte DNA is not exactly similar to human oocyte DNA. Indeed, Gook et al. (1993) compared mouse and human oocvtes cryopreserved by slow freezing with the use of PrOH and found a 4% morphologic survival rate for mouse oocytes versus a 64% survival rate for human oocytes (34). Genotoxicity assessment of vitrification protocols cannot be explored on mature human oocytes because of bioethical laws. We could in the future envisage performing this study on nonhuman primate mature oocytes. However, in the mean- time, in view of our successive results and according to the effects of PrOH reported in the recent literature, we think it is important to be cautious. We therefore prefer vitrification techniques without PrOH for human oocyte vitrification until more studies on PrOH toxicity and long-term evaluation of oocyte vitrification with PrOH protocols are available.

Acknowledgment: The authors thank Erika Lopez, D.M.V., Ph.D., and Jean-Marc-Feuerstein for their technical assistance (Centre de Formation et de Recherches Experimentales Medico-Chirurgicales, CFREMC/CEPA, Aix-Marseille Universite) and Dr. Luke Harper for correcting the English translation.

REFERENCES

- Yang D, Brown SE, Nguyen K, Reddy V, Brubaker C, Winslow KL. Live birth after the transfer of human embryos developed from cryopreserved oocytes harvested before cancer treatment. Fertil Steril 2007; 87:1469.e1–4.
- Domingo J, Ayllon Y, Domingo S, Cobo A, Crespo J, Pellicer A. New approaches to female fertility preservation. Clin Transl Oncol 2009;11:154–9.
- Cobo A, Domingo J, Perez S, Crespo J, Remohí J, Pellicer A. Vitrification: an effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients. Clin Transl Oncol 2008;10:268–73.
- García JI, Noriega-Portella L, Noriega-Hoces L. Efficacy of oocyte vitrification combined with blastocyst stage transfer in an egg donation program. Hum Reprod 2011;26:782–90.
- Porcu E, Fabbri R, Maria Ciotti P, Frau F, de Cesare R, Venturoli S. Oocytes or embryo storage? Fertil Steril 2002;78:S15.
- Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. Theriogenology 2000;53:59–72.
- Levi Setti PE, Albani E, Novara PV, Cesana A, Morreale G. Cryopreservation of supernumerary oocytes in IVF/ICSI cycles. Hum Reprod 2006;21:370–5.
- Borini A, Lagalla C, Antonietta Bonu M, Bianchi V, Flamigni C, Coticchio G. Cumulative pregnancy rates resulting from the use of fresh and frozen oocytes: 7 years' experience. Reprod Biomed Online 2006;12:481–6.
- Bianchi V, Coticchio G, Distratis V, Di Giusto N, Flamigni C, Borini A. Differential sucrose concentration during dehydration (0.2 mol/L) and rehydration (0.3 mol/L) increases the implantation rate of frozen human oocytes. Reprod Biomed Online 2007;14:64–71.
- La Sala GB, Nicoli A, Villani MT, Pescarini M, Gallinelli A, Blickstein I. Outcome of 518 salvage oocyte-cryopreservation cycles performed as a routine procedure in an in vitro fertilization program. Fertil Steril 2006;86:1423–7.
- van der Elst J. Oocyte freezing: here to stay? Hum Reprod Update 2003;9: 463–70.
- Chen S-U, Yang Y-S. Slow freezing or vitrification of oocytes: their effects on survival and meiotic spindles, and the time schedule for clinical practice. Taiwan J Obstet Gynecol 2009;48:15–22.
- Cobo A, Diaz C. Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Fertil Steril 2011;96:277–85.
- Lucena E, Bernal DP, Lucena C, Rojas A, Moran A, Lucena A. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. Fertil Steril 2006;85:108–11.
- Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, Antinori S. Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. Reprod Biomed Online 2007;14:72–9.
- Chian R-C, Gilbert L, Huang JYJ, Demirtas E, Holzer H, Benjamin A, et al. Live birth after vitrification of in vitro matured human oocytes. Fertil Steril 2009;91:372–6.
- Noyes N, Porcu E, Borini A. Over 900 oocyte cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies. Reprod Biomed Online 2009;18:769–76.
- 18. Speit G, Vasquez M, Hartmann A. The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. Mutat Res 2009;681:3–12.
- Morita T, Hayashi M, Nakajima M, Tanaka N, Tweats DJ, Morikawa K, et al. Practical issues on the application of the GHS classification criteria for germ cell mutagens. Regul Toxicol Pharmacol 2009;55:52–68.
- Speit G, Rothfuss A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. Methods Mol Biol 2012;920:79–90.
- Horvathova E, Dusinska M, Shaposhnikov S, Collins AR. DNA damage and repair measured in different genomic regions using the comet assay with fluorescent in situ hybridization. Mutagenesis 2004;19:269–76.

- Aye M, di Giorgio C, de Mo M, Botta A, Perrin J, Courbiere B. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. Food Chem Toxicol 2010;48:1905–12.
- Berthelot-Ricou A, Perrin J, di Giorgio C, de Meo M, Botta A, Courbiere B. Comet assay on mouse oocytes: an improved technique to evaluate genotoxic risk on female germ cells. Fertil Steril 2011;95:1452–7.
- Berthelot-Ricou A, Perrin J, di Giorgio C, de Meo M, Botta A, Courbiere B. Assessment of 1,2-propanediol (PrOH) genotoxicity on mouse oocytes by comet assay. Fertil Steril 2011;96:1002–7.
- Roustan A, Perrin J, Berthelot-Ricou A, Lopez E, Botta A, Courbiere B. Evaluating methods of mouse euthanasia on the oocyte quality: cervical dislocation versus isoflurane inhalation. Lab Anim 2012;46:167–9.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ Mol Mutagen 2000;35:206–21.
- Larman MG, Sheehan CB, Gardner DK. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. Reproduction 2006;131:53–61.
- Larman MG, Katz-Jaffe MG, Sheehan CB, Gardner DK. 1,2-Propanediol and the type of cryopreservation procedure adversely affect mouse oocyte phys- iology. Hum Reprod 2007;22:250–9.
- Kader A, Agarwal A, Abdelrazik H, Sharma RK, Ahmady A, Falcone T. Evaluation of post-thaw DNA integrity of mouse blastocysts after ultrarapid and slow freezing. Fertil Steril 2009;91:2087–94.
- Larman MG, Minasi MG, Rienzi L, Gardner DK. Maintenance of the meiotic spindle during vitrification in human and mouse oocytes. Reprod Biomed Online 2007;15:692–700.
- Sharma GT, Dubey PK, Chandra V. Morphological changes, DNA damage and developmental competence of in vitro matured, vitrified-thawed buffalo (Bubalus bubalis) oocytes: a comparative study of two cryoprotectants and two cryodevices. Cryobiology 2010;60:315–21.
- Huang JYJ, Chen HY, Park JYS, Tan SL, Chian R- C. Comparison of spindle and chromosome configuration in in vitro– and in vivo–matured mouse oocytes after vitrification. Fertil Steril 2008;90:1424–32.
- Hu W, Marchesi D, Qiao J, Feng HL. Effect of slow freeze versus vitrification on the oocyte: an animal model. Fertil Steril 2012;98:752–760.e3.
- Gook DA, Osborn SM, Johnston WI. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. Hum Reprod 1993;8:1101–9.

Risque génotoxique et ovocyte

DISCUSSION GENERALE

1. Limites des tests de génotoxicologie applicables à l'ovocyte.

Les tests de génotoxicité ont pour objet de détecter les dommages de l'ADN (direct ou indirect) engendrés par l'action d'agents génotoxiques. Les dommages de l'ADN sont multiples et fréquents : cassures simples brins, doubles brins, adduits, pontages intra-brins ou encore modifications de l'oxydation des bases...et les mécanismes de réparation de l'ADN sont également nombreux (16). Actuellement il est recommandé d'appliquer des stratégies associatives pour répondre à la question de la génotoxicité d'un agent ou produits étudié et d'en déterminer précisément les effets mutagènes, aneugènes ou clastogènes associés (10). L'application de tests de génotoxicité à la cellule germinale est source de difficultés inhérentes à ce type cellulaire. Les différents tests de génotoxicité existant à ce jour pour les cellules somatiques sont réalisables sur des quantités cellulaires importantes et/ou sur des cellules en division (bactérie (Ames), cellules somatiques eucaryotes (USD Test)...). Concernant les cellules germinales, le problème quantitatif ne se pose pas pour les spermatozoïdes, mais représente une limite majeure pour la réalisation de ces tests sur l'ovocyte. D'autre part, l'ovocyte mature est non seulement une cellule qui ne se divise pas mais également une cellule dont le cycle cellulaire est interrompu en métaphase et ce jusqu'à la fécondation. Pour ces raisons les stratégies associatives des tests habituels de génotoxicité ne sont pas applicables, comme le test des micronoyaux par exemple. Enfin pour des problèmes éthiques il n'est pas envisageable d'obtenir des ovocytes matures humains pour la réalisation de test de génotoxicité. L'extrapolation des données de tests in Vitro utilisant des cellules non humaines ou des lignées cellulaires mutées restera donc toujours délicate et discutable. En effet il peut exister une différence de sensibilité des cellules à l'agent génotoxique, selon l'espèce choisie (63).

Les données de la littérature sur les lésions de l'ADN et ovocytes mature sont encore très pauvres. On retrouve uniquement des tests de détection de l'apoptose cellulaire comme le TUNEL Assay (18). Le test des comètes est un test classique pour l'étude des lésions primaires de l'ADN en évaluant les cassures de l'ADN. Cependant, une cassure de l'ADN peut être réparée sans effet mutagène. Un test des comètes positif ne permet pas de conclure formellement à un effet génotoxique, mais à un risque d'effet génotoxique. En effet lors de la survenue de lésions de l'ADN au sein d'une cellule trois options se présentent : la mise en route des mécanismes de mort cellulaire aboutissant à l'apoptose, la tolérance des lésions avec maintien de l'anomalie aboutissant alors à la mutation (lésion stable et héritable de l'ADN), et la réparation des lésions (16). Afin de pouvoir déterminer la place des systèmes de réparations et donc d'éliminer les phénomènes d'apoptose à l'issu d'un test des comètes positif, il parait effectivement très intéressant de pouvoir associer un test de mise en évidence de cassure de l'ADN et un test de réparation de l'ADN. Récemment le test de détection de phosphorylation des histones H₂AX a été décrit et pourrait trouver sa place dans cette indication. Ce test permet la détection de la phosphorylation de l'histone H₂AX (62). Cette phosphorylation de H₂AX est une réponse rapide et quantitative à la mise en œuvre de mécanismes de réparation de cassure double brins impliquées dans les mécanismes de mutagenèse et cancérisation. Cette activité a été démontrée sur des cellules précancéreuses in vivo (63,64). Néanmoins, les mécanismes de réparation de l'ADN ne sont actifs que lors des phases actives du cycle cellulaire (16) ainsi la détection de phosphorylation de H₂AX est effectuée sur six cycles cellulaires somatiques. Ce test est maintenant appliqué à la cellule germinale masculine en complément du test des comètes pour étudier la génotoxicité et le mécanismes de réparation de l'ADN au cours de la spermatogenèse (62). Cependant, pour la cellule germinale féminine se pose encore un fois le problème d'une cellule bloquée en métaphase II qui ne terminera sa méiose qu'après l'entrée du spermatozoïde dans l'ovocyte. Les lésions potentielles de l'ADN

ovocytaire ne pourront donc être réparées qu'à la reprise du cycle cellulaire c'est-à-dire dans le zygote après la fécondation.

2. Mécanismes de réparation des lésions de l'ADN par l'ovocyte

Les mécanismes de réparation de l'ADN ovocytaires sont peu connus et la littérature sur le sujet est pauvre. Une récente revue de la littérature réalisée par Carroll and Marangos s'est attachée à décrire précisément les différents types réponses ovocytaire aux lésions de l'ADN et ce au cours des différentes phases du cycle cellulaire (65). Comme nous l'avons signalé précédemment l'ovocyte est une cellule dont le cycle est bloqué en prophase I de méiose durant un période particulièrement longue pouvant aller jusqu'à 40 ans pour les dernières ovulations d'une femme. Les mécanismes de réparation de l'ADN de l'ovocyte, décrit dans la littérature, sont ceux mis en œuvre lors de l'ovogenèse donc avant le blocage en Méiose I, puis après la fécondation, le zygote étant alors capable de procéder à la réparation des lésions de l'ADN issues des 2 gamètes (66). Cependant aucune étude ne s'est attachée à étudier les dommages de l'ADN de l'ovocyte mature en métaphase II comme non l'avons fait dans ce travail, et la question de l'existence de mécanismes de réparation de l'ovocyte mature reste entière. C'est pourtant à ce stade que les ovocytes sont employés en médecine de reproduction ainsi les agents génotoxiques pouvant être en contact avec les ovocytes matures pourront générer des lésions de l'ADN dont la réparation ne sera effectuée qu'après fécondation (figure 12).





D'après Carroll and Marangos 2013 (66).

3. Avantages et inconvénients du test des comètes sur ovocyte dans l'évaluation des toxiques.

Le test « idéal » permettrait de distinguer effets cytotoxiques, apoptotiques et génotoxiques. Les critiques majeures adressées au test des comètes sont la mauvaise reproductibilité inter laboratoire et le fait qu'il soit très sensible à la viabilité cellulaire, risquant ainsi d'induire des faux positifs. La variabilité selon les laboratoires serait liée à la sensibilité importante de ce test (importance de la formation de l'opérateur) et au faible nombre de cellules étudiées. Afin d'éviter d'analyser des « faux-positifs », il faut au préalable déterminer l'effet cytotoxique et l'apoptose cellulaire engendré par l'agent génotoxique avant de pouvoir réaliser des tests de génotoxicité. Ces tests de cytotoxicité avaient été réalisés dans un travail préliminaire sur cellules CHO (40). Le test des comètes, mis au point sur l'ovocyte lors de ce travail, était réalisé uniquement sur ovocytes matures en métaphase II, morphologiquement normaux. Les cellules atrétiques ou clivées étaient exclues des manipulations, afin de ne pas obtenir un taux de faux positif liés à ces phénomènes d'apoptose. Depuis sa mise au point dans l'équipe, ce test a été utilisé avec succès dans plusieurs études (69-70) et a été encore simplifié afin de permettre une grande reproductibilité (71). Ainsi le test des comètes appliqué à l'ovocyte, nous permet à ce jour de pouvoir étudier rapidement et simplement l'action d'agents potentiellement génotoxiques ex vivo ou in vivo sur ovocytes matures. Ce test n'est effectivement pas parfait, mais permet de quantifier les lésions primaires de l'ADN, liées à l'exposition de l'ovocyte à un agent qu'il soit environnemental ou médicamenteux par exemple. Ce test étant à ce jour le seul applicable à l'ovocyte, il nous semble qu'il apporte des données absentes sur un type cellulaire bien peu étudié.

Risque génotoxique et ovocyte

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Grâce à une batterie de tests, notre équipe a montré un effet génotoxique direct du PrOH à haute concentration sur les lignées cellulaires somatiques (40) et sur l'ovocyte de souris (2), qu'il soit employé seul ou en association avec un autre cryoprotecteur, et que ce soit avant vitrification ou après réchauffement (3). Nos travaux ont utilisé des ovocytes murins car les ovocytes de souris présentent de nombreuses similitudes morphologiques et fonctionnelles avec l'ovocyte humain (42,51,52). Les ovocytes de souris seraient cependant plus sensibles aux agents chimiques que les ovocytes humains (63). Cependant, l'obtention d'ovocytes matures humains en quantité suffisante pour réaliser des études de génotoxicité de bonne qualité est éthiquement et techniquement impossible. Bien qu'il faille rester prudent quant à l'extrapolation de ces résultats à l'ovocyte humain, et dans l'attente d'études complémentaires sur la génotoxicité du PrOH et sur les phénomènes de réparation pouvant intervenir dans l'ovocyte, nous préférons utiliser en pratique pour la vitrification des ovocytes humains des solutions cryoprotectrices ne comprenant pas de PrOH. Il semble important de poursuivre l'étude de la génotoxicité de ce cryoprotecteur sur l'ovocyte.

Notre travail nous a permis de développer le test des comètes adapté à l'ovocyte de mammifère. Le test des comètes sur ovocytes non dépellucidés de souris est un test rapide, simple et efficace pour étudier la survenue de lésions primaires de l'ADN sur les cellules germinales féminines. Ce test pourrait avoir des applications dans différents domaines, avec :

- Des applications pour la recherche en biologie de la reproduction par exemple pour évaluer la génotoxicité directe d'éventuels nouveaux réactifs employés ou pour évaluer les risques ovocytaires de nouvelles thérapeutiques. Il existe actuellement un projet dans l'équipe d'étudier l'effet de certains agents de chimiothérapie utilisés dans les cures d'induction de leucémie aigüe afin d'étudier les effets aneugènes et clastogènes éventuels de certains agents de chimiothérapie sur l'ADN ovocytaire (72). En vue de préserver les gamètes des femmes atteintes de cancer, une stimulation ovarienne en vue d'un recueil ovocytaire est parfois proposée dans une intercure, c'est-à-dire au cours d'une courte période depuis la chimiothérapie précédente. Suite à une expérience clinique chez seulement deux patientes, Rossi et al. ont estimé que la toxicité des cures d'induction par Daunorubicine et Cytarabine était faible et préconisaient de stimuler dans une intercure pour congeler des embryons avant greffe de moelle (73). Cependant, lorsque nous proposons une stimulation ovarienne en vue d'une vitrification ovocytaire, nous ne disposons actuellement d'aucune information concernant les risques mutagènes éventuels d'un antécédent immédiat de chimiothérapie associant Cytarabine et Daunorubicine sur les ovocytes. Le test des comètes sur ovocytes permettrait d'étudier chez la souris le risque génotoxique des chimiothérapies d'induction prescrites dans les leucémies aigües.

- Des applications en recherche en reprotoxicologie après exposition *in vivo* des souris pour évaluer l'impact des toxiques environnementaux sur l'ADN ovocytaire. Grâce à la mise en place de ce test dans l'équipe, des travaux de recherche ont depuis pu étudier l'impact sur l'ovocyte d'une exposition in vivo aux hydrocarbures aromatiques polycycliques présents dans les gaz d'échappement et la fumée de cigarette (69).

D'autre part, Notre équipe s'est investie dans le Projet LABEX 2012 – 2018, dont l'objectif est d'étudier l'impact et les effets biologiques des nanoparticules sur les cellules humaines. Ce projet collaboratif (INSERM, CEREGE, CEA, IBEB, IMBDE, INERIS, INRA, UJF) inclut 4 sous-projets dont l'étude de l'impact des nanoparticules sur la santé humaine, et en particulier l'impact gamétique engendré par la diffusion systémique des nanoparticules, après absorption digestive ou respiratoire. Un travail préliminaire utilisant le test des comètes a permis d'étudier la génotoxicité de nanoparticules de dioxyde de cérium (C_eO₂) sur des ovocytes de souris (70).

- Enfin des applications en toxicologie génétique environnementale avec l'évaluation de

l'effet protecteur de molécules antioxydantes sur l'ovocyte animal et humain.

Risque génotoxique et ovocyte

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Berthelot-Ricou A, Perrin J, Di Giorgio C, De Meo M, Botta A, Courbiere B. Comet assay on mouse oocytes: an improved technique to evaluate genotoxic risk on female germ cells. Fertil Steril. 2011; 95(4):1452-1457.

2. Berthelot-Ricou A, Perrin J, di Giorgio C, de Meo M, Botta A, Courbiere B. Assessment of 1,2-propanediol (PrOH) genotoxicity on mouse oocytes by comet assay. Fertil Steril. 2011; 96(4):1002-1007.

3. Berthelot-Ricou A, Perrin J, di Giorgio C, de Meo M, Botta A, Courbiere B. Genotoxicity assessment of mouse oocytes by comet assay before vitrification and after warming with three vitrification protocols. Fertil Steril. 2013;100(3): 882-888.

4. Thybaud V, Aardema M, Clements J, Dearfield K, Galloway S, Hayashi M, et al. Strategy for genotoxicity testing: hazard identification and risk assessment in relation to in vitro testing. Mutat Res. 2007; 627(1):41-58.

5. Dearfield KL, Moore MM. Use of genetic toxicology information for risk assessment. Environ Mol Mutagen. 2005;46(4):236-245.

6. Meek MEB, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKeeman LD, et al. A framework for human relevance analysis of information on carcinogenic modes of action. Crit Rev Toxicol. 2003;33(6):591-653.

7. Speit G, Vasquez M, Hartmann A. The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. Mutat Res. 2009; 681(1):3-12.

8. Speit G, Rothfuss A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2012;920:79-90.

9. Vogel EW, Natarajan AT. DNA damage and repair in somatic and germ cells in vivo. Mutat Res. 1995;330(1-2):183-208.

10. Dearfield KL, Cimino MC, McCarroll NE, Mauer I, Valcovic LR, US Environmental Protection Agency. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. Mutat Res. 2002;521(1-2):121-135.

11. Morita T, Hayashi M, Nakajima M, Tanaka N, Tweats DJ, Morikawa K, et al. Practical issues on the application of the GHS classification criteria for germ cell mutagens. Regul Toxicol Pharmacol RTP. 2009;55(1):52-68.

12. Food and Drug Administration, HHS. International Conference on Harmonisation; guidance on S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals intended for Human Use; availability. Notice. Fed Regist. 2012;77(110):33748-33749.

13. Kirsch-Volders M, Plas G, Elhajouji A, Lukamowicz M, Gonzalez L, Vande Loock K, et al. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. Arch Toxicol. 2011;85(8):873-899.

14. Samanta S, Dey P. Micronucleus and its applications. Diagn Cytopathol. 2012;40(1):84-90.

15. Berthelot-Ricou A, Perrin J, Orsière T, Aye M, Roustan A, Botta A, et al. Genotoxicity risk assessment and oocytes: Basis of genetic toxicology and application in reproductive science. Gynecol Obstet Fertil. 2013; 41: 44–47

16. Ménézo Y, Dale B, Cohen M. DNA damage and repair in human oocytes and embryos: a review. Zygote Camb Engl. 2010;18(4):357-365.

17. Villani P, Fresegna AM, Ranaldi R, Eleuteri P, Paris L, Pacchierotti F, et al. X-Ray Induced DNA Damage and Repair in Germ Cells of PARP1–/– Male Mice. Int J Mol Sci. 2013;14(9):18078-18092.

18. Martínez-Burgos M, Herrero L, Megías D, Salvanes R, Montoya MC, Cobo AC, et al. Vitrification versus slow freezing of oocytes: effects on morphologic appearance, meiotic spindle configuration, and DNA damage. Fertil Steril. 2011;95(1):374-377.

19. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. Hepatol Baltim Md. 1995;21(5):1465-1468.

20. Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. Lancet. 1986;1(8486):884-886.

21. La Sala GB, Nicoli A, Villani MT, Pescarini M, Gallinelli A, Blickstein I. Outcome of 518 salvage oocyte-cryopreservation cycles performed as a routine procedure in an in vitro fertilization program. Fertil Steril. 2006;86(5):1423-1427.

22. Borini A, Levi Setti PE, Anserini P, De Luca R, De Santis L, Porcu E, et al. Multicenter observational study on slow-cooling oocyte cryopreservation: clinical outcome. Fertil Steril. 2010;94(5):1662-1668.

23. Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. Theriogenology. 2000;53(1):59-72.

24. Courbière B, Baudot A, Mazoyer C, Salle B, Lornage J. La vitrification : technique d'avenir pour la cryoconservation ovarienne ? Bases physiques de cryobiologie, avantages et limites. Gynécologie Obstétrique Fertil. 2009;37(10):803-813.

25. Isachenko E, Isachenko V, Rahimi G, Nawroth F. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2003;108(2):186-193.

26. Boutron P. Comparison with the theory of the kinetics and extent of ice crystallization and of the glass-forming tendency in aqueous cryoprotective solutions. Cryobiology. 1986;23(1):88-102.

27. Baudot A, Odagescu V. Thermal properties of ethylene glycol aqueous solutions. Cryobiology. 2004;48(3):283-294.

28. Cobo A, Diaz C. Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. Fertil Steril. 2011;96(2):277-285.

29. Noyes N, Porcu E, Borini A. Over 900 oocyte cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies. Reprod Biomed Online. 2009;18(6):769-776.

30. Guérin J-F. Vitrification of oocytes and embryos: the law, the results, the future. Gynécologie Obstétrique Fertil. 2012;40 Suppl 1:24-27.

31. Porcu E, Fabbri R, Maria Ciotti P, Frau F, De Cesare R, Venturoli S. Oocytes or embryo storage? Fertil Steril. 2002;78, Supplement 1(0):S15.

32. Cobo A, Domingo J, Pérez S, Crespo J, Remohí J, Pellicer A. Vitrification: an effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients. Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex. 2008;10(5):268-273.

33. Cobo A, Remohí J, Chang C-C, Nagy ZP. Oocyte cryopreservation for donor egg banking. Reprod Biomed Online. 2011;23(3):341-346.

34. Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO, Shaw JM. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. Cryobiology. 1999;38(2):119-130.

35. Lucena E, Bernal DP, Lucena C, Rojas A, Moran A, Lucena A. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. Fertil Steril. 2006;85(1):108-111.

36. Oktay K, Cil AP, Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. Fertil Steril. 2006;86(1):70-80.

37. Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, Antinori S. Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. Reprod Biomed Online. 2007;14(1):72-79.

38. Chian R-C, Gilbert L, Huang JYJ, Demirtas E, Holzer H, Benjamin A, et al. Live birth after vitrification of in vitro matured human oocytes. Fertil Steril. 2009;91(2):372-376.

39. Edgar DH, Gook DA. How should the clinical efficiency of oocyte cryopreservation be measured? Reprod Biomed Online. 2007;14(4):430-435.

40. Aye M, Di Giorgio C, De Mo M, Botta A, Perrin J, Courbiere B. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc. 2010;48(7):1905-1912.

41. Aardema MJ, Snyder RD, Spicer C, Divi K, Morita T, Mauthe RJ, et al. SFTG international collaborative study on in vitro micronucleus test III. Using CHO cells. Mutat Res. 2006;607(1):61-87.

42. Mazoyer C, Courbière B, Salle B, Smitz J, Lornage J. État actuel de la folliculogenèse in vitro chez la souris. Gynécologie Obstétrique Fertil. 2008;36(1):6-16.

43. Roustan A, Perrin J, Berthelot-Ricou A, Lopez E, Botta A, Courbiere B. Evaluating methods of mouse euthanasia on the oocyte quality: cervical dislocation versus isoflurane inhalation. Lab Anim. 2012;46(2):167-169.

44. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res. 1988;175(1):184-191.

45. De Méo M, Laget M, Castegnaro M, Duménil G. Genotoxic activity of potassium permanganate in acidic solutions. Mutat Res. 1991;260(3):295-306.

46. Decome L, De Méo M, Geffard A, Doucet O, Duménil G, Botta A. Evaluation of photolyase (Photosome) repair activity in human keratinocytes after a single dose of ultraviolet B irradiation using the comet assay. J Photochem Photobiol B. 2005;79(2):101-108.

47. Suzuki T, Fujikura K, Higashiyama T, Takata K. DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. J Histochem Off J Histochem Soc. 1997;45(1):49-53.

48. Olive PL, Banáth JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the « comet » assay. 1990. Radiat Res. 2012;178(2):AV35-42.

49. Bauer E, Recknagel RD, Fiedler U, Wollweber L, Bock C, Greulich KO. The distribution of the tail moments in single cell gel electrophoresis (comet assay) obeys a chi-square (chi2) not a gaussian distribution. Mutat Res. 1998;398(1-2):101-110.

50. Teresa M. A. Basile, Laura Caponetti, Giovanna Castellano, and Gianluca Sforza. A Texture-Based Image Processing Approach for the Description of Human Oocyte Cytoplasm. 2010; 59(10): 2591-2601.

51. Wassarman PM, Litscher ES. The multifunctional zona pellucida and mammalian fertilization. J Reprod Immunol. 2009;83(1-2):45-49.

52. Huang I, Griffin J, Emery B, Jones KP, Peterson C, Carrell DT. Mathematical Regression Analysis of the Follicular-Oocyte Complex Shows Remarkable Similarity for the Mouse, Hamster and Human. Fertil Steril. 2005;84, Supplement 1:S399.

53. Botta C, Di Giorgio C, Sabatier A-S, De Méo M. Effects of UVA and visible light on the photogenotoxicity of benzo[a]pyrene and pyrene. Environ Toxicol. 2009;24(5):492-505.

54. Fan ZQ, Wang YP, Yan CL, Suo L, Zhu SE. Positive effect of partial zona pellucida digestion on in vitro fertilization of mouse oocytes with cryopreserved spermatozoa. Lab Anim. 2009;43(1):72-77.

55. Botta C, Di Giorgio C, Sabatier A-S, De Méo M. Genotoxicity of visible light (400-800 nm) and photoprotection assessment of ectoin, L-ergothioneine and mannitol and four sunscreens. J Photochem Photobiol B. 2008;91(1):24-34.

56. Kirkland D, Kasper P, Müller L, Corvi R, Speit G. Recommended lists of genotoxic and nongenotoxic chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity tests: a follow-up to an ECVAM workshop. Mutat Res. 2008;653(1-2):99-108.

57. Petersen AB, Gniadecki R, Vicanova J, Thorn T, Wulf HC. Hydrogen peroxide is responsible for UVA-induced DNA damage measured by alkaline comet assay in HaCaT keratinocytes. J Photochem Photobiol B. 2000;59(1-3):123-131.

58. Miranda-Vilela AL, Alves PC, Akimoto AK, Lordelo GS, Gonçalves CA, Grisolia CK, et al. Gene polymorphisms against DNA damage induced by hydrogen peroxide in leukocytes of healthy humans through comet assay: a quasi-experimental study. Environ Health Glob Access Sci Source. 2010;9:21.

59. Larman MG, Katz-Jaffe MG, Sheehan CB, Gardner DK. 1,2-propanediol and the type of cryopreservation procedure adversely affect mouse oocyte physiology. Hum Reprod Oxf Engl. 2007;22(1):250-259.

60. Katz-Jaffe MG, Larman MG, Sheehan CB, Gardner DK. Exposure of mouse oocytes to 1,2-propanediol during slow freezing alters the proteome. Fertil Steril. 2008;89(5 Suppl):1441-1447.

61. Sharma GT, Dubey PK, Chandra V. Morphological changes, DNA damage and developmental competence of in vitro matured, vitrified-thawed buffalo (Bubalus bubalis) oocytes: A comparative study of two cryoprotectants and two cryodevices. Cryobiology. 2010;60(3):315-321.

62. Hu W, Marchesi D, Qiao J, Feng HL. Effect of slow freeze versus vitrification on the oocyte: an animal model. Fertil Steril. 2012;98(3):752-760.e3.

63. Gook DA, Osborn SM, Johnston WI. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. Hum Reprod Oxf Engl. 1993;8(7):1101-1109.

64. Kuo LJ, Yang L-X. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. Vivo Athens Greece. 2008;22(3):305-309.

65. Seo J, Kim SC, Lee H-S, Kim JK, Shon HJ, Salleh NLM, et al. Genome-wide profiles of H2AX and -H2AX differentiate endogenous and exogenous DNA damage hotspots in human cells. Nucleic Acids Res. 2012;40(13):5965-5974.

66. Seo J, Kim K, Chang D-Y, Kang H-B, Shin E-C, Kwon J, et al. Genome-wide reorganization of histone H2AX toward particular fragile sites on cell activation. Nucleic Acids Res. 2014;42(2):1016-1025.

67. Carroll J and Marangos P. The DNA damage response in mammalian oocytes. Frontiers in genetics. 2013; 117 (4) :1-9.

68. Ashwood-Smrth M.J and Edwards R.G. DNA repair by oocytes. Molecular Human Reproduction. 1996; 2(1):46-51.

69. Einaudi L, Courbiere B, Tassistro V, Prevot C, Sari-Minodier I, Orsiere T, et al. In vivo exposure to benzo(a)pyrene induces significant DNA damage in mouse oocytes and cumulus cells. Hum Reprod Oxf Engl. 2014;29(3):548-554.

70. Courbiere B, Auffan M, Rollais R, Tassistro V, Bonnefoy A, Botta A, et al. Ultrastructural interactions and genotoxicity assay of cerium dioxide nanoparticles on mouse oocytes. Int J Mol Sci. 2013;14(11):21613-21628.

71. Courbiere B, Greco F, Auffan M, Tassistro V, Orsiere T, Perrin J. Comet assay on mouse oocytes: technical adaptation to study genotoxicity of environmental factors on cumulus oocyte complexes.Communication acceptée au congrés de l'ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology), 30 Juin – 3 Juillet 2014, Munich, Allemagne.

72. Meirow D, Epstein M, Lewis H, Nugent D, Gosden RG. Administration of cyclophosphamide at different stages of follicular maturation in mice: effects on reproductive performance and fetal malformations. Hum Reprod Oxf Engl. avr 2001;16(4):632-637.

73. Rossi BV, Ashby RK, Srouji SS. Embryo banking between induction and consolidation chemotherapy in women with leukemia. Fertil Steril. 2011;96(6):1412-1414.

Risque génotoxique et ovocyte

PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THESE ANAIS BERTHELOT-RICOU

1. Articles parus dans des revues à comité de lecture.

a. Revues internationales

<u>Berthelot-Ricou A</u>, Perrin J, di Giorgio C, de Meo M, Botta A, Courbiere B. Genotoxicity assessment of mouse oocytes by comet assay before vitrification and after warming with three vitrification protocols. Fertil Steril. 2013; 100 (3):882–888.

<u>Berthelot-Ricou A</u>, Perrin J, di Giorgio C, de Meo M, Botta A, Courbiere B. Assessment of 1, 2-propanediol (PrOH) genotoxicity on mouse oocytes by comet assay. Fertil Steril. 2011; 96(4):1002-1007.

<u>Berthelot-Ricou A</u>, Perrin J, Di Giorgio C, De Meo M, Botta A, Courbiere B. Comet assay on mouse oocytes: an improved technique to evaluate genotoxic risk on female germ cells. Fertil Steril. 2011; 95(4):1452-1457.

Roustan A, Perrin J, <u>Berthelot-Ricou A</u>, Lopez E, Botta A, Courbiere B. Evaluating methods of mouse euthanasia on the oocyte quality: cervical dislocation versus isoflurane inhalation. Lab. Anim. 2012;46(2):167-9. Epub 2012 Apr 17.

b. Revues nationales

<u>Berthelot-Ricou A</u>, Perrin J, Orsiere T, Aye M, Roustan A, Botta A, et al. Genotoxicity risk assessment and oocytes: Basis of genetic toxicology and application in reproductive science. Gynécologie Obstétrique Fertil. 2013;41: 44–547.

2. Communications orales nationales.

B. Courbiere, <u>A. Berthelot-Ricou</u>, T. Orsière, M. Aye, A. Roustan, A. Botta, J. Perrin. Risque génotoxique et ovocytes : principes de toxicologie génétique et applications. 18^{ème}JournéesFédération Française d'Etude de la Reproduction, Rouen, 25-27 Septembre 2013.

B Courbiere, <u>A Berthelot-Ricou</u>, J Perrin, A Roustan, C Di Giorgio, M De Meo, Alain Botta. Etude du risque génotoxique des protocoles de vitrification ovocytaire par test des comètes sur ovocytes de souris.17^{ème}Journées Fédération Française d'Etude de la Reproduction, Paris 19-21 Septembre 2012.

<u>A. Berthelot-Ricou</u>, J Perrin, A Roustan, C Di Giorgio, M De Meo, A Botta, B Courbiere. Test des comètes sur ovocytes de souris : étude de la génotoxicité du 1,2 Propanediol. 15^{ème}Journées Fédération Française d'Etude de la Reproduction, Paris, 6-8 Octobre 2010.

3. Communications affichées.

a. Congrès internationaux

B Courbiere, <u>A Berthelot-Ricou</u>, J Perrin, C Di Giorgio, M De Meo, A Botta. Genotoxicity assessment of three oocyte vitrification protocols, by comet assay on mouse oocytes. P 319: Annual Meeting of the European Society of Human reproduction & Embryology (ESHRE), Londre, 8-10 Juillet 2013.

B Courbiere, <u>A Berthelot-Ricou</u>, J Perrin, C Di Giorgio, M De Meo, A Botta. Assessment of 1, 2-propanediol (PrOH) genotoxicity on mouse oocytes by comet assay. P 347: Annual Meeting of the European Society of Human reproduction & Embryology (ESHRE), Stockholm 3-6 Juillet 2011.

b. <u>Congrès nationaux</u>

<u>A Berthelot-Ricou</u>, J Perrin, A Roustan, C Di Giorgio, M De Meo, A Botta, T Orsiere, B Courbiere. Test des comètes sur ovocytes de souris: Validation et application d'un test de génotoxicité à la cellule germinale féminine. Exemple d'étude du risque génotoxique des protocoles de vitrification ovocytaire. Congrès EDSE 2013, Marseille 15-16 Avril 2013

<u>A Berthelot-Ricou</u>, J Perrin, C Di Giorgio, M De Meo, A Botta, B Courbiere. Etude du risque génotoxique des protocoles de vitrification ovocytaire par test des comètes sur ovocytes de souris. 17^{ème}Journées de la Fédération Française d'Etude de la Reproduction, Paris, (FFER) Paris Septembre 2012.

<u>A Berthelot-Ricou</u>, J Perrin, C Di Giorgio, M De Meo, A Botta, B Courbiere. Test des comètes sur ovocytes de souris : Validation d'un test de génotoxicité adapté à la cellule germinale féminine. 15^{ème}Journées Fédération Française d'Etude de la Reproduction(FFER), Paris, 6-8 Octobre 2010.

<u>A Berthelot-Ricou</u>, J Perrin, C Di Giorgio, M De Meo, A Botta, B Courbiere. Test des comètes sur ovocytes de souris: étude de la génotoxicité du 1,2 Propanediol. 15^{ème}Journées Fédération Française d'Etude de la Reproduction(FFER), Paris, 6-8 Octobre 2010.

Risque génotoxique et ovocyte

ANNEXES

ANNEXE 1 : Avis du comité régional d'éthique sur l'expérimentation animale

Comité d'éthique de Marseille
Enregistré auprès du Comité National de Réflexion Ethique sur l'Expérimentation Animale Sous le numéro 14
Rousset, le 19 Avril 2010
Notification du Président
à Mme Blandine Courbiere
Objet : Avis favorable Comité d'éthique pour votre protocole référence n° : 3-24112009
Le comité d'éthique pour l'expérimentation animale de Marseille a examiné votre demande concernant le protocole intitulé : « Cryoconservation de l'ovocyte par vitrification : mise au point d'un test mutagenese et de genotoxicité sur l'ovocyte de souris ».
Le choix de l'espèce Souris ainsi que le nombre d'individus est justifié.
Le protocole est décrit en suivant des procédures qui seront réalisées par des expérimentateurs agréé dans un établissement lui-même agréé pour l'expérimentation animale dans des conditions respect l'hygiène et la sécurité.
L'examen de l'ensemble du dossier a conduit le Comité à émettre un avis favorable à la réalisat de cette étude. Toute augmentation éventuelle du nombre d'animaux nécessaire à cette étude de être signalée et justifiée auprès du Comité.
E is being a strange with a filler of the second states
Pan a Rousser ce jour pour servir et faire valoir ce que de dron.
Dr Guy Dubreuil
Président du Comité d'éthique
Président du Comité d'éthique
Président du Comité d'éthique

ANNEXE 2 : Article Genotoxicity risk assessment and oocytes: Basis of genetic toxicology and application in reproductive science. Gynécologie Obstétrique Fertil. 2013;41: 44–547.

	Cynècologie Obstituique & I	estiline ana (2013) ana-ana
ELSEVIER MASSON	Disponible en ligne sur SciVerse ScienceDirect www.sciencedirect.com	Elsevier Masson France EM consulte www.em-consulte.com
Dix-huitièmes Journé (Rouen, 25–27 septer	es nationales de la Fédération frança nbre 2013}	ise d'étude de la reproduction
Risque génotox applications	ique et ovocytes : principe	s de toxicologie génétique et
Genotoxicity risk (application in rep	assessment and oocytes: Basis roductive science	of genetic toxicology and
A. Berthelot-Ricou A. Botta ⁴ , B. Courbi	^b , J. Perrin ^{ad} , T. Orsière ^a , M. Aye ere ^{4+e}	^d , A. Roustan ^d ,
CECCE, laboratoire de biologie de 13005 Marseille, Prance *Laboratoire de matogenére et ti Marseille, Prance	la reproduction, pile de gynécologie-solucierique et reprod uccologie environnementalics, IMME, faculté de phormasi	action, Cynépôle, AP-4011 la Conception, 147, houlevard Baille. . Ain-Maeurille université, 27, boulevard Jean-Maulin, 13003
THE & BREAKSHAMMER	et reproduction, Gynépôle, Ar-Mild La Conception, 147, be	ulevard Balle, 13005 Marselle, Prance
rine de generatigie-abilitrieger I N F O Å IE T I C L E Historique de l'ortide : Reço le 12 juin 2013 Accepté le 5 juillet 2013 Diripoolile sur Internet le sox Mate clé : Tent des condites Orneyte Lésions de l'ADN Céptotusidet Cryoprotecteurs	et repreduction, Gynépôle, AP-488 La Conception, 147, los R É S 12 M É L'application de tests de gêno une substance potentiellemes descendance des individus e simple, reproductible et capid Ce test perset de complétie- cellules somatiques, et pour l'étude de l'impact des faiteur une application preatique de o cryoprotecteurs utilisés à ha permis de démontrer l'absent sur les ovocytes et nous out (PrOH) à haute concentration	uievard Buile, 13005 Mancille, Prance tuxicité sur sellules germinales vise à évaluer l'impact d'une exposition et mutagène qui pourrait constituer un rinque pour la fertilité ou pour sponé. Le teut des cumètes sur ovocytes matures de souris est un ter e pour étudier la survenue de leision primaiers de l'ADN sur les voccyte des tests de toxicologie génétique réalisés en première intention sur de ait truuver de nombreuses applications en reprotoxicologie concernan s'ensimmementaux sur les cellules germinales féminines. Nous décrivo se tests en biologie de la reproduction avec l'étude de la génotoxicité du te concentration pour la visitification des ovocytes. Ces tests nous o de génotoxicité du diméthylvullisside (DMSG) et de l'irthyléne glycul (EG conduits à émettre l'hypothèse d'une génotoxicité du 1.2-propanedia
*rise de generatigie-abitivitique îl N F O Â E T I C L E Historique de Particle : Reço le 12 juin 2013 Accepté le 5 juillet 2013 Disponible sur tistemet le sox Mars cês : Test des consètes Oriençõe Lésions de l'ADN Génotraiché Dryoprofecteurs	R È S 12 M È R È S 12 M È L'application de tests de géno une rubritance potentiellemm descendance des individus e simple, reproductible et capid Ce test permet de complètec cellules somatiques, et pour l'étude de l'impact des facteur une application pratique de o cryoprotecteurs utilisés à ha permis de démontrer l'absence sur les ovocytes et nous noi (PrOH) à haute concentration E S T R À C T	nicourd Buile, 13005 Marseile, Prance trackcité sur cellules germinales vise à évaluer l'impact d'une exposition ti mutagène qui pourrait constituer un rinque pour la fertilité ou pour l ponés. Le test des comètes aur ovocytes matures de souris est un ten e pour étudier la survenue de lesions primaires de l'ADN sur les ovocyte des tests de trackcologie génétique réalisés en première intention sur de ait trouvre de combresses applications en reprotoxicologie concernan servisionnementaux sur les cellules germinales féminines. Nous décrivon es tests en biologie de la reproduction avec l'étude de la génatoxicité du te concentration pour la visitification des ouvyetes. Ces tests nons ou e de gésotoxicité du diméthyloudinide (DMSIO) et de l'éthyléne glycul (EC conduits à émettre l'hypothèse d'une génotoxicité du 1.2-propanetia © 2013 Elsevier Masson SAS. Tour denits réservé

Adresses e-mail : blandine anarhiter@up-hes.lt, blandine anarhitere@imbe.lt (8. Courbiere).

1297-53855 - see front matter & 2013 Elsevier Masson SAS. Toux douits réserves. http://dx.doi.org/10.1016/j.gyvbfe.2013.07.000

Pour citer cet article : Berthelot-Ricou A, et al. Risque génotoxique et ovocytes : principes de toxicologie génétique et applications. Gynécologie Obstétrique & Fertilite (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.gyohfe.2013.07.008

Risque génotoxique et ovocyte

GYOBFE-2466, No. of Pages 4

ARTICLE IN PRESS

Berthelat Birms et al / Cynécologie Októlirique & Rettilité aux (2013) xxx-xxx

1. Principes de toxicologie génétique

La toxicologie génétique ou génotoxicologie est une discipline qui vise à détecter des facteurs chimiques ou physiques interagissant (directement ou non) avec l'ADN des cellules somatiques et/ou germinales et qui, en l'absence de réparation fidèle, sont susceptibles de provoquer des mutations géniques et/ ou chromosomiques. Ces mutations géniques et chromosomiques sont susceptibles d'initier un processus cancèrogène lorsqu'elles ont lieu sur des cellules somatiques. En cas d'atteinte des cellules germinales, l'effet génotoxique risque d'entraîner une toxicité visà-vis de la reproduction (reprotoxicité) et/ou un risque théorique de transmission des mutations à la descendance [1-3]. Les objectifs des différents tests de génotoxicité sont d'une part

La plupart des stratégies réglementaires visant à autoriser la mise sur le marché de produits chimiques et leurs conditions d'emploi recouvent à la combinaison d'un test de mutations géniques sur cellules procaryotes, d'un test in vitro de mutation chromoiomique sur cellules de mammifères, et d'un test de mutation chromosomique in vivo sur la moelle osseuse de rongeurs [6]. Si les résultats de ces tests sont négatifs, l'agent ne sera pas considéré comme génotoxique [1.4,6]. Deux tests sont actuellement très employés, le test des comètes et le test des micronoyaux. Le test des comètes est un test de génotoxicité

relativement rapide qui met en évidence des dommages de l'ADN (cassures de brin, sites labiles alcalins et sites incomplets de réparation) chez des cellules eucaryotes individuelles suite à une exposition à des agents génotoxiques in vitro ou in vivo. Du fait de sa grande sensibilité, le test des cométes est actuellement l'un des plus utilisés et il peut être réalisé sur un grand nombre de types cellulaires [7,8]. Les cassures d'ADN peuvent être directem induites par l'agent génotoxique, consécutives au stress oxydatif induit par l'agent, ou encore la conséquence de la mise en œuvre de systèmes de réparation de l'ADN. Le principe de ce test repose sur une technique de micro-électrophorèse : en présence de cassures de l'ADN, les fragments d'ADN formés migrent plus rapidement que l'ADN intact, donnant à l'ADN cellulaire l'aspect de comètes. La tête de la comète contient l'ADN intact tandis que la queue renferme les fragments d'ADN cassés ayant migrès (Fig. 1) [8]. Le test des micronoyaux permet de mettre en évidence la présence d'anomalies chromosomiques de nombre ou de structure, consécutives à l'action d'agents génotoxiques. Les micronoyaux se définissent comme des entités nucléaires indépendantes du noyau principal et présentes dans le cytoplasme des cellules en interphase. Ils sont constitués de fragments de chromosomes (effet clastogène) ou de chromosomes entiers (effet aneugène) perdus par le noyau cellulaite au cours de la mitose (Fig. 2) [9,10].

2. Limites des tests de génotoxicité classiques pour l'étude de l'ovocyte

Le test des comètes est appliqué couramment aux spermatozoides dans le cadre de la recherche en biologie de reproduction [7]. Le test des micronoyaux n'est réalisable que sur des cellules en division. Concernant l'étude de la génotoxicité chez l'ovocyte, on retrouve dans la littérature quelques tests d'évaluation de la fragmentation de l'ADN comme le « TUNEL assay » [11,12] qui est un test d'évaluation de l'apoptose et non des lésions d'ADN d'une cellule vivante. Il n'existe pas de tests de génotoxicologie validés permettant d'évaluer les risques mutagènes d'une substance sur l'ADN ovocytaire.

3. Test des comètes sur ovocytes de souris [13]

Devant l'absence de tests de génotoxicologie adaptés à la cellule germinale férninine, notre équipe a développé l'application du test des comêtes sur ovocytes de souris afin de pouvoir évaluer la génotoxicité éventuelle de substances pouvant entrer en contact



Fig. 1. Enemple d'acquisition d'images après test des combies sur invectes de souris. A Ovocyte témoin règatif. B. Ovocyte agrès exposition à un agent génolmoique [15]. La migration par électrophonère se fait de gauche à droite. La tête de la comète contient l'ADN intact et la quese de sonsète, les fragments d'ADN cassés ayant migrés. Échefie 100 µM, grounissement - 200.

Pour citer cet article : Berthelot-Ricou A, et al. Risque génotoxique et ovocytes : principes de toxicologie génétique et applications. Gynécologie Obstétrique & Fertilite (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.gyobde.2011.07.008


Fig. 2. Principe du test des micronoyaux sur cellules somatiques pousant mettre en évidesur un effet aneugène (perte de chromosomes estien) ou clastogène (perte de fragments de chromosomes) au sours de la mitune après esposition à un agent génetoxique.

avec les ovocytes, de façon directe (ex. : cryoprotecteurs...) ou indirecte par voie sanguine (médicaments, tabac...). Les lésions de l'ADN ont été quantifiées par un paramètre classique au test des comètes appelé « olive tail moment « (OTM) qui associe la longueur de la queue de la comète et le pourcentage d'ADN qui y est contenu « tail DNA ».

Application : évaluation des risques génotoxiques des cryoprotecteurs utilisés à haute concentration pour la vitrification des ovocytes

4.1. Génotuxicité des cryoprotecteurs sur lignée cellulaire CHO [14]

L'objectif de nos travaux a été d'évaluer la génotoxicité des trois cryoprotecteurs les plus fréquemment utilisés pour la vitrification des ovocytes humains : le dimétbylsulfoxide (DMSO), l'éthylène glycol (EG) et le 1,2-propanediol (PrOH). Dans un premier travail, nous avons utilisé deux tests classiques de toxicologie génétique : le test des micronoyaux et le test des cométes sur une lignée cellulaire somatique d'ovaire d'hamster chinois (CHO) [14,15]. Cette étude a montré que le DMSO et l'EG n'induisaient pas de cassures simple brin de l'ADN et n'exerçaient pas d'activité clastogène ni aneugène sur les cellules CHO. En revanche, à haute concentration, le PrOH induisait in vitro des lèsions de l'ADN et des cassures chromosomiques. Nous avions ainsi êmis l'hypothèse que le PtOH était génotoxique pour les cellules CHO. Cependant, bien que ce modèle cellulaire et que ces tests soient largement utilisés en toxicologie génétique pour évaluer les risques génotoxiqués des agents chimiques ou physiques [15], il nous était impossible d'extrapoler nos résultats à l'ovocyte.

4.2. Génotoxicité des cryoprotecteurs sur ovocytes de souris [16]

Nous avons dans un second temps évalué la génotoxicité du PrOH sur ovocytes de souris par application du test de comètes [13]. Les ovocytes de souris ent été exposés à trois solutions de PrOH à des concentrations de 5,75 et 15 %, Après exposition des ovocytes aux solutions de PrOH à 7,5 et 15 %, nous avons observé une augmentation statistiquement significative des lésions primaires de l'ADN, en comparaison au groupe d'ovocytes témoins négatifs, à la fois pour les durées d'exposition longues (1 et 2 h) et courtes (1 et 5 min). Nous avons observé une corrélation entre concentration d'exposition, durée d'exposition et lésions primaires de l'ADN. Ces résultats doivent être interprêtés avec précaution car les ovocytes ont été exposés au PrOH seul et en l'absence de gradients de concentration, ce qui est conforme aux protocoles classiques de génotoxicologie mais qui ne correspondait pas aux protocoles de vitrification d'ovocytes humains.

 Génotoxicité des protocoles de vitrification sur ovocyte de souris [17]

La suite de notre travail a eu pour objectif d'évaluer la génotoxicité de trois solutions inclues dans trois kits de vitrification commercialisés pour la vitrification des ovocytes humains. Deux kits étaient composés d'EG et de DMSO et un kit contenait de l'EG et du PrOH. Nous avons réalisé le test des comètes à deux étapes de la procédure de vitrification ovocytaire : immédiatement après exposition des ovocytes aux solutions d'équilibration et vitrification, et après procédure compléte de vitrification, réchauffement et réhydratation des ovocytes. L'exposition des ovocytes de souris aux kits composes d'EG et DMSO ne générait pas de lésions de l'ADN, tandis que la vitrification ovocytaire avec le kit PrOH + EG entraînait des lésions significatives de l'ADN ovocytaire pour les deux étapes testées.

5. Discussion

Après avoir associé des tests à court terme de toxicologie génétique sur un modèle cellulaire validé dans ce domaine à un test des comètes sur ovocytes de souris, nous avons émis l'hypothèse que le PrOH a une action génotoxique directe à haute concentration à la fois sur les cellules somatiques (CHO) et sur les ovocytes de souris. Nos résultats sont cohérents avec ceux d'autres études qui rapportent aussi des effets délétères du PrOH. Larman et al. ont retrouvé chez la souris des modifications des flux de calcium intracellulaire et une activation parhogénétique en cas de vitrification ovocytaire avec du PrOH, ce qui altérait sévèrement la viabilité cellulaire [18,19]. L'étude de Sharma et al. a comparé deux méthodes de vitrification d'ovocytes de bovins avec une solution contenant de l'EG et une solution contenant du PrOH [20], et avait montré une augmentation significative d'anomalies morphologiques (fracture de la zone pellucide, ovocytes clivés involués) ainsi que des lésions de l'ADN dans le groupe des ovocytes vitrifiés avec du PrOH. Hu et al. ont comparé l'effet de deux protocoles de vitrification d'ovocytes de bovins (DMSO + EG versus PrOH + EG) sur la configuration du fuseau méiotique, la méthylation de l'ADN, ainsi que sur les processus d'apoptose et de fragmentation de l'ADN. Les taux d'apoptose et d'hyperméthylation étaient significativement plus élevés dans le groupe d'ovocytes vitrifiés par EG + PrOH en comparaison au groupe témoin négatif (ovocytes frais) et au groupe d'ovocytes vitrifiés par EG + DMSO. Le PrOH entraînerait non seulement un excès de mort cellulaire mais également une vulnérabilité des ovocytes

Pour citer cet article : Berthelot-Ricou A, et al. Risque génotoxique et ovocytes : principes de toxicologie génétique et applications Gynécologie Obstétrique & Fertilite (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.gyohfe.2013.07.005

OYOBFE-3466, No. of Pages 4

ARTICLE IN PRESS

to Rentility any (2012) ann-any 1.00

non apoptotiques du fait de l'augmentation de la méthylation de LADN 1211

6. Conclusion et perspectives

Nos travaux ont utilisé des ovocytes murins, car les ovocytes de souris présentent de nombreuses similitudes morphologiques et fonctionnelles avec l'ovocyte humain [22-24]. Les ovocytes de souris seraient cependant plus sensibles aux agents chimiques que les ovocytes humains [25]. Il faut donc rester prudent quant à l'extrapolation de nos résultats à l'ovocyte humain. Cependant, Tobtention d'ovocytes matures humains en quantité suffisante pour réaliser des études de génotoxicité de bonne qualité est éthiquement impossible.

Le but des tests de génotoxicité sur cellules germinales est d'évaluer l'impact d'une exposition à des mutagènes environne-mentaux qui pourrait constituer un risque pour la fertilité ou pour la descendance des individus exposés. Le test des comètes sur ovocytes matures de souris est un test simple, reproductible et rapide pour étudier la survenue de lésions primaires de l'ADN sur les cellules germinales féminines. Ce test permet de compléter des tests de toxicologie réalisés en première intention sur des cellules somatiques, et pourrait trouver de nombreuses applications en reprotoxicologie concernant l'étude de l'impact des facteurs environnementaux sur les cellules germinales féminines.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- Thybaud V, Azolema M, Clempron J, Dearfield K, Galloway S, Hayashi M, et al. Multicey for generationcey tertiling: barand identification and role increases in selation to in vitro tertiling. Multa Res 2007;827:41-38.
 Dearfield RJ, Moore MM. Use of generic toxicology information for tolk antenument. Environ Mol Mutager 2007;44:338-43.
 Meek MRJ, Bucker RJ, Cohron SM, DePilarov V, Holl RM. Lefeman-McKreenan UD, et al. A framework for human velocume analysis of information on carcino-genic modes of actions. CMR Rev Context 304, 2015;951-653.
 Dearfield RJ, Cimmo MC, McCarnill HE, Materi I, Valovici CR, UE Invienment and Prosterious destance in the anteneous analysis of the information on carcino-genic modes of actions. CMR Rev Context 304, 2015;951-653.
 Dearfield RJ, Cimmo MC, McCarnill HE, Materi I, Valovici CR, UE Invienment and Prosterious Anteneous and Construction and Actional and Actional Actionary and Actionary and Prosterious and Actionary MC, McCarnill ME, Materi I, Valovici CR, UE Invienment and Prosterious Actionary Construction and Actionary and Actionary and Actionary Actionary Actionary Actionary Actionary Actionary and Actionary Actionary Prosterious Actionary Actionary Actionary Actionary and Actionary Action

- [4] Deathers R., Columb M., McCalman M., Malary I. Vakcevic CK. On dimensioner in Protection Agency. Constraints' With American Sector 1: a proposed classification intrategy. Mutat Res 2002;321:1121–135.
 [5] Monta Y. Hayashi M., Nakaima M., Tanaka N. Tweats ID, Marikawa K. et al. Practical inters on the application of the CHS classification criteria for germ cell mutagras. Regul Tookon Pharmacel 2009;35:32–68.
 [6] Jood and Drug Administration (This: International conference on harmonisa-tion: guidance on \$22(81) generativity toxing and data interpretation. For

- pharmacroticals intended for human use; evaliability. Notice Fed Regist 2012;77:31748-9.
 [7] Spelt G. Vangaet M. Martmann A. The conset analy as an indicator test for genes of geneticating. Matter Res. 2009;78(1):5-12.
 [8] Spelt G. Bothlann A. The conset analy a structure geneticating test for the flectration of DNA damage and repairs. Methods Mod Biol 2012;72:07:79-70.
 [9] Kirsch-Wildert M. Plat G. Ebargouit A. Lukamonicat M. Gonz after 1, Vande Lucci K. K. et al. The in vitro MN analy in 2011: religin and fair, biological significance, protection, high throughputs methodologies and fair, biological relevance. Arch 100 Stenastic 5. Dev P. Micromadem, and P. Senderton. Theory Constraints. Arch 100 Stenastic 5. Dev P. Micromadem.
- Texcel 201 (28) 073-075
 [10] Samata S, Dey P, Micromachus and By applications. Diagn Cytoputhel 2012;40:84-00.
 [11] Martinez-Berges M, Herrero L, Megian D, Salvanes R, Montoya MC, Colo AC, et al. Vitelification versus slone freezing of occytes: effects on morphologic appearators, metode spladie configuration, and DNA damage. Fertil Steril 2011;59:374-7.
- 2011.192-214-T.
 [12] Gault-Raugp, B. Butfilary-Neebrcky B., Koudelka H., Bukmenka K., Burnch W., Schulter-Hermann R. In vitu detection of fragmented DNA (TUNHL anary) lade in discriminate among apoptosis. neuronia, and autohylic cell death: a cau-tionary note. Wepathiogy 1995;21:1465-8.
 [13] Bertihelot-Biccou A. Perritti, Di Giorgio C, De Mos M, Butta A. Courbiere R. Consell.

- In discriminate among apoptois, normal, and autohylic cell death: a casting processing path. Highlanding 1995;21:1425.3.
 Benthelet Alcov A, Pertin J, Di Cangti C, De Moo M, Butta A, Couthiere E. Count assay on mouse oxylet: an improved inclusing to to rodulate genotoxic trik an found error cells. Section 2011;93:1423.7.
 Aye M, Di Clanguo C, De Mito M, Botta A, Pertin J, Chushner E. Assessment of the pentomoly of store cryptoprotexians used to human occurs evide with Classica and an error cells. Section 2011;93:1423.7.
 Aye M, Di Clanguo C, De Mito M, Botta A, Pertin J, Chushner E. Assessment of the pentomoly of store cryptoprotexians used to human occurs evide with Classica and an error cells. Section 2010;94:1500-120.
 Anderna MJ, Sorgher ED, Spierr C, Divi K, Mosika T, Maathe FJ, et al. 977G international callaborative study on its vitus macrosmaleus to the bing DNO cells. Musat the 7: 2000;107:181-87.
 Anderna MJ, Sorgher ED, Spierr C, Divi K, Mosika T, Maathe FJ, et al. 977G international callaborative study on its vitus macrosmacking an mouse occytes by center assay. Fertil Seril 2011;50:1002-7.
 Berthelet-Ricca A, Frenin J, Di Giorgio C. De Meo M, Botta A, Couchiere E, Accessinett at Large-proparecial (Provid) pentitication protocols. Before vitilitation and after warning, on mouse occytes by corner assay. Fertil Storel 2011;50:1002-7.
 Berthelet-Ricca A, Frenin J, Di Giorgio CL. De Meo M, Botta A, Couchiere E, Genetoscity assessment of 112-9.
 Berthelet-Ricca A, Frenin J, Di Gater, and CL. Di Meo M. 2015;4022(13)00032-3. https://doi.org/10.1011/j.fren.2010.0013/j.piz.30013-0222(13)00032-3. https://doi.org/10.1011/j.fren.2010.0013/j.piz.30013-0222(13)00032-3. https://doi.org/10.1011/j.fren.2010.0013/j.piz.30013-0222(13)00032-3. https://doi.org/10.1011/j.fren.2010.0013/j.piz.3013-021.
 Bartan MG, Kazz-Jaffe MG, Sherban CB, Gatdeer DK. Exposure of resource cocyters to 12-2-proparecial durang slow freezing allers the p

Pour citer cet article : Berthelot-Ricou A, et al. Risque génotoxique et ovocytes : principes de toxicologie génétique et applications Gynécologie Obstétrique & Fertilite (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.gyobde.2011.07.008

ANNEXE 3 : Evaluating methods of mouse euthanasia on the oocyte quality: cervical dislocation versus isoflurane inhalation. Lab. Anim. 2012;46(2):167-9. Epub 2012 Apr 17.

Short Report

Evaluating methods of mouse euthanasia on the oocyte quality: cervical dislocation versus isoflurane inhalation

Audrey Roustan¹, Jeanne Perrin^{1,2,3}, Anaïs Berthelot-Ricou¹, Erica Lopez⁴, Alain Botta¹ and Blandine Courbiere^{1,2}

¹Biogénotoxicologie – Santé Humaine et Environnement, Aix-Marseille Université, UMR CNRS 7263 IMBE, FR CNRS 3098 ECCOREV, Faculté de Médecine, 27 Bd Jean Moulin, 13005 Marseille, France; ³AP-HM, La Conception, Pôle de Gynécologie – Obstátrique et Reproduction, 147 Bd Baille, 13005 Marseille, France; ⁵AP-HM, La Conception, CECOS – Laboratoire de Biologie de la Reproduction, 147 Bd Baille, 13005 Marseille, France; ⁶CFREMC/CEPA, UFR de Médecine, 27 Bd Jean Moulin, 13005 Marseille, France Corresponding author: A Roustan, Email: audrey.roustan@laposte.net

Abstract

Cervical dislocation is a commonly used method of mouse euthanasia. Euthanasia by isoflurane inhalation is an alternative method which allows the sacrifice of several mice at the same time with an anaesthesia, in the aim to decrease pain and animal distress. The objective of our study was to assess the impact of these two methods of euthanasia on the quality of mouse occytes. By administering gonadotropins, we induced a superovulation in CD1 female mice. Mice were randomly assigned to euthanasia with cervical dislocation and isoflurane inhalation. Oviducts were collected and excised to retrieve metaphase II occytes. After microscopic examination, occytes were classified into three groups: intact, fragmented/cleaved and artetic. Intact metaphase II occytes were employed for biomedical research. A total of 1442 occytes in the cervical dislocation group were compared with 1230 occytes in the isoflurane group. In the cervical dislocation group, 93.1% of the occytes were intact, versus 65.8% in the isoflurane group ($P \le 0.001$). In light of these results, we conclude that cervical dislocation is the best method of mouse euthanasia for obtaining intact occytes for biomedical research.

Keywords: Euthanasia, mouse, isoflurane, cervical dislocation, oocyte

Laboratory Animals 2012; 46: 167-169, DOI: 10.1258/la.2012.011115

The mouse is the most commonly used model in biomedical research, particularly for fundamental studies on gametes and embryos.^{1,2} Euthanasia of laboratory animals must be performed according to ethical standards, with trained personnel using appropriate techniques, equipment and reagents in order to induce a death as least painful and streadul as possible.³ However, the euthanasia method should not cause histological or histochemical changes that would adversely affect research results. Cervical dislocation is a conventional technique for mouse euthanasia. Instead of cervical dislocation, we wanted to test an alternative euthanasia method by isoflurane inhalation, which is an anaesthetic agent of the family of halogenated ethers, in the aim to decrease pain and distress in mice. Because our research laboratory conducted biomedical research on occytes.^{2,4} we wanted to assess the impact of these two methods of euthanasia on the quality of mouse occytes.

We used prepubescent CD1 female mice aged 4-5 works (Charles River Laboratory, L'Arbresle, France). The animals were housed in a temperature- and light-controlled room, with free access to food and water. All experimental protocols and animal handling procedures were reviewed and approved by the National Ethics Committee on Animal Experimentation (IRB: 3-4112009). On day 1, mice were injected intraperitoneally with pregnant mare serum gonadotropin (101U/100 µL) (Sigma-Aldrich, St Fallavier, France) to induce superovulation. On day 3, ovulation was triggered by adding an intraperitoneal injection of human chorionic gonadotropin (10 IU/100 µL) (Sigma-Aldrich). Sixteen hours after human chorionic gonadotropin, mice were euthanized. Two methods of euthanasia were tested, each condition was replicated six times on two groups of 16 mice: (1) cervical dislocation that causes a sharp section of the spinal cord followed by an instantaneous cardiac arrest, and (2) inhalation of a lethal dose of isoflurane (concontration of 5%) in a closed chamber, which causes death in less than 60 s after a depression of the central nervous system and the respiratory system. Isoflurane was delivered from an Isotec 3 vaporizer (Ohmeda, Steeton, West Yorkshire, UK), with O2 as a carrier. Mice were dissected immediately after euthanasia to collect oviducts. Oviducts were dissected into M2 medium (Sigma-Aldrich). Intact cumulus masses

Laboratory Animals 2012; 48: 167-109



Figure 1 Morphological examination of different types of occytes under a binocular microscope: (a) Intact occyte; (b) deaved occyte; and (c) athetic occyte. Scale bar, 100 µm. Final magnification ×500

were released from excised oviducts and incubated with hyaluronidase (10 mg/mL). A morphological examination under a binocular microscope (×200) was blindly conducted to assess occyte quality: appearance of the cytoplasm, intact occytes, fragmented/cleaved occytes and atretic occytes were scored (Figure 1). Statistical differences between the two methods of euthanasia were determined using the χ^2 test. The test was considered positive and statistically significant when P < 0.05. Intact metaphase II occytes were then used for biomedical research on the occyte.²

During the mouse dissection, oviduct dissection and cumulus masses removal were easier in the cervical dislocation group. Indeed, the different anatomical structures were easily individualized. In the isoflurane group, the uterine horns and ovaries were the site of microhaemorthages by vasodilation, which perturbed the oocytes removal in the oviducts. A total of 1442 oocytes in the cervical dislocation group was examined and compared with 1230 oocytes in the isoflurane group. In the cervical dislocation group, 93.1% (n = 1342) of the oocytes were intact, versus 63.7% (n = 809) in the isoflurane group ($P \le 0.001$). The number of fragmented, cleaved and attric oocytes was significantly higher in the isoflurane group (100 versus 421 altered oocytes, $P \le 0.001$).

The mouse is the most commonly used model in biomedical research. Different methods are used for euthanasia." The use of inhalation anaesthetic agents, like isoflurane, is justified by the ease of the protocol, the relative safety of the procedure, the capacity to sacrifice larger numbers of animals at the same time with an anaesthesia, by requiring a minimum of handling of animals.^{6,7} Staff safety is ensured by the use of gas scavenging units, as recommended by the European Commission recommendations for euthanasia." Cervical dislocation is another technique commonly used for euthanasia of mice. Realized by trained personnel, this method offers many advantages. Neither specific equipment is required; it is safe, painless and non-aversive like gas. However, the main drawback of this technique is the inability to euthanize many animals simultaneously, which may be a prerequisite for conducting studies with larger cohorts." Moreover, the realization of cervical dislocation requires a learning curve to induce as less painful and stressful a death as possible. Isoflurane inhalation appears to be an alternative method of euthanasia compared with cervical dislocation. The National Center for Scientific Research in France considers isoflurane inhalation

to be the most appropriate method of euthanasia for rodents. To our knowledge, our study is the first to compare these two methods of mouse euthanasia on the oocyte quality. Many parameters can affect the quality of oviduct collection as well as the morphology and viability of oocytes. We have observed that euthanasia with isoflurane had a negative impact on occyte quality. The occurrence of microhaemorrhagic events into the surrounding tissues hindered the collection of oocytes in the oviducts. In addition, the oocyte morphology was significantly altered in the group using isoflurane euthanasia, with only 65.7% intact occytes. The exact mechanism of action of isoflurane is still unclear. Absorbed mainly by inhalation, isoflurane is distributed throughout the body via blood. It induced a loss of consciousness by a disturbance of neurotransmission (reversible changes in the neuronal membrane) and caused a dose-dependent depression of respiratory and cardiovascular centres." The consequences of isoflurane on the reproductive system is unknown. Ceyhan et al.10 reported that exposure to isoflurane in rabbits had negative effects on spermatogenesis and sperm morphology. Conversely, to our knowledge, no study in the literature has investigated the impact of this anaesthetic on the oogenesis

A good quality of occytes is the key step of any biomedical research on gametes and embryos. In conclusion of this study, we have observed that mouse euthanasia by cervical dislocation was the best method to obtain intact occytes in comparison with isoflurane inhalation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Michel Skandalovski and Jean-Marc Feuerstein for their precious technical assistance.

Disclaimers: The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- 1 Kulandavelu S, Qu D, Sunn N, et al. Embryonic and neonatal phenotyping of genetically engineered mice. ILAR J 200647: 103–17
- 2 Berthelet-Ricou A, Perrin J, Di Giorgio C, De Mess M, Botta A, Gourbiere B. Cornet assay on mouse occytes: an improved technique to evaluate genotoxic risk on female germ cells. *Tertil Steril* 2011;95: 1452–7.
- 3 Donesan J, Brown P. Eathanasia. Corr Protoc Immunol 2006;1:1-8

ANNEXE 4 : Poster ESHRE 2013

Genotoxicity assessment of three vitrification protocols by comet assay on mouse oocytes.



Anaïs BERTHELOT-RICOU^{1,2}, Jeanne PERRIN^{1,3}, Audrey ROUSTAN¹, Carole DI GIORGIO⁴, Michel DE MEO⁴, Alain BOTTA¹, Blandine COURBIERE^{1,5*}.



¹ Austral (Melliamanian de Biodherstein et al Europie (MEE), MAR CNED/(MELED, Europie Biogenstance)enge, Samt Humaine & 18 CME 2001 (2001), Faculté de Marinette de Donastein (Neu Australie, Neuro-Hu, Neuro-Hu, Humaine, Korona, 1900 de Orden Conject Construinte, CAU de la Marinet, Nie CME, Outerstein, MAR Biolog, Europie, Nator Donas, De de la Marinet, France, 1900 de Orden Conject Construinte de la Marinette, MA-Marinette, Marinette, Marinette, Marinette, Marinette, 1900 de Construinte et la Marinette de la Marinette, MA-Marinette, Natoriel, Decemption, 1971 de Bales, Ergette Marinette, 1900 de Construinte et la Marinette de la Marinette, MA-Marinette, Natoriel, 1900 de Construinte et la Marinette de la Marinette, Natoriel, 1900 de Construinte et la Marinette, Natoriel, Natoriel, 1900 de Construinte et Marinette, Natoriel, Construinte, 1971 de Bales, Ergette Marinette 1900 de Construinte et Marinette, Natoriel, Construinte, 1971 de Bales, Ergette Marinette 1900 de Construinte et Marinette de la Marinette, Natoriel, 1900 de Construinte et Marinette, Natoriel, Natoriel, 1900 de Construinte et Marinette, Natoriel, Natoriel, 1900 de Construinte et Marinette, Natoriel, Natoriel, 1900 de Construinte et Marinette Austruinte, 1990 de Construinte, 1990 de Construinte, 1900 de Construinte et Marinette, Natoriel, Natoriel, 1900 de Construinte, Marinette, 1990 de Construinte, 1990 de Construinte



tid of that 30

Introduction

Since 1999, oocyte vitrification has led to several hundred live births with reassaring obstetrical and perinatal outcomes. The main problem taised by vitrification is the possible toxic effects, such as DNA damage, because of the use of high concentrations of intracellular cryoprotectants. DNA damage in germ cells, may promote genoto events, which can lead to chromosome abnormality which can be transmitted to the progeny. In previous studies, our team assessed the genotoxic effect of three cryoprotectants widely used in vitrification: dimethyl sulfaxide (DMSO), whylene glycol (EG) and propylene glycol (PyOH). In vitro exposure to PrOH at high concentrations

(7.5% and 15%) induced significant DNA damage in somatic cells (1) and on mature mouse bocyte whatever the duration of exposure (2). The aim of the present study was to assess the genotoxic effects of three occyte vitrification protocols used in ART, by corner assay (3) on mature mouse occytes. DNA damage was first evaluated by corner assay after exposure of the occytes to the three different equilibration and vitrification solutions. Secondly, corner assay was arformed following the full vitrification and warming precedure and then compared with control groups.

Materials & methods

3. Main Outcome Measures

Resultats -

1. Oocyte exposure to vitrification protocols

id to 3 commentatized human occyse venification late : The conint usual adapted to musue was conducted for each pro

On mediative control docvin emote internel in mediam culture only).

memory in Mth methors.

- kits 1 and 2 containing DWSO + E0 kit 3 containing EB + PyOH
- For each kit, we applied the manufacturer's protocal designed for human oucytes.

2. Alkaline comet assay on mouse oocytes

net analy is a simple and short test of genotoscity, which allows the detection of pr DNA damage in single cets. Cell membranes are lysed, protein bonds are split and the DNA is unwoord at alkalize pH. During a thort period of electrophenois, broken straints of DNA are drown out and a cell with damaged DNA gives the approximite of a "consit" The head (figure 1A) of the const contains undersignil ONA, which does not manufe with electrophysesis in the specific experimental conditions, and the sumet tail contains damaged DNA pieces which regione beety (figure 18)

DNA damage was quantified in Olive tail moment (UTM). Statistical analysis consided of a Shapiro-Wilk

Terit: Then, protocol OTM medium was isompared to the negative control group using the Mann-Willney U test. The difference was considered statistically significant if the p value was <0.0%.



Immediately at the end of exposure of the occytes to the vitrification solution (less than 1 minute) 2: After usight vitrification and warning procedure, or intact mutaphase (i locytes at the end of the)

num exposed to indirusio perceide 04.C.1

Eigare I Example of means except DNA aspect after connect uppay and Propolitem rodule stationing. A seguitive control intact DNA (E: Admint), D, expansive (250),M, Simitations at 4°C). Broken DNA



ANNEXE 5 : Poster ESHRE 2011



a bland (Charterbourne), Strength (1997), (1997) Inter-Works & Parriel A. 20 Values D. Da Max. M. Smith S. Cardinero B. Development of a in S. Sectorand W. Nuclei V. Nuclei I. Heather S. Start J. Starting and M. Start, and A. S. Sectorand J. S. Sectorand J. S. Sectorand J. Sectoral Science S unitation an internet including to some and particular provincing. Participant, 2011;38:18(5);7 pt. (ed. pri algorithment (hered normal) plants to the square static set is gamman manifulation, Mar. Nameanity, 1922;200:103-014. - Surati This study was supported by a grant from the Agoince de la Basminteoine. Fin

ANNEXE 6 : Poster Congrès EDSE 2013



ANNEXE 7 : Poster FFER 2012

Etude du risque génotoxique des protocoles de vitrification ovocytaire par test des comètes sur ovocytes de souris.



Anais BERTHELOT-RICOU^{1,2}, Jeanne PERRIN^{1,3}, Audrey ROUSTAN^{4,3}, Carole DI GIORGIO⁴, Michel DE MEO⁴, Alain BOTTA¹, Blandine COURBIERE^{1,5}.

ni de Brahande al l'Europe (688), UNI CARLTRE PELLI, Europe Ba

E EDDOREY, Paulat de Relation de Alderende Alte Mensie, Manade, Manade, es es Generange Daverages, ON/ de Parises, De DEC, note de Daverage VIII Des Deves, la se la Relation COL - Laboration de Daverage de la Republication de réd La Companyo, 14 (19 de Sala, 1998) Barrado de Europées de Restaurba et d'Envelgement des Educationes de l'Entretonnement (CERFER), URIE (2005) Esta Sala ¹ Partial Understates in Distinct the el ("Design (2007), Laboration in Maingerson el Tamologie MDE, Paralis in Planetaria in Università d'Ale Marcelle, Marcelle, ¹ Para in Designi Constrainte el Planetario, el Plan. Marcelle, ¹ Para de Designi (1), ¹ Planetaria and estate d'an Are 5.

hitl Children ECCOREV 27

Introduction -

La vitification des procytes est devenue en une dazine d'annee une technique de reutive en biscoge de la réproduction, auec natisance de paueuxes centeres d'antients dans le monte. La vitification est un processua physique qui permet - grâce à l'utilization de crysponecteurs à haute concentration - de prèger les solutions aqueuses dans un étal antiès et annaphe du « vitieux », exitant aine toute formation de prese pouvent être destitions pour les cetures.

arranged on a version a, trainer area take torreador en unavara la pace possient erro deserves pour es censes. Dens un travel pretermans, notre equipe avait étudit la générolade ous propriécieurs sur un lignet cellulaire CHO, et reup avant étudit de l'ADN requires que la 12 programment (MONI (1). Des resums de l'ADN avant ensuite eté disservées dans ancientes possient au PROV à taute innomination (2, 1). L'objectif de ce traval a été d'étudier, grâce au lesé des condées sur evocytes de sourts, les risques génotosiques de linus protocoles de vérification. (1) immédia exposition des evocytes aux solutions d'équilitation et de vitrification; (2) Après vitrification, réchautement, et réhydratation des evocytes. nt aprete

Matériels et méthodes -

1 Exposition des ovocytes aux protocoles de vitrification

Les procytes matures and elle othersal apres sopersycabori chez des sourie CD1. Tros groupes de 40 ovocytes ont elle exposes tros fue fue secon les recommanizations des taxinants a tros elle ae vitilitation commentative i Protocole 1 (P1): directlytudioxide (DSMO) + ethylene (book (EG)) Protocole 3 (P2): DMBO + EG Protocole 3 (P3): PrOH + EG

2. Test des comètes sur ovocytes de souris

Le test des ponders a été naiste à 3 reprises sur trois groupes de 40 précentes de soutre (5) immédiatement quine exposition des nonches aux sealutions de vitification. (2) Après Vertification, rechardlement, intégratation, incluier et troisabilités pendant 3 h à 37 °C. Les originales and haus été vitifiée en spatiene terme Crystight (invine Scientificht Unit 31, Version). W-Harvett

Le groupe Témpies négatite (T fileg) étamoi (1) pour l'étude des divergites espasés aux anudirms de référantes, un provan de 40 concepts manterios à 1° ambiente cares du môteu M2, (2) pour l'étude des projectes après vitification et rechautement, un proupe de 40 ovocytes maintenus 8.37 C dans du relieur M1.

La groupe Témpine positife (T Pos) étail constitué par 40 évocytes exposés svoie event la realisation du test des constex, A du Perceyde d'Hydrogène (H₂O₂) durant Smit a 410 dans Resultats

-> Le test des constites (2) a pour but de détecter et quantifier les leccon primaires de l'ADN d'une cellue tridividualisée

to A Train

- PRICE

L'ADN line appareil sous la forme de convites duri la parte distaie est proportionnile au reindre de calaures de três L'interpretation de ce foit est quantitative préce au logicie Kanvel K.B. L'Olive Tal Maneré (OTM) est défei communa les pe iduit au pourcerilage d'ADN Hgarit dans la sumue de la camete par la distance antre les hanycentins de la liffe et de la sueue de la nométe



Figure 1 Report in (ADS) overclaim active test line constitut et constant A function to Progetium A. Tarono regul 9. Terresti overclaim active activity activity (C), a 2004dl. 5 oriendes A V C.



Figure 2: Off 1.00



I. Test de cométes apres vitrification, rechauffement et réhystratation Apres vitification des ovorpries de locare avec les précordes 1 et 2, ecus il avons pas cesarve de lesbre statistiquement significatives de l'ADN par report av

1 Test de constitus avant vibrilication

A reporter and an Arra d'application of differences and and a second and a rate of an OARS, has set total to stars again the star Arch of the second as these

ingener Galerier Galerier is composite de Prote et 60 entre des maines primateur d'Able de facer statistiquement opprituides par lapport se prespir timen registr

prope lensos repaint, tende que la vibrification evec la protocola 2 a indust des lestona significatives de l'ADN por spent as youge birtuit regalf

		0754	20%	1995	T	1.00	value p.*
Preninte	perte	Trail due out	within her	the address	man data	erec place	the according store
automa.	49.98	- Buaine					
T Feng	- 24	8.018	3.042	A MAT .			
100	74.	8.810	8.370	1.008	4522.507	102.000	-5.001
100	100	7.780	2.940	220.000	2730.505	1205-508	10.074
1.000	100-1	13,075	6.000	22 7 28	anes not	875.455	10.001
Deusidana	partie	s: Taid dies to	million op	nika witerili	icuthisis, 16	(has find	and, all
digitization	dana da	en investighes i	te source				
7 7 mg	24.	5.425	2,550	10.415			
1000	1.65	7.230	2.810	14.240	4527 (01)	2124.365	10.241
100	28.	5.795	3.125	10.200	1005.000	\$75,000	D-ATS.
100	42	3.830	4.000	24,785	3427,248	3224.305	10.0452
fact du Th	-	4 de Strapho-F	10.00	south profits	080		
T Neg Ne	-	quit, sources	a al TT anto	traction day	a bi hika	1962	
* automation	-	manufacture must	adding.	(ALCON	elisis ad with	Road and inte	and produced in
123							
1.2.3 • oktion	ban, 19	informat.	1000		And in case	- margine	4.0712
1.2.3 ** obtical peridant 3		-		-	And in the	-	1012
1,2,5 ¹⁰ októwi pescheri († 1 Teol de	1	and the second		in airin	distant das		a 87%.
n oktion perchant (h		anana U.S		1 págrafia			+ 87% (+0.35
1,2,3 ** októwa pestant 3 * Tawi de	there are	Alterna U.S.		n nigrafika	and a state		4 875 (+0.3)
1.2.5 * obtical perchant 3 * Table 49 * Table 49	them on P	ana ua		1 1			4.875 4-0.35
Tables	them on the	Analyse state				1 of 101	a BTE a+0.35
12.5 * obticat perchant 3 * Tables Tables	there are	Andreas U.D.	et stade	ten er inn 1 signifika		1 of April 1	a BTE a=0.31

Conclusion -

Nos résultata montrent aur modèle sourls l'absence d'effet génotoais nous avoirs observe des itsions de l'ADN des ovocytes de sourls in que ce soit avant et après vitrification. L'extrapolation à l'ovocyte hu stentigue à cetui de la femme, mais pourrait nous conduirs à prétére Ification utilisant du DMSO et de FEO. En revanche el employé seul [7] ou en association avec de FSO, le car FADH de l'ovocyte de sourts n'est pas e de vitrification sante PFOH.

Références

12 An IX 20 Graph C 24 Min W, Bolds A, Frem J, Dantines B. Assessment of the products of these synamication scentering used for honor security clicitation about 2014 AV 2021 ne, whyte-te gives and propolete giptil. Point Direct Test a.A. Perce J. D. Gauger, C. Sa Han M. Shita, A. Curtowe B. Cored assess increase ancient antisense increase angles and provide the providence of the prov

ANNEXE 8 : Poster 1 FFER 2010



ANNEXE 9: Poster 2 FFER 2010



INTRODUCTION

En toxicologie généfique, le test des comètes est réalisé sur de nombreux types de cellules somatiques pour évaluer la génotoxicité d'agents physiques ou chimiques potentiellement carcinogènes⁵. Le test des comètes est un test simple et rapide, qui évalue à partir d'une cellule eucaryote, les lésions primaires de l'ADN provoquées par un agent génotoxique. Ce test repose sur l'étude de la migration des fragments d'ADN lésés per électrophorése. Au microscope, les noyaux intacts apparaissent sous la forme d'une sphère. Les noyaux lésés prennent Faspect d'une comète dont la queue est constituée des fragments cassés d'ADN ayant migrés².

MATERIELS ET METHODES



Nous avons utilisé des ovocytes matures de souris CD1; Dans un premier temps nous avons évalué l'impact de la zone pellucide (ZP) sur la migration des fragments d'ADN par exposition d'ovocytes non dépellucidés (ZP+) et dépellucidés (ZP-) à une agent génotoxique en comparaison à un témoin négatif. Dans un second temps 3 groupes d'ovocytes matures (n=40) décoronisés non dépellucidés ont été exposés à 3 reprises à 3 types d'agents génotoxiques bien connus pour les cellules somatiques: le rayonnement solaire artificiel (RSA), le methylmethanesulfonate (MMS), et le peroxyde d'hydrogène (H2O2). L'exposition à ces trois agents a été comparée avec un groupe d'ovocytes témoin négatif (milieu de culture M2)

Le test des comètes adapté à l'ovocyte a été appliqué à ces quatre groupes d'ovocytes. L'analyse des images obtenues par microscopie à fluorescence à été effectuée à l'aide d'un logiciel validé (KOMET 5.5, Nottingham, UK).

Les lésions de l'ADN ont été quantifiées par un paramètre appelé «Olive Tail Moment»

OTM = % ADN dans la queue x distance entre les barycentres (unités arbitraires)

L'interprétation des résultats était donnée par l'OTMx². Le test était considéré comme positif quand une exposition à un agent induisait une augmentation significative de l'OTMx2 en comparaison avec celui obtenu pour les ovocytes du groupe témoin avec un p<0.0013.



Le Test des comètes a été réalisée sur ovocytes non dépellucidés (ZP+) Un faible niveau de lésions d'ADN spontanées a été observé dans le groupe témoin. RSA, MMS et H₂O₂ ont entraîné une augmentation significative des lésions de l'ADN en comparaison avec celles retrouvées dans le groupe témoin négatif (p<0.001***) Les valeurs d'OTMy² obtenues après analyse statistique étai



CONCLUSION

RESULTATS

Le test des comètes sur ovocytes de souris non dépellucidés est un test simple et rapide pour étudier la survenue de lésions primaires de l'ADN sur les cellules germinales féminines. Cette technique pourrait être utile dans le domaine de la recherche en reprotoxicologie, par exemple pour l'étude de la génotoxicité directe de certains agents utilisés en AMP comme les milieux de culture ou les cryoprotecteurs, ou pour l'évaluation de la génotoxicité indirecte des polluants environnementaux (ex : hydrocarbures aromatiques polycycliques de la fumée de cigarette ou des partícules diesels), ou encore pour étudier l'efficacité de molécules antioxydantes sur l'ovocyte.

BIBLIOGRAPHIE

Spell G at al. The const assay as an indicator test for germ cell generotocicly. Mulditors Research Revears in Mutation Research 2019;88:13-12.
 Horvethous E et al. DNA served in spear measured in other and generotic regions using the conset away with Reveauced in Information. Mutageneeus 2004;18:289-276.

3. Baser E et al. The statistical of the fail investers in single cell gal electrophonesis (correct escap) obeys a (h)-separer (rh/2) red a genesien statisticales. Modeline, Mesaerzh 1988;305 (01, 110)

Projet réalisé avec le soutien financier de l'Agence de la Biomédecine