

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



Université Djilali Liabes Sidi Bel Abbès
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de Biologie

Thèse de Doctorat en sciences

Présenté par : Mme Ouafia LIAMANI LABGA

Spécialité : Sciences biologiques

Option : Biologie de la reproduction et du développement

THEME

***Exploration de l'infertilité masculine à l'ouest
Algérien, à l'aide des techniques de FISH et TUNEL***

Soutenu le

Devant le jury composé de :

Président :	Mr TOU .A	Professeur	UDL Sidi Bel Abbès
Examineur :	Mr SAHRAOUI .T	Professeur	Université d'Oran2
Examineur :	Mr SLIMANI .M	Professeur	Université de Saida
Examineur :	Mme BENDAHMENE M.	Professeur	UDL Sidi Bel Abbès
Examineur :	Mr ARIBI M.	Professeur	Université de Tlemcen
Directeur de thèse :	Mme MOULESSEHOUL .S	Professeur	UDL Sidi Bel Abbès

Année universitaire : 2017 – 2018

Résumé

Aujourd'hui, dans les pays industrialisés, environ 15% des couples sont confrontés à des problèmes d'infertilité, dans 1/3 des cas, l'étiologie est masculine. La production de gamètes chromosomiquement déséquilibrés issus de la ségrégation méiotique particulière à chaque anomalie ainsi que la fragmentation d'ADN pourraient expliquer, en partie, l'infertilité de ces hommes.

L'exploration de l'infertilité masculine reste avant tout basée sur l'analyse classique des paramètres du sperme. Néanmoins, d'autres techniques visant à évaluer l'équipement chromosomique et l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes, viennent aujourd'hui la compléter.

Notre travail consiste à étudier, par la technique FISH (Fluorescent in situ Hybridization) pour les chromosomes 13, 18, 21, X et Y, l'analyse du taux d'aneuploïdie des gamètes de 12 hommes infertiles qui ont été soumis à un examen spermatique, ainsi que le taux de fragmentation de l'ADN spermatique par la méthode TUNEL (Terminal Uridine Nick-end Labeling).

L'analyse du taux d'aneuploïdie dans les spermatozoïdes montre un taux moyen de 11,78% et qui est significativement plus élevé par rapport au groupe témoin. Par ailleurs le taux de fragmentation de l'ADN spermatique est compris entre 3,9% et 16,1% avec une valeur moyenne de 10,53% et qui reste significativement supérieur à celui du groupe témoin.

L'étude de la ségrégation méiotique par la technique FISH et celle de la fragmentation de l'ADN par la méthode de TUNEL semblent se compléter dans l'exploration de l'infertilité masculine. Elles permettent notamment un meilleur choix des techniques mises en œuvre dans l'aide à la procréation médicale.

Mots clés: Oligoasthénospermie, aneuploïdies, FISH, fragmentation de l'ADN, TUNEL.

Summary

Today, in industrialized countries, about 15% of couples are confronted with infertility problems, in 1/3 of cases, the etiology is masculine. The production of chromosomally unbalanced gametes resulting from the meiotic segregation peculiar to each anomaly as well as the fragmentation of DNA could explain, in part, the infertility of these men.

The exploration of male infertility remains primarily based on the classical analysis of sperm parameters. Nevertheless, other techniques aimed at evaluating the chromosomal equipment and the integrity of the spermatozoa DNA, come today to complete it.

Our work consists in studying, by the technique FISH (Fluorescent in situ Hybridization) for the chromosomes 13, 18, 21, X and Y, the analysis of the aneuploidy rate of the gametes of 12 infertile men who were subjected to an examination sperm, as well as the rate of fragmentation of sperm DNA by the TUNEL method (Terminal Uridine Nick-end Labeling).

The analysis of the aneuploidy rate in spermatozoa shows an average rate of 11.78% and is significantly higher compared to the control group. In addition, the fragmentation rate of the sperm DNA is between 3.9% and 16.1% with an average value of 10.53% and which remains significantly higher than that of the control group.

The study of meiotic segregation by the FISH technique and that of DNA fragmentation by the TUNEL method seem to complement each other in the exploration of male infertility. They allow in particular a better choice of the techniques implemented in the aid to the medical procreation.

Key words: Oligoasthenoteratozoospermia, aneuploidies, FISH, DNA fragmentation, TUNEL.

ملخص

اليوم، في البلدان الصناعية، يواجه حوالي 15٪ من الأزواج مشاكل العقم، في 3/1 من الحالات، المسبب هو الذكر. إنتاج الأمشاج غير متوازق صبغيا و تجزئة DNA يمكن أن يفسر، جزئيا، عقم هؤلاء الرجال.

ويستند استكشاف العقم عند الذكور في المقام الأول على التحليل الكلاسيكي للسائل المنوي. بالإضافة إلى تقنيات تعتمد على تقييم التجهيز الصبغي و نوعية ADN الحيوانات المنوية، التي تأتي اليوم لتكميل طرق الاستكشاف. عملنا هو دراسة، من خلال FISH (Fluorescent in situ Hybridization) للصبغيات 13، 18، 21، X و Y، وتحليل معدل عدم توازن الصبغيات في الأمشاج 12 رجلا يعانون من العقم و الذين فحصت حيواناتهم المنوية، وكذلك معدل تجزئة الحمض النووي للحيوانات المنوية بواسطة طريقة (Terminal Uridine Nick-end) TUNEL (Labeling).

تحليل عدم توازن الصبغيات في الحيوانات المنوية يظهر متوسط قدره 11.78٪ وهو أعلى بكثير بالمقارنة مع مجموعة الشواهد. وبالإضافة إلى ذلك، فإن معدل تجزئة الحمض النووي للحيوانات المنوية ما بين 3.9٪ و 16.1٪ مع متوسط قيمته 10.53٪ والتي لا تعتبر أعلى بكثير من مجموعة الشواهد.

دراسة العزل ميوزي بواسطة تقنية FISH وتجزئة الحمض النووي بواسطة طريقة TUNEL يبدو أنه كل منهما يكمل الآخر في استكشاف العقم عند الذكور. و أن هتين التقنيتين تسمح على وجه الخصوص باختيار أفضل تقنية للمساعدة على الإنجاب الطبي.

الكلمات المفتاحية : Oligoasthenoteratozoospermie، عدم توازن الصبغيات، FISH، تجزئة DNA، TUNEL.

I.2.1 Spermogramme.....	66
I.2.2 Spermocytogramme.....	70
I.2.3 Cytogénétique moléculaire	71
a) Types de sondes d'ADN utilisés.....	71
b) L'hybridation <i>in situ</i> fluorescence (FISH) sur spermatozoïdes.....	71
I.2.4 Technique de fragmentation	74
II. Résultats	75
II.1 Spermogramme et Spermocytogramme	75
II.2 Etude de la ségrégation méiotique.....	76
II.3 Etude de la fragmentation de l'ADN.....	82
III. Discussion Générale.....	85
Conclusion	91

Références Bibliographiques

Annexes

Liste des Abréviations

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique
AMP : Aide Médicale à la Procréation
AO : Acridine orange
ARN : Acide RiboNucléique
BAC : Bacterial Artificial Chromosomes
CEP : Chromosome Enumeration Probe
CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CGH : Comparative Genomic Hybridization
DAPI : 4'-6-DiAmidino-2-PhenylIndol
der : dérivé
DFI : DNA Fragmentation Index
DPC : Diagnostic préconceptionnel
DPI : Diagnostic PréImplantatoire
dUTP : DeoxyUridine Triphosphate
FISH: Fluorescent in situ Hybridization
FIV : Fécondation in vitro
FUdR : 5-Fluoro-2'-deoxyUridine
GTE : Glucose Tris EDTA
HAS : Haute Autorité de Santé
IA : Insémination Artificielle
IAC : Insémination Artificielle avec sperme du conjoint
IAD : Insémination Artificielle avec sperme du donneur
IAM : Index d'anomalies multiples
ICSI : IntraCytoplasmic Sperm Injection
IIU : Insémination Intra-Utérine
IMSI : Intracytoplasmic Morphologically selected Sperm Injection
IP: Iodure de propidium
ISIS : in situ Imaging System
LSI : Locus Specific Identifier
MGG : May-Grünwald-Giemsa
MSOME: Motile sperm organellar morphology examination
NP40 : Nonidet P40
NT : in situ Nick Translation assay

OAT: oligoasthénoteratospermie
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PBS : Phosphate Buffered Saline
PCP : Partial Chromosome Paint
PCR : Polymerase Chain Reaction
PNA : Peptide Nucleic Acids
PRINS : Primed in situ labeling
PRM1 : Protamine de type 1
PRM2 : Protamine de type 2
PS : PhosphatidylSerine
Safec: Société algérienne de fertilité et de contraception
SCD : Sperm Chromatin Dispersion test
SCGE : Single Cell Gel Electrophoresis
SCSA : Sperm Chromatin Structure Assay
SDS : Sodium DodecylSulfate
SOR : Substances Oxygénées Réactives
SPZ : Spermatozoïde
SRY : Sex-determining Region of Y chromosome
SSC : Sodium Saline Citrate
TdT : Terminal deoxynucleotidyl Transferase
TNP1 : Transition Nuclear Protein 1
TNP2 : Transition Nuclear Protein 2
TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling assay
WCP : Whole Chromosome Paint
WHO : World Health Organization

Introduction

Introduction

Depuis toujours, les hommes ont été confrontés aux problèmes de reproduction, toutefois, la demande des couples et les possibilités thérapeutiques offertes n'ont fait que s'accroître au fil du temps. Le pourcentage des couples concernés par des problèmes d'infertilité est estimé à environ 15% et dans 1/3 des cas elle se révèle être d'origine masculine (Martin, 2008). Selon les statistiques du ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme hospitalière, l'Algérie compte plus de 300.000 couples souffrant d'infertilité, soit 15 % des couples (Hamdi, 2013).

La production de gamètes présentant des aneuploidies issus de la ségrégation méiotique particulière à chaque anomalie pourrait expliquer, en partie, l'infertilité chez l'homme.

L'exploration de l'infertilité masculine reste avant tout basée sur l'analyse classique des paramètres du sperme. Néanmoins, d'autres techniques visant à évaluer l'équipement chromosomique et l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes, viennent aujourd'hui la compléter (Fellous et Siffroi, 2003 ; Guérin et Benchaib ; 2004).

Dans la littérature, un grand nombre d'étude ont rapporté un taux élevé d'aneuploidie dans le sperme d'hommes infertiles (Rubio et al., 2001 ; Calegero et al., 2003 ; Burello et al., 2003 ; Minz et al., 2005 ; Kumtepe et al., 2009 ; Pylyp et al., 2013 ; Borini et al., 2016). Ces aneuploidies résultent le plus souvent d'une anomalie de la ségrégation des chromosomes au cours de la méiose. Elles ont pour conséquence des fausses couches spontanées plus ou moins précoces chez la femme, des malformations, des retards psychomoteurs et une infertilité masculine chez le fœtus. Une anomalie chromosomique constitutionnelle peut altérer la spermatogenèse par action spécifique sur la méiose ou sur la différenciation des cellules germinales. L'étude cytogénétique moléculaire par hybridation in situ en fluorescence (FISH) des spermatozoïdes permet d'évaluer le taux de gamètes déséquilibrés, de réaliser un conseil génétique adéquat et de proposer une prise en charge optimale aux hommes infertiles (De Braekeleer et al., 1991 ; De Braekeleer et al., 2006) .

De multiples études portant sur l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes ont été menées, elles ont notamment pu mettre en évidence un taux d'ADN fragmenté plus élevé dans les spermatozoïdes d'hommes infertiles (McPherson et Longo, 1993 ; Sakkas et al., 2002 ;

Brugnon et al., 2006, Tavalae et al., 2009, Mehdi et al., 2009, Brahem et al., 2012, Perrin et al., 2013).

La fragmentation de l'ADN est une des conséquences de l'apoptose, et les taux plus élevés de spermatozoïdes avec ADN fragmenté observés chez les patients infertiles, pourraient donc être le reflet d'un dérèglement apoptotique et expliquer ainsi l'infertilité de ces hommes (Koykul et al., 2000 ; Eaker et al., 2001). Cependant, l'apoptose ne semble pas être l'origine unique de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes (Ozmen et al., 2007).

Ainsi, la ségrégation méiotique spécifique et la fragmentation élevée de l'ADN des spermatozoïdes sont deux hypothèses pouvant expliquer l'infertilité masculine. Une question se pose alors : ces deux phénomènes sont-ils complémentaires?

Dans cette étude, nous avons essayé d'analyser par la technique d'hybridation in situ fluorescente, le taux d'aneuploïdie dans les spermatozoïdes des hommes infertiles ayant les paramètres spermatiques anormaux (oligoasthénospermie), et d'étudier l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes par la technique TUNEL (Terminal Uridine Nick-End).

*Partie 1 : Revue
Bibliographique*

IV. L'infertilité masculine et son exploration :

On parle de fécondité lorsque l'individu a conçu. Le contraire est, qu'elle soit volontaire ou involontaire. Un individu fertile est un individu apte à concevoir. On parle d'infertilité lorsqu'un couple reste sans enfant après deux ans de rapports complets, de fréquence suffisamment rapprochée et sans contraception d'aucune sorte. L'infertilité est toujours involontaire. Une stérilité est dite « primaire » lorsqu'il n'y a jamais eu de grossesse. Dans le monde, il est actuellement admis que 15 à 20 % des couples consulteront à un moment donné pour une difficulté à concevoir. Parmi ces couples, 2/3 obtiendront une grossesse alors que l'autre tiers ne pourra pas réaliser son projet parental par la médicalisation (HAS 2006). Dans l'espèce humaine, la fécondabilité, c'est-à-dire la probabilité de concevoir à chaque cycle menstruel, est en moyenne de 25 % par cycle. On connaît actuellement le pourcentage cumulatif de grossesse à l'échelon d'une population en fonction du temps d'exposition. Ainsi, 10 % des couples qui concevront spontanément attendront 18 mois et à 2 ans, 90 % des couples auront conçu. (Item 29, 2011). Quant à la notion de stérilité (incapacité totale et définitive à procréer), elle a largement évolué ces dernières années. Par exemple, les hommes azoospermes étaient considérés comme stériles jusqu'à l'apparition de méthodes de fécondation comme l'injection intracytoplasmique de spermatozoïdes intratesticulaires ou intraépididymaires (Perrin A., 2009).

Globalement, la cause de l'infertilité est : d'origine féminine dans environ 30 % des cas, d'origine masculine dans environ 20 % des cas, d'origine mixte dans environ 40 % des cas. La stérilité reste inexplicée dans un peu moins de 10 % des cas (Item 29, 2011).

Les facteurs masculins d'infertilité comprennent principalement des altérations quantitatives et/ou qualitatives du sperme.

I.1- Principales étiologies :

Les étiologies peuvent être pré-testiculaires, testiculaires ou post-testiculaires. Mais l'infertilité masculine peut également être inexplicée, elle est alors dite idiopathique.

En ce qui concerne les étiologies pré-testiculaires, Elles sont très rares. Ces troubles endocriniens touchent l'axe hypothalamo-hypophysotesticulaire (ex : hypogonadisme : dysfonctionnement des gonades) (Salenave et al., 2012 ; Young, 2012 ; Boehm et al., 2015).

Par ailleurs, les étiologies testiculaires sont les plus fréquentes. Les signes cliniques, l'analyse du sperme, le caryotype, les études géniques et/ou la biopsie testiculaire peuvent permettre d'établir le diagnostic.

L'anomalie concerne le testicule et se caractérise par une diminution de la production de spermatozoïdes. Cette altération quantitative de la spermatogenèse se traduit par une azoospermie ou une oligozoospermie. A ces anomalies de numération peuvent être associées des anomalies de la mobilité (asthénospermie), de la morphologie (téatospermie) et du pouvoir fécondant des spermatozoïdes. L'origine testiculaire de l'infertilité peut être en rapport avec des anomalies génétiques (White et al., 2007).

La spermatogenèse peut également être altérée à cause d'une cryptorchidie (absence de descente d'un ou des deux testicules dans le scrotum). Le ou les testicules en position intra-abdominale sont en effet altérés par une condition thermique défavorable. La cryptorchidie est un symptôme dont les causes peuvent être multiples, associant de façon variable des composantes génétique, développementale et environnementale (Virtanen et Toppari, 2015).

La varicocèle peut également avoir un impact négatif sur la spermatogenèse. Il s'agit d'une dilatation des veines du cordon spermatique. Cette dilatation provoque un ralentissement de la circulation sanguine de retour. La pathologie concerne les veines spermatiques situées à l'intérieur des bourses. Elle est souvent asymptomatique et peut éventuellement s'accompagner d'une altération de la spermatogenèse. Cette anomalie est retrouvée fréquemment dans la population générale (15-20%) et chez environ 40% des hommes infertiles (White et al., 2007).

La spermatogenèse peut également être altérée par des atteintes testiculaires bactériennes ou virales (orchite ourlienne...), des traumatismes (chirurgicaux...), une torsion testiculaire, certaines pathologies (diabète, hémochromatose...), une exposition à des facteurs physiques

(radiations ionisantes, chaleur) ou chimiques (métaux lourds, herbicides, pesticides etc...) (Lopez-Teijon et al., 2008).

Des causes iatrogènes (chimiothérapies anticancéreuses, stéroïdes anabolisants, médicaments hyperprolactinémisants, nitrofurantoïne, cimetidine, dapsonne, anticonvulsivants...) et toxicologiques (alcool, tabac, cocaïne, marijuana...) sont enfin rapportées (Vendrely et al., 1998). Avant un traitement par chimiothérapie et/ou radiothérapie, il est recommandé de conserver le sperme du patient et de préserver ainsi une fécondité ultérieure.

Enfin, les étiologies post-testiculaires sont représentées par les infections (spermatiques ou des voies génitales), les anomalies de l'éjaculation (hypospadias, éjaculation rétrograde...), les anomalies canalaire (par exemple une agénésie congénitale des canaux déférents : A B C D, souvent associée à une ou deux mutations de CFTR dans le cadre d'une mucoviscidose) (Yu et al., 2012).

I. 2 Exploration clinico-biologique

Devant une suspicion d'infertilité masculine, un premier bilan comportant systématiquement un examen clinique et deux spermogrammes à 3 mois d'intervalle est réalisé.

I.2.1 Examen clinique :

Un examen général est effectué (pouls, tension artérielle, poids, taille) afin d'examiner la pilosité axillaire et pubienne et de rechercher une gynécomastie. La taille de la verge est notée ainsi que l'emplacement du méat urétral (hypospadias). Le scrotum est examiné (recherche d'hydrocèle ou de varicocèle), le volume, la consistance et la sensibilité des testicules sont notés. L'épididyme est palpé à la recherche de séquelles d'épididymite, d'une sténose déférentielle, d'une agénésie épидидymaire, déférentielle et/ou des vésicules séminales. Enfin, la prostate est appréciée par un toucher rectal.

I.2.2 Analyse du sperme :

Le bilan de sperme est un examen crucial dans l'évaluation de la fertilité masculine et fournit des informations sur la fonction testiculaire et l'intégrité du tractus génital masculin.

Deux spermogrammes sont réalisés du fait d'importantes fluctuations des paramètres spermatiques dans la population générale au cours du temps. Divers facteurs physiologiques (comme la saison) ou pathologiques banals (prise de médicaments, fièvres) sont connus pour avoir un retentissement direct sur les caractéristiques du sperme (Couet, 1999).

Ainsi, ces deux examens seront séparés de 3 mois, étant données la durée de la spermatogenèse (74 jours dans l'espèce humaine).

a. conditions de recueil :

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2010) recommande :

- une abstinence sexuelle de 2 à 5 jours précédant le recueil.
- Un recueil au laboratoire.
- Un réceptacle adapté, stérile, non toxique.
- Un délai d'acheminement au laboratoire inférieur à 1 heure si le prélèvement a été effectué à domicile par suite d'un échec au laboratoire.

b. Spermogramme standard (OMS, 2010) (Tableau 1):

• Le volume

Il renseigne sur le fonctionnement du système glandulaire :

- Un faible volume (hypospermie) $< 1,5$ ml peut traduire un hypogonadisme, une testostérone plasmatique basse ou une agénésie vésiculaire. En outre, une prostatite ou une vésiculite peuvent diminuer le volume séminal.

- Un volume élevé (hyperspermie) > 6 ml peut traduire une infection ou une éjaculation incomplète (éjaculation rétrograde).

• Le pH

L'éjaculat est un mélange de sécrétions prostatiques acides (blanchâtres) et de sécrétions vésiculaires basiques (jaunâtres).

- Un pH acide $<7,2$ traduit une insuffisance ou une absence de sécrétions vésiculaires (exemple : agénésie des vésicules séminales).
- Un pH basique $> 7,8$ évoque une insuffisance prostatique (prostatite chronique).

□ □ **La numération des spermatozoïdes :**

Il est difficile, voire impossible, de définir une valeur au dessous de laquelle tous les hommes sont infertiles.

- Absence totale de spermatozoïdes ou azoospermie (0 / ml) qui peut être d'origine obstructive (obstruction des voies séminales) ou non obstructive (absence de production par les testicules).
- Spermatozoïdes < 15 millions par ml ou oligospermie ou oligozoospermie.

Le seuil de fécondité est de 5 millions par ml. Entre 5 et 15 millions par ml, le pourcentage de grossesse est relativement identique mais le temps d'attente est plus long.

• **La mobilité :**

On parle d'asthénospermie ou asthénozoospermie en cas de diminution de la mobilité des spermatozoïdes par rapport aux valeurs normales. En cas d'asthénospermie, il faut chercher une infection, la présence d'anticorps anti spermatozoïdes, une varicocèle...

• **La vitalité :**

On parle de nécrospermie si le taux de spermatozoïdes morts est élevé (spermatozoïdes vivants < 60 %).

Tableau 1 : Valeurs normales des paramètres du spermogramme (OMS, 2010).

Valeurs normales selon l'OMS-2010		Définitions de l'anomalie	
Volume du sperme : > 1,5 ml (1,4 - 1,7) < 1,5 ml :		Hypospermie	
Numération des spermatozoïdes (par ml): > 15 millions/ml (12 - 16) Numération des spermatozoïdes (par éjaculat): > 39 millions (33 - 46)		0 : Azoospermie < 15 millions/ml : Oligozoospermie	
Mobilité des spermatozoïdes à la première heure après l'éjaculation. - Grade (a) : mobilité en trajet fléchant.rapide (>25 µm/s) - Grade (b) : mobilité lente et progressive (5-25 µm/s). - Grade (c) : mobilité sur place. - Grade (d) = immobile	- Mobilité progressive de type (a+b) des spermatozoïdes : > 32 % (31 à 34) (ou > 30 %)	<32%	Asthénospermie
	- Mobilité de type (a+b+c) des spermatozoïdes : > 40 % (38 - 42)	< 40 %	
Mobilité à la quatrième heure après l'éjaculation.	Chute de mobilité inférieure à 50 % comparativement aux chiffres de la première heure	Chute de mobilité supérieure à 50%	
Morphologie normale des spermatozoïdes : >30 %		< 4 %: Tératospermie	

<p>> 4 % (3,0 - 4,0)</p> <p>(se rapproche de la classification Kruger) Ou : > 15 % (selon la classification de David modifiée par Auger et Eustache).</p>	
<p>Leucocytes < 1 million/ml</p>	<p>> 1 million/ml : Leucospermie</p>
<p>Vitalité des spermatozoïdes : > 58 % (55 - 63)</p>	<p><58 %: Nécrosospermie</p>
<p>□ □D'autres valeurs normales (consensus) :</p> <ul style="list-style-type: none"> o pH : > 7,2 o MAR test (anticorps anti spermatozoïdes de type IgA, IgG, IgM fixés sur les spermatozoïdes) : < 50 %. o Immunobead test (motile spermatozoa with bound particules) (ou seprmatozoïde mobile avec anticorps antispermatozoïde) : < 50 % o Peroxidase-positive leukocytes : < (1,0) million/ml). o Fructose séminal : > (13) µmol/éjaculât o Phosphatase acide seminale : > 200 U/éjaculât. o Acide citrique séminal : > 52 µmol/éjaculât. o Zinc séminal : > (2,4) µmol/ejaculât o Seminal neutral glucosidase : > (20) mU/éjaculât o L-carnitine séminale : 0.8-2.9 µmol/éjaculât 	

c. *Le spermocytogramme* :

Définition

C'est l'étude morphologique ou cytologique des spermatozoïdes. Elle permet parfois de poser le diagnostic étiologique. Actuellement, la coloration Hemalun-Shorr qui associe un colorant nucléaire, *l'hemalun de Mayer* à un colorant cytoplasmique, *le colorant de Shorr* permet de réaliser cette étude morphologique des spermatozoïdes.

Méthode de classification de David : Principe, définition et exemples

1. Principe

La méthode de David pour le classement des anomalies morphologiques des spermatozoïdes humains a été proposée en 1972 lors d'un colloque sur la fécondité et la stérilité du male et publiée en 1975 (Fellous et Siffroi, 2003). La classification initiale comportait 13 types d'anomalies, sept pour la tête et six pour le flagelle. La classification de David modifiée recense en dehors des spermatozoïdes morphologiquement normaux (Figure 6):

- **7 anomalies de la tête** : têtes allongées, amincies, microcéphales, macrocéphales, multiples, présentant un acrosome anormal ou absent, présentant une base (région postacrosomique) anormale.
- **3 anomalies de la pièce intermédiaire (PI)** : reste cytoplasmique, PI grêle, PI angulée.
- **5 anomalies de la pièce principale** : absente, écourtée, de calibre irrégulier, enroulée et Multiple.

Compte tenu de l'inhomogénéité du sperme humain et de la faible fréquence de certaines anomalies, 100 spermatozoïdes au minimum doivent être classés pour fournir une évaluation correcte du pourcentage de spermatozoïdes typiques et du profil des différentes atypies. Cette recommandation est cependant parfois impossible à suivre lorsque la concentration de spermatozoïdes est très faible. Dans ces cas, la classification peut être faite à partir de 50 spermatozoïdes, mais le résultat pour les spermatozoïdes normaux et anormaux ne doit pas être rendu en pourcentage et la conclusion doit tenir compte de la fiabilité diminuée des fréquences des anomalies retrouvées, notamment lorsqu'il s'agit d'anomalies rares.

Les flagelles isolés ou les spermatozoïdes en lyse ne sont pas classés dans la grille de lecture modifiée, mais leur fréquence est évaluée parallèlement au compte des spermatozoïdes normaux et anormaux. Il en est de même pour la fréquence des cellules de la lignée blanche, des autres cellules (cellules du tractus urogénital) et des fragments cellulaires (Ounis, 2015).

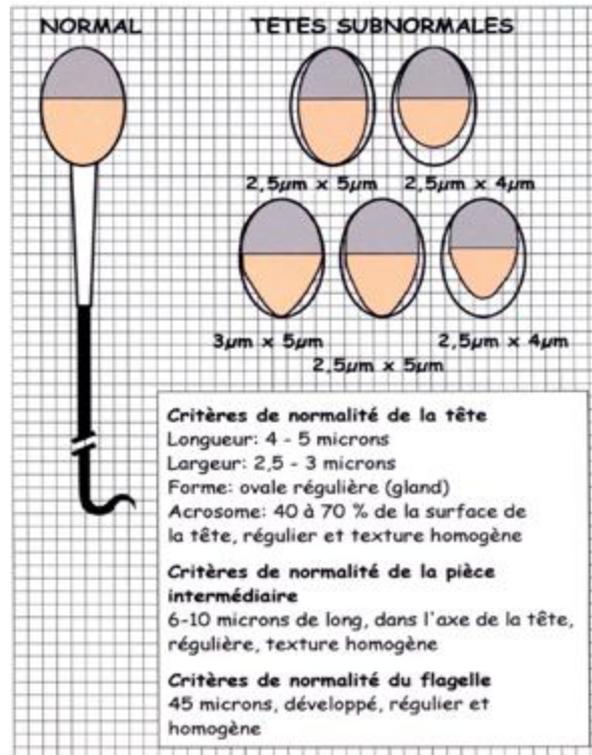


Figure 1 : Illustrations du spermatozoïde humain normal ou subnormal, considéré comme normal, et rappel des définitions (Auger et Eustache, 2000).

Tête allongée: Le grand axe est plus long que la normale et le petit axe présente une longueur normale.

Tête amincie: Le petit axe a une longueur plus petite que la normale et le grand axe présente une longueur normale.

Microcéphale: Le grand axe et le petit axe ont des longueurs plus petites que la normale. Dans cette catégorie entrent les têtes rondes le plus souvent dépourvues d'un acrosome, mais il existe d'autres aspects de spermatozoïdes microcéphales avec un acrosome plus ou moins normal.

Macrocéphale: Le grand axe et le petit axe sont plus grands que la normale (figure 2).

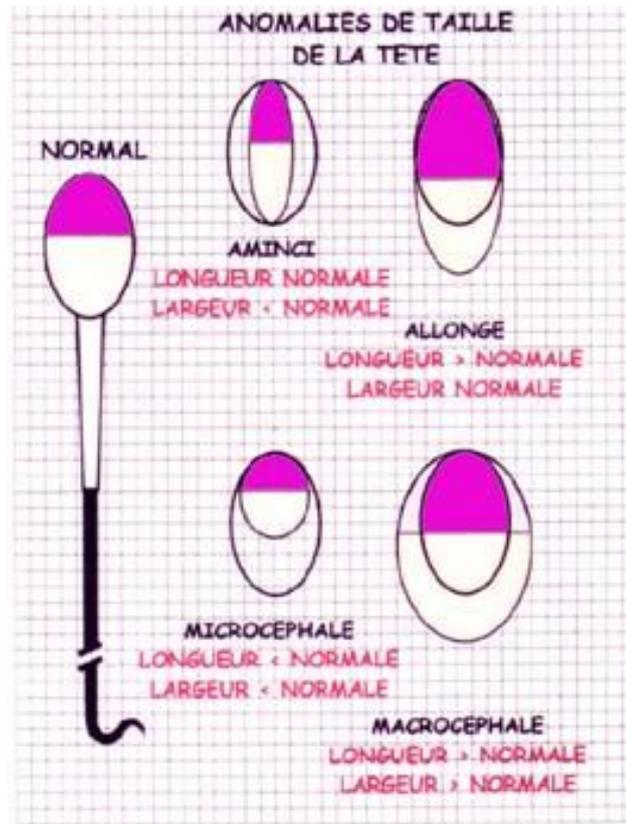


Figure 2 : Anomalies de taille de la tête des spermatozoïdes humains (Auger et Eustache, 2000).

Têtes multiples : Il y a plus d'une tête par spermatozoïde. Elles peuvent être accolées et occuper une surface totale similaire à celle d'une seule tête ou bien être parfaitement dissociées (Figure 3).

Anomalies de l'acrosome : On classe dans cette catégorie toute anomalie de taille, de contour ou de texture de la région acrosomique ainsi que l'absence d'acrosome. La surface de l'acrosome est inférieure à 40 % ou supérieure à 70 % de la surface totale de la tête (Figure 3).

Anomalies de la base de la tête ou région post-acrosomique : Toutes les anomalies de contour et de texture de la région post-acrosomique. (Figure 3).

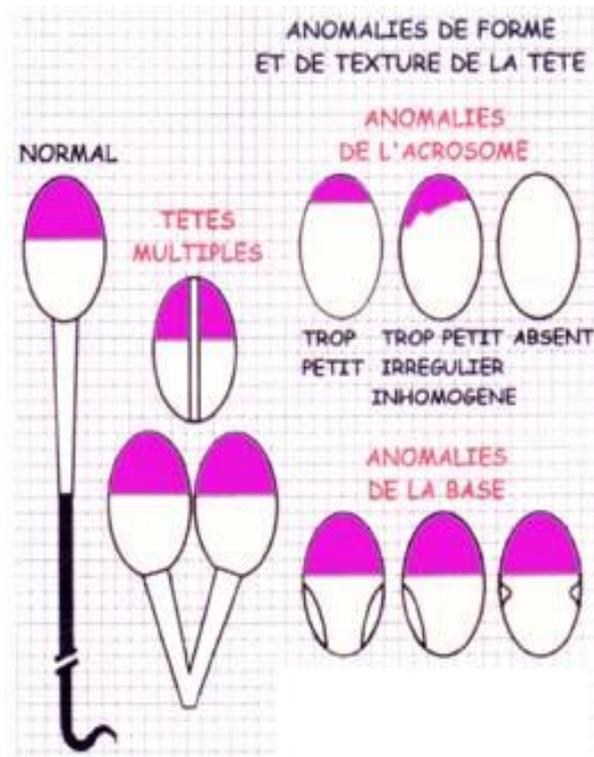


Figure 3 : Anomalies de forme et de texture de la tête des spermatozoïdes humains (Auger et Eustache, 2000).

Reste cytoplasmique : le reste cytoplasmique est considéré comme une anomalie s'il a une surface supérieure au tiers de la surface d'une tête normale. Il se situe le plus souvent à la jonction de la tête et de la pièce intermédiaire et c'est pourquoi il est classé comme anomalie de la pièce intermédiaire mais il peut également entourer l'ensemble de la cellule (souvent dans le cas de spermatozoïdes enroulés) ou englober seulement la tête (Figure 4).

Pièce intermédiaire grêle: le diamètre de la pièce intermédiaire est égal ou inférieur au diamètre de la pièce principale dans sa partie initiale. Cette anomalie correspond à une gaine mitochondriale qui ne s'est pas constituée (Figure 4).

Angulations du flagelle : l'axe de la pièce intermédiaire et l'axe de la tête ou l'axe de la pièce principale forment un angle net ou encore le flagelle n'est pas implanté dans l'axe de la tête. Les angulations sont bien visibles en microscopie électronique. Elles se présentent sous la forme d'une plicature à la jonction de la pièce intermédiaire et de la pièce principale ou plus loin sur le flagelle et régulièrement les structures axonémales et périaxonémales en regard sont désorganisées (Figure 4).

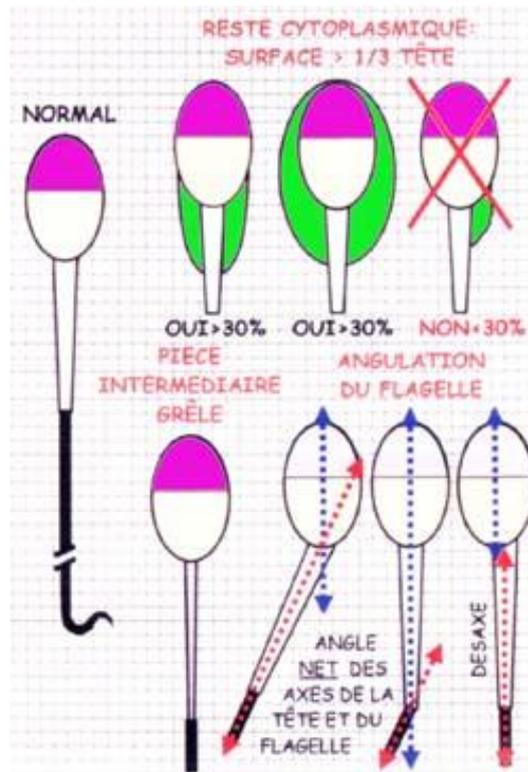


Figure 4 : Anomalies de la pièce intermédiaire des spermatozoïdes humains (Auger et Eustache, 2000).

Flagelle absent : les têtes isolées sont comptées dans cette catégorie. La pathologie ultrastructurale intéresse les colonnes striées qui sont absentes et/ou la pièce connective qui est rudimentaire (Figure 5).

Flagelle court : le flagelle est significativement écourté (<5 fois la longueur de la tête). La microscopie électronique à transmission indique parfois que le flagelle est court du fait d'une brièveté de la pièce intermédiaire mais, le plus souvent, on observe des flagelles courts et épaissis avec une prolifération des éléments composant la gaine fibreuse. Ces flagelles ne sont pas fonctionnels (Figure 5).

Flagelle irrégulier : le diamètre de la pièce principale est variable, présentant des rétrécissements ou des élargissements. En microscopie électronique à transmission, cette anomalie correspond à des désorganisations étagées de l'axonème et/ou du périaxonème (Figure 5).

Flagelle enroulé : Le flagelle est enroulé autour de la tête ou en dehors de la tête. En microscopie électronique à transmission, on observe des coupes transversales multiples de flagelles correspondant à des niveaux différents au sein d'un même reste cytoplasmique, parfois des incidences longitudinales plus rares montrant nettement un enroulement du flagelle autour de la tête. Sur les coupes transversales de flagelle, on observe des désorganisations de la disposition circulaire stricte des différents éléments de l'axonème et du périaxonème dont certains manquent.

Flagelles multiples : il y a plus d'un flagelle par spermatozoïde, la pièce intermédiaire étant commune ou multiple. En microscopie électronique à transmission, on observe des têtes spermatiques bien isolées avec deux (et plus) plaques basales et deux (et plus) pièces connectives (Figure 5) (Ounis, 2015).

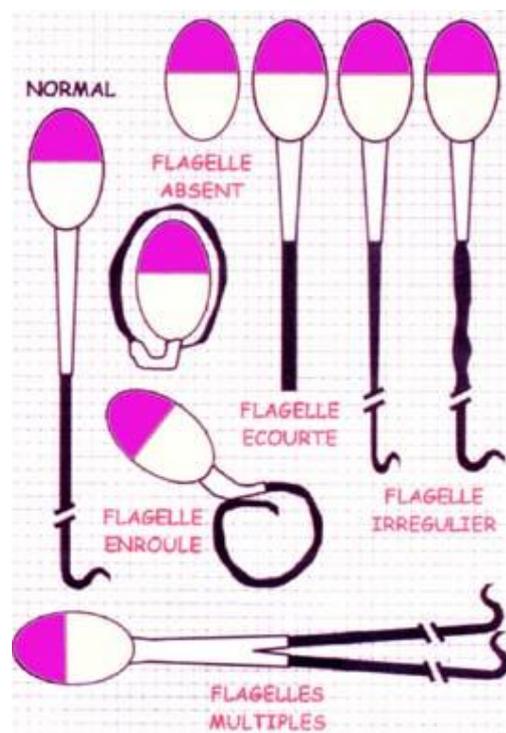


Figure 5 : Anomalies de la pièce principale des spermatozoïdes humains (Auger et Eustache, 2000).

• Les anomalies de la tête.		
FORMES ALLONGÉES	Simple	
	Base amincie	
	Battant de cloche	
	Effilés	
FORMES AMINCIES		
MICROCEPHALES		
MACROCEPHALES		
DUPLIQUÉES		
FORMES IRRÉGULIERS	Contour irrégulier	
	Acrosome mal formé	
	Sans acrosome	
FORME EN LYSE		
• Les anomalies de la pièce intermédiaire		
RESTES CYTOPLASMIQUES		
ANGULATION		
• Les anomalies du flagelle		
FLAGELLES ABSENTS		
FLAGELLES COURTS		
FLAGELLES ENROULÉS		
FLAGELLES DOUBLES		
Autres		
• Flagelles isolés		
• Présence cellules de la lignée spermatique		
• Des éléments à signaler.		

Figure 6 : Classification de David 1975 des anomalies morphologiques des spermatozoïdes (Mansat et Bennet, 1986).

I.3 Exploration cytogénétique :

La découverte de l'implication des anomalies chromosomiques dans les problèmes d'infertilité masculine remonte à 1957 (Ferguson-Smith et al., 1957). Un corpuscule de Barr, correspond à la présence de deux chromosomes X, fut identifié chez 10 hommes sur 91 présentant une azoospermie ou une oligozoospermie sévère. Il a été démontré plus tard que ces hommes avaient un caryotype 47,XXY (Jacobs et Strong, 1959). Dès lors, de nombreuses études concernant le caryotype d'hommes infertiles ont effectuées, surtout depuis l'application en routine des techniques de *Banding* (Caspersson et al., 1970 ; Dutrillaux et Leujeune, 1971 ; Seabright, 1971 ; Dutrillaux, 1973 ; Yunis et Sanchez, 1975). Le marquage en bandes et le caryotype haute résolution ont permis d'améliorer la résolution et la sensibilité de l'analyse cytogénétique (Hugon-Rodin, 2010).

I.3.1 Cytogénétique conventionnelle :

a) Généralités :

Le caryotype est un examen de cytogénétique conventionnelle ayant pour but de classer les chromosomes, présents au cours de la métaphase de la mitose, par paires d'homologues et ainsi de permettre le dépistage d'éventuelles anomalies chromosomiques. Dans un caryotype normal, ils sont répartis en 22 paires d'autosomes et de 2 gonosomes (XX ou XY). Les autosomes sont eux-mêmes répartis en 7 groupes : de A à G, en fonction de leur taille, de la position du centromère et du profil des bandes.

Le tableau 2 résume cette classification:

Tableau 2: Classification des chromosomes humains selon la convention de Paris, (1973)

Groupe	Chromosomes	Caractéristiques Morphologiques
A	1-3	Grands chromosomes métacentriques facilement individualisables par leur taille et la position du centromère. Le chromosome 2 est submetacentrique.
B	4-5	Chromosomes submetacentriques difficiles a distingué les uns des autres.
C	6-12 + X	Chromosomes de taille moyenne, a centromère en position submetacentrique difficile à distinguer les uns des autres. L'X ressemble au plus grand chromosome de ce groupe.

D	13-15	Chromosomes acrocentriques de tailles moyenne et porteurs de satellites.
E	16-18	Chromosome métacentrique (le 16) ou submétacentriques (17 et 18) relativement courts.
F	19 et 20	Petits chromosomes métacentriques.
G	21 et 22 + Y	Petits chromosomes acrocentriques porteurs de satellites pour le 21 et 22, de bras courts pour l'Y.

L'établissement du caryotype sanguin est effectué dans le cadre de l'exploration d'une infertilité masculine et est considéré comme un examen de seconde intention après l'examen clinique et spermologique. Il sera effectué devant toute altération profonde du spermogramme.

D'autre part, c'est un examen réalisé de manière systématique avant toute micro-injection programmée, que celle-ci soit envisagée dans un contexte d'azoospermie, d'oligozoospermie et même de normospermie à la suite d'échecs répétés de fécondation *in vitro* ou fausses couches à répétition (Jalbert, 2004).

b) Principales anomalies chromosomiques rencontrés dans l'infertilité masculine :

La fréquence d'anomalies chromosomiques constitutionnelles est augmentée chez les hommes infertiles. En effet cette population, l'incidence des anomalies du caryotype oscille entre 1,7 et 19,6% et elle est 10 à 15 fois plus élevée que celle observée dans une population de nouveau-nés (De brakeleer et Dao, 1991 ; Van Assche et al., 1996 ; Morel et al., 2004a).

D'autres part, il est observé 5 fois plus d'anomalies au niveau des autosomes et 27 fois plus au niveau des chromosomes sexuels (Van Steirteghem et al., 1999 ; Vialard *et al.*, 2009).

La prévalence des anomalies chromosomiques semble corrélée à la sévérité de l'atteinte spermatique. En effet, il a été montré un taux d'anomalies chromosomiques dans une population d'hommes infertiles plus élevé chez les patients oligozoospermiques et encore plus chez les patients azoospermiques (May-Panloup et al., 2001).

Il a été observé un nombre plus élevé d'anomalies au niveau des autosomes dans le cadre des oligozoospermies, alors qu'il s'agirait surtout d'anomalies des gonosomes en cas d'azoospermie (Van Steirteghem et al., 1999).

Les anomalies chromosomiques retrouvées chez les hommes infertiles sont de deux types. Il s'agit d'une part des anomalies du nombre de chromosomes ou aneuploïdies, et d'autre part des anomalies de structure.

▪ **Anomalies chromosomiques constitutionnelles de nombre :**

Les anomalies de nombre les plus fréquemment retrouvées sont celle concernant les gonosomes.

Le syndrome de Klinefelter touche 0,105% des hommes, 4,05% des hommes infertiles et 11% des hommes azoospermiques (De Brakeleer et al., 2006 ; Vialard et al, 2009). C'est l'anomalie la plus fréquente puisqu'elle représente plus de 60 % des anomalies de nombre touchant les gonosomes. Le caryotype met en évidence une formule à 47, XXY parfois en mosaïque (généralement 46, XY ; 47, XXY). L'anomalie chromosomique aurait le plus souvent pour origine une non disjonction (maternelle dans deux tiers des cas), ou une erreur mitotique postzygotique dans 3 % des cas (Smyth et al., 1998).

Les changements pathologiques caractéristiques au niveau testiculaire apparaissent à la puberté : il s'agit d'un processus de fibrose et de hyalinisation des tubules séminifères. Les sujets présentent une azoospermie et plus rarement une oligospermie souvent sévère (Foresta et al., 1999).

Le caryotype 47,XYX (Figure 7) est la deuxième aneuploïdie la plus fréquente des chromosomes sexuels. L'incidence est de 1 pour 1000 de l'ensemble des naissances vivantes de sexe masculin (Torniero *et al*, 2011).

Les hommes porteurs sont phénotypiquement normaux, et ils sont généralement grands (plus de 2 mètres). L'origine de ce trouble est une non disjonction paternelle à la méiose II. L'analyse du sperme révèle généralement une oligozoospermie sévère ou une azoospermie.

Les hommes 47,XYX sont pour la plupart féconds. La perte pré-méiotique du chromosome Y surnuméraire permet la réalisation de la spermatogenèse et la production de spermatozoïdes normaux (Gabriel et al, 1996).

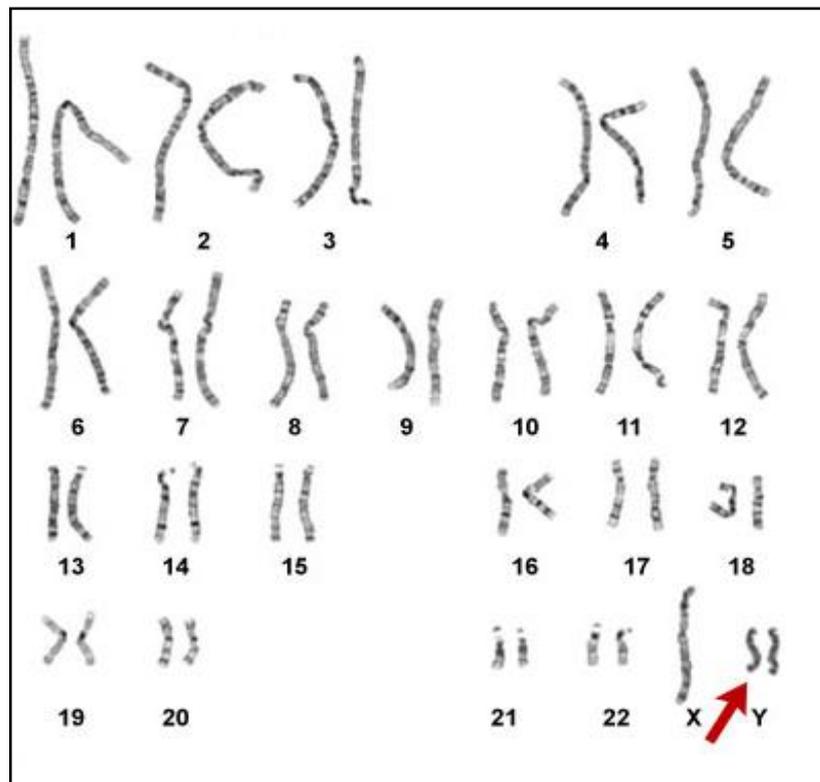


Figure 7 : Caryotype 47,XYY (2 chromosomes Y) (Rabineau & Dupont , 2003)

Le syndrome des hommes 46, XX est rare et concerne environ un individu sur 20 000. Il est observé essentiellement chez les mâles azoospermiques, avec une fréquence de 0,9% (Mau-Holzmann, 2005). Le phénotype est semblable au syndrome de Klinefelter, mais avec une taille normale et une intelligence intacte.

Anomalies chromosomiques constitutionnelles de structure :

Chez l'homme, les premières anomalies chromosomiques constitutionnelles ont été découvertes à partir de 1959. Plusieurs types d'anomalies de structure sont rencontrés, les translocations robertsoniennes, les translocations réciproques et les inversions.

➤ Les translocations réciproques équilibrées :

Sont les anomalies de structure chromosomique les plus fréquemment retrouvées avec une incidence de 1 pour 1175 naissance (De Braekeleer & Dao, 1991).

Elles ont une fréquence 7 fois plus élevée dans les populations d'hommes infertiles (0,6%) (De Braekeleer & Dao, 1991).

Cette anomalie consiste en l'échange de matériel chromosomique entre deux chromosomes sans perte ni gain de matériel (Figure 8). Généralement, elle est sans conséquences phénotypique pour le porteur mais peut entraîner des anomalies lors de la formation des gamètes.

Chez les nouveau-nés, la fréquence de translocations réciproques équilibrées est de 1 pour 625 (Van Dyke et al., 1983) et de 0,6% dans la population d'hommes infertiles (De Braekeleer & Dao, 1991). Les translocations réciproques équilibrées affectent tous les chromosomes.

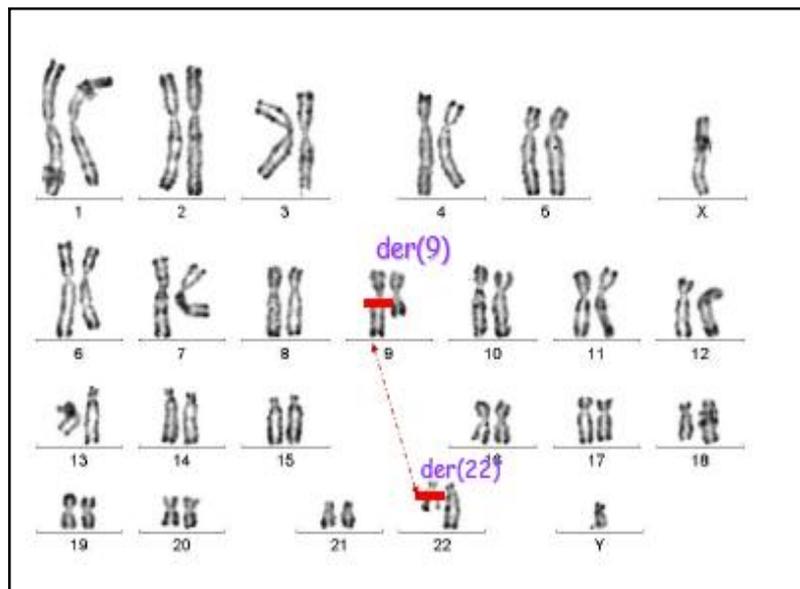


Figure 8 : caryotype d'un patient porteur d'une translocation réciproque équilibrée entre les chromosomes 9 et 22. 46,XY, t(9;22)(q21;q11.2) (Morel et al., 2004b).

➤ **Les translocations Robertsoniennes :**

La fréquence des translocations robertsoniennes est estimée à 0,8 chez les hommes infertiles (De Braekeleer et Dao, 1991 ; Ferlin *et al*, 2006). Cette anomalie concerne uniquement les chromosomes dits acrocentriques. Dans l'espèce humaine, ces chromosomes sont au nombre de 5 (13, 14, 15, 21 et 22) et ils se distinguent par la présence de bras courts (bras p) de très petite taille. Ces derniers sont constitués de séquences répétées en tandem, les NOR (Nucleolar Organizer Region). Ce sont des gènes d'ARN ribosomiaux. Ces translocations peuvent se produire entre deux chromosomes acrocentriques homologues (Figure 9), soit une fusion des centromères, soit par une cassure dans les régions juxtacentromériques, pour former un chromosome dérivé (der). Si fusion centromérique a lieu, les bras courts sont entièrement perdus. Si les cassures se produisent sur les bras courts,

il se forme un chromosome dicentrique (présence de deux centromères). Généralement, l'un des deux centromères est inactivé évitant ainsi des problèmes de ségrégation lors de l'anaphase. Le chromosome résultant de la fusion des bras courts d'acrocentrique et est donc perdu d'où un caryotype à 45 chromosomes. Cette anomalie est dite équilibrée malgré la perte de tout ou partie des bras courts car les séquences qu'ils portent sont présentes sur tous les acrocentriques et leur perte n'a de conséquence phénotypique pour le porteur. C'est donc par abus de langage que cette anomalie est considérée comme équilibrée.

En revanche, cette anomalie peut avoir un impact sur le contenu chromosomique des spermatozoïdes des hommes porteurs.

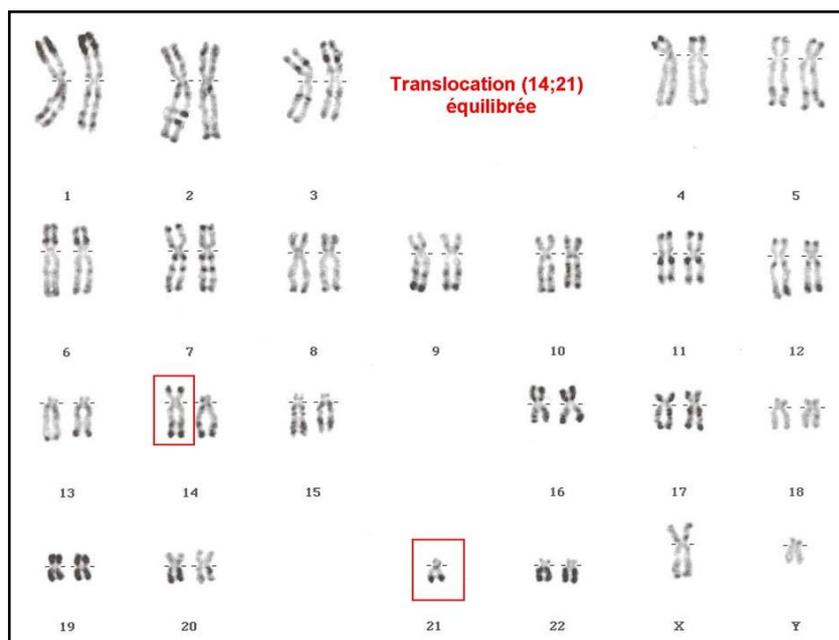


Figure 9 : caryotype d'un patient porteur d'une translocation robertsonienne entre les chromosomes 14 et 21. (Hennequin et al., 2005)

➤ **Les inversions paracentriques et péricentriques :**

Enfin, un autre type d'anomalie de structure équilibrée est l'inversion. Ce réarrangement ne concerne qu'un seul chromosome. Il existe deux types d'inversions : paracentrique ou péricentrique.

L'incidence des inversions dans la population générale est estimée à 0,012% (De Breakleer & Dao, 1991). Elle est 13 fois plus élevée parmi les hommes infertiles que dans la population générale (De Breakleer et al., 2006).

Elle est d'origine familiale dans 90% des cas (Vialard et al., 2007). Une inversion est dite paracentrique lorsque les deux points de cassure se situent sur le même bras. Le segment cassé subit une rotation de 180° avant d'être réinséré dans le chromosome, l'incidence centromérique n'est alors pas modifiée.

Une inversion est dite péricentrique lorsqu'il y a un point de cassure de part et d'autre du centromère d'un chromosome. Ce segment subit une rotation de 180° avant d'être « recollé » au sein de ce même chromosome. En dehors de la configuration particulière où les points de cassure sur les bras p et q (bras longs) sont à égale distance du centromère, une inversion péricentrique entraîne une modification de l'indice centromérique (Figure 10). Tous les chromosomes peuvent être concernés, mais les chromosomes 1, 2, 8, 9, 16 et Y le sont plus fréquemment (Jaarola et al., 1998 ; Chantot-Bastarud et al., 2007 ; Morel et al., 2007, Thomas et al., 2008). Toutefois, quelques inversions péricentriques concernant l'hétérochromatine sont en fait considérées comme de simple polymorphisme (Hsu et al., 1987 ; Hysert et al., 2006 ; Thomas et al., 2008).

Les porteurs d'inversions paracentriques ou péricentriques n'ont généralement pas d'anomalies phénotypiques mais ces remaniements peuvent perturber la méiose et entraîner la formation de gamètes chromosomiquement déséquilibrés.

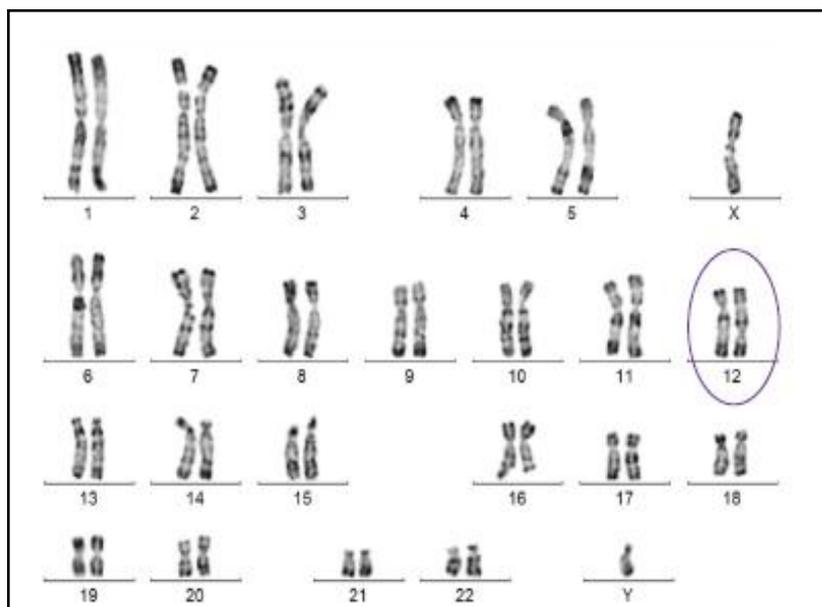


Figure 10 : Caryotype d'un patient porteur d'une inversion péricentrique du chromosome 12 :46,XY,inv(12)(p11q23) (Morel et al., 2007).

➤ Anomalies de structure du chromosome Y

Malgré sa petite taille, des anomalies de structure ont pu être observées au caryotype et leur relation avec le phénotype d'infertilité a permis d'assigner à certaines régions du chromosome Y un rôle majeur dans la spermatogenèse.

- Translocations impliquant le chromosome Y

Le chromosome Y peut être impliqué dans des translocations avec le chromosome X, un autosome (à l'exception des chromosomes 11 et 20), ou un autre chromosome Y surnuméraire. Les translocations (X ; Y) entraînent des phénotypes très variables selon les gènes délétés, allant du phénotype masculin, au phénotype féminin, en passant par différents stades d'ambiguïtés sexuelles et/ou d'anomalies phénotypiques associées (petite taille, infertilité, dysmorphisme, retard mental, anomalies de la face, ...).

La fréquence des translocations (Y ; autosomes) est estimée à 1/2000 dans la population générale (Faure, 2007).

- Isochromosomes Y

L'isochromosome Y (iY) est constitué de deux bras identiques, soit longs, soit courts. Il survient lorsque le chromosome normal ne se divise pas longitudinalement mais transversalement.

Les phénotypes rapportés dans la littérature pour l'isochromosome du bras court, i(Yp) vont de l'ambiguïté sexuelle avec des stigmates de syndrome de Turner, à un phénotype masculin. À l'inverse, pour l'isochromosome du bras long, i(Yq) et du fait de l'absence du gène SRY, les phénotypes sont féminins, avec des gonades réduites à de fines bandelettes fibreuses avec impubérisme.

Le chromosome Y isodicentrique étant instable, il est souvent retrouvé en association avec une lignée cellulaire 45,X (Faure, 2007).

- Chromosomes Y en anneau

Les chromosomes en anneaux sont des chromosomes refermés sur eux-mêmes par leurs bras courts et longs après une cassure chromosomique dont la localisation déterminera la perte de fragments distaux p et q plus ou moins importants.

La taille de ces derniers et la nature des gènes qu'ils contiennent conditionneront ensuite le phénotype. En général, ce dernier est masculin car le gène SRY est souvent conservé. Parfois, le phénotype est féminin, soit parce que le gène SRY est perdu lors de la formation de l'anneau, soit plutôt parce qu'il existe une lignée cellulaire 45,XO importante. Les mosaïques 45,X/46,X r(Y) sont en effet extrêmement fréquentes en raison de la grande instabilité mitotique de ces anneaux (Ravel et Siffroi, 2009).

- Les polymorphismes du chromosome Y

□ □ Longueur de l'hétérochromatine

La partie hétérochromatique en Yq12 du chromosome Y humain présente des tailles différentes selon les individus, sans entraîner d'anomalies phénotypiques.

□ □ Satellites du chromosome Y

La présence de satellites aux extrémités du bras long du chromosome Y (Yqs) est considérée comme une variation normale sans incidence phénotypique.

□ □ Inversions du chromosome Y

Les inversions du chromosome Y sont le plus souvent considérées comme des variants sans conséquence phénotypique.

Les inversions péricentriques du chromosome Y (inv(Y)(p11q11)) sont le plus souvent héritées. On estime qu'elles sont présentes à l'état de variant normal dans 0,06% des cas. Elles entraînent une infertilité masculine lorsqu'elles sont associées à une délétion. Les inversions paracentriques du bras long du chromosome Y, quant à elles, n'ont été décrites que très rarement dans la littérature (Faure, 2007).

I.3.2 Etude cytogénétiques des spermatozoïdes :

a) Origine méiotique des spermatozoïdes :

La spermatogénèse (Figure 11) est le processus de différenciation cellulaire qui aboutit à la transformation des cellules germinales en spermatozoïdes. Elle se déroule dans la paroi des tubes séminifères du testicule (Clermont, 1963; Czyba et Montella, 1993; Dadoune et Demoulin, 1991; Hartl et Jones, 2003; Wing-Yee et Yan Cheng, 2008).

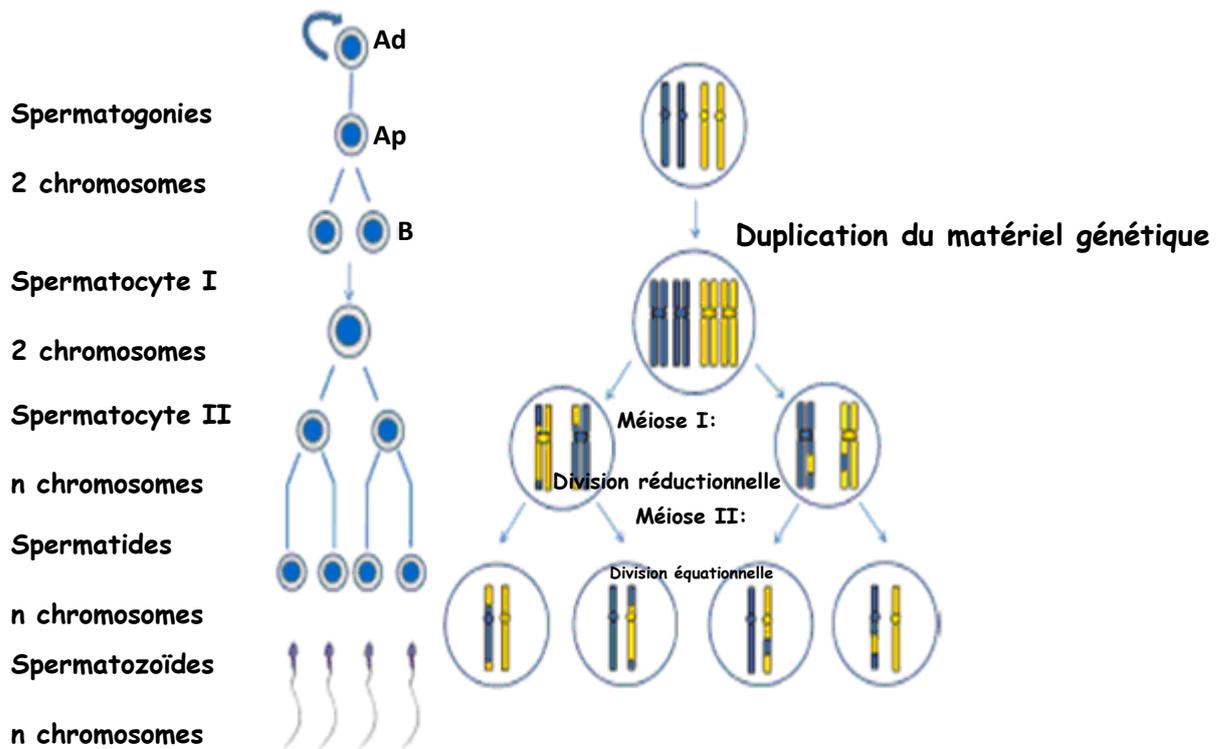


Figure 11 : Schématisation de la spermatogénèse chez l'homme et du contenu chromosomique des cellules au cours des différentes étapes (Perrin A., 2009).

Evolution des cellules de la lignée germinale :

Trois types de cellules germinales sont impliqués dans la spermatogénèse : les spermatogonies, les spermatocytes et les spermatozoïdes (Figure 12).

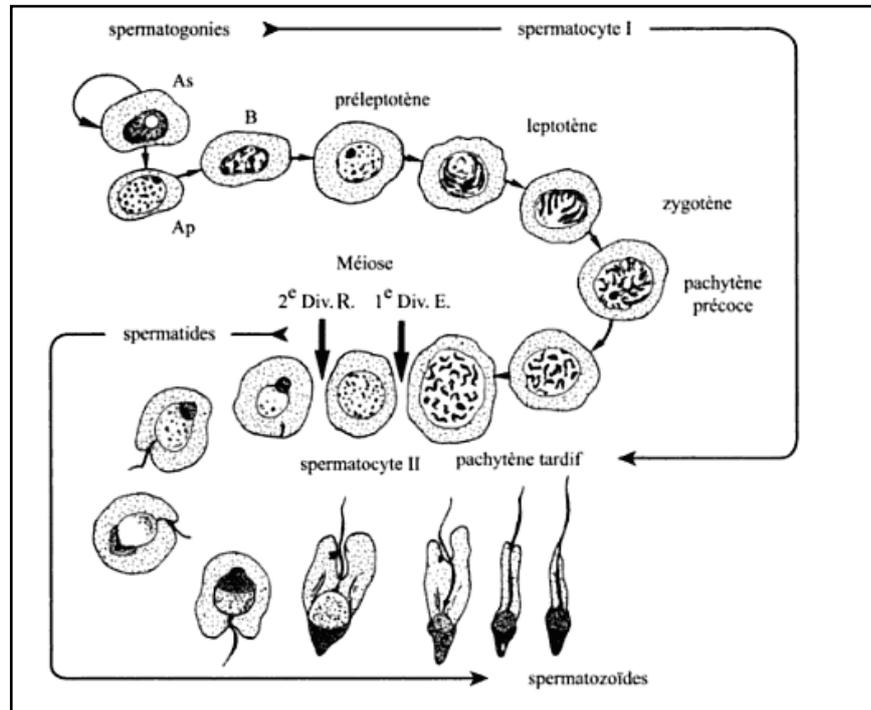


Figure 12 : Les cellules de la lignée germinale (Thibault et Levasseur, 2001).

Les spermatogonies :

Il s'agit de cellules diploïdes se divisant par mitoses, disposées en périphérie des tubes séminifères. Ce sont des cellules arrondies, d'un diamètre de 10 à 15 μm , avec un cytoplasme clair et un noyau ovoïde. Il en existe trois types selon Clermont (Clermont, 1963) :

- spermatogonies Ad, à chromatine dense, d'aspect sombre;
- spermatogonies Ap, à chromatine poussiéreuse, claire;
- spermatogonies B, à chromatine mottée et irrégulière.

Les spermatocytes :

Il s'agit de cellules disposées à distance de la membrane tubulaire.

Issus de la dernière division des spermatogonies B, les spermatocytes primaires sont de grandes cellules au noyau arrondi contenant plusieurs nucléoles. Ils traversent une courte interphase (stade pré-leptotène), pendant laquelle s'effectue une réplication d'ADN (les

spermatocytes primaires sont des cellules à $2n$ chromosomes dupliqués ou $4n$ molécules d'ADN).

Ces cellules entrent ensuite dans un processus de division qui n'affecte que les cellules de la lignée germinale, appelé la méiose. Sa finalité est d'assurer le brassage de l'information génétique et la diminution de moitié du contenu en chromosomes de la cellule. Elle consiste en deux divisions successives (méioses I et II), consécutives à une seule phase de réplication d'ADN (Figure 13 et 14). Chacune des deux divisions peut être décomposée, comme la mitose, en 4 étapes distinctes : prophase, métaphase, anaphase, télophase.

La prophase de méiose I comprend cinq stades successifs : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse. Cette prophase est caractérisée par l'appariement des chromosomes homologues d'origine paternelle et maternelle, avec échange de matériel génétique entre les chromatides homologues au stade pachytène. Ainsi, les cellules en prophase I possèdent une chromatine sous forme de filaments plus ou moins épais selon le stade méiotique.

En métaphase de première division méiotique, les chromosomes homologues se disposent de part et d'autre de la plaque équatoriale, les chiasmas (au niveau desquels ils sont attachés) sont sur la plaque équatoriale, les centromères de part et d'autre de la plaque équatoriale.

En anaphase de méiose I, les chromosomes homologues se séparent et s'orientent vers chacun des pôles cellulaires de façon aléatoire.

Les cellules en cours de méiose I les plus souvent présentes dans les tubes séminifères sont les cellules au stade pachytène car elles ont une durée de vie longue (16 jours).

La première division méiotique aboutit à la séparation des chromosomes homologues et à la formation de spermatocytes secondaires, dans lesquels chaque chromosome est formé de deux chromatides. Les spermatocytes secondaires contiennent donc n chromosomes dupliqués ou $2n$ molécules d'ADN. Ces cellules sont rarement visualisées en histologie sur les coupes de biopsie testiculaire, car elles ont une durée de vie très brève (1 jour). Elles se présentent comme des cellules au noyau arrondi avec une chromatine homogène.

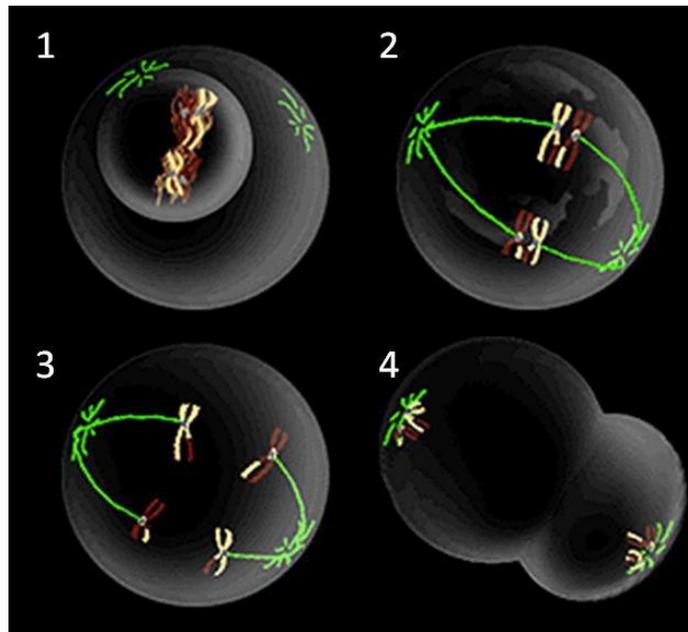


Figure 13 : Principe de la méiose I avec 4 chromosomes (1/prophase, 2/métaphase, 3/anaphase, 4/télophase).

Après une interphase très courte où les chromosomes ne se décondensent que partiellement, les spermatocytes secondaires entrent en deuxième division de méiose, sans réplication d'ADN préalable. La deuxième division est similaire à une mitose somatique normale, à ceci près qu'elle ne porte que sur 23 chromosomes au lieu de 46.

La prophase de deuxième division méiotique a une durée très courte, contrairement à la prophase I.

En métaphase II, les chromosomes s'alignent au niveau de leurs centromères sur la plaque équatoriale.

En anaphase de méiose II, ce sont les centromères qui se séparent, entraînant la séparation des chromatides sœurs de chaque chromosome qui vont s'orienter vers chacun des pôles cellulaires de façon aléatoire.

La deuxième division méiotique aboutit à la ségrégation des chromatides sœurs dans les deux cellules filles, les spermatides, qui sont des cellules haploïdes contenant n chromosomes et n molécules d'ADN (Faure, 2007).

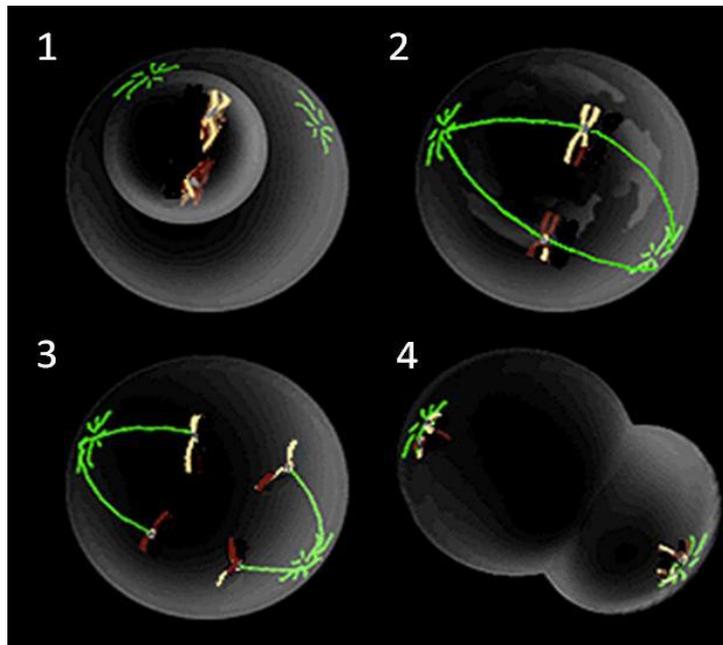


Figure 14 : Principe de la méiose II avec 4 chromosomes (1/prophase, 2/métaphase, 3/anaphase, 4/télophase).

Les spermatides :

La différenciation post-méiotique des spermatides en spermatozoïdes est appelée la spermiogénèse. Chez l'homme, elle dure environ 23 jours, et peut être divisée en 8 étapes (Figure 15).

Les spermatides, localisées près du centre du tube séminifère, sont de petites cellules de 6 à 7 μ m de diamètre divisées en trois classes :

i/ les spermatides rondes (étapes 1-2), qui possèdent un noyau rond avec une chromatine pâle et homogène;

ii/ les spermatides en élongation (étapes 3-4-5), dont le noyau s'allonge et dont la chromatine devient plus sombre;

iii/ les spermatides en condensation (étapes 6-7-8), dont le noyau est très allongé, avec une partie caudale globulaire et une partie antérieure saillante, et dont la chromatine est sombre et condensée.

La maturation consiste en :

i/ une réorganisation nucléaire, avec élongation et compaction importante du noyau.
Cette étape cruciale modifie globalement la structure du génome. Elle sera détaillée plus loin;

ii/ une élimination de la majeure partie du cytoplasme via les corps résiduels;

iii/ la mise en place de l'acrosome à partir de l'appareil de Golgi;

iv/ l'assemblage des structures du flagelle.

La spermiogenèse aboutit à la libération des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères. Ceux-ci subiront une dernière maturation dans l'épididyme, puis dans les voies génitales féminines, de manière à acquérir leur pouvoir fécondant (Faure, 2007).

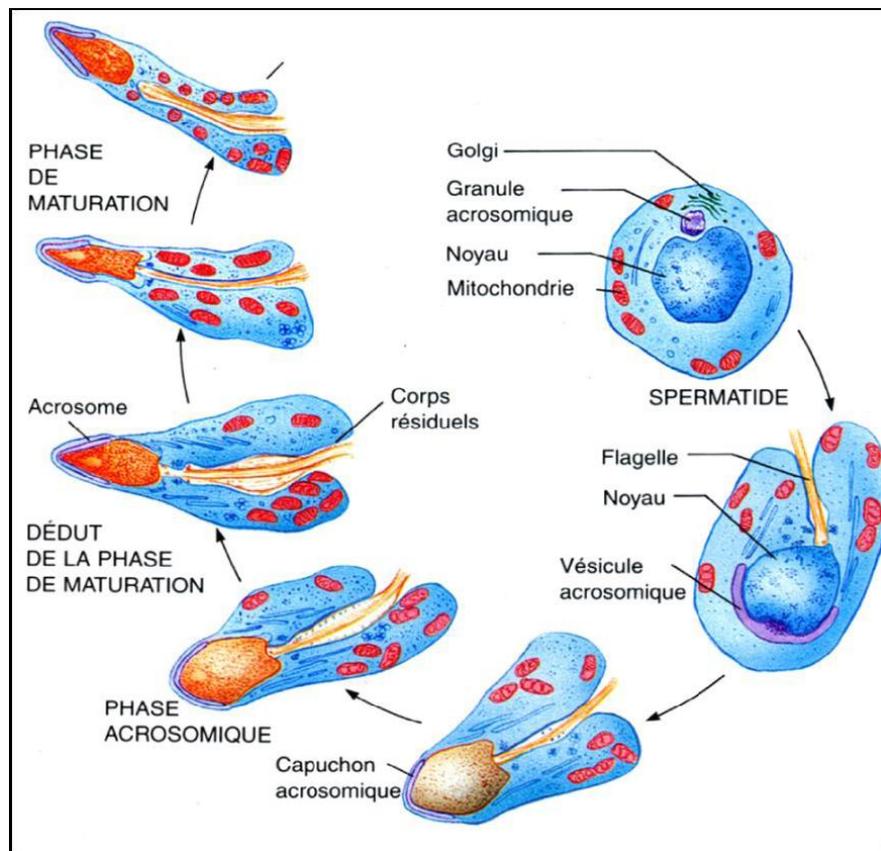


Figure 15 : Schéma de la spermiogenèse, adaptée de Marc, 2004.

Cinétique de la spermatogenèse :

La production des spermatozoïdes est continue à partir de la puberté grâce au renouvellement des spermatogonies souches Ad et Ap par mitoses. Chez l'homme, les

spermatogonies Ap un peu plus différenciées donneraient naissance aux cellules souches de renouvellement ou spermatogonies B, lesquelles entameraient leur différenciation.

La spermatogenèse humaine dure 74 jours. Le cycle spermatogénétique est défini comme la succession chronologique des différents stades de différenciation d'une génération de cellules germinales (depuis la spermatogonie jusqu'au spermatozoïde) (Figure 12). Chacune des étapes du cycle spermatogénétique a une durée constante (Tableau 3).

Tableau 3 : Durée de vie moyenne des cellules germinales humaines (Faure, 2007).

Cellule germinale	Durée de vie moyenne (jours)
Spermatogonie B	16
Spermatocyte primaire	23
dont pachytène	16
Spermatocyte secondaire	1
Spermatides	23

b) Spermatogénèse et tératozoospermie :

Une morphologie anormale d'un spermatozoïde peut concerner la tête, la pièce intermédiaire et/ou le flagelle. L'information génétique étant contenu dans les têtes de spermatozoïdes, il ne serait pas étonnant de trouver une corrélation entre la morphologie des têtes et leur équipement chromosomique et ce, malgré un caryotype lymphocytaire normal. (Perrin, 2009)

Certains considéraient qu'une tératozoospermie sévère pouvait être une contre indication à l'ICSI puisque les gamètes concernés pouvaient avoir un taux d'aneuploïdie plus important (Lee et al. , 1996; Calogero et al. , 2001). D'autres, au contraire, ont montré que la morphologie des gamètes ne semblait pas avoir d'impact sur les résultats d'ICSI (Nagy et al. , 1995; Vegetti et al. , 2000). Ainsi, une ICSI serait réalisable en l'absence de spermatozoïdes de morphologie normale dans l'éjaculat. Cette notion reste controversée. Il est évident que l'ICSI ignore les barrières naturelles telles que les voies génitales féminines, les cellules de la corona radiata ou encore la zone pellucide et la membrane cytoplasmique. En 2000, Viville et al. n'ont pas constaté d'augmentation significative du taux d'aneuploïdie chez trois patients ayant différentes anomalies de la morphologie de leurs gamètes telles qu'une

globozoospermie, des flagelles courts ou encore des acrosomes anormaux. En revanche, un taux supérieur d'aneuploïdie a été rapporté chez un patient avec des gamètes macrocéphales (Viville et al., 2000). En 2006, Sun et al. ont montré que les taux d'aneuploïdies sont augmentés dans les gamètes avec des flagelles anormaux (Sun et al. , 2006). Ainsi, la spermatogenèse apparaît comme pouvant être perturbée malgré un caryotype lymphocytaire normal.

c) Analyse de l'équipement chromosomique des spermatozoïdes :

Au départ, des études sur spermatozoïdes éjaculés ont été consacrées aux anomalies du chromosome Y en utilisant la coloration à la quinacrine (Barlow & Vosa, 1970; Pearson & Bobrow, 1970; Pearson et al., 1970).

La difficulté pour l'étude de l'équipement chromosomique des spermatozoïdes résidait principalement dans le fait que ces cellules soient amitotiques (incapables de se diviser par mitoses). Ainsi, l'obtention d'un caryotype ne fut possible que par la réalisation d'une fécondation afin d'obtenir des métaphases haploïdes de spermatozoïdes. En 1976, une équipe a mis au point une technique de fécondation in vitro hétérospécifique entre des ovocytes dépellucidés de hamster doré et des spermatozoïdes humains (Yanagimachi & Yanagimachi, 1976). Cette technique originale a permis de montrer que les hommes porteurs d'anomalies chromosomiques (notamment les translocations) pouvaient avoir une grande variabilité des taux d'anomalies chromosomiques dans leurs spermatozoïdes. Cependant, cette technique est lourde à mettre en œuvre et ne permet l'étude que d'un nombre limité de caryotypes de spermatozoïdes. Ainsi, il aura fallu près de 20 années pour obtenir 10 000 caryotypes de spermatozoïdes humains (Guttenbach et al., 1997).

L'hybridation in situ fut appliquée à l'homme au début des années 70 pour localiser des séquences d'ADN satellite, jusqu'en 1981, seules les séquences hautement répétées purent être localisées. Le principe consistait à hybrider une sonde d'ADN marquée par un radio-isotope sur une préparation chromosomique ; la détection était réalisée par autoradiographie. L'analyse s'effectuait par comptage des grains d'argent sur les chromosomes colorés au Giemsa.

Au début des années 80 des améliorations techniques permirent la mise en évidence de séquence unique : utilisation de sondes clonées, introduction du sulfate de Dextran dans la solution d'hybridation permettant d'augmenter le signal d'hybridation. Cependant, malgré leur réelle efficacité, la lourdeur de ces techniques nécessitant l'utilisation de la radioactivité en

limitait l'exploitation : précautions liées à la manipulation de radio-isotopes, durée des temps d'exposition (2 à 3 semaines), longueur de l'analyse, manque de précision dans la localisation des signaux... L'introduction de marqueurs non radioactifs par modification chimique ou physique des acides nucléiques et le développement de systèmes de détection efficace, notamment la fluorescence, a permis aux laboratoires de diagnostics une utilisation en routine devenue indispensable au début des années 90.

La technique d'hybridation in situ en fluorescence comporte trois étapes. La première consiste en une dénaturation de l'ADN de la sonde si cette dernière est sous forme double brin. La sonde est ensuite hybridée sur l'ADN cible. La troisième correspond à la révélation de l'hybridation qui peut être directe ou indirecte et à la contre-coloration support, c'est à dire les chromosomes ou les noyaux interphasiques. La sonde hybridée avec la cible est révélée par un signal fluorescent (Muleris, 1996) (Figure 16).

En général, la révélation s'effectue par immunodétection et enfin l'observation s'effectue grâce à un microscope à épifluorescence. L'introduction de marqueurs non radioactifs a permis de s'affranchir de la lourdeur des techniques utilisant des radio-isotopes réservés aux laboratoires de recherche. De nombreuses améliorations ont permis d'obtenir une qualité et une reproductibilité remarquable (sondes clonées, amélioration des solutions d'hybridation...). Son utilisation pratique est relativement facile et rapide (Marc, 2004).

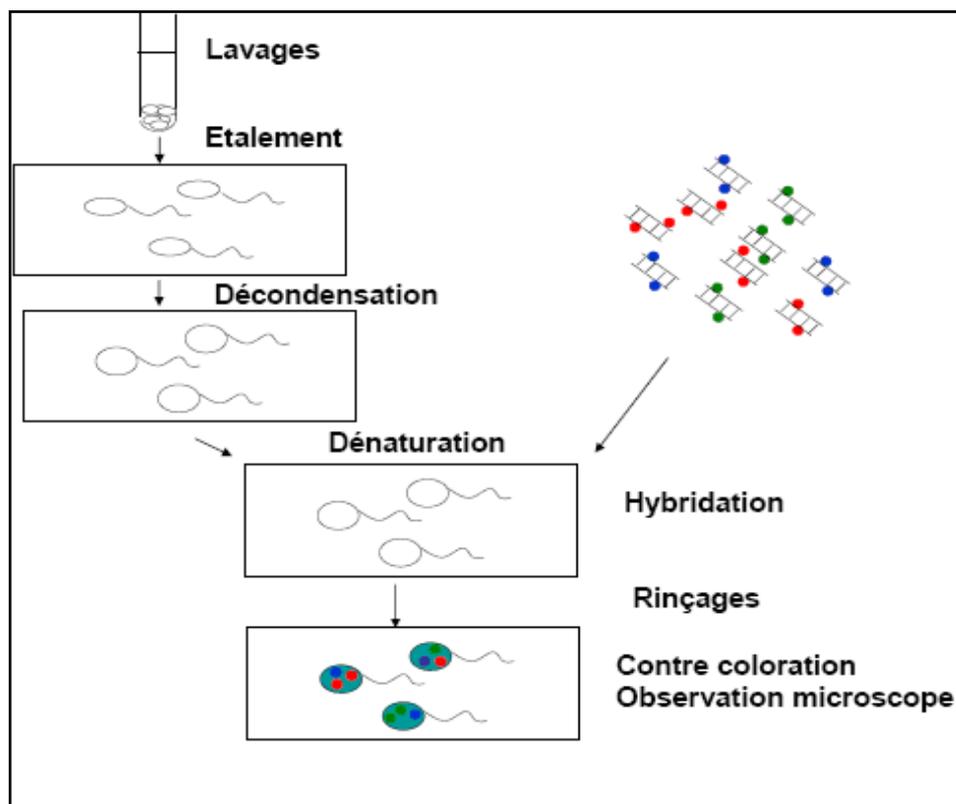


Figure 16 : Principe de la technique FISH sur spermatozoïdes (Perrin, 2009).

Dans les années 1990 la FISH a été utilisée sur spermatozoïdes en interphase (Guttenbach et al., 1990; Martin et al., 1993; Robbins et al., 1993). Elle permet une étude de la ségrégation méiotique bien plus aisée, sur un grand nombre de cellules (jusqu'à 10 000 spermatozoïdes étudiés par patient). L'utilisation de la technique de FISH sur spermatozoïdes se fait grâce à plusieurs types de sondes. Les sondes commercialisées couplées à des fluorochromes sont aujourd'hui à notre disposition dont des sondes centromériques (CEP : chromosome enumeration probe), des sondes locus-spécifique (LSI : locus specific identifier), des sondes subtélomériques, des peintures partielles ou totales (PCP – partial chromosome paint, WCP – whole chromosome paint). Il existe également des sondes BACs (bacterial artificial chromosomes) pour lesquelles il est nécessaire d'extraire l'ADN contenu dans des bactéries transformées et de réaliser un marquage par des fluorochromes. Selon l'anomalie de structure, les sondes seront choisies de façon différente.

Une autre technique de cytogénétique moléculaire, introduite en 1989 (Koch et al., 1989) sous l'appellation de PRINS (Primed *In Situ* labelling ou synthèse *in situ* amorcée), est aujourd'hui applicable à l'analyse des noyaux des spermatozoïdes (Pellestor et al., 1995a). L'originalité de cette technique réside dans l'utilisation de courtes amorces oligonucléotidiques (18 à 35 nucléotides) qui, une fois appariées *in situ* à leurs séquences complémentaires sur l'ADN cible dénaturé, vont servir de points d'initiation à une réaction d'élongation catalysée par une polymérase, en présence d'un mélange de nucléotides. La visualisation des fragments d'élongation engendrés *in situ* résulte de l'incorporation enzymatique dans ces fragments d'un nucléotide fluorescent ou couplé à un haptène détectable par chimio-luminescence (Pellestor, 1998). La technique PRINS est caractérisée par sa rapidité de mise en œuvre et son efficacité, mais la méthodologie à adapter à chaque type d'amorce représente un frein à son utilisation.

Cette technique a été adaptée pour l'hybridation des noyaux spermatiques (Quenesson et al., 1995; Pellestor et al., 1995a; Pellestor et al., 1995b). Ceci étant, avec ces techniques, il peut s'avérer nécessaire de faire une mise au point avec chaque couple d'amorces nouvellement utilisé. Cela alourdit la technique d'un point de vue de la durée.

Enfin, des analogues d'acides nucléiques, plus précisément, les PNAs (peptide nucleic acids) ont été développés en 1991 (Nielsen et al., 1991). Ces molécules ont été conçues pour des analyses de liaison avec l'ADN et s'utilisent en cytogénétique moléculaire depuis

quelques années. La technique PNA-FISH, élaborée en 2001, permet de réaliser un marquage de 3 chromosomes en une seule étape (Taneja et al., 2001). L'équipe de Pellestor et al. a ensuite adapté cette technique au marquage in situ des spermatozoïdes (Pellestor et al., 2003). Cette nouvelle approche peut se révéler intéressante mais elle n'est pas encore utilisée classiquement en routine.

Ceci étant, la grande majorité des laboratoires utilise la FISH qui est la technique de référence pour l'étude du contenu chromosomique des spermatozoïdes.

d) Fragmentation de l'ADN spermatique :

Comme nous le savons, les techniques d'AMP ont permis une avancée extraordinaire dans le traitement symptomatique des infertilités. Le succès de ces techniques dépend d'une multitude de facteurs dont certains ont été abordés précédemment. Avec l'utilisation de l'ICSI, se pose le problème du risque de transmission de maladies génétiques. De ce fait, les chercheurs se sont davantage concentrés sur l'intégrité du génome des spermatozoïdes. L'intégrité structurale comme fonctionnelle des gamètes utilisés est bien évidemment primordiale. Au départ, les scientifiques pensaient que le développement préimplantatoire précoce était presque uniquement sous influence maternelle et que c'était donc principalement la qualité de l'ovocyte qui importait. Au début des années 1990, des chercheurs ont montré que la mauvaise qualité spermatique était souvent associée à une morphologie embryonnaire médiocre et à de faibles pourcentages de grossesses évolutives (Ron-el et al., 1991). L'équipe de Ménézo montre que la présence de paramètres spermatiques anormaux est corrélée à l'altération de la formation des blastocystes (Janny & Menezo, 1994). Il est alors devenu incontestable que la qualité des spermatozoïdes avait un rôle très important lors du développement embryonnaire. De plus, il a été mis en avant que la qualité de l'ADN des spermatozoïdes pouvait avoir un impact sur la qualité embryonnaire. Ainsi, une équipe a rapporté un taux de spermatozoïdes à l'ADN fragmenté significativement supérieur chez des patients dont le spermogramme était anormal par rapport à celui d'hommes aux paramètres spermatiques normaux (Huang et al., 2005).

d.1 Structure de l'ADN spermatique :

Dans les cellules somatiques, l'ADN s'organise en nucléosomes. Un nucléosome est constitué d'un octamère d'histones (deux histones H2A, deux H2B, deux H3 et deux H4) autour duquel la molécule d'ADN s'enroule. Deux modèles sont actuellement proposés pour décrire la structure de l'ADN compacté, soit un modèle en zigzag (Dorigo et al., 2004), soit un modèle en forme de solénoïde (Braun, 2001) (Figure 17). L'ADN du gamète mâle, support de l'information génétique à transmettre, est une longue molécule fragile fortement compactée. La chromatine d'un spermatozoïde s'organise en une superposition de boucles d'ADN que sont les super-enroulements. Celles-ci ont la forme d'un "doughnut" (beignet).

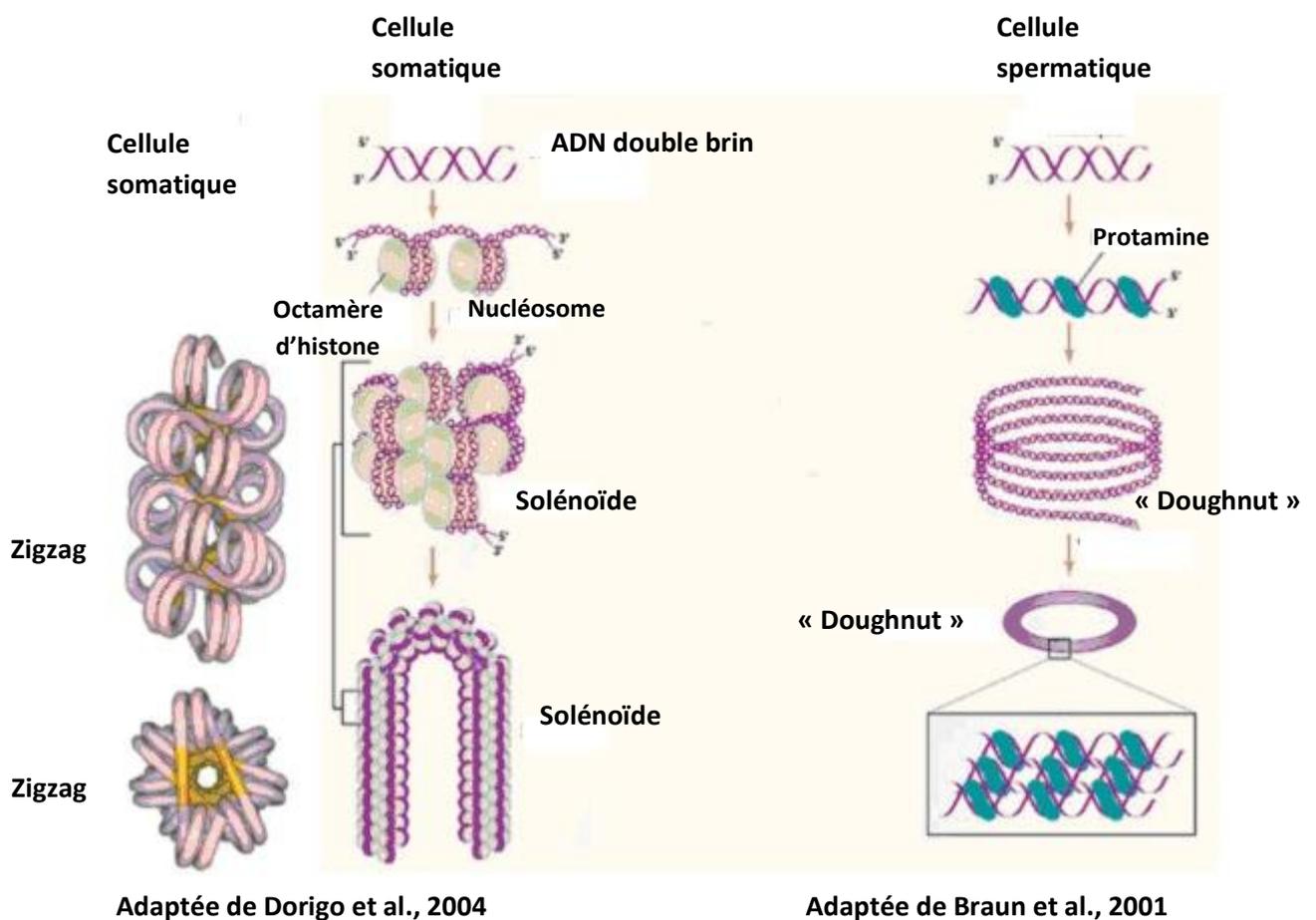


Figure 17 : Modèles de l'organisation de la chromatine dans une cellule somatique (zigzag ou solénoïde) et dans une cellule spermatique (doughnut).

C'est au cours de la spermiogenèse que les nucléoprotéines de type histones sont remplacées par une structure basée sur des protamines afin de réduire le volume nucléaire et d'augmenter significativement la compaction de l'ADN.

La chromatine des spermatozoïdes est environ six fois plus condensée que celles des cellules somatiques. Cette compaction très importante correspond à la mise en place d'une protection physique du noyau du gamète aux différentes agressions auxquelles il va être soumis tout au long de son trajet, du tube séminifère jusqu'au cytoplasme ovocytaire. Il est nécessaire que le patrimoine génétique puisse être acheminé, sans dommage, des voies masculines jusque dans les voies féminines (Manicardi et al., 1998). Au stade de la spermatide ronde, les histones sont remplacées par des protéines de transition 1 et 2 (TNP1 et TNP2 : Transition Nuclear Protein). TNP1 interviendrait dans les processus de réparation de l'ADN, TNP1 et TNP2 dans la mise en place des protamines de type 2 (PRM2). Lors du stade de l'élongation des spermatides, les protéines de transition sont remplacées par des protamines de type 1 (PRM1) et des PRM2 (Aoki et al., 2006). Les protamines sont des protéines basiques riches en arginine et en cystéine. Lors du transit des spermatozoïdes dans l'épididyme, le nombre de ponts disulfures est augmenté au niveau des résidus cystéine des protamines. Environ 95% des groupements thiols (-SH) portés par la cystéine sont oxydés. Cela conduit à la formation de cystine qui consiste en l'union de deux molécules de cystéine par un pont disulfure, ce qui permet une stabilisation supplémentaire de la structure nucléaire. Ce compactage très important est responsable de la perte de la possibilité pour l'ADN spermatique de se répliquer et d'être réparé (Roux et al., 2004).

Au final, dans les spermatozoïdes humains matures, environ 15% d'histones persistent dans le noyau (Braun, 2001) et plus de 70% des protéines nucléaires basiques sont des protamines (Sergerie et al., 2005a).

d.2 Origines de la fragmentation de l'ADN spermatique :

La spermatogenèse est un processus complexe qui consiste en la prolifération des cellules germinales puis en la différenciation des spermatogonies en spermatozoïdes matures. Tout au long de ce processus, la chromatine des gamètes est susceptible d'être altérée. Habituellement, le taux de fragmentation est faible dans la plupart des spermatozoïdes. Après fécondation, l'ovocyte peut contribuer à réparer ces coupures anormales, sous réserve qu'elles se trouvent dans une proportion raisonnable. Pour des raisons diverses et sans doute pas toutes répertoriées aujourd'hui, il peut arriver que les brins de l'ADN spermatique se coupent de manière excessive : cela se traduit par une augmentation du taux de fragmentation de l'ADN. Trois théories principales sont proposées pour tenter d'expliquer ces dommages.

Une première hypothèse concerne la compaction de l'ADN des spermatozoïdes matures. En règle générale, plus des deux tiers de la chromatine des spermatozoïdes sont très compactés grâce aux protamines. La compaction chromatinienne des spermatozoïdes requiert des endonucléases comme la Topoisomérase II qui aide au remplacement des histones par des protamines en générant des cassures dans l'ADN. Ces dernières sont nécessaires pour libérer les super-enroulements de la chromatine (McPherson & Longo, 1993). Seulement 15% de l'ADN est moins fortement condensé car la compaction s'opère grâce à des histones. Un dysfonctionnement de la Topoisomérase II pourrait entraîner un taux anormal de fragments d'ADN non réparés (McPherson & Longo, 1993).

Certains hommes infertiles ont un ratio histone : protamine supérieur à celui des hommes fertiles. La compaction chromatinienne devient donc plus faible à cause d'une sous-protamination. Cette compaction moindre serait susceptible d'augmenter la sensibilité de l'ADN des spermatozoïdes à des stress extérieurs, l'ADN étant moins bien protégé, il en résulterait des cassures endogènes. En 2001, une équipe met en évidence une déficience complète des protamines chez 5 à 15% d'hommes infertiles (Carrell & Liu, 2001). En 2005, une étude montre un lien entre la déficience en protamines dans l'ADN des gamètes masculins et les altérations présentes dans l'ADN de ces spermatozoïdes (Nasr-Esfahani et al., 2005). En 2006, Aoki et al. constatent que les spermatozoïdes présentant un faible taux de protamines ont une viabilité diminuée et une susceptibilité augmentée de leur ADN à être endommagé (Aoki et al., 2006).

La seconde théorie susceptible d'expliquer la présence de dommages dans l'ADN des spermatozoïdes éjaculés concerne la production de substances oxygénées réactives (SOR). Celles-ci sont des agents oxydants dont le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion superoxyde (O_2^-) et les radicaux libres. Les SOR sont connus pour avoir un effet délétère sur la majorité des tissus et donc sur les cellules qui les constituent. En effet, les SOR sont impliquées, par exemple, dans des cancers ou des problèmes vasculaires. Cependant, vers le début des années 1990, des chercheurs ont découvert que de faibles concentrations en SOR, produites au moment opportun, pouvaient jouer des rôles importants dans des cascades de transduction de signaux. Nous savons maintenant que les SOR jouent un rôle physiologique très important dans la différenciation et les fonctions des spermatozoïdes. Les SOR sont nécessaires pour que les spermatozoïdes acquièrent certaines compétences. Il est prouvé que l' O_2^- , le H_2O_2 et le monoxyde d'azote (NO) sont trois SOR qui ont un rôle dans l'activation des spermatozoïdes (de Lamirande & Gagnon, 1993; Herrero et al., 2003; Thundathil et al., 2003; de Lamirande

& O'Flaherty, 2008) ; ceci n'est probablement pas exhaustif mais aucune étude ne prouve clairement le rôle d'autres SOR à l'heure actuelle.

Les spermatozoïdes ont deux fonctions, à savoir acheminer le contenu génétique paternel jusqu'à l'ovocyte, grâce à la mobilité que lui confère son flagelle, et se lier à l'ovocyte, puis le féconder. Le processus de capacitation est un pré-requis indispensable pour la réaction acrosomiale, réaction de libération d'enzymes hydrolytiques permettant au spermatozoïde de traverser la zone pellucide de l'ovocyte pour le féconder. Ainsi, de nombreux changements cellulaires se produisent à des moments et des endroits précis lors du processus de capacitation, comme des modifications lipidiques pour augmenter la fluidité membranaire, des afflux de calcium dans la tête et le flagelle du spermatozoïde et une production de quantités contrôlées de SOR. D'autre part, dans le liquide séminal, le spermatozoïde se déplace de façon linéaire. Lors de la capacitation au cours de la migration dans les voies génitales féminines, cette mobilité augmente. Cette hyperactivation dont le(s) mécanisme(s) n'est pas encore exactement connue, contrôlée par des SOR, ferait intervenir une augmentation des phosphorylations des protéines du flagelle. Quant à la réaction acrosomiale, c'est un processus complexe qui demande également des modifications cellulaires comme des afflux de calcium ou la production de SOR. Toutefois, les agents déclencheurs et/ou la cinétique sont différents de ceux nécessaires à la capacitation. La réaction acrosomiale est régulée par des réactions d'oxydo-réduction mais les mécanismes précis par lesquelles les SOR ont un impact sur cette réaction ne sont pas connus (de Lamirande & O'Flaherty, 2008). La quantité de SOR générées est contrôlée par des antioxydants présents dans le liquide séminal des hommes fertiles. Les effets délétères que peuvent engendrer les SOR sont, par exemple, une augmentation des cassures simple et double brin de l'ADN. L'anion superoxyde et le radical hydroxyl (OH^\cdot) ont des effets mutagènes et peuvent être la source de cassures ou de mutations chromosomiques (Pons-Rejraji et al., 2009).

Les spermatozoïdes de morphologie anormale, tout particulièrement ceux présentant des résidus cytoplasmiques (Tremellen, 2008) ainsi que les leucocytes, seraient la source principale d'une production excessive de SOR. Les dommages de l'ADN résultent plus de l'augmentation de la production de SOR que de la diminution de la capacité des agents antioxydants à jouer leur rôle protecteur. De plus, il peut y avoir une production de spermatides avec une mauvaise protamination. Un nombre insuffisant de ponts disulfures au niveau des thiols conduisant à une diminution de la compaction de la chromatine entraîne alors une vulnérabilité plus importante de l'ADN aux cassures pouvant être induites par les SOR (Ozmen et al., 2007).

La troisième hypothèse concernerait le rôle de l'apoptose au cours de la spermatogenèse. L'apoptose est une mort cellulaire programmée nécessaire notamment pour l'homéostasie cellulaire, c'est-à-dire, l'équilibre entre la prolifération cellulaire et la mort de certaines cellules. Au cours de la spermatogenèse, se produisent des divisions mitotiques et méiotiques ainsi que la transformation des spermatogonies en spermatozoïdes. Cette expansion de cellules germinales doit nécessairement être contrôlée. L'apoptose intervient dans le maintien du nombre de cellules germinales par rapport au nombre de cellules de Sertoli. Des cellules germinales sont éliminées par apoptose pour qu'il n'y en ait pas plus que ne peuvent en supporter les cellules de Sertoli. Pour les uns, dans des conditions normales de spermatogenèse, plus de la moitié des cellules germinales qui pourraient devenir matures serait perdue et la plupart d'entre elles seraient éliminées lors d'une apoptose des spermatogonies (Dunkel et al., 1997). Pour les autres, plus de 75% des cellules de la spermatogenèse seraient éliminées par ce processus (O'Brien & Zini, 2005).

La mort apoptotique possède certaines caractéristiques comme la chute du potentiel de membrane mitochondrial, l'activation de caspases, la perte de la distribution symétrique de la phosphatidylsérine (PS) de la membrane plasmique, la condensation de la chromatine ainsi que la fragmentation du noyau. La cellule est ensuite détruite en petites structures appelées corps apoptotiques. A la surface de ces derniers se trouvent des résidus phosphatidylsérines reconnaissables par les macrophages qui les phagocytent. Aucune réaction inflammatoire n'est produite lors de ce processus. Ces caractéristiques apoptotiques identiques à celles trouvées dans les cellules somatiques ont été mises en évidence dans les cellules germinales ainsi que dans les spermatozoïdes éjaculés. L'apoptose pourrait permettre l'élimination des spermatozoïdes éjaculés anormaux et potentiellement néfastes (Gorczyca et al., 1993).

D'après les marqueurs et les voies connus de l'apoptose dans les cellules somatiques, une représentation schématique par extrapolation en a été faite par une équipe lilloise (Marchetti & Marchetti, 2005). Les voies extrinsèques débutent par un engagement des récepteurs de mort dont Fas qui serait présent à la surface des spermatozoïdes humains. De plus, un taux relativement bas de spermatozoïdes exprimant Fas à leur surface a été mesuré chez des hommes dont les paramètres spermatiques étaient normaux. Au contraire, chez des hommes aux paramètres anormaux, les taux peuvent aller jusqu'à 50% signant une clairance anormale des spermatozoïdes via l'apoptose. Ce facteur pourrait contribuer à l'infertilité (Sakkas et al., 1999).

Après l'engagement de récepteurs de mort cellulaire, s'ensuit une activation des caspases 8 puis 3, avant l'étape de fragmentation de l'ADN. Les mitochondries sont également impliquées car elles libèrent des facteurs pro-apoptotiques qui activent la caspase 3, conduisant à la fragmentation de l'ADN. Lorsque les mitochondries sont impliquées, il y a une chute caractéristique de leur potentiel de membrane (Figure 18).

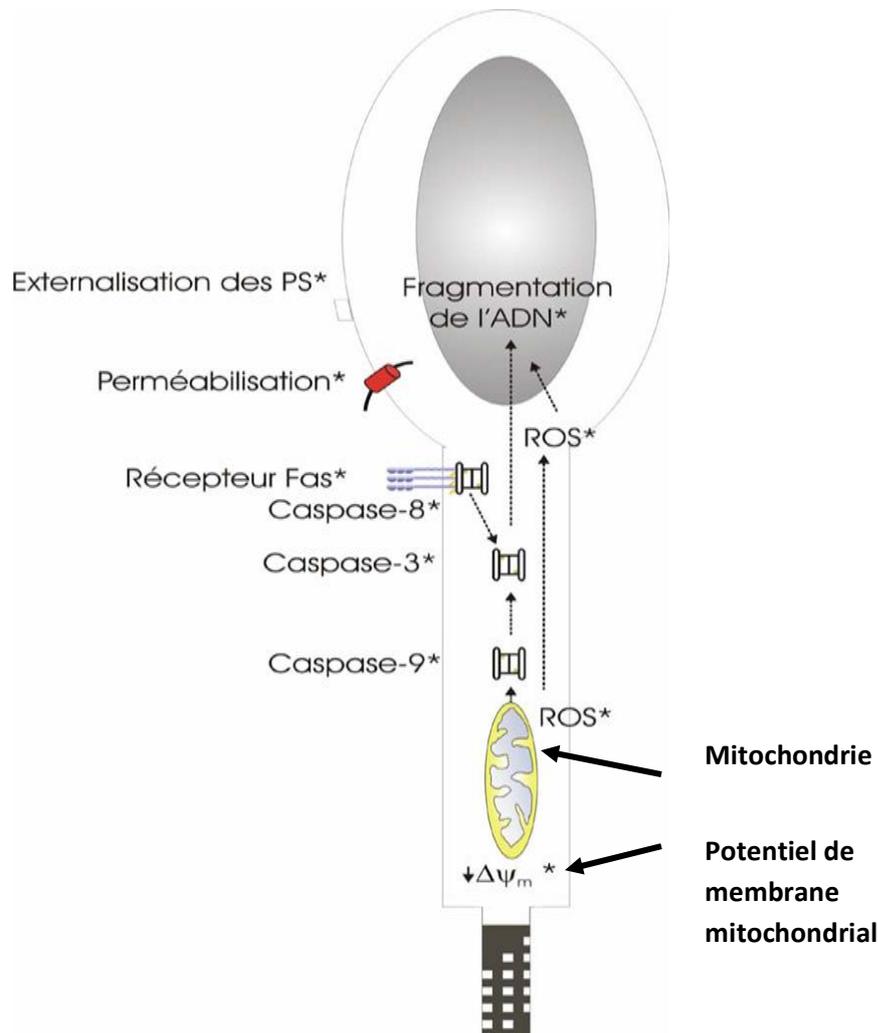


Figure 18: Représentation schématique des voies apoptotiques hypothétiques pouvant être présentes dans les spermatozoïdes éjaculés de patients infertiles, adaptée de Marchetti & Marchetti, 2005.

La présence dans un éjaculat de spermatozoïdes montrant des traits apoptotiques ainsi qu'une fragmentation de l'ADN suggérerait qu'un processus d'apoptose a été déclenché mais que celui-ci n'a pu aller jusqu'à son but ultime, cela a été décrit comme le processus d'apoptose abortive (Figure 19) (Sakkas et al., 1999). La figure 19a schématise une spermatogonie B normale et une autre présentant Fas. Celle-ci est donc éliminée par apoptose. Au final, deux spermatozoïdes normaux sont formés. Les paramètres spermatiques de cet

homme sont normaux. La figure 19b schématise deux spermatogonies B présentant le récepteur Fas, l'une est bien éliminée par apoptose, l'autre échappe à ce processus et continue ses divisions cellulaires. Au stade spermatocyte primaire, les deux cellules formées portent le récepteur Fas, l'une est détruite, l'autre poursuit ses divisions pour former deux spermatocytes secondaires. Là encore, le récepteur Fas est présent sur les deux cellules mais l'une des deux échappe à la "destruction". Cette cellule survivante aboutit à la formation de deux spermatides, toutes deux portant Fas. L'une est éliminée, l'autre poursuit sa maturation en un spermatozoïde possédant Fas, présentant des dommages de son ADN mais vivant. Les paramètres spermatiques de cet homme sont altérés.

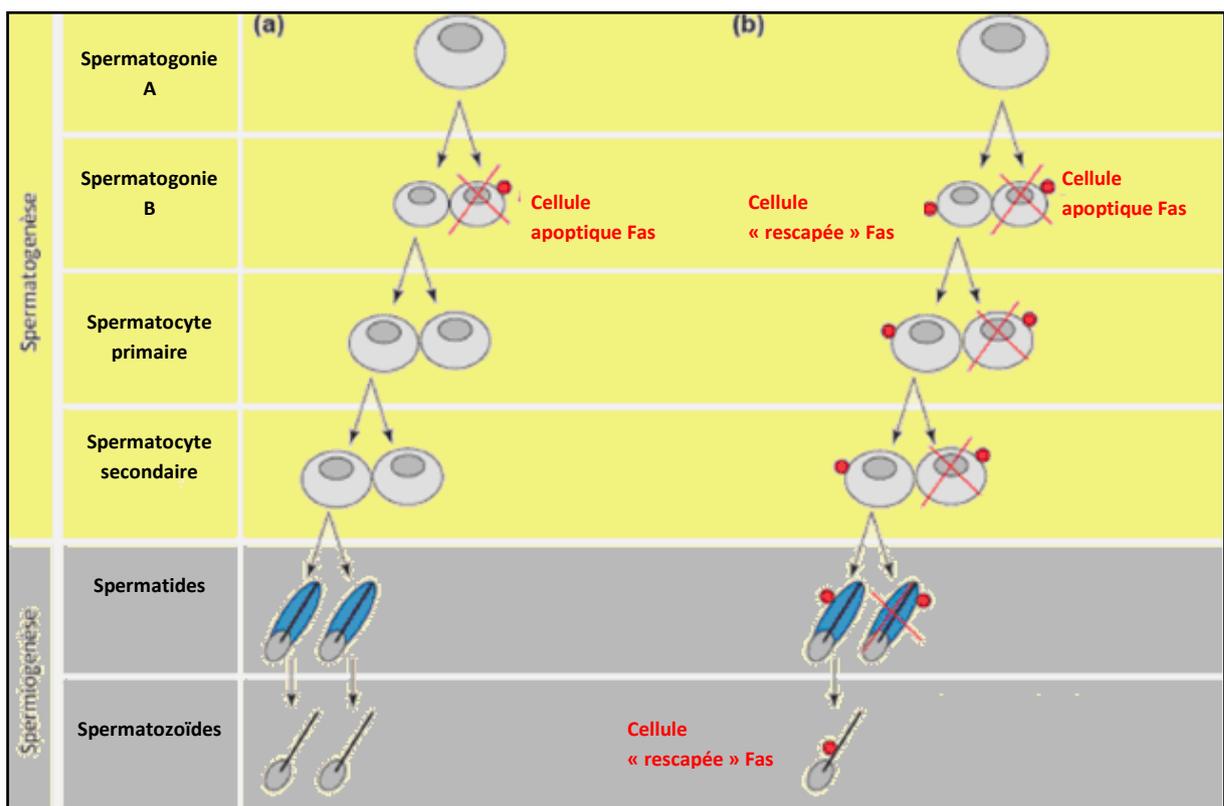


Figure 19 : Rôle hypothétique de Fas au cours de la spermatogenèse chez des hommes aux paramètres spermatiques normaux (a) et anormaux (b), adaptée de Sakkas et al., 1999.

La signification de la présence de ces traits apoptotiques reste très largement contestée puisque des cellules transcriptionnellement inactives ne devraient pas pouvoir déclencher une réaction apoptotique (Marchetti & Marchetti, 2005). La place et l'intérêt des marqueurs apoptotiques dans l'exploration de l'infertilité masculine ne sont pas clairement établis. En effet, les connaissances d'aujourd'hui sur les voies apoptotiques reposent sur les expériences réalisées sur des cellules somatiques. Rien ne permet actuellement d'affirmer que les

spermatozoïdes subissent un processus apoptotique et peut-être que s'ils en subissent un, ce processus utilise des voies tout à fait différentes de celles répertoriées pour les cellules somatiques.

d.3 Techniques d'évaluation de l'intégrité de la molécule d'ADN :

d.3.1 Evaluation de l'intégrité membranaire

Les altérations membranaires sont caractéristiques du processus d'apoptose. La phosphatidylsérine (PS) a un rôle important dans la fusion membranaire, la reconnaissance cellulaire et l'apoptose. Dans les cellules vivantes, il y a une asymétrie membranaire de la PS dépendante du taux de calcium (Ca^{2+}) intracellulaire. La localisation sur la face interne est associée à un faible taux de calcium intracellulaire. Dans les cellules somatiques, une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire in vitro peut induire une apoptose cellulaire en faisant intervenir des translocases Ca^{2+} -dépendantes. En induisant une modification de l'asymétrie membranaire, accompagnée de l'externalisation de la PS, le processus apoptotique permet la reconnaissance de la cellule et son élimination par les cellules phagocytaires. Le passage de la PS en dehors de la cellule permet l'envoi d'un signal destiné aux macrophages environnants. L'annexine V se lie spécifiquement à la PS extériorisée. Ainsi, l'annexine V peut être utilisée pour détecter l'apoptose à un stade précoce du processus apoptotique. En effet, le passage de la PS vers les membranes externes précéderait la fragmentation de l'ADN.

L'annexine V peut également rentrer dans une cellule après perméabilisation accrue de la membrane plasmique lorsque la cellule devient nécrotique. Ainsi, certains ont étudié des spermatozoïdes en faisant un double marquage d'une part, par l'annexine V couplée à un fluorochrome et d'autre part, par l'iodure de propidium (IP) qui indique s'il y a une perméabilité membranaire. Ainsi, il est possible de distinguer :

- des spermatozoïdes viables (normalement imperméable à l'IP) (annexine V- ; IP-)
- des spermatozoïdes morts mais sans externalisation de PS (annexine V- ; IP+)
- des spermatozoïdes nécrotiques (annexine V+ ; IP+)
- des spermatozoïdes viables mais avec des altérations membranaires apoptotiques (annexine V+ ; IP-)

Cette dernière population est plus fréquente dans les éjaculats d'hommes infertiles que chez les hommes fertiles (Moustafa et al., 2004; Brugnon et al., 2006).

d.3.2 Evaluation de l'intégrité de l'ADN spermatique :

Les techniques permettant d'évaluer la qualité de l'ADN spermatique ont pour objectif l'identification des patients ayant un taux important d'anomalies de l'ADN nucléaire de leurs spermatozoïdes. Le but ultime est d'expliquer l'infertilité des couples et de réussir à déterminer un seuil de fragmentation au-dessus duquel la réussite d'une technique d'aide médicale à la procréation est fortement compromise.

L'analyse des gamètes se fait au microscope à épifluorescence ou peut se faire avec un cytomètre de flux (premier appareil développé par Göhde, 1968). L'analyse se fait selon un mode binaire, la chromatine des gamètes est altérée ou intacte.

Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) :

Le test de sperm chromatin structure assay (SCSA) est basé sur le fait que la chromatine spermatique anormale est plus susceptible de se dénaturer après un traitement in situ par une solution acide et/ou par la chaleur, qu'une chromatine intacte (Darzynkiewicz et al., 1975; Evenson et al., 1980; Evenson et al., 1985). La technique SCSA utilise les propriétés métachromatiques de l'acridine orange. L'analyse se fait grâce à un cytomètre de flux qui mesure le ratio entre la fluorescence rouge (simple brin d'ADN dénaturé) et la fluorescence verte (ADN double brin) (Figure 20). Un coefficient appelé DFI (DNA fragmentation index) est calculé par la relation suivante : $\text{Fluorescence rouge} / (\text{Fluorescence rouge} + \text{verte})$ (Roux et al., 2004). Un DFI de 0,1 ou de 0,9 signe, respectivement, un ADN non dénaturé ou très dénaturé. La cytométrie de flux permet d'étudier rapidement un grand nombre de spermatozoïdes, cependant, les prélèvements spermatiques avec une faible numération ne peuvent pas être analysés.

Les résultats obtenus à l'aide de la technique SCSA ne sont que faiblement corrélés aux paramètres de l'OMS à savoir la concentration, la mobilité et la morphologie (Evenson et al., 1991). Ce test paraît donc être un outil diagnostique supplémentaire dans l'exploration de l'infertilité masculine (Larson et al., 2000).

Il a été proposé un seuil de DFI aux environs de 30% à partir duquel le taux de fécondité serait diminué (Evenson et al., 1999; Boe-Hansen et al., 2006).

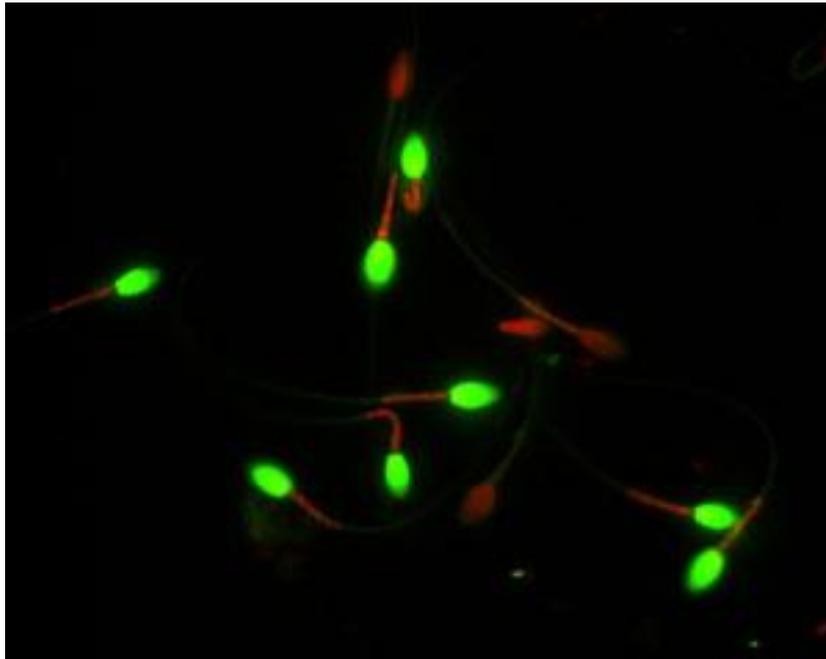


Figure 20 : Photo montrant des spermatozoïdes après Sperm Chromatin Structure Assay. Les gamètes avec fluorescence rouge (ADN fragmenté) et les gamètes avec fluorescence verte (ADN non fragmenté) (Evensen, 2016).

Test à l'acridine orange (AO) :

L'acridine orange s'intercale dans l'ADN natif (double brin) et émet une fluorescence verte (515-530 nm). Il peut également se fixer sur l'ADN simple brin ou dénaturé. Dans ce cas, l'acridine orange émet une fluorescence rouge-orangé (>630nm) (Figure 21). La coloration à l'acridine orange a été appliquée aux frottis de sperme en 1984 (Tejada et al., 1984). Le principe est donc tout à fait identique à la technique SCSA en dehors du fait que le test à l'acridine orange ne requiert pas un cytomètre de flux, l'analyse se fait à l'aide d'un microscope à épifluorescence. Plus la chromatine est condensée, plus l'intensité fluorescente diminue, c'est pourquoi un spermatozoïde émet une fluorescence moins forte (5 fois moins) qu'une cellule diploïde ou que des spermatides rondes (Roux et al., 2004). Cette méthode est peu utilisée car elle est moins sensible que la technique SCSA ou TUNEL dans l'évaluation de la fragmentation de l'ADN (Chohan et al., 2006; Martins et al., 2007).

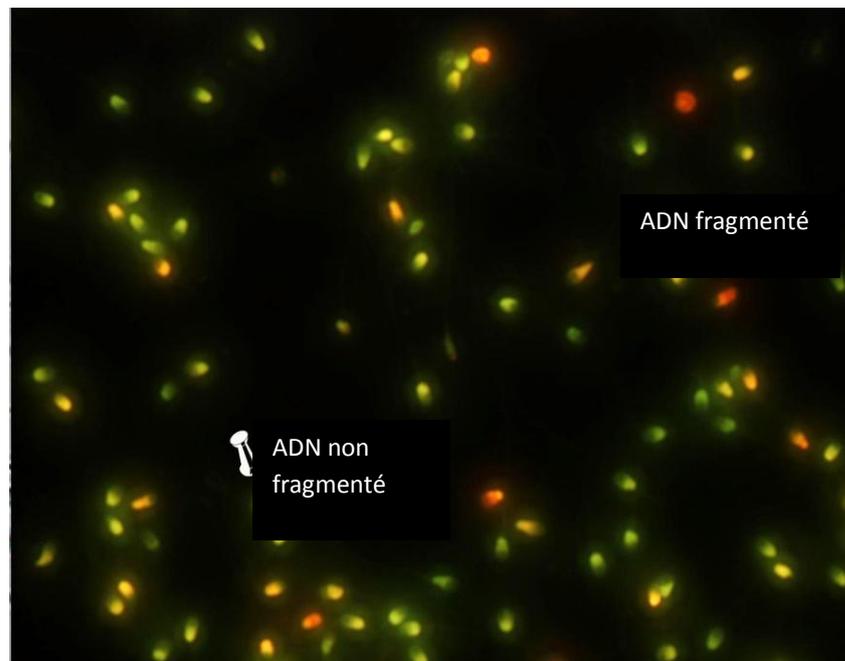


Figure 21 : Photo montrant des spermatozoïdes après Test à l'acridine orange. Les gamètes avec fluorescence rouge-orangé (ADN fragmenté) et les gamètes avec fluorescence verte (ADN non fragmenté)

Technique Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) dite COMET :

La technique SCGE a été décrite la première fois en 1988 pour évaluer les dommages de l'ADN des cellules dus à divers facteurs comme les radiations par ultraviolets, la radiothérapie (Singh et al., 1988). Cette méthode consiste à détecter des cassures dans les brins d'ADN des cellules à étudier. Adaptée à l'analyse des spermatozoïdes (Singh et al., 1989), cette technique consiste à mélanger le sperme avec de l'agarose légèrement chauffé. Le tout est déposé sur une lame. Les cellules sont ensuite lysées. La lyse peut être alcaline ($\text{pH} > 10$), elle dénature alors l'ADN spermatique. Des cassures simple et double brin sont décelées (Morris et al., 2002 ; Collins, 2004 et Speit et al., 2009). Quelques modifications de la technique faites en 1991 ont permis d'obtenir une détection des cassures double brin uniquement (Olive et al., 1991). La technique COMET, à $\text{pH} 7$, est plus adaptée à la mise en évidence de dommages de l'ADN liés à une infertilité puisque ces conditions neutres ne dénaturent pas l'ADN contrairement au pH alcalin (Andrabi, 2007).

Après l'étape de lyse, les gamètes sont soumis à une électrophorèse. Si un spermatozoïde est soumis à un champ électrique, l'ADN sans cassure reste dans les têtes spermatiques de par son haut poids moléculaire. Au contraire, si l'ADN a des cassures, il migre et sort petit à petit de la tête spermatique et donne ainsi l'aspect d'une comète (d'où le nom de la technique).

Après marquage des spermatozoïdes par un colorant fluorescent, l'intensité de la fluorescence et la longueur de la queue de la comète, proportionnelles aux cassures des brins de l'ADN des gamètes, sont analysées (Figure 22). Si la lyse est alcaline, l'augmentation de la longueur de la queue de la comète ne résulte pas seulement des cassures préexistantes dans l'ADN mais elle est également due à la présence de sites sensibles aux attaques alcalines.

Les résultats obtenus par la technique COMET ont été utilisés comme facteur prédictif de la qualité des embryons (Tomsu et al., 2002). Un taux élevé de cassures de l'ADN a été corrélé à la faible capacité d'atteindre le stade blastocyste (Nasr-Esfahani et al., 2005), à la diminution des divisions embryonnaires après fécondation (Morris et al., 2002) et à de faibles taux de grossesse (Lewis et al., 2004). En revanche, aucune corrélation n'a été mise en avant entre les résultats obtenus par COMET et les taux de fécondation (Lewis et al., 2004; Nasr-Esfahani et al., 2005).

Enfin, même si cette technique détecte les cassures de l'ADN spermatique, il n'y a pas de standardisation de la méthodologie nécessaire à une application en routine. De fait, il n'a pas été établi de seuil à partir duquel un impact clinique existe.

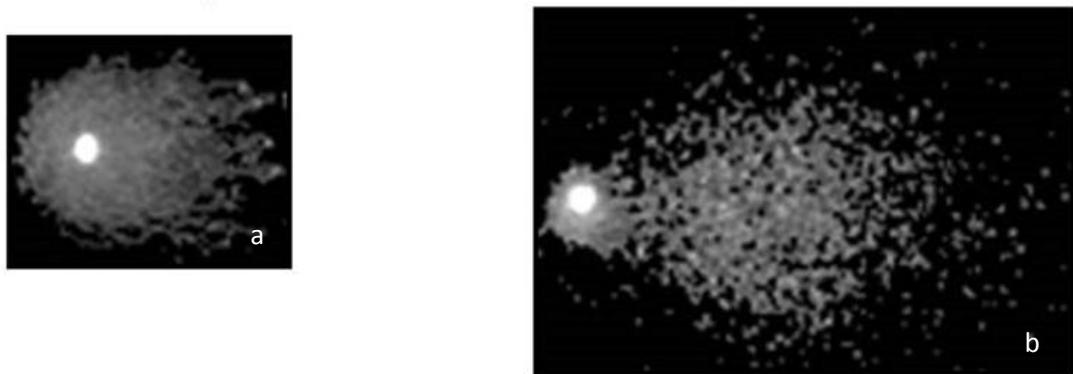


Figure 22 : Photos montrant des spermatozoïdes après la Technique Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE), a : gamète avec ADN non fragmenté, b : gamète avec ADN fragmenté (Evenson, 2016).

Sperm Chromatin Dispersion test (SCD):

En 2003, une équipe a présenté (Fernandez et al., 2003) le test SCD comme une méthode simple et peu coûteuse. Le principe de cette méthode consiste à traiter des spermatozoïdes par une solution acide puis par un tampon de lyse. L'ADN est ensuite contre-coloré au DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindol). Après ces traitements, les gamètes sans ADN fragmenté relâchent des boucles d'ADN qui forment de grands halos (Figure 23).

Au contraire, les gamètes avec un ADN fragmenté ne produisent pas ou peu de halos de dispersion (Fernandez et al., 2003). De plus, les hommes fertiles ont significativement plus de gamètes avec de grands halos que les hommes infertiles (Chohan et al., 2006). En 2008, une équipe (Meseguer et al., 2008a) a montré que le taux de fragmentation estimé par SCD est corrélé à la qualité embryonnaire après injection dans un ovocyte d'un spermatozoïde testiculaire, ainsi qu'à la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes (Velez de la Calle et al., 2008). En revanche, aucun impact sur le devenir d'une grossesse clinique n'a été mis en évidence. Cette dernière équipe a trouvé une corrélation entre le taux de spermatozoïdes avec un ADN fragmenté, quand il est supérieur à 18%, et le taux de fécondation.

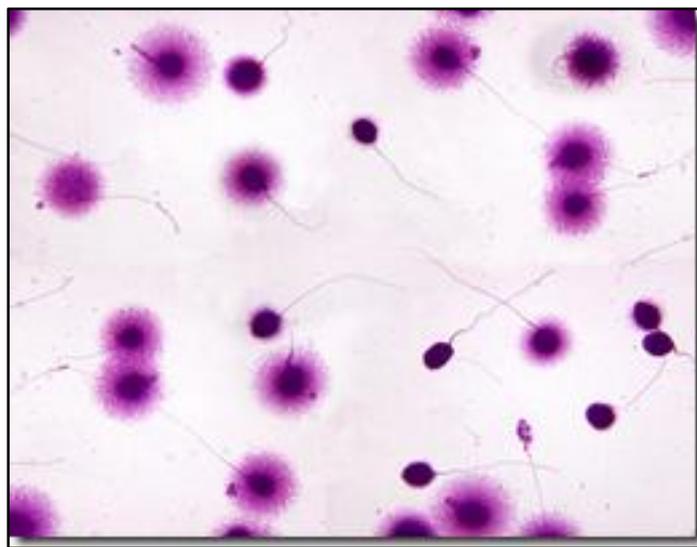


Figure 23: Photo montrant des spermatozoïdes après la Technique de Sperm Chromatin Dispersion test (SCD), grand halo : gamètes avec ADN non fragmenté, peu ou pas de halo : gamètes avec ADN fragmenté (Fernandez et al., 2003).

In situ Nick Translation assay (NT):

Le test *in situ* de cassures dans l'ADN spermatique consiste en la mesure de l'incorporation du complexe biotine-dUTP (deoxyuridine triphosphate) au niveau des points de cassure de l'ADN simple brin en utilisant l'activité de l'enzyme ADN polymérase I. Afin d'amplifier le signal obtenu, il est possible d'ajouter de l'avidine (se fixe spécifiquement sur la biotine) couplée à un fluorochrome facilement identifiable en microscopie à fluorescence (Sergerie et al., 2005a). L'utilisation de cette technique a été assez restreinte notamment par le fait qu'aucun seuil n'a été déterminé comme étant discriminant entre les hommes infertiles et les hommes fertiles.

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick- End Labeling assay (TUNEL):

Le TUNEL a été développé en 1992 pour étudier l'apoptose des cellules somatiques (Gavrieli et al., 1992). La technique a ensuite été adaptée pour les spermatozoïdes (Sailer et al., 1995). Dans les cellules somatiques, il se produit des cassures de l'ADN par action d'endonucléases lors du processus apoptotique. Les cassures induisent des libérations d'extrémités 3'-OH (Gorczyca et al., 1993). Cette technique utilise l'activité exonucléasique de la terminal deoxynucleotidyl transférase (TdT) qui catalyse l'incorporation de nucléotides triphosphates aux extrémités 3'-OH libres des doubles ou simples brins. Les nucléotides incorporés forment un oligomère composé de nucléotides couplés à la digoxygénine et de nucléotides non marqués. Des anticorps antidigoxygénine couplés à un fluorochrome sont ajoutés. Le ratio nucléotides marqués/non marqués est optimisé afin d'assurer une bonne liaison des anticorps anti-digoxygénine (Figure 24).

L'analyse de la fragmentation de l'ADN peut se faire à l'aide d'un microscope à épifluorescence ou par cytométrie de flux (si la numération spermatique n'est pas trop faible).

En 2005, Sergerie et al. ont montré que les patients infertiles ont un taux de fragmentation (mis en évidence par TUNEL) supérieur à celui des hommes fertiles. Il paraît donc être un bon indicateur de la fertilité masculine (Sergerie et al., 2005b). De plus, Tesarik et al. rapporte un taux supérieur de gamètes à l'ADN fragmenté lorsque les couples ont connu des fausses couches spontanées à répétition (Tesarik et al., 2004).

D'autre part, il a plusieurs fois été suggéré que la technique TUNEL mettait en évidence une activité apoptotique. Une équipe (Sakkas et al., 2002) a étudié le taux de gamètes fragmentés par la technique TUNEL ainsi que la présence de marqueurs apoptotiques tels que

Fas, p53 et Bcl-x chez des patients avec des paramètres spermatiques normaux et anormaux. Les auteurs trouvent une proportion de gamètes avec un ADN fragmenté et une expression plus forte de Fas et p53 chez les patients avec une faible numération spermatique et une tératozoospermie. Cependant, la fragmentation n'est pas toujours corrélée à l'expression des marqueurs apoptotiques. Les auteurs suggèrent la présence d'au moins deux populations de spermatozoïdes différentes : une population qui aurait échappé à la mort cellulaire initiée dans les testicules et une seconde population ayant eu des perturbations lors du remodelage nucléaire (remplacement des histones par les protamines) au cours de la spermiogenèse. Mais l'hypothèse selon laquelle la technique TUNEL met en évidence une activité apoptotique reste controversée. Elle permet certainement de détecter des fragmentations issues d'autres voies telle la voie nécrotique (Muratori et al., 2000; Aitken et al., 2009).

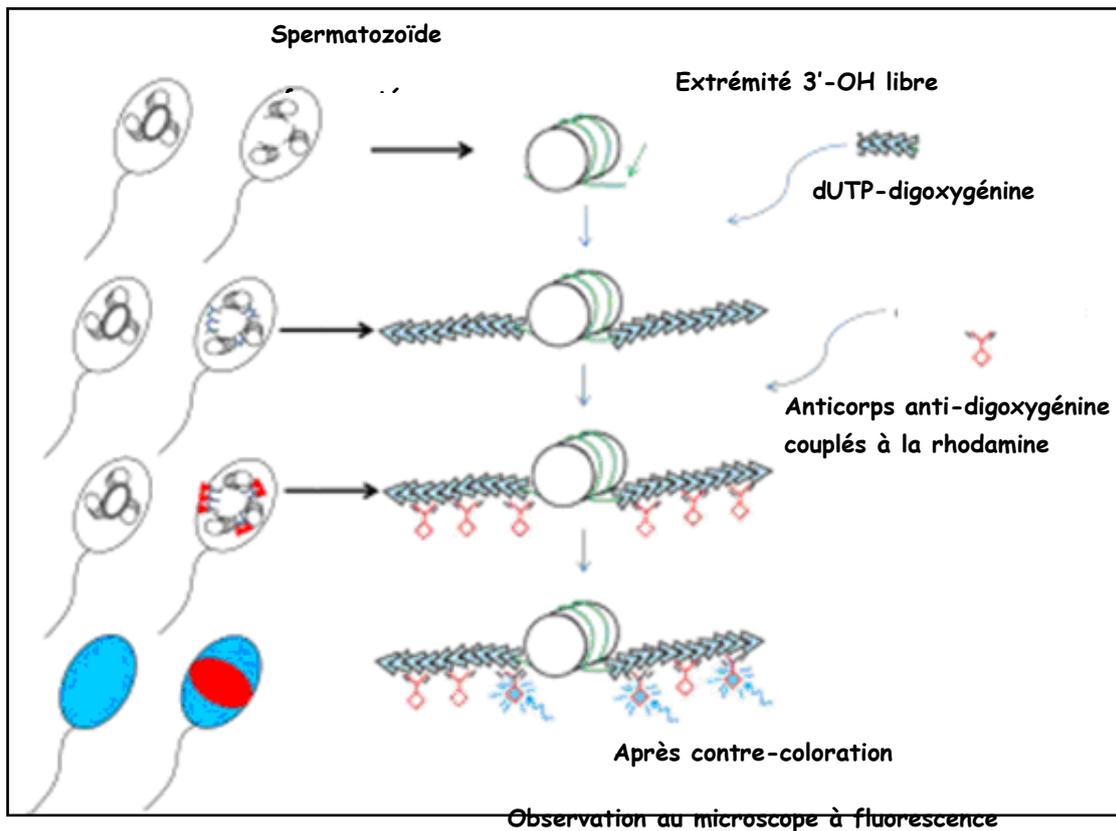


Figure 24 : Principe de la technique TUNEL, adaptée de Perrin A., 2009.

II. Traitement de l'infertilité masculine :

Si un simple traitement hormonal, une antibiothérapie ou une intervention chirurgicale ne suffit pas à rétablir la fécondité au sein du couple, des techniques d'aide médicale à la procréation (AMP) peuvent être mises en place. Ces techniques sont l'insémination artificielle (IA), la fécondation in vitro (FIV) et l'injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde dans un ovocyte (ICSI : Intra Cytoplasmic Sperm Injection).

II.1 L'insémination artificielle (IA) (Figure 25) :

C'est une technique qui permet de déposer des quantités relativement importantes de spermatozoïdes sains soit à l'entrée du col de l'utérus, soit à l'intérieur de l'utérus en passant le col, pour leur permettre d'accéder directement aux trompes de Fallope. Avant l'insémination, les spermatozoïdes subissent une préparation spéciale en laboratoire afin d'optimiser leur pouvoir fécondant. L'insémination artificielle est indiquée dans les cas de production de spermatozoïdes en nombre anormalement bas ou lorsque la proportion de spermatozoïdes sains est trop faible. Le plus souvent, le sperme utilisé est celui du conjoint (IAC) mais parfois le couple peut avoir recours à des paillettes de sperme de donneur anonyme. Il s'agira alors d'insémination artificielle avec donneur (IAD).

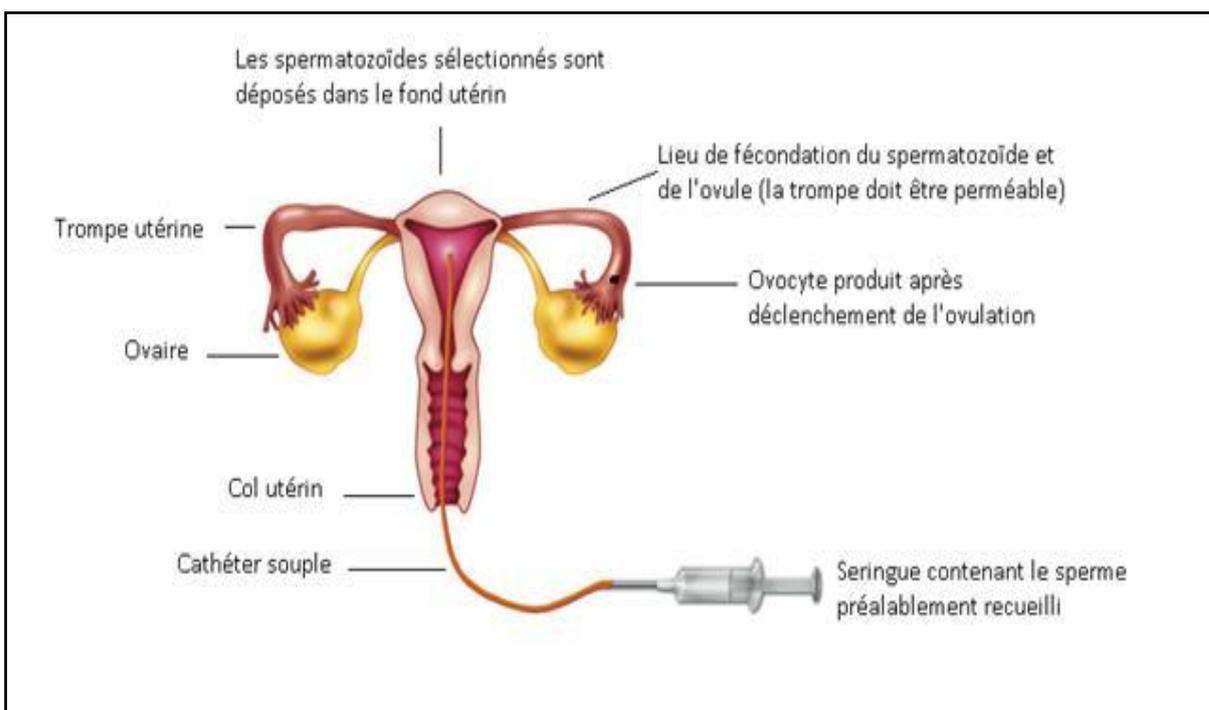


Figure 25 : L'insémination intra-utérine (IIU)

II.2 La fécondation *in vitro* (FIV) (Figure 26) :

Depuis la naissance de Louise Brown le 25 juillet 1978 après fécondation *in vitro* (Steptoe & Edwards, 1978), la pratique de cette technique s'est répandue partout dans le monde.

Elle consiste à reproduire au laboratoire ce qui se passe naturellement dans les trompes de Fallope : la fécondation et les premières étapes du développement embryonnaire.

Elle se déroule selon la chronologie suivante :

- La stimulation ovarienne,
- Le prélèvement des ovocytes,
- La fécondation *in vitro* proprement dite,
- Le transfert des embryons dans l'utérus.

La stimulation des ovaires va permettre le développement de plusieurs follicules. La ponction de ces derniers, faite juste avant l'ovulation, permet le recueil de plusieurs ovocytes. Ces ovocytes sont ensuite mis avec les spermatozoïdes du conjoint, dans un incubateur à CO₂ à 37°C. Au bout de 48 heures, des embryons à 2 ou 4 cellules sont obtenus. Un ou deux seront alors replacés dans l'utérus (transfert) où ils s'implanter et effectuer leur nidation.

Cette technique permet de court-circuiter les trompes (stérilités tubaires) et de rapprocher les spermatozoïdes des ovocytes (infertilités masculines peu importantes).

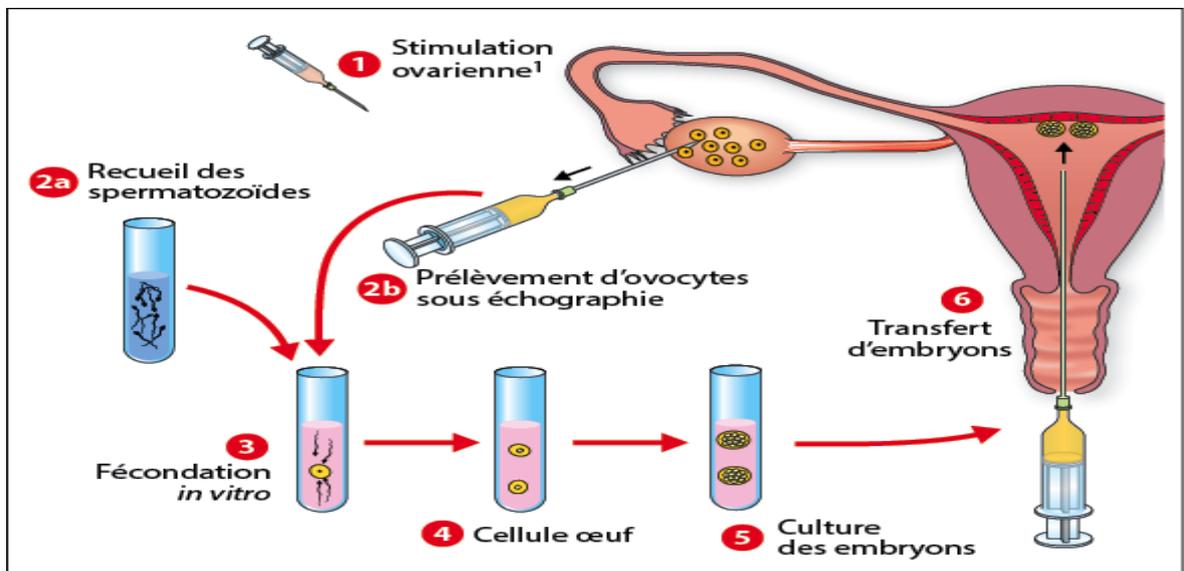


Figure 26 : Fécondation In Vitro

II. 3 Injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde (ICSI) :

Cette technique, appelée ICSI, permet de pallier certaines anomalies des spermatozoïdes qui les empêchent de féconder.

En effet, pour féconder l'ovocyte le spermatozoïde doit se fixer sur une coque qui entoure l'ovocyte, la zone pellucide. Grâce à des enzymes contenues au niveau de sa tête ([acrosome](#)), le spermatozoïde va traverser la zone pellucide et pénétrer dans l'ovocyte. Pour que cette fécondation soit possible, il est nécessaire que les spermatozoïdes soient en nombre suffisant, qu'ils soient mobiles et qu'ils aient une morphologie normale. Dans certaines infertilités masculines, ces conditions ne sont pas remplies et les spermatozoïdes ne peuvent pas spontanément féconder l'ovocyte. Dans ces cas-là, on peut injecter directement, à l'aide d'une micro-pipette, un spermatozoïde dans l'ovocyte (Figure 27), ce qui augmente les chances d'obtenir des embryons (ovocytes fécondés). La micro-injection est réalisée à l'aide d'un microscope équipé de micromanipulateurs (Figure 28). Cette intervention se fait au laboratoire après un traitement de [stimulation ovarienne](#) et une ponction des ovocytes identiques à une fécondation in vitro. De même, le transfert et la [congélation](#) des embryons sont identiques à ceux d'une FIV.

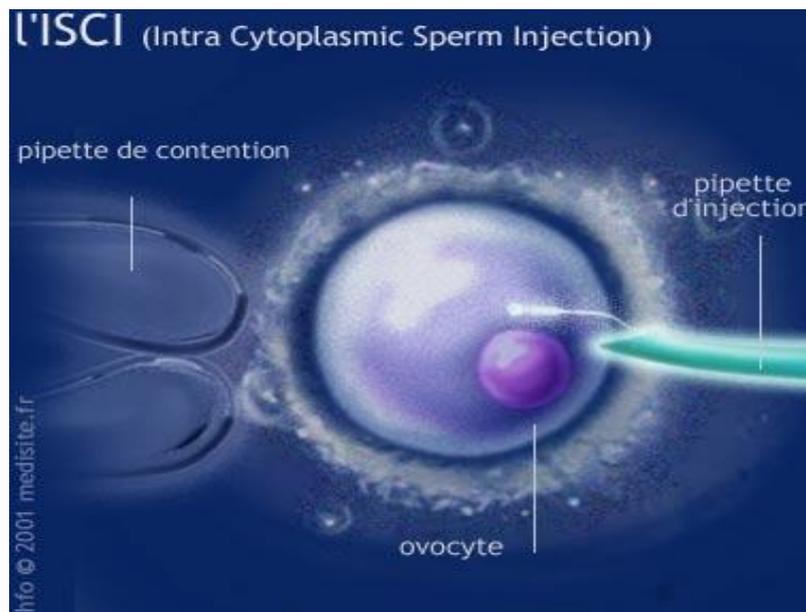


Figure 27 : micro- Injection d'un spermatozoïde dans l'ovocyte



Figure 28 : Poste de micromanipulation pour ICSI

Selon les situations, des examens biologiques plus approfondis, en particulier génétique, doivent être réalisés avant de recourir à cette nouvelle technique de procréation assistée.

Lors de cette technique de fécondation, le choix du spermatozoïde, crucial pour le succès de l'ICSI, se fait uniquement selon des critères morphologiques et de mobilité. Les examens consistant à évaluer la qualité d'un spermatozoïde n'apportent pas certaines informations pourtant essentielles, comme la qualité nucléaire du spermatozoïde ou encore l'équipement chromosomique. Jusqu'en 2002, la sélection d'un spermatozoïde n'était possible qu'à un grossissement de x200/400. Pour améliorer ce type d'analyse, des équipes ont essayé de mettre au point un système d'analyse de la morphologie des spermatozoïdes (Davis et al., 1992; Kruger et al., 1995) en définissant des critères stricts à prendre en compte. Puis en 2002, un nouveau procédé, permettant un grossissement de x6600, le MSOME (motile sperm organellar morphology examination) a été publié (Bartoov et al., 2002). Ce procédé a été appliqué pour le choix d'un spermatozoïde lors d'une technique d'ICSI. Ce nouveau type d'ICSI a été appelé IMSI (intracytoplasmic morphologically selected sperm injection). En 2003, cette équipe a montré que l'utilisation de l'IMSI par rapport à l'ICSI permettait une augmentation de la fréquence des grossesses (respectivement 66,0% versus 30,0%) chez des couples ayant eu préalablement au moins deux échecs d'ICSI (Bartoov et al., 2003). Ces résultats ont été confirmés par une équipe italienne qui a obtenu un taux de grossesses

cliniques significativement augmenté avec l'IMSI (39,2%) par rapport à l'ICSI (26,5%). L'étude a porté sur 446 couples (Antinori et al., 2008).

Indications de la FIV / ICSI

D'après l'ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology), l'absence bilatérale de perméabilité tubaire représente une indication absolue pour la FIV. D'autres indications sont représentées par une perméabilité tubaire douteuse, une endométriose, des altérations modérées des caractéristiques du sperme, une infertilité inexplicée ou l'échec de plusieurs cycles d'induction de l'ovulation ou d'inséminations artificielles. La FIV devrait être proposée comme un traitement de première intention chez des femmes qui ont un âge avancé, quelle que soit la cause de l'infertilité. La FIV ne devrait pas être proposée si les caractéristiques du sperme sont très altérées, ou après plusieurs échecs de fécondation lors de tentatives antérieures (ESHRE, 2008).

D'après la Haute Autorité de Santé (HAS, 2006), les indications de l'ICSI en première intention sont une azoospermie non obstructive, une azoospermie due à l'absence bilatérale des canaux déférents et une oligoasthénotérazoospermie modérée ou sévère. Les critères de diagnostic à partir desquels la décision de choix entre FIV et ICSI est prise varient en fonction des centres. Des experts ont proposé que l'ICSI soit réalisée lorsqu'il y a moins de 500 000 spermatozoïdes progressants au total ou après préparation ou plus de 500 000 spermatozoïdes progressants au total après préparation en cas de morphologie et/ou de survie anormale.

Par ordre de préférence, les spermatozoïdes utilisés en ICSI doivent être les spermatozoïdes éjaculés, puis épидидymaires et testiculaires. Certaines études indiquent que les embryons issus de la fécondation d'un ovocyte par un spermatozoïde testiculaire ont un meilleur potentiel de développement que ceux issus d'une fécondation par un spermatozoïde épидидymaire (Steele et al. , 1999; Dozortsev et al. , 2006). D'autres présentent des résultats qui montrent le contraire (Brugnon et al. , 2010). Le recours à l'ICSI en cas de paucifécondation (nombre faible d'embryons par rapport au nombre d'ovocytes fécondables, inférieur ou égal à 20%) est justifié même sans cause masculine. De plus, si le taux d'anticorps anti-spermatozoïdes est égal ou supérieur à 80%, l'ICSI peut être réalisée d'emblée.

D'autres indications techniques impliquent le recours à l'ICSI : si une FIV ou une IAC ne peuvent être réalisées pour des raisons techniques indépendantes de la fertilité comme une disponibilité limitée des paillettes, s'il y a une altération de la qualité des spermatozoïdes en

cas d'autoconservation après décongélation, si un diagnostic préimplantatoire (DPI) est envisagé ou encore un contexte viral particulier.

Le recours à l'ICSI est indiqué en seconde intention lors d'une azoospermie obstructive acquise post-vasectomie dans un délai minimum de six mois, d'un hypogonadisme hypogonadotrope, si, après un traitement médical hormonal, le sperme continue à être de mauvaise qualité et ne permet pas de conception naturelle, ni d'IAC, ni de FIV. Une varicocèle spermatique pourrait conduire à un recours de 2ème intention à l'ICSI, mais le traitement de la varicocèle, si celle-ci est invalidante, doit être réalisé en première intention. Une azoospermie obstructive acquise des voies séminales doit faire l'objet d'un prélèvement chirurgical des spermatozoïdes avec autoconservation. Après traitement, l'ICSI ne sera réalisée qu'en cas de persistance d'une mauvaise qualité du sperme ne permettant pas de conception naturelle, ni d'IAC, ni de FIV. Dans certaines conditions, les pathologies de l'éjaculation peuvent conduire à l'utilisation de l'ICSI.

II.4 Prise en charge de l'infertilité en Algérie :

Selon le professeur Bouzekrini (chef de service de gynécologie et obstétrique de l'hôpital Parnet et président de la Société algérienne de fertilité et de contraception (Safec)), l'infertilité touche environ 15% des couples Algériens. Il estime que ces problèmes peuvent concerner aussi bien l'homme que la femme. Selon la nature du problème, différentes techniques médicales peuvent être ainsi utilisées pour aider à la procréation médicalement assistée telles que :

- *L'insémination artificielle à partir du sperme du conjoint (IAC),*
- *La fécondation in vitro (FIV),*
- *Et la micro-injection appelée aussi ICSI.*

Dès le début de la procréation médicalement assistée en Algérie, les praticiens ont trouvé des réponses adéquates en se référant à la déontologie, pour s'interdire tout acte en contradiction avec les lois de la nature. C'est ainsi qu'ils ont banni les choix relatifs au sexe et à la couleur de l'enfant.

Les contraintes éthiques de l'AMP en Algérie

D'une manière générale l'AMP soulève de très nombreux problèmes éthiques dans des sociétés laïques bien informées. Alors qu'en est-t-il de l'Algérie où non seulement il y a une absence d'information, mais où le poids des traditions et de la religion est déterminant ?

Le législateur Algérien a reconnu l'AMP comme technique médicale moderne de conception après l'**Ordonnance n° 05-02 du 27 février 2005 modifiant et complétant la loi n° 84-11 du 9 juin 1984 portant code de la famille** (annexe 4).

L'AMP a déjà été réalisée au CHU d'Hussein Dey, par le Pr Laliem et le Dr Ftouki, au début des années 90, avec neuf naissances enregistrées par la fécondation in vitro, situant ainsi déjà à l'époque, l'Algérie comme le premier pays africain à réussir cette performance et comme précurseur en la matière (Louafi, 2008).

Les centres d'AMP en Algérie :

L'AMP a trouvé un écho favorable en Algérie, elle s'est développée rapidement grâce à la multiplication des centres spécialisés en médecine de la reproduction qui sont actuellement en nombre de 18 repartis en cliniques privées et étatiques (tableau 04).

Centres	Privés	Publics	Total
Alger	8	1	9
Oran	3	1	4
Constantine	1	1	2
Annaba	1	0	1
Mostaganem	1	0	1
Ghardaïa	1	0	1
Total	15	3	18

Tableau 04 : Répartition des centres d'AMP privés et public à travers les wilayas d'Algérie (Boucif, 2014).

L'organisation et le fonctionnement de ces centres d'AMP sont définis par l'Instruction ministérielle **n°300 du 12/05/2001** (Annexe 5).

*Partie 2: Partie
Expérimentale*

I. Patients et méthodes :

I.1 Patients et témoins :

Les patients que nous avons inclus dans notre étude, sont des hommes ayant des problèmes d'infertilité, d'hypofertilité du couple ou dont la conjointe est sujette à des avortements spontanés. Au total 80 patients ont été recrutés. Un bilan de sperme a été effectué pour chacun.

Notre groupe témoin est composé d'hommes non stériles.

I.2 Méthodes :

I.2.1 Spermogramme:

Le spermogramme est l'examen clé qui permet une appréciation quantitative et qualitative du sperme. Il permet une double analyse ; l'évaluation de l'activité sécrétoire à travers la mesure du volume, de pH et de la viscosité et la production gamétique à travers la numération, mobilité et la vitalité du sperme.

a) Condition de recueil du sperme

Le patient reçoit un certain nombre d'informations et d'instructions en ce qui concerne les conditions de recueil de son sperme de manière claire pour assurer le bon déroulement et la précision de l'analyse par la suite à savoir :

- une abstinence sexuelle de 03 jours pour éviter le recueil d'un volume diminué d'éjaculat due a un délai d'abstinence plus court ou un volume contenant un dédoublement de numération avec un pourcentage élevé de spermatozoïdes morts due a une abstinence trop longue.
- le sujet doit être informé sur l'importance de la totalité de l'éjaculat, car une fraction n'est pas représentative de l'ensemble de l'éjaculat.
- le recueil se fait sur place, dans une chambre au laboratoire, destinée au prélèvement afin de limiter les risques de perte d'une partie de l'éjaculat.
- le recueil s'effectue par masturbation dans un réceptacle, à usage unique, stérile avec couvercle.

b) Examen macroscopique :

L'examen macroscopique permet d'évaluer un certain nombre de paramètres selon le protocole suivant :

▪ Liquéfaction

Dès sa réception, l'échantillon de sperme est déposé dans une étuve à 37° C pendant 30 min pour assurer sa liquéfaction. Au terme de celle-ci, l'examen est réalisé. Une liquéfaction prolongée doit être notée si l'éjaculat ne se liquéfie pas après ce délai.

▪ Couleur

L'observation de la couleur est faite à l'œil nu, un sperme normal a un aspect homogène gris opalescent, et peut prendre une couleur brune en cas d'hémospermie ou jaunâtre qui témoigne une probable infection.

▪ Odeur

On utilise notre propre odorat pour déterminer ce paramètre. À l'état normal le sperme a une odeur caractéristique chlorée, alors qu'en cas d'infection l'odeur du sperme peut devenir fétide.

▪ Viscosité

Elle est évaluée en plongeant une pipette pasteur dans le sperme, en notant la façon dont le sperme s'écoule. Un sperme d'une viscosité normale, s'écoule sous forme de gouttes bien séparées alors qu'un sperme de forte viscosité forme des filaments de plus de 2 cm entre chaque goutte.

▪ Volume

Il est estimé à l'aide d'une éprouvette graduée, la mesure est faite à 0,1 ml près. Un volume normal se situe entre 2 à 6 ml, au dessous de 2 ml on note une hypospermie et en dessus de 6 ml on parle d'une hyperspermie. En cas d'absence totale d'éjaculat on note une aspermie.

- **pH**

Une goutte de sperme est déposée sur une bandelette de papier pH, la couleur de la zone imprégnée est comparée à une échelle de lecture. Le pH est mesuré dans l'heure qui suit l'éjaculation, il est normalement compris entre 7,2 et 8.

c) Analyse microscopique

L'analyse microscopique est réalisée, après préparation des échantillons en fonction du paramètre à apprécier, grâce à une observation sous un microscope photonique, aux grossissements 40x.

- **Mobilité et qualité du mouvement**

Une goutte de sperme (20µl) bien homogénéisée est déposée entre lame et lamelle, plusieurs champs sont par la suite observés au grossissement 40x et le mouvement de chaque spermatozoïde rencontré est analysé puis classé selon 03 formes (Jouannet., 1977) :

- Les spermatozoïdes traversant le champ microscopique suivant un trajet régulier, rapide et progressif sont considérés comme forme à mobilité normale. - Les spermatozoïdes ondulant sur place ou traversant lentement le champ ou présentant un trajet irrégulier sont considérés comme formes à mobilité diminuée.

- Si aucun mouvement n'est observé, les spermatozoïdes sont considérés comme formes immobiles. Quatre à six champs sont parcourus pour classer 100 spermatozoïdes consécutifs et calculer leur pourcentage respectif dans chacune des formes. Selon les normes plus de 50% de spermatozoïdes doivent présenter une progression rapide rectiligne. Au dessous de cette valeur on parlera d'une asthénospermie.

- **Appréciation de l'agglutination**

Sur la même lame préparée pour la mobilité et la qualité du mouvement, plusieurs champs microscopiques consécutifs sont parcourus pour apprécier la présence ou non d'agglutinats spontanés de spermatozoïdes entre eux par la tête, la pièce intermédiaire, le flagelle, ou de manière mixte.

En fonction de l'appréciation, l'autoagglutination est notée à l'aide de croix, (+) Nombre réduit, (++) plus ou moins importante et (+++) autoagglutination importante. Un sperme normal ne contient pas d'agglutinats spontanés de spermatozoïdes.

▪ **Numération des spermatozoïdes**

La numération des spermatozoïdes est évaluée en nombre de spermatozoïdes par ml compté dans un hémocytomètre après immobilisation. Une lamelle calibrée est fixée sur le support de la cellule de Malassez. Dans un tube à hémolyse le sperme est diluée au 1/10 (0.1 ml de sperme / 0.9 ml de solution de Ringer formolé). La solution est par la suite homogénéisée puis introduite par capillarité à l'aide d'une pipette pasteur dans le compartiment de la cellule. Après 10 minutes de repos, la lecture est réalisée par comptage des spermatozoïdes sur chaque grille, sous un microscope photonique au grossissement 40x. Le calcul de la concentration des spermatozoïdes, exprimée en millions/ml est obtenu par la formule suivante :

$$C = N \times Di \times V \times 1000$$

- C : concentration millions /ml
- N : nombre de spermatozoïdes comptés sur la totalité de la cellule.
- Di: dilution = 10.
- V : volume =10
- 1000 : conversion de cm³ en ml.

A partir de la concentration calculée lors de la numération, le sperme est classé en :

- Polyzoospermie : >200 millions /ml
- Normospermie : 15 à 200 millions /ml.
- Oligozoospermie modéré : de 5 à 15 millions /ml.
- Oligozoospermie sévère : <5 millions /ml.
- Azoospermie : absence de spermatozoïdes

▪ **Concentration des cellules rondes**

La concentration des cellules rondes est mesurée à l'état frais à l'aide d'un hémocytomètre cellule de Malassez. La concentration en cellules rondes d'un éjaculat normal n'excède pas 10⁶ cellules/ml (inférieure à 5 % de la concentration totale des spermatozoïdes).

▪ **Test de vitalité**

Le test de vitalité est évalué par un colorant vital l'Eosine-Nigrosine (Annexe 1). Ce test permet d'estimer la nécrospermie par la recherche du nombre des spermatozoïdes morts et vivants.

Pour la préparation des frottis, une goutte de sperme est mélangée à 2 gouttes d'Eosine à 1% dans un tube à hémolyse. Après 30 secondes d'incubation on ajoute 2 gouttes de Nigrosine à 10%. Le frottis est préparé à partir d'une goutte du mélange sur une lame, puis laisser sécher à l'air libre. La lecture se fait sous un microscope photonique, au grossissement 40x. Ainsi, les spermatozoïdes morts apparaissent colorés en rose, alors que les spermatozoïdes vivants sont incolores. Les spermatozoïdes représentant une bordure post acrosomial colorée en rose sont considérés comme cellules mortes, même si le reste de la cellule est incolore. 100 spermatozoïdes sont comptés sur plusieurs champs consécutifs et le pourcentage des spermatozoïdes morts ainsi le pourcentage des spermatozoïdes vivants sont déterminés. Un sperme normal contient plus de 75% de formes vivantes. Au dessous de 50% de cellules vivantes on parle d'une nécrospermie.

I.2.2 Spermocytogramme

Le spermocytogramme est une analyse morphologique des spermatozoïdes. La morphologie de 100 spermatozoïdes est appréciée (objectif à immersion x100) après coloration d'un frottis par la méthode de May Grünwald-Giemsa (MGG). La technique de coloration au MGG est réalisée en 2 mL de May Grünwald sur le frottis de sperme. Après 4 min, 2 mL d'eau (pH 7,2) sont ajoutés. Le colorant dilué agit 1 min est éliminé. Du Giemsa (dilution au $1/10^{\text{ème}}$) est déposé de façon à recouvrir la lame pendant 5 min. la lame est rincée sous un filet d'eau courante puis séchée. Le montage est réalisé en déposant 1 goûte de baume de canada et une lamelle. Les atypiques sont détaillées selon la classification de David (David, 1975).

I.2.3 Cytogénétique moléculaire:

L'hybridation *in situ* fluorescence (FISH) est la technique de cytogénétique moléculaire de référence pour l'étude du contenu chromosomique des spermatozoïdes d'hommes ayant les paramètres spermatiques anormaux (OAT).

L'analyse FISH a été effectuée au laboratoire Clément (Paris XVIe- Le Blanc Mesnil-Drancy).

a) Types de sondes d'ADN utilisés :

Les sondes nucléiques utilisées pour les investigations en FISH sont des fragments d'ADN destinés à s'hybrider sur des régions chromosomiques d'intérêt par complémentarité de base.

Les sondes employées dans notre étude sont marquées directement par un fluorochrome.

Les fluorochromes utilisés sont la fluorescéine (isothiocyanate de fluorescéine ou FITC), donnant une fluorescence verte, la rhodamine, donnant une couleur rouge et la coumarine (cyanine de fluorescence bleue).

Les sondes utilisées dans notre étude :

- La sonde CEP **X** (DXZ1, Spectrum green, Abbott, Rungis, France).
- La sonde CEP **Y** (DYZ3, Spectrum orange, Abbott, Rungis, France).
- La sonde CEP **18** (D18Z1, Spectrum aqua, Abbott, Rungis, France).
- Les sondes **13q14/21q22** (Spectrum orange, Kreatech, Strasbourg, France).

b) L'hybridation *in situ* fluorescence (FISH) sur spermatozoïdes

Un frottis de sperme est effectué sur lame Superfrost® dégraissées et séchées. Après séchage à l'air libre, les spermatozoïdes sont fixés dans une solution de carnoy pendant une nuit, puis les lames sont de nouveau séchées.

Quelques étalements seront réservés à l'analyse de fragmentation de l'ADN.

- **Perméabilisation des membranes cellulaires :**

Les lames sont plongées dans une solution de SSC (Sodium Saline Citrate) 2X/0,4% NP 40 (Nonidet P40) (composition en annexe2) à 37°C pendant 30 minutes. Cette étape va faciliter l'accès des sondes à l'ADN, en augmentant la perméabilité membranaire des cellules.

Les lames sont ensuite déshydratées par passage dans 3 bains d'alcool successifs à 70°, 90°, puis 100°, d'une durée de 3 minutes chacun, à température ambiante. Cela permet d'éviter une dilution de la sonde.

- **Pré-traitement avant hybridation**

La chromatine des noyaux des spermatozoïdes étant fortement condensée (6 fois plus compactée que la chromatine des autres cellules), il est nécessaire d'effectuer une étape de décondensation de celle-ci, de manière à faciliter l'accès des sondes à l'ADN et l'analyse ultérieure.

Pour cela, plonger les lames dans un bain de NaOH 1N pendant 3 min 30. Ce qui provoque la rupture des ponts disulfures entre les molécules de protamine. Ce temps peut varier de 2 à 4 mn. Ensuite un bain de 2X SSC pendant 10 min puis déshydratées par passage dans des bains d'alcools à 70°, 90° puis 100° d'une durée de 3 minutes chacun et enfin séchées à l'air ambiant, cette étape de déshydratation permet d'éviter une dilution de la sonde.

Puis vérifier au microscope (contraste de phase) si la décondensation est suffisante mais pas excessive. Et enfin, effectué un bain de 2X SSC/0,4 NP40 à 37°C pendant 30 mn, suivi des bains d'alcools à 70°, 90°, 100°, d'une durée de 3 minutes chacun, à température ambiante.

- **Etape de dénaturation et hybridation**

Six microlitres du mélange de sondes sont déposés sur les lames placées sur une plaque chauffante programmable nommée HYBrite® à une température de 45°C puis les lames sont recouvertes d'une lamelle (Menzel-Glöser, Braunschweig, Allemagne) de 22X22 mm scellée avec du rubber cement® (Starkey chemical Process, Lagrange, Il) afin d'éviter une évaporation. La dénaturation simultanée de l'ADN cible et des sondes est réalisée par chauffage à 70° pendant 1 minute, suivie de l'hybridation à 37°C pendant une nuit en atmosphère humide.

- **Rincage post-hybridation**

Le lendemain, les lamelles sont enlevées, les lames sont plongées dans une solution de 0,4 X SSC/0,3 % NP40 (composition en annexe2) à 72°C pendant 45 secondes puis dans une solution de 2X SSC/0,1% NP40 (composition en annexe 2), pendant 20 secondes à température ambiante. Ces lavages sont indispensables pour éliminer l'excès des sondes et les éventuelles hybridations aspécifiques.

- **Contre-coloration et montage des lames**

Chaque lame est montée, à l'abri de la lumière, avec 14 µL de DAPI (4'-6'-diamidino-2phénylindol, Vectashield® (Monting Medium for fluorescence with DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, CA), 1,5 µg/mL) et recouverte d'une lamelle 24X32 mm scellée par du vernis à ongle. Le DAPI est un agent intercalant qui se fixe à l'extérieur de la double hélice d'ADN, préférentiellement au niveau des bases Adénine et Thymines. Parce qu'il est excitable dans la gamme des rayons ultraviolets et émet dans le bleu, son spectre excitation/émission ne chevauche pas ceux des fluorochromes des sondes utilisées dans l'étude. Ainsi, l'ADN apparaît coloré en bleu.

- **Analyse au microscope à fluorescence et interprétation :**

L'analyse des préparations est réalisée au microscope à fluorescence Zeiss-axioplan (Zeiss, Le Pecq, France) en chambre noire. Le microscope est relié à une caméra de haute sensibilité et les images sont capturées à l'aide d'un logiciel informatique : ISIS (In Situ Imaging System de MetaSystems®, Altlusheim, Allemagne).

La lecture et l'interprétation des signaux sont soumises à certaines.

Pour toutes les études, de 500 à 1000 spermatozoïdes, sont analysés en utilisant des critères stricts de sélection. Le spermatozoïde doit être une cellule isolée avec un contour bien défini et présenter un flagelle. Les signaux seront comptabilisés s'ils sont de même intensité et s'il existe un espace correspondant au diamètre d'un signal entre deux signaux.

I.2.4 Technique de fragmentation :

L'étude de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes s'effectue par la technique TUNEL (Terminal Uridine Nick-End labeling) à l'aide du kit ApopTagTM de Q-Biogene (Illkirch, France).

Les étalements de spermatozoïdes sont lavés dans une solution de 2X SSC/0,4 NP40 pendant 30 minutes à 37°C, puis déshydratés par passage de 3 minutes dans des bains d'alcool successifs à 70°, 90° et 100°, puis séchés à température ambiante.

Une solution tampon d'équilibration (Buffer Equilibration) est ensuite déposée sur la lame (50µl) et laissée 30 secondes à température ambiante, après avoir recouvert la lame d'une lamelle en plastique. Cette étape permet d'équilibrer le pH et d'hydrater la préparation.

Une fois la lamelle et le surplus de liquide enlevés, l'enzyme, la Terminale désoxynucléotidyle Transférase et les nucléotides triphosphates dont le désoxyuridine triphosphate (dUTP) marqué à la digoxigénine, sont déposés sur lame (45 µL de la solution 1 du kit : 31,5 µL Buffer Reaction +13,50 µL TdT Enzyme). Celle-ci est recouverte d'une lamelle et incubée 1 heure à 37°C en chambre humide, puis enlever la lamelle. La lame est ensuite plongée 10 minutes dans la solution 2 (1 mL de stop wash Buffer du kit + 50 mL d'eau distillée), ce qui va stopper la réaction en éliminant l'excès de nucléotides et l'enzyme.

Puis la lame est lavée par deux bains de PBS (1X) pendant 1 min 30 chacune, avant de déposer la solution contenant l'anticorps anti-digoxigénine conjugué à la rhodamine (43 µL de solution 3 du kit : Blocage Solution + anti-Digoxigenine conjugate) qui est laissée en contact 30 minutes à 37°C en chambre humide. Cette étape permet le marquage fluorescent en rouge par la rhodamine des noyaux à ADN fragmenté. Ensuite, les lames sont lavées dans 2 bains de PBS (1X) pendant 4 min chacune. Et enfin, une contre-coloration de la lame est effectuée par le dépôt de 14 µL de DAPI (1,5 µg/mL).

La lecture s'effectue à l'obscurité, au microscope à fluorescence (Zeiss-axioplan). Le comptage se fait sur 500 spermatozoïdes, à l'objectif x 63 sous immersion. Seules les cellules ayant les caractéristiques des spermatozoïdes sont analysées.

Les gamètes à ADN non fragmenté apparaissent uniquement en bleu (filtre DAPI) et ceux à ADN fragmenté en rouge (rhodamine) et en bleu (filtre DAPI).

II. Résultats :

Les études de la ségrégation méiotique réalisées par la technique FISH ainsi que ceux concernant la fragmentation de l'ADN par la technique TUNEL, nous ont permis d'avoir des résultats illustratifs sur les spermatozoïdes d'hommes infertiles et d'hommes témoins.

II.1 Spermogramme et Spermocytogramme :

Le spermogramme et le spermocytogramme ont été réalisés sur le prélèvement ayant servi à l'analyse de la ségrégation méiotique et à l'évaluation de la fragmentation de l'ADN (Tableau 5).

Tableau 5 : spermogramme et spermocytogramme des patients.

Patient	Age (Ans)	Spermogramme			Morphologie normale (%)	Conclusion Spermogramme (normes OMS 2010)
		Numération (millions/mL)	Mobilité (%)	Vitalité (%)		
P1	31	4,60	25	25	03	OAT
P2	37	2,80	25	25	02	OAT
P3	27	0,18	00	00	00	OAT
P4	37	0,80	25	25	01	OAT
P5	35	8,80	20	20	03	OAT
P6	32	7,80	20	20	03	OAT
P7	45	0,38	00	00	00	OAT
P8	44	2,60	15	15	03	OAT
P9	38	1,70	30	30	02	OAT
P10	31	1,41	15	15	02	OAT
P11	37	1,40	10	10	03	OAT
P12	28	0,12	05	05	00	OAT

O : oligospermie (< 15 millions/mL) ; A : asthénospermie (< 32% progressant) ; T : tératospermie (< 4% de formes typiques) ; OAT : oligoasthénotératospermie.

II.2 Etude de la ségrégation méiotique :

Nous avons analysé entre 500 et 1000 spermatozoïdes par la technique FISH pour tous les patients (Tableau 6, Figure 29).

L'âge des patients du groupe OAT est entre 27-45 ans, avec une moyenne de 35,17 ans, alors que pour l'âge du groupe témoin varie entre 28-45 ans et l'âge moyen est de 38,87 ans. Tous les patients, ainsi que les individus inclus dans le groupe témoin, présentent des aneuploïdies chromosomiques du sperme, mais une grande variabilité des taux d'aneuploïdie a été trouvée.

Pour chaque individu inclus dans l'étude, nous avons trouvé un équipement chromosomiquement déséquilibré des gamètes impliquant tous les chromosomes évalués. Les résultats de l'équipement chromosomique des gamètes après analyse FISH des patients OAT ainsi que du groupe témoin sont présentés dans le tableau 6.

Le taux de la disomie et de la nullisomie du chromosome 18 dans le groupe OAT (tableau 6) est significativement plus élevé que dans le groupe témoin. Le taux de disomie du chromosome 18 varie entre 0,19% et 0,43%; La valeur moyenne est de 0,30%. Elle est plus élevée comparativement au taux de disomie du chromosome 18 du groupe témoin (0,06%).

Le taux de la nullisomie du chromosome 18 dans le groupe OAT varie entre 0,32% et 0,69%, la valeur moyenne est de 0,45% vs 0,06% dans le groupe témoin.

La moyenne du taux des disomies et des nullisomies des chromosomes sexuels dans le groupe OAT (tableau 6) est plus élevée que celle identifiée dans le groupe témoin. Le taux d'aneuploïdie des gonosomes a présenté de grandes variations pour le groupe d'étude.

Le taux de nullisomie gonosomique varie entre 2,99% et 6,57%, avec une valeur moyenne de 4,51%. Le taux de nullisomie pour les chromosomes sexuels est significativement plus élevé dans le groupe OAT que dans le groupe témoin (4,51% vs 0,34%).

Pour le taux de disomies des chromosomes gonosomiques, des variations plus importantes ont été observées, entre 0,84% et 2,63%, la valeur moyenne était de 1,54% vs 0,24% pour le groupe témoin.

Le taux des disomies et des nullisomies du chromosome 13 dans le groupe OAT est significativement plus élevé que dans le groupe témoin (tableau 6).

Le taux de disomie du chromosome 13 varie entre 0,19% et 1,21%, avec une valeur moyenne de 0,52%, et qui est plus élevé comparativement au taux de disomie du chromosome 13 du groupe témoin (0,14%).

Le taux de nullisomie du chromosome 13 dans le groupe OAT varie entre 1,21% et 2,35%, avec une valeur moyenne de 1,61%. Le taux de la nullisomie du chromosome 13 est plus élevé dans le groupe OAT que dans le groupe témoin: 1,61% vs 0,15%.

Pour le groupe OAT, nous avons trouvé que le taux de Disomie 21 varie entre 0,01% et 1,12%, la valeur moyenne est de 0,62% (Tableau 6), tandis que dans le groupe témoin, elle est de 0,15%.

Le taux de nullisomie du chromosome 21 varie entre 1,12% et 2,37% avec une valeur moyenne de 1,71% alors que pour le groupe témoin, il n'est que de 0,18%.

Le taux de diploïdie dans le groupe OAT varie entre 0,35% et 0,93%, avec une valeur moyenne de 0,50%. Le taux de diploïdie est plus élevé dans le groupe OAT que dans le groupe témoin: 0,50% à 0,34%.

En comparant le taux des disomies dans le groupe OAT, le taux le plus élevé est celui de la disomie des chromosomes sexuels, suivie de la disomie des chromosomes 21,13 puis de 18.

De grandes variations interindividuelles ont été trouvées dans le groupe de patients OAT. Le taux le plus élevé des disomies du chromosome 13 (Figure 30 et 31) a été observé chez le patient P 7 (1,21%), alors que le patient P 8 a le taux le plus faible (0,19%).

Pour le chromosome 18, le taux de disomies varie entre 0,43% (P 1) et 0,21% (P 6). Le taux le plus élevé de disomies autosomiques a été trouvée pour le chromosome 21 (Figure 30 et 31), pour ce chromosome, le taux de disomie est 1,12% (P 12). Le plus faible taux est 0,01% (P 7).

Le taux de disomies des chromosomes sexuels (Figure 30,33 et 34) est plus élevé que le taux de disomies autosomiques et la variance interindividuelle pour les disomies des gonosomes (Figure 30, 33 et 34) est très importante. Le P 7 présente le plus fort taux de

disomies gonosomiques (2,63%), tandis que le P 2 présente le plus faible taux (0,84%) (Figure 30).

Le taux le plus élevé de diploïdies (Figure 30 et 32) est observé chez le patient P 7 (0,93%), tandis que le taux le plus faible (0,35%) est observé chez les patients P 1 et 10.

Tableau 6: Equipement chromosomique des gamètes après analyse FISH chez les patients et le groupe témoin.

	Taux de disomies (%)						Somme Disomies gonosomiques (%)	Somme diploïdies (%)	Taux de nullisomies (%)			
	1313 XY	1818 XY	2121 XY	XX	YY				1821 XY	X/Y	1313 XY	
P 1	0.29	0.43	0.34	0.10	0.59	0.18	0.87	0.35	0.50	4.53	1.35	1.06
P 2	0.25	0.35	0.44	0.25	0.30	0.29	0.84	0.45	0.39	3.47	1.21	1.84
P 3	0.18	0.28	0.58	0.54	0.49	0.38	1.41	0.79	0.45	2.99	1.06	1.63
P 4	0.42	0.19	0.69	0.48	0.23	0.59	1.30	0.45	0.41	4.21	1.18	1.48
P 5	0.56	0.34	0.79	0.33	0.41	0.36	1.10	0.50	0.32	5.11	1.29	1.93
P 6	0.33	0.21	0.36	0.45	0.29	0.45	1.19	0.39	0.36	4.54	1.39	1.47
P 7	1.21	0.39	0.01	0.72	0.82	1.09	2.63	0.93	0.69	6.57	2.03	1.98
P 8	0.19	0.29	0.98	0.41	0.53	0.98	1.92	0.45	0.56	3.84	1.92	1.12
P 9	0.53	0.32	0.83	0.27	0.50	0.29	1.06	0.37	0.35	4.62	1.84	1.60
P 10	0.31	0.22	0.21	0.30	0.46	0.61	1.37	0.35	0.43	3.91	1.65	1.92
P 11	0.92	0.23	1.09	0.66	0.72	1.06	2.44	0.46	0.52	5.38	2.35	2.19
P 12	1.08	0.33	1.12	0.70	0.63	1.08	2.41	0.52	0.47	4.92	2.11	2.37
moyenne	0.52	0.30	0.62	0.43	0.50	0.61	1.55	0.50	0.45	4.51	1.61	1.71

Groupe témoin	0,14	0,06	0,15	0,09	0,07	0,08	0,24	0,34	0,06	0,34	0,15	0,18
----------------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------

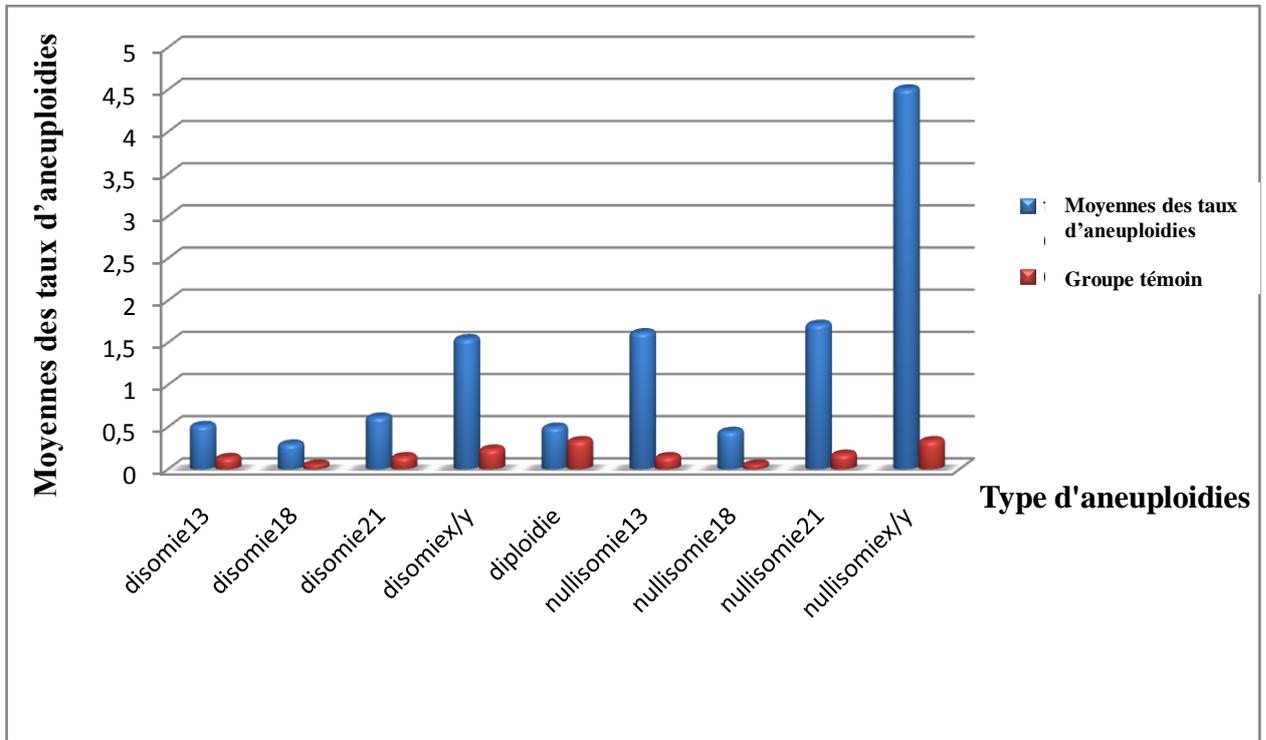


Figure 29 : Histogramme représentant la moyenne des taux d'aneuploidies après FISH chez les patients et le groupe témoin

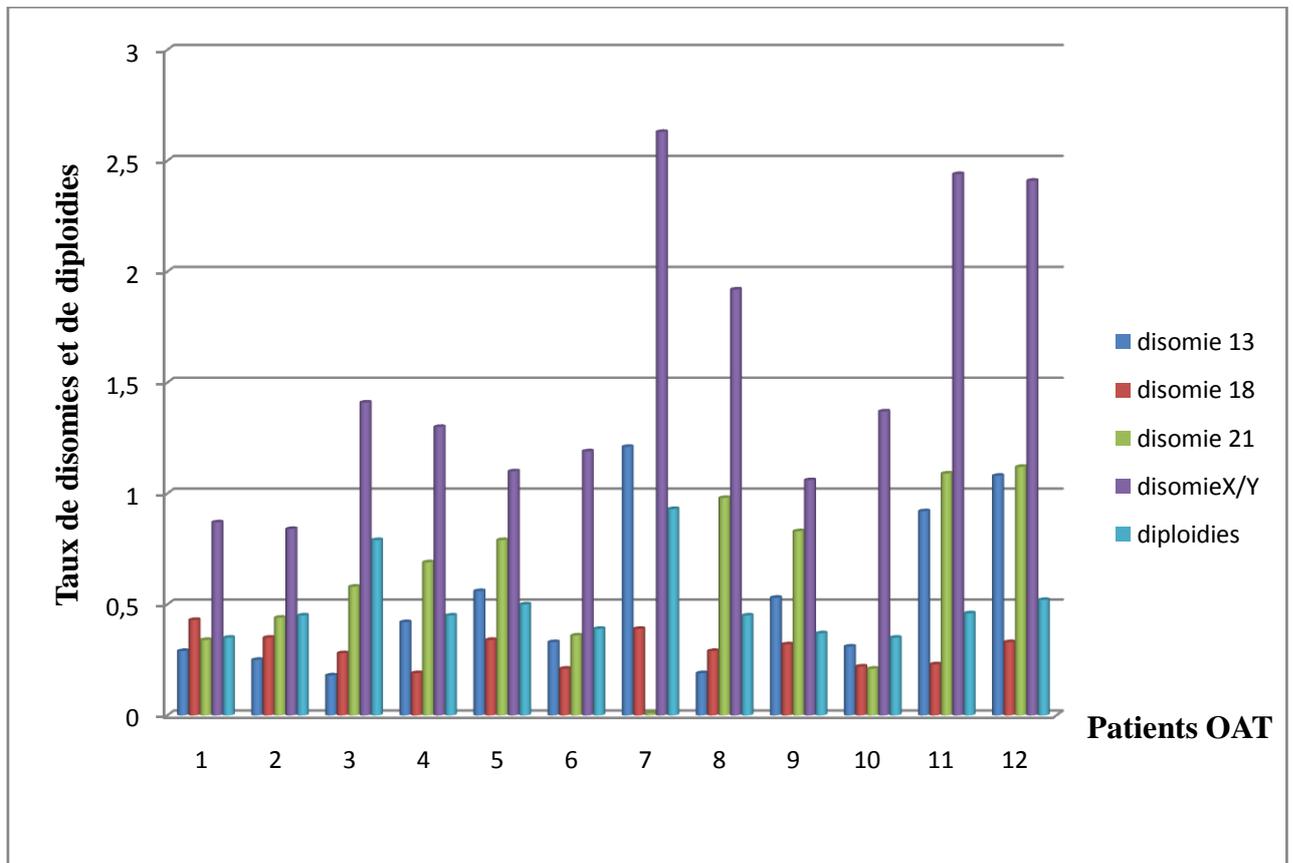


Figure 30: Histogramme représentant les taux de disomies et de diploïdies pour chaque patient

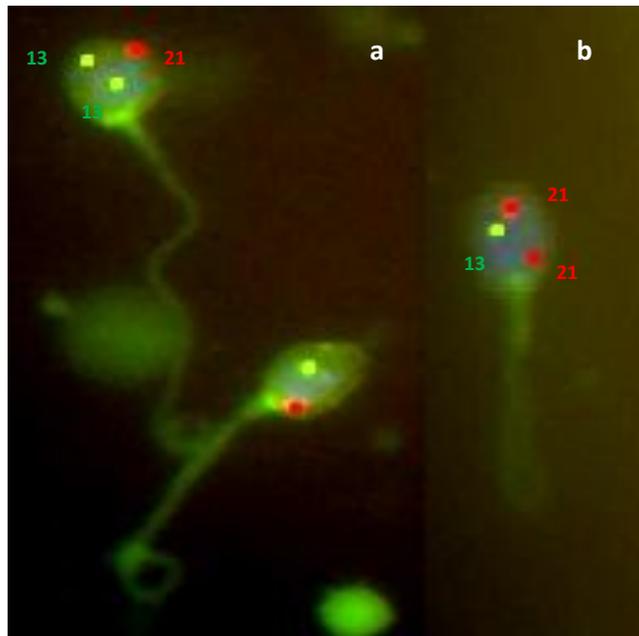


Figure 31 –Spermatozoïdes d’un patient après la FISH (LSI13 et LSI21, avec respectivement les spectrum vert et rouge).

a- Disomie du chromosome 13 - deux signaux verts correspondant au chromosome 13 et un signal rouge correspondant au chromosome 21, b- Disomie du chromosome 21 - un signal vert correspondant au chromosome 13 et deux signaux rouges correspondant au chromosome 21. (GX1000)

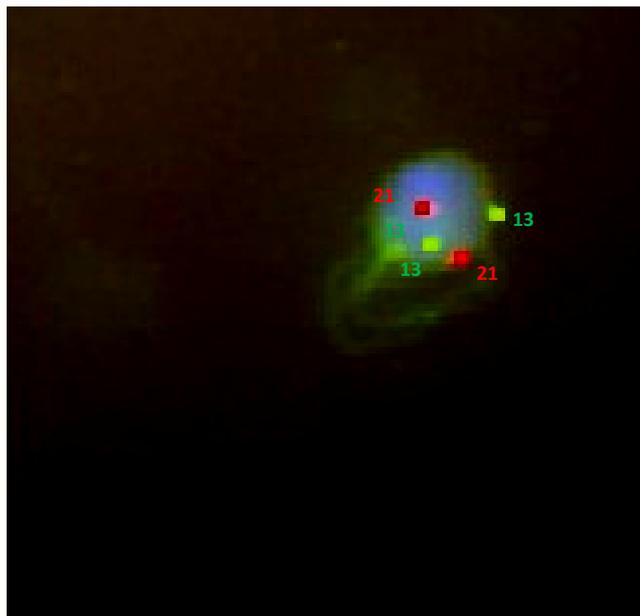


Figure 32 - Spermatozoïde d’un patient après la FISH (LSI13 et LSI21, avec respectivement les spectrum vert et rouge).

Diploïdie - deux signaux verts correspondant au chromosome 13 et deux signaux rouges correspondant au chromosome 21. (GX1000)



Figure 33 - Spermatozoïdes d'un patient après la FISH (CEPY, CEPX et CEP18, avec respectivement les spectrum rouge, vert et aqua).

Disomie du chromosome Y - deux signaux rouges correspondant au chromosome Y, un signal bleu correspondant au chromosome 18. (GX1000)

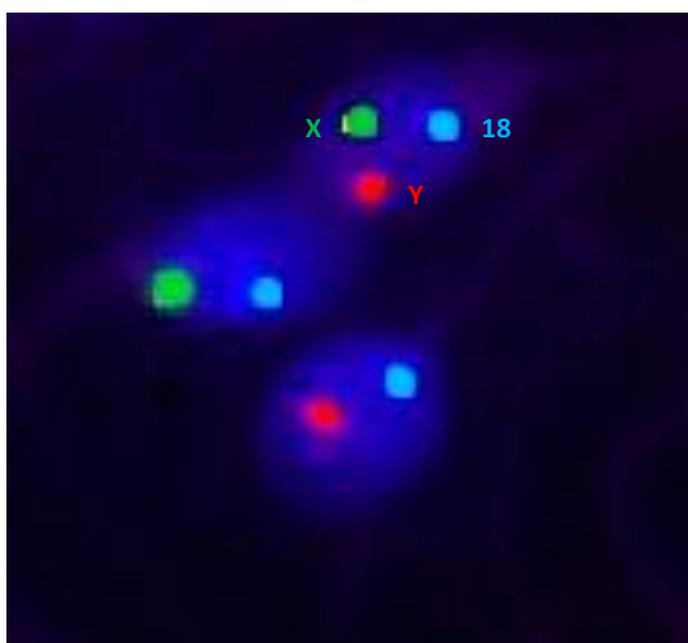


Figure 34 - Spermatozoïdes d'un patient après la FISH (CEPY, CEPX et CEP18, avec respectivement les spectrum rouge, vert et aqua).

Disomie du chromosome Y et X - un signal vert correspondant au chromosome X, un signal rouge correspondant au chromosome Y et un signal bleu correspondant au chromosome 18. (GX1000)

II.3 Etude de la fragmentation de l'ADN :

Le taux de spermatozoïdes à ADN fragmenté pour les patients avec une oligoasthénospermie est présenté dans le tableau 7.

Le taux moyen de gamètes à ADN fragmenté évalué par la technique TUNEL dans le groupe des patients est de 10,53%. Cependant, cette valeur dans le groupe témoin n'était que de 3,6% avec une moyenne de 1,20% +/- 0,94. Le taux de fragmentation de l'ADN le plus élevé est observé chez le P 7 (16,1%) et le taux plus faible est observé chez le P 2 (3,9%) (Figure 35, 36 et 37).

Tableau 7 : Taux de fragmentation de l'ADN des Spermatozoïdes des patients et du groupe témoin.

	Spermatozoïdes à ADN fragmenté (%)	Spermatozoïdes à ADN non fragmenté (%)
P1	5,3	94,7
P2	3,9	96,1
P3	13,9	86,1
P4	12,3	87,7
P5	4,4	95,6
P6	12,7	87,3
P7	16,1	83,9
P8	10	90
P9	6,3	93,7
P10	11,6	88,4
P11	15,3	84,7
P12	14,6	85,4
moyenne	10,53	89,47
Groupe témoin	3,6	96,4

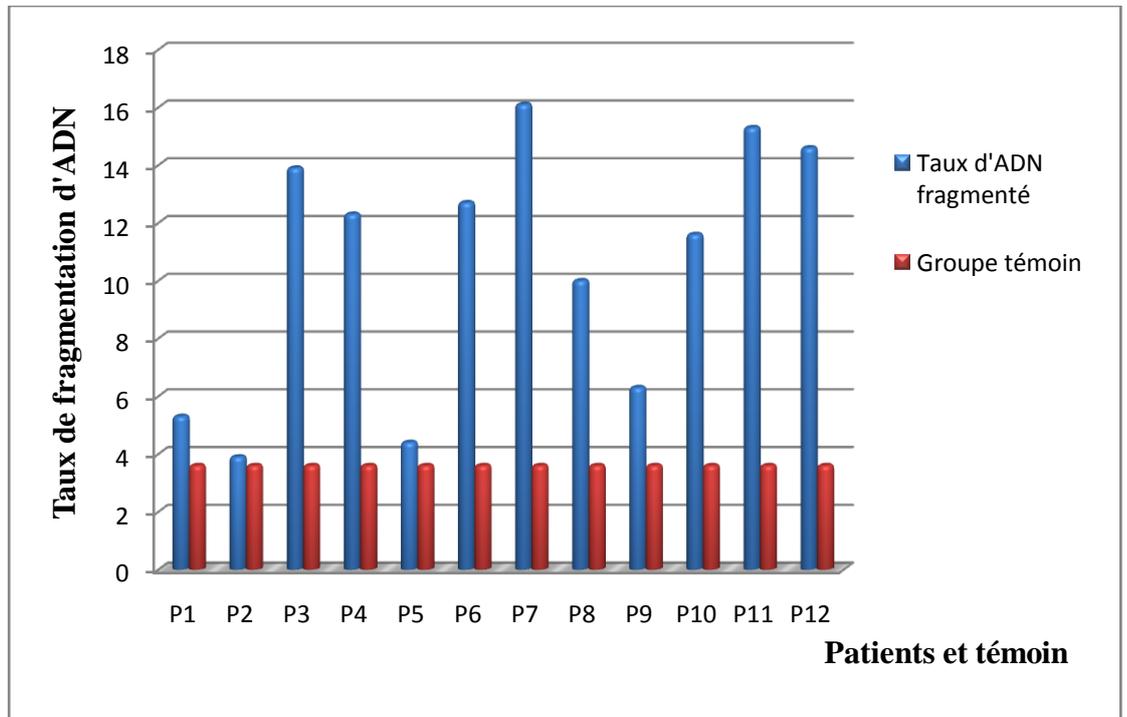


Figure 35 : histogramme représentant le taux de fragmentation de l'ADN après TUNEL chez les patient OAT par rapport au groupe témoin

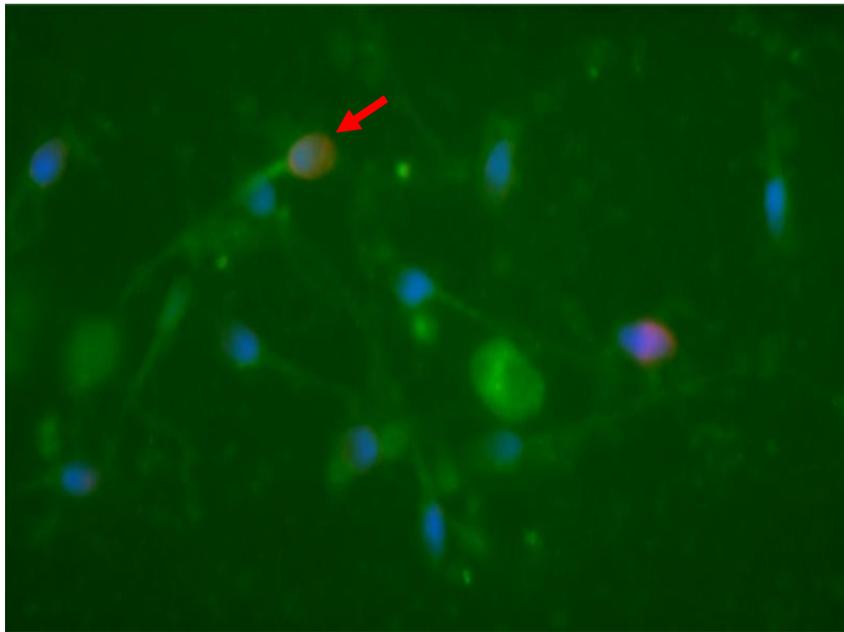


Figure 36: Spermatozoïdes d'un patient après TUNEL → indique un spermatozoïde macrocéphale avec ADN fragmenté. (GX630)

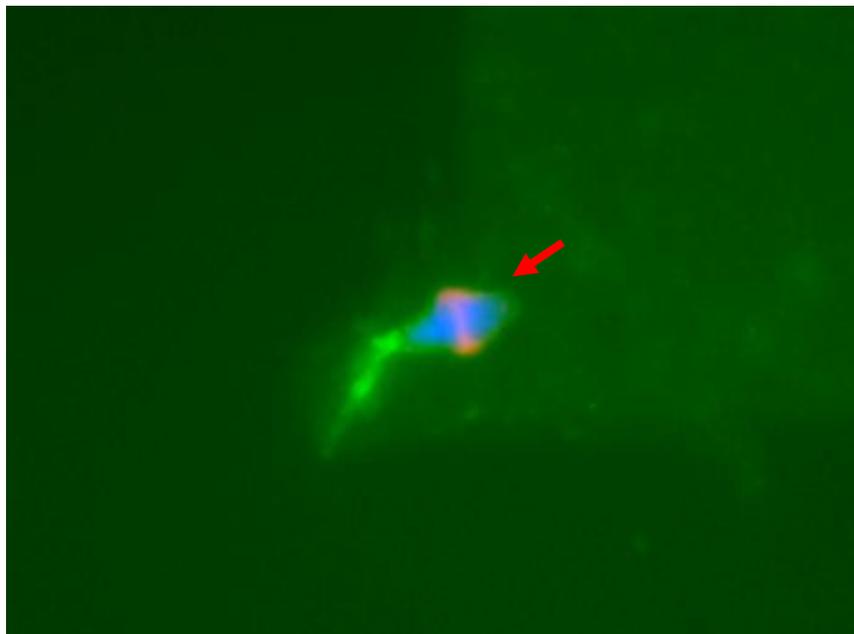


Figure 37: Spermatozoïde d'un patient après TUNEL avec ADN fragmenté (le spermatozoïde est malformé (tête amincie plus une anomalie de la région post-acrosomique et un flagelle court)). (GX630)

III. Discussion générale:

Les patients ayant une altération de la spermatogenèse sont connus comme étant des patients à risque d'aneuploïdie fœtale augmenté (Hens et al., 1988). Cette augmentation est due à un taux des aneuploïdies spermatiques plus élevée chez les patients infertiles que chez les sujets fertiles. Selon les études, le taux d'aneuploïdie varie chez les patients infertiles de 6 à 15 % contre une variation de 0,72 à 1,62 % chez des patients témoins fertiles et normospermiques (Pang et al., 1999).

De plus, certaines anomalies morphologiques spermatiques, comme la macrocéphalie, sont reconnues comme étant associées à un haut risque d'anomalies chromosomiques, y compris pour les spermatozoïdes non macrocéphales (Guthauser et al., 2006).

Notre étude de la ségrégation méiotique chez les patients OAT rapporte un taux moyen d'aneuploïdies de 11,78%, ce qui est comparable aux études rapportée par Andreescu et al. (2016) en Roumanie (14,63%); Pylyp et al (2013) en Ukraine (17%); Kumtepe et al. (2009) en Turquie (12%). Des taux plus faibles d'aneuploïdie ont été rapportés par Wang et al., (2010) en Chine (8,5%) ; Rao et al. (2005) en Inde (7,9%) ; Gekas et al. (2001) en France (6,9%).

Dans cette étude, nous avons également noté l'taux de la nullisomie, qui n'est pas souvent rapporté dans la littérature, il y a un débat concernant son évaluation et la distinction d'un échec d'hybridation (Templado et al., 2013).

Les taux de disomie et de nullisomie observés dans les spermatozoïdes des patients OAT sont significativement plus élevés que ceux du groupe témoin.

Par ailleurs, il ya une augmentation significative du taux de diploïdie dans les spermatozoïdes des patients (0.50% vs 0.34% dans le groupe témoin).

Toutefois, de telles augmentations de disomies et/ou de diploïdies sont également retrouvés fréquemment chez des patients avec des anomalies de spermogramme (Morel et al., 2007 ; Guthauser et al., 2006 ; Clément et al. 2009).

Il a été montré que les hommes infertiles avec des paramètres spermatiques anormaux ont un taux d'aneuploïdie supérieur à celui trouvé chez les hommes fertiles (Machev et al. , 2005; Miharu, 2005 ; Perrin et al, 2008). Toutefois, il reste difficile de savoir si ces augmentations sont dues à l'oligozoospermie et/ou à l'asthénozoospermie et/ou à la tératozoospermie.

Nous avons une nette impression que le taux des hommes Algériens présentant des anomalies évidentes de leurs spermogrammes, leurs spermocytogrammes, et surtout des anomalies chromosomiques dans leurs gamètes est en augmentation.

Ces problèmes de santé restent délicats et touchent à la pudeur des hommes qui, pour certains, ne se sentent pas concernés et refusent l'évidence des études scientifiques.

La technique FISH permet un conseil génétique plus personnalisé et oriente vers la meilleure solution parmi les possibilités qui s'offrent au couple.

Plus récemment, l'impact négatif de la fragmentation de l'ADN sur les capacités de fécondation et de développement embryonnaire a été incriminé.

Un certain nombre d'études ont montré que les spermatozoïdes présentant un ADN fragmenté sont plus fréquents chez les hommes infertiles que chez les hommes fertiles (Evenson et al., 1980; Tesarik et al., 2004) et peuvent conduire à la transmission paternelle de matériel génétique défectueux, avec des conséquences néfastes sur le développement embryonnaire (Guérin et Benchaïb, 2004 ; Clément et al., 2009 ; Aitken et al., 2003; Bakos et al., 2007; Mehdi et al., 2009).

Ainsi, il nous paru intéressant d'évaluer le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes chez les hommes qui ont des paramètres spermatiques anormaux, de manière à mieux appréhender son implication dans leur problème d'infertilité.

Notre étude a montré que dans le groupe de patients OAT, le taux de gamètes avec ADN fragmenté varie entre 3,9% et 16,1% avec une valeur moyenne de 10,53%. Ainsi, nous avons mis en évidence un taux de gamètes avec ADN fragmenté significativement plus élevé chez les patients OAT par rapport au groupe contrôle.

La littérature récente montre des données mixtes, certaines études montrant une bonne association et d'autres ne trouvant aucune corrélation (Greco et al., 2005, Nicopoullou et al., 2005, Zini et al, 2005, Ozmen et al., 2007, Caer et al., 2007, Lin et al , 2008, Nijs et al., 2009, Tavalaei et al., 2009, Mehdi et al., 2009, Mougou-Zerelli et al., 2011 ; Brahem et al., 2012, Perrin et al., 2013, Borini et al., 2016). De telles hypothèses peuvent être liées tout d'abord à l'étude de populations différentes, mais également à l'application de protocoles de la méthode TUNEL différents, ou encore à une interprétation microscopique différente. Ces différentes hypothèses soulignent d'une part, le caractère important d'inclusion d'un groupe témoin dans l'étude de la fragmentation de l'ADN, servent de références et d'autre part, l'application de

règles très strictes de lecture microscopique. Il est d'ailleurs recommandé que les lectures soient effectuées par le même opérateur dans une même étude, dans la mesure du possible.

Le taux de spermatozoïdes avec ADN fragmenté trouvé chez les patients OAT pourrait être une autre explication à leur infertilité.

La dernière des hypothèses avancées pour tenter d'expliquer le mécanisme à l'origine de la fragmentation spermatique est la théorie de « l'apoptose abortive ». Pendant la spermatogenèse, la mort cellulaire programmée (apoptose) se produit. Grâce à ce processus, les gamètes génétiquement anormaux sont éliminés et les gamètes en maturation sont maintenus dans un rapport normal. La prolifération d'une cellule germinale chromosomiquement anormale (c'est-à-dire des spermatogonies diploïdes, haploïdes) peut être bloquée par des points de contrôle méiotiques spécifiques induisant un processus apoptotique et être associée à la fragmentation de l'ADN. En effet, il a été proposé que l'aneuploïdie puisse déclencher la fragmentation de l'ADN, dans le cadre d'un mécanisme conçu pour inactiver génétiquement un noyau de spermatozoïdes avec une constitution génomique anormale (Muriel et al., 2007). Cependant, certains de ces gamètes anormaux échappent (apoptose abortive) de ce mécanisme de surveillance et par conséquent, ils sont présents dans l'éjaculat (Sakkas et Alvarez, 2009 ; Perrin et al., 2011 et Brugnon et al., 2010). Les spermatozoïdes matures avec l'ADN fragmenté pourraient correspondre à des spermatocytes génétiquement anormaux marqués comme apoptotiques qui n'ont pas été éliminés, mais ont complété le processus de la méiose et la spermatogenèse. Par conséquent, on peut spéculer que chez les patients atteints d'une spermatogenèse défectueuse, les phénomènes d'apoptose abortive sont supposés plus fréquents que chez les patients ayant une spermatogenèse normale (Enciso et al., 2013).

Quelle que soit l'origine de la fragmentation de l'ADN, au-delà d'un certain seuil, les mécanismes de réparation qu'offre l'ovocyte pourraient être dépassés et les anomalies persistantes entraveraient la poursuite du développement embryonnaire.

La fragmentation de l'ADN a un impact négatif sur le développement préimplantatoire de l'embryon pour atteindre le stade blastocyste (Meseguer et al., 2008), tout comme sur le taux d'implantation et de grossesses cliniques (Frydman et al., 2008). Pour certains, le taux de fécondation obtenu après ICSI est corrélé négativement au taux de fragmentation (Tavalae et al., 2009). Le taux de gamètes avec ADN spermatique fragmenté serait également un

indicateur pronostique des fausses couches après AMP (Benchaib et al., 2007; Zini et al., 2008, Perrin et al, 2013).

Les résultats de notre étude soutiennent l'importance de l'analyse FISH sur spermatozoïdes et la technique TUNEL pour les patients atteints d'OAT, qui subit habituellement des techniques de reproduction assistée. Ces deux techniques permettent d'évaluer l'aneuploïdie du sperme et les taux de fragmentation de l'ADN et doivent être recommandées avant l'application de toute procédure de procréation assistée. Ces investigations permettent d'identifier les patients présentant un risque accru de défaillance de la reproduction et de faciliter un conseil approprié pour informer les patients sur leurs options de reproduction, les tests génétiques de préimplantation et les tests génétiques prénataux disponibles. Ainsi afin d'approfondir et compléter ce travail, il faudrait étendre l'étude sur un nombre de patients plus conséquent permettant un traitement statistique des données afin de dégager des corrélations entre les paramètres mis en cause et les différentes pathologies suspectées.

Conclusion

Conclusion

Nous avons analysé le taux d'aneuploidies et la fragmentation de l'ADN spermatique dans les spermatozoïdes des hommes infertiles ayant les paramètres spermatiques anormaux (oligoasthénospermie).

Les résultats obtenus montrent un taux d'aneuploidies plus élevé chez les patients infertiles que chez les sujets fertiles. Ainsi, nous avons mis en évidence un taux de gamètes avec ADN fragmenté significativement plus élevé que celui observé dans le groupe contrôle. Ces taux observés pourraient être une autre voie aidant à expliquer leurs troubles de la reproduction.

Au final, il semble que l'étude du taux d'aneuploïdie et de la fragmentation d'ADN des spermatozoïdes soit toutes deux contributives dans l'exploration de l'infertilité masculine et qu'elles devraient être complémentaires notamment pour évaluer les chances de succès des méthodes d'aide médicale à la procréation.

Au-delà de notre travail, les études de la ségrégation méiotique dans les gamètes d'hommes infertiles doivent être poursuivies pour aider à la compréhension de la mécanique méiotique. Il en est de même pour les études de la fragmentation de l'ADN spermatique.

Il serait intéressant et très informatif d'évaluer la fragmentation de l'ADN dans la population des spermatozoïdes déséquilibrés pour mieux comprendre le lien qui est susceptible d'exister entre les deux phénomènes.

Références
Bibliographiques

Références Bibliographiques

Aitken R. J., De Iuliis G. N. and McLachlan R. I. (2003). Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl* 32(1): 46-56.

Andrabi S. M. (2007). Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. *J Assist Reprod Genet* 24(12): 561-9.

Andreescu N., Cosma M., Farcaș S., Stoian M., Amzăr DG. Puiu M. (2016). Assessment of chromosomal aneuploidies in sperm of infertile males by using FISH technique *Rom J Morphol Embryol* 2016, 57(1):173–178

Antinori M., Licata E., Dani G., Cerusico F., Versaci C., d'Angelo D. and Antinori S. (2008). "Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial." *Reprod Biomed Online* 16(6): 835-41.

Aoki V. W., Emery B. R., Liu L. and Carrell D. T. (2006). Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *J Androl* 27(6): 890-8.

Auger, J. and Eustache, F. (2000) Standardization of the Morphological Assessment of Human Spermatozoa According to Modified David's Classification. *Andrologie*, 10, 358-373.

Bakos HW, Thompson JG, Feil D, Lane M. (2007). Sperm DNA damage is associated with assisted reproductive technology pregnancy. *Int J Androl* 30:1–9.

Barlow, P. and Vosa C. G. (1970). "The Y chromosome in human spermatozoa." *Nature* 226(5249): 961-2.

Bartoov, B., A. Berkovitz, F. Eltes, A. Kogosovsky, A. Yagoda, H. Lederman, S. Artzi, M. Gross and Y. Barak (2003). "Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection." *Fertil Steril* 80(6): 1413-9.

Bartoov, B., Berkovitz A., Eltes F., Kogosowski A., Menezo Y. and Barak Y. (2002). "Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome." *J Androl* 23(1): 1-8.

Benchaib M, Braun V, Lornage J. et al. (2003). Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod*;18:1023-1028.

Benchaib M., Lornage J., Mazoyer C., Lejeune H., Salle B. and Guerin J. F. (2007). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 87(1): 93-100.

Bernardini LM., Calogero AE., Bottazzi C., Lanteri S., Venturini PL., Burrello N., De Palma A., Conte N., Ragni N. (2005). Low total normal motile count values are associated with increased sperm disomy and diploidy rates in infertile patients. *Int J Androl*;28:328–336.

Boe-Hansen G. B., Fedder J., Ersboll A. K. and Christensen P. (2006). The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 21(6): 1576-82.

[Boehm U](#), [Bouloux PM](#), [Dattani MT](#), [de Roux N](#), [Dodé C](#), [Dunkel L](#), [Dwyer AA](#), [Giacobini P](#), [Hardelin JP](#), [Juil A](#), [Maghnie M](#), [Pitteloud N](#), [Prevot V](#), [Raivio T](#), [Tena-Sempere M](#), [Quinton R](#), [Young J](#). (2015). Expert consensus document: European Consensus Statement on congenital hypogonadotropic hypogonadism--pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* 2015; 11 : 547-64.

Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D. (2006). Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod.*;21:2876-2881.

Borini A., Di Santo M., Tarozzi N., Nadalini M. (2016). Analysis of Sperm DNA Fragmentation and Aneuploidy in 109 Infertile Patients: Are the Two Parameters Correlated? *Gynecology & Obstetrics Case Report*. Vol.2 No.2:31.

Boucif-debab Z. (2014). Ethique de la recherche et des essais cliniques cas de la procréation médicalement assistée « PMA », mémoire pour l'obtention du diplôme de Magister en Biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, université d'Oran. pp 73-84.

Brahem S., [Mehdi M.](#), [Elghezal H.](#), [Saad A.](#) (2011a). Detection of DNA fragmentation and meiotic segregation in human with isolated teratozoospermia. *J Assist Reprod Genet*; 28(1):41-8.

Brahem S., [Mehdi M.](#), [Elghezal H.](#), [Saad A.](#) (2011b). The effects of male aging on semen quality, sperm DNA fragmentation and chromosomal abnormalities in an infertile population. *J Assist Reprod Genet*; 28(5):425-32.

Brahem S., [Mehdi M.](#), [Elghezal H.](#), [Saad A.](#) (2012). Study of aneuploidy rate and sperm DNA

fragmentation in large-headed, multiple-tailed spermatozoa. *Andrologia*; 44(2):130-5.

Braun R. E. (2001). Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Genet* 28(1): 10-2.

Brugnon F., Janny L., Communal Y., Darcha C., Szczepaniak C. (2010). Apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm from Robertsonian translocation carrier patients. *Hum Reprod* 25: 1631-1642.

Brugnon F., Van Assche E., Verheyen G., Sion B., Boucher D., Pouly J. L., Janny L., Devroey P., Liebaers I. and Van Steirteghem A. (2006). Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. *Hum Reprod* 21(3): 685-93.

Burrello N, Vicari E, Shin P. Lower sperm aneuploidy frequency is associated with high pregnancy rates in ICSI programmes. *Hum Reprod* 2003; 18(7):1371-6.

Caer E., [Perrin A.](#), [Douet-Guilbert N.](#), [Amice V.](#), [De Braekeleer M.](#), [Morel F.](#) (2008). Differing mechanisms of meiotic segregation in spermatozoa from three carriers of a pericentric inversion of chromosome 8; [Fertil Steril.](#) ; 89(6):1637-40. Epub 2007 Jul 2.

Calogero A. E., De Palma A., Grazioso C., Barone N., Romeo R., Rappazzo G., D'Agata R. (2001). Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. *Hum Reprod* 16(6): 1172-9.

Calogero AE, Burrello N, De Palma A. (2003). Sperm aneuploidy in infertile men. *Reprod Biomed Online*; 6(3):310-7.

Calogero AE, De Palma A, Grazioso C, et al. (2001). High sperm aneuploidy rate in unselected infertile patients and its relationship with intracytoplasmic sperm injection outcome. *Hum Reprod* ; 16 : 1433-9.

Carrell D. T. and Liu L. (2001). Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *J Androl* 22(4): 604-10.

Carrell D.T., Wilcox AL, Lowy L, Peterson CM, Jones KP, et al. (2003) Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol* 101: 1229-1235.

[Caspersson T.](#), [Zech L.](#), [Johansson C.](#) (1970). Differential banding of alkylating fluorochromes

in human chromosomes. *Exp Cell Res* 60: 315-319.

Chantot-Bastaraud S., Ravel C., Berthaut I., McElreavey K., Bouchard P., Mandelbaum J., Siffroi J. P. (2007). Sperm-FISH analysis in a pericentric chromosome 1 inversion, 46,XY,inv(1)(p22q42), associated with infertility. *Mol Hum Reprod* 13(1): 55-9.

Chohan K. R., Griffin J. T., Lafromboise M., De Jonge C. J., Carrell D. T. (2006). Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* 27(1): 53-9.

Cimini D., Moree B., Canman JC., Salmon ED. (2003). Merotelic kinetochore orientation occurs frequently during early mitosis in mammalian tissue cells and error correction is achieved by two different mechanisms. *J Cell Sci*, 116(Pt 20): 4213–4225.

Clément P. Hammoud I., Molina Gomes D., Albert M., Selva J., Vialard F. (2009). Étude de la fragmentation de l'ADN spermatique et des aneuploïdies spermatiques en cas de fausses couches à répétition. *La Lettre du Gynécologue* n° 347

Clermont Y. (1963). The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat*, 112: 35-51.

Collins A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26(3): 249-61.

Couet M. (1999). Exploration du couple infertile. Dans : Hammamah S., Saliba E., Benhamed M., Gold F (sous la direction de Lansac J). *Médecine et biologie de la reproduction*. Masson, Paris, pp17-48.

Cupisti S., Conn CM., Fragouli E., Whalley K., Mills JA., Faed MJW., Delhanty JDA. (2003). Sequential FISH analysis of oocytes and polar bodies reveals aneuploidy mechanisms. *Prenat Diagn*, 23(8):663–668.

Czyba J-C., Montella A. (1993). Testicules et épидидymes. *Biologie de la reproduction humaine*. Sauramps médical, Montpellier, pp 49-83.

Dadoune JP., Demoulin A. (1991). Structure et fonctions du testicule. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Ellipses, Paris, pp 221-50.

Dakouane M., Albert M., Nergère M., Sabbagh C., Brayotel F., Vialard F., Lombroso R., Bicchieray L., Selva J. (2005). Influence du vieillissement sur la spermatogénèse: évaluation histologique, risqué chromosomique et apoptose des spermatozoïdes. *Gynecol Obstét Fertil* ; 33 : 659-664.

Darzynkiewicz Z., Traganos F., Sharpless T. and Melamed M. R. (1975). Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry. *Exp Cell Res* 90(2): 411-28.

David G. (1975). Anomalies morphologiques du spermatozoïde humain. Propositions pour un système de classification. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 4(Suppl 1): 7-36.

Davis, R. O., Bain D. E., Siemers R. J., Thal D. M., Andrew J. B. and Gravance C. G. (1992). "Accuracy and precision of the CellForm-Human automated sperm morphometry instrument." *Fertil Steril* 58(4): 763-9.

De braekeleer M. and Dao TN. (1991). Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Repro*; 6 (2): 245-250.

De braekeleer M., Perrin A., Morel F. (2006). Chromosomal abnormalities in male infertility. Dans: De braekeleer M. cytogenetic and infertility. Transworld research network. Kerala, India 27-52.

De Lamirande E. and Gagnon C. (1993). A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl* 16(1): 21-5.

De Lamirande E. and O'Flaherty C. (2008). Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochim Biophys Acta* 1784(1): 106-15.

Dorigo B., Schalch T., Kulangara A., Duda S., Schroeder R. R and Richmond T. J. (2004). Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science* 306(5701): 1571-3.

Downie S E., Flaherty S P., Matthews C D. (1997). Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using fluorescence in-situ hybridization. *Molecular Human Reproduction* vol.3 no.7 pp.585–598.

Dozortsev, D., R. Neme, M. P. Diamond, S. Abdelmassih, V. Abdelmassih, F. Oliveira and R., Dunkel L., Hirvonen V. and Erkkila K. (1997). Clinical aspects of male germ cell apoptosis during testis development and spermatogenesis. *Cell Death Differ* 4(3): 171-9.

Durak Aras B., Aras I., Can C., Toprak C., Dikoglu E., Bademci G., Ozdemir M., Cilingir O., Artan S. (2012). Exploring the relationship between the severity of oligozoospermia and the frequencies of sperm chromosome aneuploidies. *Andrologia*, 44(6): 416–422.

Dutrillaux B. and Lejeune J. (1971). Une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain.

CR Acad Sci Paris, 272 : 2638-2640.

Dutrillaux B. and Lejeune J. (1973). Nouveau système de marquage chromosomique : les bandes T. *chromosoma*, 41 : 395-402.

Eaker S., Pyle J., Handel A. (2001). Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice, *J Cell Sci*, 114 : 2953-2965.

Ekenazi B., Wyrobek AJ., Slotter E., (2003). The association of age and semen quality in healthy men. *Hum Reprod*; 18(2): 447-454.

Enciso M., Alfarawati S., Wells D. (2013) Increased numbers of DNA-damaged spermatozoa in samples presenting an elevated rate of numerical chromosome abnormalities. *Hum Reprod* 28: 1707-1715.

ESHRE (2008). "Bonnes pratiques cliniques dans le domaine de la procréation médicalement assistée. Une prise de position de l'ESHRE. Traduction française : P. Boyer et JF. Guérin."

Eskenazi B., Wyroek AJ., Slotter E. (2003). The association of age and semen quality in healthy men. *Hum Reprod*; 18(2): 447-454.

Evenson D. P., Darzynkiewicz Z. and Melamed M. R. (1980). Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210(4474): 1131-3.

Evenson D. P., Higgins P. J., Grueneberg D. and Ballachey B. E. (1985). Flow cytometric analysis of mouse spermatogenic function following exposure to ethylnitrosourea. *Cytometry* 6(3): 238-53.

Evenson D. P., Jost L. K., Baer R. K., Turner T. W. and Schrader S. M. (1991). Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reprod Toxicol* 5(2): 115-25.

Evenson D. P., Jost L. K., Marshall D., Zinaman M. J., Clegg E., Purvis K., De Angelis P. and Claussen O. P. (1999). Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 14(4): 1039-49.

Evenson D.P. (2016). The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Animal Reproduction Science* 169 : 56–75.

Faure A.K. (2007). Exploration du génome et de l'épigénome dans les troubles sévères de la

spermatogenèse chez l'homme, Université Joseph Fourier–Grenoble I, Chimie et Sciences du Vivant, pp 11-26.

Fellous M., Siffroi J.P. (2003). Génétique de l'infertilité chez l'homme, nouvelles approches. 13: 148:57.

Ferguson-Smith M. A., Lennox B., Mack W. S. and Stewart J. S. (1957). Klinefelter's syndrome; frequency and testicular morphology in relation to nuclear sex. *Lancet* 273(6987): 167- 169.

Ferlin A., Arredi B., Foresta C. (2006). Genetic causes of male infertility. *Reprod Toxicol*; 22: 133-141.

Fernandez J. L., Muriel L., Rivero M. T., Goyanes V., Vazquez R. and Alvarez J. G. (2003). The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 24(1): 59-66.

Foresta C., Galeazzi C., Bettella A., Marin P., Rossato M., Garolla A., Ferli A. (1999). Analysis of meiosis in intratesticular germ cells from subjects affected by classic Klinefelter's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*; 84 (10): 3807-10.

Frydman N., Prisant N., Hesters L., Frydman R., Tachdjian G., Cohen-Bacrie P. and Fanchin R. (2008). Adequate ovarian follicular status does not prevent the decrease in pregnancy rates associated with high sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 89(1): 92-7.

Gabriel-Robez O., Delobel B., Croquette MF., Rigot JM., Djlelati R., Rumpler Y. (1996). Synaptic behaviour of sex chromosome in two XYY men. *Annales de Génétiques*; 39:129-132

Gandini L., Lombardo F., Paoli D., Caponecchia L., Familiari G., Verlengia C., Dondero F., Lenzi A. (2000). Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod*; 15:830-839.

Gavrieli Y., Sherman Y. and Ben-Sasson S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119(3): 493-501.

Gekas J., Thepot F., Turleau C., Siffroi JP., Dadoune JP., Briault S., Rio M., Bourouillou G., Carré-Pigeon F., Wasels R., Benzacken B. (2001). Association des Cytogénéticiens de Langue Française. Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men. *Hum Reprod*, 16(1):82–90.

Gianaroli L., Magli MC., Cavallini G., Crippa A., Nadalini M., Bernardini L., Menchini Fabris GF., Voliani S., Ferraretti AP. (2005). Frequency of aneuploidy in sperm from patients with extremely severe male factor infertility. Hum Reprod. 20(8):2140-52.

Gorczyca W., Gong J. and Darzynkiewicz Z. (1993). Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. Cancer Res 53(8): 1945-51.

Greco E., Scarselli F., Iacobelli M., Rienzi L., Ubaldi F., Ferrero S., Franco G., Anniballo N., Mendoza C., Tesarik J. (2005). Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. Hum Reprod; 20:226–230.

Guérin JF. and Benchaïb M. (2004). Tests d'exploration de la qualité nucléaire du spermatozoïde : relations avec la fertilité et la qualité du conceptus. Gynecol obstet Fertil, 32 : 799-802.

Guérin P., Matillon C., Bleau G., Lévy R., Ménézo Y. (2005). La fragmentation de l'ADN du spermatozoïde : impact en Assistance Médicale à la procréation. Gynécol Obstét Fertil; 33 : 665-668.

Guthauser B., Vialard F., Dakouane M., Izard V., Albert M., Selva J. (2006). Chromosomal analysis of spermatozoa with normal-sized heads in two infertile patients with macrocephalic sperm head syndrome. Fertil Steril; 85(3):750e5-750e7.

Guttenbach M. and Schmid M. (1990). "Determination of Y chromosome aneuploidy in human sperm nuclei by nonradioactive in situ hybridization." Am J Hum Genet 46(3):553-8.

Guttenbach M., Engel W. and Schmid M. (1997). "Analysis of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of normal men and carriers of constitutional chromosome aberrations." Hum Genet 100(1): 1-21.

Hamdi R. (2013). Stérilité et procréation médicalement assistée: le taux de réussite, en Algérie, est proche de celui mondial. Santé-MAG;19.

Hartl DL., Jones EW. (2003). Les bases chromosomiques de l'hérédité. Génétique : les grands principes. Troisième édition. Dunod, Paris, pp 73-119.

HAS (2006). "Évaluation de la fécondation in vitro avec micromanipulation (Intracytoplasmic sperm injection [ICSI]) Indications, coût-efficacité et risques pour la descendance." Service évaluation des actes professionnels. Service évaluation médico-économique et santé publique:

1-177.

Hassold T, Chui D, Yamane J. Parental origin of autosomal trisomies. *Ann Hum Genetic* 2000;48:129-44.

Hennequin M. (2005). « [Dis-moi si j'ai mal ou l'expression de la douleur chez les personnes porteuses de trisomie 21](#) », Actes des 7èmes Journées nationales de Pau, pp 77-85.

Hens L., Bonduelle M., Liebaers I., Devroey P., Van Steirteghem AC. (1988). Chromosome aberrations in 500 couples referred for in-vitro fertilization or related fertility treatment. *Hum Reprod*; 3(4):451-7.

Herrero M. B., De Lamirande E. and Gagnon C. (2003). Nitric oxide is a signaling molecule in spermatozoa. *Curr Pharm Des* 9(5): 419-25.

Hristova R., Ko E., Greene C., Rademaker A., Chernos J., Martin R. (2002). Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with asthenoteratozoospermia. *Biol Reprod*; 66:1781–1783.

Hsu L. Y., Benn P. A., Tannenbaum H. L., Perlis T. E. and Carlson A. D. (1987). Chromosomal polymorphisms of 1, 9, 16, and Y in 4 major ethnic groups: a large prenatal study. *Am J Med Genet* 26(1): 95-101.

Huang C. C., Lin D. P., Tsao H. M., Cheng T. C., Liu C. H. and Lee M. S. (2005). Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril* 84(1): 130-40.

Hugon-Rodin J. (2010). Analyse de 9 patientes avec une insuffisance ovarienne précoce et une translocation x-autosome par puces à ADN pangénomiques de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Thèse Gynécologie Médicale. Paris : Université Paris Descartes (Paris 5); 92 p.

Hysert M., Bruyere H., Cote G. B., Dawson A. J., Dolling J. A., Fetni R., Hrynychak M., Lavoie J., McGowan-Jordan J., Tihy F. and Duncan A. M. (2006). Prenatal cytogenetic assessment and inv(2)(p11.2q13). *Prenat Diagn* 26(9): 810-3.

Item 29. (2011). Stérilité du couple, Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français (CNGOF), Université Médicale Virtuelle Francophone. <http://umvf.univnantes.fr/endocrinologie/enseignement/item29/site/html/1.html>

Jaarola M., Martin R. H. and Ashley T. (1998). Direct evidence for suppression of

recombination within two pericentric inversions in humans: a new sperm-FISH technique. *Am J Hum Genet* 63(1): 218-224.

Jacobs P. A. and Strong J. A. (1959). A case of human intersexuality having a possible XXY sexdetermining mechanism. *Nature* 183(4657): 302-303.

Jalbert P. (2004). Exploration génétique du couple infertile. Dans : Hamamah S, Saliba E, Benhamed M, Gold F. *Médecine et biologie de la reproduction*. Masson, Paris: 55-66.

Janny L. and Menezo Y. J. (1994). Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. *Mol Reprod Dev* 38(1): 36-42.

Jouannet P. (1977) : Le laboratoire face à la clinique : L'examen du sperme. *Le technicien biologiste* (4): 153 – 157

Koch JE., Kolvraa S., Petersen KB., Gregersen N., Bolund L. (1989). Oligonucleotide-priming methods for the chromosome-specific labelling of alpha satellite DNA in situ. *Chromosoma*, 98: 259-265.

Koykul W., Baguma-Nibasheka M., King WA., Basrur PK. (2000). Meiosis and apoptosis in germ cells of X-autosome translocation carrier boars, *Mol Reprod Dev*, 56 : 448-457.

Kruger T. F., du Toit T. C., Franken D. R., Menkveld R. and Lombard C. J. (1995). "Sperm morphology: assessing the agreement between the manual method (strict criteria) and the sperm morphology analyzer IVOS." *Fertil Steril* 63(1): 134-41.

Kumtepe Y., Beyazyurek C., Cinar C., Ozbey I., Ozkan S., Cetinkaya K., Karlikaya G., Karagozoglu H., Kahraman S. (2009). A genetic survey of 1935 Turkish men with severe male factor infertility. *Reprod Biomed Online*, 18(4):465–474.

La Rochbrochard (De) E., McElreavey K., Thonneau P. (2003). Paternal age over 40 years: the “amber light” in the reproductive life of men. *J Androl*; 24(4): 459-465.

Laoufi L. (2008). L'insémination artificielle dans le code de la famille, l'école supérieure des magistrats- Alger, 2008.

Larson K. L., DeJonge C. J., Barnes A. M., Jost L. K. and Evenson D. P. (2000). Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 15(8): 1717-22.

Lee J. D., Kamiguchi Y. and Yanagimachi R. (1996). Analysis of chromosome constitution of

human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes. *Hum Reprod* 11(9): 1942-6.

Lewis S. E., O'Connell M., Stevenson M., Thompson-Cree L. and McClure N. (2004). An algorithm to predict pregnancy in assisted reproduction. *Hum Reprod* 19(6): 1385-94.

Lin HH., Lee RK., Li SH., Lu CH., Sun FJ., Hwu YM. (2008). Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil Steril*; 90:352–359.

Lopez-Teijon M., Elbaile M. and Alvarez J. G. (2008). "Geographical differences in semen quality in a population of young healthy volunteers from the different regions of Spain." *Andrologia* 40(5): 318-28.

Machev N., Gosset P., Treger M., Schillinger M., Viville S. (2005). Fluorescence in situ hybridization sperm analysis of six translocation carriers provides evidence of an interchromosomal effect. *Fertile Steril*; 84(2): 365-73.

Manicardi G. C., Tombacco A., Bizzaro D., Bianchi U., Bianchi P. G. and Sakkas D. (1998). DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assays. *Histochem J* 30(1): 33-9.

Mansat A. et Bennet P. (1986). *Techniques d'examen du sperme. Stage de formation.* Toulouse. France.: Laboratoire de biologie de reproduction du CECOS Midi-Pyrénées.

Marc J-P. (2004). *Génétique médicale, formelle, chromosome, moléculaire, clinique, ED* Masson, 412 pages.

Marchetti C. and Marchetti P. (2005). [Detection of apoptotic markers in human ejaculated spermatozoa as new methods in human reproductive biology]. *Gynecol Obstet Fertil* 33(9): 669-77.

Martin R. H. (2008). "Cytogenetic determinants of male fertility." *Hum Reprod Update* 14(4): 379-90.

Martin R., Ko E. and Chan K. (1993). "Detection of aneuploidy in human interphase spermatozoa by fluorescence in situ hybridization (FISH)." *Cytogenet Cell Genet* 64: 23-6.

Martin R., Rademaker A. (1987). *The Effect Of Age On The Frequency Of Sperm*

Chromosomal Abnormalities In Normal Men. *Am J Hum Genet*;41:459-68.

Martin R.H., Rademaker A.W., Greene C., Ko E., Hoang T., Barclay L. And Chernos J. (2003). A Comparison Of The Frequency Of Sperm Chromosome Ab-Normalities In Men With Mild, Moderate And Severe Oligo-Zoospermia. *Biol. Reprod*, 69: 535-539.

Martins C. F., Dode M. N., Bao S. N. and Rumpf R. (2007). The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA. *Genet Mol Res* 6(1): 94-104.

Mau-Holzmann UA. (2005). Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet Genome Res*; 111: 317-336.

May-Panloup P., Malinge MC., Larget-Piet L., Chrétien MF. (2001). Infertilité masculine d'origine génétique et assistance médicale à la procréation gynécol Obstét Fertil ; 29 : 583-593.

McPherson S. and Longo F. J. (1993). Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur J Histochem* 37(2): 109-28.

Mehdi M., Khantouche L., Ajina M., Saad A. (2009). Detection of DNA fragmentation in human spermatozoa: correlation with semen parameters. *Andrologia*; 41(6):383–6.

Meseguer M., Martinez-Conejero J. A., O'Connor J. E., Pellicer A., Remohi J. and Garrido N. (2008a). The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a male infertility prognostic factor. *Fertil Steril* 89(5): 1191-9.

Meseguer M., Santiso R., Garrido N., Gil-Salom M., Remohi J. and Fernandez J. L. (2008b). Sperm DNA fragmentation levels in testicular sperm samples from azoospermic males as assessed by the sperm chromatin dispersion (SCD) test. *Fertil Steril*.

Miharu N. (2005). Chromosomes abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: oligospermia. *Cytogenet genom Res*; 111: 347-351.

Minz M., Lohmann L., Clément P. (2005). Cytogenetic and genetic aspects and investigations of impaired human fertility, *La Lettre du Gynécologue* - n° 298-299.

Morel F., Douet-Guilbert N., Le Bris M. J., Amice V., Le Martelot M. T., Roche S., Valeri A., Derrien V., Amice J. and De Braekeleer M. (2004a). Chromosomal abnormalities in couples

undergoing intracytoplasmic sperm injection. A study of 370 couples and review of the literature. *Int J Androl* 27(3): 178-82.

Morel F., Douet-Guilbert N., Le Bris M. J., Herry A., Amice V., Amice J. and De Braekeleer M. (2004b). Meiotic segregation of translocations during male gametogenesis. *Int J Androl* 27(4): 200-12.

Morel F., Douet-Guilbert N., Perrin A., Le Bris M. J., Amice V., Amice J., De Braekeleer M. (2006). Chromosomal abnormalities in spermatozoa. Dans : De Braekeleer M. cytogenetics and infertility. Transworld Resaerch network. Kerala, India, 53-112.

Morel F., Laudier B., Guerif F., Couet M. L., Royere D., Roux C., Bresson J. L., Amice V., De Braekeleer M. and Douet-Guilbert N. (2007). Meiotic segregation analysis in spermatozoa of pericentric inversion carriers using fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 22(1): 136-41.

Morris I. D., Ilott S., Dixon L. and Brison D. R. (2002). The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 17(4): 990-8.

Mougou-Zerelli S., Brahem S., Kammoun M., Jerbi M., Elghezal H., Ajina M., Saad A. (2011). Detection of aneuploidy rate for chromosomes X, Y and 8 by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from patients with severe non-obstructive oligozoospermia. *J Assist Reprod Genet*, 28(10):971–977.

Moustafa M. H., Sharma R. K., Thornton J., Mascha E., Abdel-Hafez M. A., Thomas A. J., and Agarwal A. (2004). Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod* 19(1): 129-138.

Muleris M., Richard F., Apiou F., Dutrillaux B. (1996). *Hybridation in situ en cytogénétique moléculaire (principe et technique)*. Paris, Lavoisier, collection Génie Génétique.

Muratori M., Piomboni P., Baldi E., Filimberti E., Pecchioli P., Moretti E., Gambera L., Baccetti B., Biagiotti R., Forti G. and Maggi M. (2000). Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl* 21(6): 903-12.

Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Alvarez JG, et al. (2007) Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH analysis. *J Androl* 28: 38-49.

Nagy Z. P., Liu J., Joris H., Verheyen G., Tournaye H., Camus M., Derde M. C., Devroey P. and Van Steirteghem A. C. (1995). The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod* 10(5): 1123-9.

Nasr-Esfahani M. H., Salehi M., Razavi S., Anjomshoa M., Rozbahani S., Moulavi F. and Mardani M. (2005). Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reprod Biomed Online* 11(2): 198-205.

Ng KK., Donat R., Chan L., Lalak A., Di Pierro I., Handelsman DJ. (2004). Sperm out put of older men. *Hum Reprod*; 19(8): 1811-1815.

Nicopoulos JDM., Ramsay JWA., Almeida P., Gilling-Smith C. (2005) Can the outcome of intracytoplasmic sperm injection be predicted by genetic screening of spermatozoa? Abstracts of the 21st annual meeting of the European Society for Human Reproduction and Embryology. June 19–22, Copenhagen. Denmark, i198.

Nielsen P. E., Egholm M., Berg R. H. and Buchardt O. (1991). "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide." *Science* 254(5037): 1497-500.

Nijs M., Creemers E., Cox A., Franssen K., Janssen M., Vanheusden E., de Jonge C., Ombelet W. (2009). Chromomycin A3 staining, sperm chromatin structure assay and hyaluronic acid binding assay as predictors for assisted reproductive outcome. *Reprod Biomed Online*; 19:671–684.

O'Brien J. and Zini A. (2005). Sperm DNA integrity and male infertility. *Urology* 65(1): 16-22.

Ohasi Y., Miharu N., Honda H., Samura O. And Ohama K.(2001). High Frequency Of Xy Disomy In Spermato-Zoa Of Severe Oligozoospermic Men. *Hum. Reprod*, 16: 703-708..

Olive P. L., Wlodek D. and Banath J. P. (1991). DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Res* 51(17): 4671-6.

Ounis L. (2015). Les anomalies morphologiques responsables des infertilités masculines dans l'Est Algérien : Aspect épidémiologique et génétique, Université Constantine 1, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.

Ozmen B., Caglar GS., Koster F., Schopper B., Diedrich K., Al-Hasani S. (2007a). Relationship between sperm DNA damage, induced acrosome reaction and viability in ICSI patients. *Reprod*

Biomed Online; 15:208–214.

Ozmen B., Koutlaki N., Youssry M., Diedrich K. and Al-Hasani S. (2007b). DNA damage of human spermatozoa in assisted reproduction: origins, diagnosis, impacts and safety. *Reprod Biomed Online* 14(3): 384-95.

Pang MG., Hoegerman SF., Cuticchia AJ. (1999). Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*; 14(5):1266-73.

Pearson P. L. and Bobrow M. (1970). "Fluorescent staining of the Y chromosome in meiotic stages of the human male." *J Reprod Fertil* 22(1): 177-9.

Pearson P. L., Bobrow M. and Vosa C. G. (1970). "Technique for identifying Y chromosomes in human interphase nuclei." *Nature* 226(5240): 78-80.

Pellestor F. (1998). Ce que le PRINS peut faire pour vous. *Médecine/Sciences*, 14: 935-938.

Pellestor F., Girardet A., Lefort G., Andreo B. and Charlieu J. P. (1995a). "PRINS as a method for rapid chromosomal labeling on human spermatozoa." *Mol Reprod Dev* 40(3): 333-7.

Pellestor F., Girardet A., Lefort G., Andreo B. and Charlieu J. P. (1995b). "Use of the primed in situ labelling (PRINS) technique for a rapid detection of chromosomes 13, 16, 18, 21, X and Y." *Hum Genet* 95(1): 12-7.

Perrin A. (2009). Analyse de l'équipement chromosomique et de la fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes d'hommes infertiles. Université de Bretagne Occidentale, Faculté de Médecine et des Sciences de la santé de Brest.

Perrin A., Caer E., Oliver-Bonet M., Navarro J., Benet J., Amice V., De Braekeleer M. et Morel F. (2008). DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality. *Fertil Steril*.

Perrin A., Nguyen H., Bujan L., Vialard F., Amice V., Gueganic N., Douet-Guilbert N., De Braekeleer M. and Morel F. (2013). DNA fragmentation is higher in spermatozoa with chromosomally unbalanced content in men with a structural chromosomal rearrangement. *American Society of Andrology and European Academy of Andrology*, 1, 632–63

Perticarari S., Ricci G., Boscolo R., De Santis M., Pagnini G., Martinelli M. and Presani G.

- (2008). Fas receptor is not present on ejaculated human sperm. *Hum Reprod* 23(6): 1271-9.
- Pons-Rejraji H., Sion B., Saez F., Brugnon F., Janny L. and Grizard G. (2009). Role of reactive oxygen species (ROS) on human spermatozoa and male infertility. *Gynecol Obstet Fertil* 37(6): 529-35.
- Pylyp LY, Spinenko LO, Verhoglyad NV, Zukin VD. (2013). Chromosomal abnormalities in patients with oligozoospermia and non-obstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet*, 30(5):729–732.
- Quenesson I., Girardet A., Coignet L., Andreo B., Lefort G., Charlieu J. P. and Pellestor F. (1995). "[Direct analysis of the frequency of disomy in human sperm using the PRINS technique]." *Ann Genet* 38(2): 85-9.
- Rabineau D. et Dupont JM. (2003). *Cytogénétique Humaine, Service d'Histologie Embryologie Cytogénétique Faculté de Médecine Cochin-Port Royal Université PARIS V.*
- Rao KL., Babu KA., Kanakavalli MK., Padmalatha VV., Deenadayal M., Singh L. (2005). Prevalence of chromosome defects in azoospermic and oligoastheno-teratozoospermic South Indian infertile men attending an infertility clinic. *Reprod Biomed Online*, 10(4):467–472.
- Ravel C. et Siffroi J-P. (2009). Anomalies de structure du chromosome Y et syndrome de Turner. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*; 37: 511-518.
- Rives NM. (2005). Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: asthenozoospermia. *Cytogenet Genome Res*; 111:358–362.
- Robbins W., Segraves R., Pinkel D. and Wyrobek A. (1993). "Detection of aneuploid human sperm by fluorescence in situ hybridization: evidence for a donor difference in frequency of sperm disomic for chromosomes 1 and Y." *Am J Hum Genet* 52: 799-807.
- Ron-el R., Nachum H., Herman A., Golan A., Caspi E. and Soffer Y. (1991). Delayed fertilization and poor embryonic development associated with impaired semen quality. *Fertil Steril* 55(2): 338-44.
- Roux C., Tripogney C., Joanne C. and Bresson J. L. (2004). Nuclear quality of the spermatozoon: exploration tests of the chromatin of human spermatozoa (nuclear proteins). *Gynecol Obstet Fertil* 32(9): 792-8.
- Rubio C., Gil-Salom M., Simon C. (2001). Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a

risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod*; 16(10):2084-92.

Ryu HM., Lin WW., Lamb DJ. et al. (2001). Increased chromosome X, Y, and 18 nondisjunction in sperm from infertile patients that were identified as normal by strict morphology : Implication for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*; 76: 879-83.

Sailer B. L., Jost L. K. and Evenson D. P. (1995). Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J Androl* 16(1): 80-7.

Sakkas D., Alvarez JG. (2009). Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 93: 1027-1036.

Sakkas D., Mariethoz E., Manicardi G., Bizzaro D., Bianchi P. G. and Bianchi U. (1999). Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 4(1): 31-7.

Sakkas D., Moffatt O., Manicardi G. C., Mariethoz E., Tarozzi N. and Bizzaro D. (2002). Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 66(4): 1061-7.

Salenave S., Trabado S., Maione L. (2012). Male acquired hypogonadotropic hypogonadism: diagnosis and treatment. *Ann Endocrinol (Paris)*; 73:141-146.

Sarrate Z, Vidal F, Blanco J. (2010). Role of sperm fluorescent in situ hybridization studies in infertile patients: indications, study approach, and clinical relevance. *Fertil Steril*, 93(6): 1892–1902.

Seabright M. (1971). Rapid banding techniques for human chromosomes. *Lancet*, 2: 971-972.

Sergerie M., Bleau G., Teule R., Daudin M. and Bujan L. (2005a). Sperm DNA integrity as diagnosis and prognosis element of male fertility. *Gynecol Obstet Fertil* 33(3): 89-101.

Sergerie M., Laforest G., Bujan L., Bissonnette F. and Bleau G. (2005b). Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 20(12): 3446-51.

Shen HM., Dai J., Chia SE., Lim A., Ong CN. (2002). Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod*; 17(5): 1266-1273.

Sherif A., Ghazi M.D., Yasser A., Khyiat M.D., Amr M., Gadalla M.D., Ahmad M., Seif M.D.,

Shedid A., Shedid M.D. And Howida K. Abdulfattah M.D.(2009). Higher Incidence of Chromosomes 13, 18, 21, X and Y Aneuploidy in Spermatozoa from Patients with Severe Oligospermia and Repeated ICSI Failure Versus Fertile Control. *Med. J. Cairo Univ.*, Vol. 77, No. 3, June: 121-125.

Singh N. P., Danner D. B., Tice R. R., McCoy M. T., Collins G. D. and Schneider E. L. (1989). Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. *Exp Cell Res* 184(2): 461-70.

Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R. and Schneider E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175(1): 184-91.

Singh NP., Muller CH., Berger RE. (2003). Effect of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril*; 80(6): 1420-1429.

Shukla K. K., Dwivedi S., Gupta G. and Sharma P. (2013). Aneuploidy and its consequences in male infertility. *APFCP News*; (6): 54-56

Smyth CM., Bremner WJ. (1998). Klinefelter syndrome. *Arch Intern Med*; 158 (22): 1309-14.

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

Steele, E. K., N. McClure, R. J. Maxwell and S. E. Lewis (1999). "A comparison of DNA damage in testicular and proximal epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia." *Mol Hum Reprod* 5(9): 831-5.

Stephoe, P. C. and R. G. Edwards (1978). "Birth after the reimplantation of a human embryo." *Lancet* 2(8085): 366.

Sun F., Ko E. and Martin R. H. (2006). Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology? *Reprod Biol Endocrinol* 4: 1.

Taneja K. L., Chavez E. A., Coull J. and Lansdorp P. M. (2001). "Multicolor fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for enumeration of specific chromosomes in human cells." *Genes Chromosomes Cancer* 30(1): 57-63.

Tang SS., [Gao H.](#), [Zhao Y.](#), [Ma S.](#) (2010). Aneuploidy and DNA fragmentation in morphologically abnormal sperm. *Int J Androl*; 33(1):e163-79.

Tavalaee M., Razavi S. and Nasr-Esfahani M. H. (2009). Influence of sperm chromatin

anomalies on assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 91(4): 1119-26.

Tejada R. I., Mitchell J. C., Norman A., Marik J. J. and Friedman S. (1984). A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril* 42(1): 87-91.

Templado C, Uroz L, Estop A. New insights on the origin and relevance of aneuploidy in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, 2013, 19(10):634–643.

Tesarik J., Greco E. and Mendoza C. (2004). Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod* 19(3): 611-5.

Thibault C., Levasseur M-C. (2001). *La Reproduction chez les mammifères et l'homme*, Ed Ellipses, pp 260-313.

Thomas N. S., Bryant V., Maloney V., Cockwell A. E. and Jacobs P. A. (2008). Investigation of the origins of human autosomal inversions. *Hum Genet* 123(6): 607-16.

Thundathil J., De Lamirande E. and Gagnon C. (2003). Nitric oxide regulates the phosphorylation of the threonine-glutamine-tyrosine motif in proteins of human spermatozoa during capacitation. *Biol Reprod* 68(4): 1291-8.

Tomsu M., Sharma V. and Miller D. (2002). Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. *Hum Reprod* 17(7): 1856-62.

Torniero C., Dalla-Bernardina B., Fontana E., Darra F., Danesino C., Elia M. (2011). Electroclinical findings in four patients with karyotype 47,XYY. *Brain and Development*; 33: 384-389.

Tremellen K. (2008). Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 14(3): 243-58.

Van Assche E., Bonduelle M., Tournaye H., Joris H., Verheyen G., Devroey P., Van Steirteghem A. and Liebaers I. (1996). Cytogenetics of infertile men. *Hum Reprod* 11 Suppl 4: 1-24;

Van Dyke D. L., Weiss L., Roberson J. R. and Babu V. R. (1983). The frequency and mutation rate of balanced autosomal rearrangements in man estimated from prenatal genetic studies for advanced maternal age. *Am J Hum Genet* 35(2): 301-8.

Van Steirteghem (2000). "Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates

investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men." *Hum Reprod* 15(2): 351-65.

Van Steirteghem A. C., Liu J., Joris H., Nagy Z., Janssenswillen C., Tournaye H., Derde M. P., Van Assche E. and Devroey P. (1993). Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum Reprod* 8(7): 1055-60.

Van Steirteghem A., Liebaers I. and Camus M. (1999). Infertilités masculines d'origine génétique. *La revue du praticien* 49(12): 1309-13.

Vegetti W., Van Assche E., Frias A., Verheyen G., Bianchi M. M., Bonduelle M., Liebaers I. and Van Steirteghem A. (2000). Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod* 15(2): 351-65.

Velez de la Calle J. F., Muller A., Walschaerts M., Clavere J. L., Jimenez C., Wittemer C. and Thonneau P. (2008). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study. *Fertil Steril* 90(5): 1792-9.

Vendrely E., Kalfon A., Arvis G. and Merviel P. (1998). "Exploration clinique et biologique d'une infertilité masculine." Dans : Salat-Baroux J, Mandelbaum J, Merviel P, Antoine J-M. *L'ICSI Le traitement moderne des stérilités masculines*. Masson, Paris.: 41-62.

Vialard F., Delanete A., Clement P., Simon-Bouy B., Aubriot F. X. and Selva J. (2007). Sperm chromosome analysis in two cases of paracentric inversion. *Fertil Steril* 87(2): 418 e1-5.

Vialard F. et Pellestor F. (2008). Intérêt de la cytogénétique des gamètes humains : résultats et perspectives. Benefit of human gamete cytogenetic: Results and perspectives. *Pathologie Biologie*; 6: 388-399.

Vialard F., Mandon-Pépin B., Pellestor F., Ziyyat A., Albert M., Molina-Gomes D., Selva J., Fellous M. (2009). Anomalies génétiques et infertilité masculine. *Androl.*; 19: 2-16.

Virtanen HE & Toppari J. (2015). *Endocrinol Metab Clin North Am*; 44:751.

Viville S, Mollard R, Bach ML, et al. (2000). Do morphological anomalies reflect chromosomal aneuploidies ? Case report. *Hum Reprod*; 15 : 2563-6.

Viville S., Mollard R., Bach M. L., Falquet C., Gerlinger P. and Warter S. (2000). Do

morphological anomalies reflect chromosomal aneuploidies?: case report. *Hum Reprod* 15(12): 2563-6.

Wang RX., Fu C., Yang YP., Han RR., Dong Y., Dai RL., Liu RZ. (2010). Male infertility in China: laboratory finding for AZF microdeletions and chromosomal abnormalities in infertile men from Northeastern China. *J Assist Reprod Genet*, 27(7):391– 396.

White W. M., Kim E. D. and Mobley J. D. (2007). "Varicocele." www.emedicine.com.

WHO. (2010). WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization.

Williams, B.J., Ballenger, C.A., Malter, H.E. *et al.* (1993) Nondisjunction in human sperm: results of fluorescence *in situ* hybridization studies using two and three probes. *Hum. Mol. Genet.*, 2, 1929–1936.

Wing-Yee L. and Yan Cheng C. (2008). Transcription regulation in spermatogenesis. Series: Special Books.

Wyrobek AJ., Eskenazi B., Young S., Arnheim N., Tiemann-Boege I., Jabs EW., Glaser RL., Pearson FS., Evenson D. (2006). Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proc Natl Acad Sci*; 103 (25): 9601-9606.

Yanagimachi, R., H. Yanagimachi and B.J. Rogers (1976). "The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa." *Biol Reprod* 15(4):471-6.

[Younan D.](#), [Sorour A.](#), [Genedy R.](#) (2015). Aneuploidy frequency in spermatozoa of Egyptian men with normal and abnormal semen parameters using fluorescence in situ hybridisation. [Andrologia](#). 47(2):228-35.

Young J. J. (2012). Approach to the male patient with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Clin Endocrinol Metab*; 97:707.

Yu J., Chen Z., Ni Y., Li Z. (2012). CFTR mutations in men with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD): a systemic review and meta-analysis. *Hum Reprod*; 27:25 – 35.

Yunis J.J. and Sanchez O. (1975). The G-banded prophase chromosomes of man. *Humangenetik*, 27: 167-172.

Zini A., Boman J. M., Belzile E .and Ciampi A. (2008). Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and metaanalysis. Hum Reprod 23(12): 2663-8.

Zini A., Meriano J., Kader K., Jarvi K., Laskin CA., Cadesky K.(2005). Potential adverse effect of sperm DNA damage on embryo quality after ICSI. Hum Reprod; 20:3476–3480

Zubkova EV., Wade M., Robaire B. (2005). Changes in spermatozoa chromatin packaging and susceptibility to oxidative challenge during aging. Fertil steril; 84 (Suppl 2): 1191-1198.

Annexes

Annexe 1: solutions utilisées pour le spermogramme et spermocytogramme

- Réceptacle à sperme à usage unique.
- Etuve 37°C.
- Microscope photonique avec oculaires 40x ; 100x.
- Papier Johnson.
- Eprouvette graduée de 10 ml.
- Tubes à hémolyse de 5 mL.
- Micropipette 100 µl.
- Pipette graduée 1mL.
- Pipettes Pasteur.
- Embouts de pipettes en polypropylène jaune 5-100µl
- Lames en verre
- Lamelles couvre objets en verre (22X32 mm).
- Papier pH réactif colorimétrique.
- Cellule de Malassez.
- Solution de Ringer formolé
- Solution d'Eosine 1%.
- Solution de Nigrosine à 10%.

Solution de Ringer formolé :

Liquide de Ringer :

CaCl₂ 0.300 g

KCl 0.250 g

NaCl 6.5 g

NaHCO₃ 0.2 g

H₂O distillée 1L

Solution de Ringer formolé (solution de travail) :

Liquide de Ringer 1 L

Formol à 40% 10 mL

Solution à Eosine 1%:

Eosine “yellowish” 1g

NaCl 9 ‰ 100 mL

Bien mélanger et filtrer.

Solution de Nigrosine à 10% :

Nigrosine 10g

NaCl 9 ‰ 100 mL

Bien mélanger jusqu'à disparition des cristaux puis filtrer.

Carnoy :

3 volumes de méthanol + 1 volume d'acide acétique.

May-Grünwald :

Bleu de méthylène -éosine RAL solutions dans méthanol 125 mL : prêt à l'emploi.

Giemsa :

Dilution au 1/10ème dans de l'eau distillée.

Annexe 2: solutions utilisées pour la technique de cytogénétique moléculaire.

Alcool 70°:

300 mL d'alcool 100° + 144 mL H₂O distillée.

Alcool 90°:

400 mL d'alcool 100° + 144 mL H₂O distillée.

2X SSC :

100 mL de 20X SSC + 900 H₂O distillée.

4X SSC :

200 mL de 20X SSC + 800 H₂O distillée.

2X SSC/0,4% NP40 :

400 µL de NP40 + 99,6 mL de 2X SSC.

2X SSC/0,1% NP40 :

100 µL de NP40 + 99,9 mL de 2X SSC.

0,4X SSC/0,3% NP40 :

300 µL de NP40 + 99,7 mL de 4X SSC.

PBS 1X :

100 mL de PBS 10X + 900 mL H₂O distillée.

NaOH 1N :

10 mL NaOH 10 M + 90 mL H₂O distillée.

Annexe 3: solutions utilisées pour la technique de TUNEL.

Solution 1 :

31,5 µL de « Reaction Buffer » + 13,5 µL TdT enzym ».

Solution 2 :

25 mL d'H₂O + 750 µL de « Stop Wash Buffer » .

Solution 3 :

22,50 µL de « Bloking » + 22,50 µL de « Anti-Digconjugate ».

Annexe 4 : l'Ordonnance n° 05-02 du 27 février 2005

Art. 11. — La loi n° 84-11 du 9 juin 1984, susvisée, est complétée par *l'article 45 bis* rédigé comme suit :

« **Art. 45 bis.** — Les deux conjoints peuvent recourir à l'insémination artificielle.

L'insémination artificielle est soumise aux conditions suivantes :

- le mariage doit être légal,
- l'insémination doit se faire avec le consentement des deux époux et de leur vivant,
- il doit être recouru aux spermatozoïdes de l'époux et à l'ovule de l'épouse à l'exclusion de toute autre personne.

Il ne peut être recouru à l'insémination artificielle par le procédé de la mère porteuse ».

Annexe 5 : L'Instruction ministérielle n°300 du 12/05/2001 fixant les conditions de bonnes pratiques cliniques et biologiques au sein des structures ou services d'assistance médicale à la procréation.

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة الصحة والسكان
MINISTRE DE LA SANTE ET DE LA POPULATION

Le Secrétaire Général

أمين العام

Objet :

Instruction n°300 du 12 MAI 2001 fixant les bonnes pratiques cliniques et biologiques en assistance médicale à la procréation.

Destinataires :

Pour application : Mesdames et Messieurs

- Les directeurs de la Santé et de la Population de wilayas
- Les Directeurs Généraux des CHU
- Les Directeurs des EHS
- Les Directeurs des secteurs sanitaires.

En communication : Messieurs les Walis

Références :

- Loi 85-05 du 16 février 1985 portant protection et la promotion de la santé, modifiée et complétée.
- Décret n°88-204 du 18 octobre 1988 fixant les conditions de réalisation, d'ouverture et de fonctionnement des cliniques privées, modifié et complété par le décret exécutif n°92-380 du 13 octobre 1992.
- Décret exécutif n°97-465 du 2 Chaâbane 1418 correspondant au 2 décembre 1997 fixant les règles de création, d'organisation et de fonctionnement des établissements hospitaliers spécialisés.
- Décret exécutif n°97-466 du 2 Chaâbane 1418 correspondant au 2 décembre 1997 fixant les règles de création, d'organisation et de fonctionnement des secteurs sanitaires.
- Décret exécutif n°97-467 du 2 Chaâbane 1418 correspondant au 2 décembre 1997 fixant les règles de création, d'organisation et de fonctionnement des centres hospitaliers universitaires.