

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOQRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Constantine 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Spécialité : *Biologie Cellulaire et Physiologie et Physio-Pathologie*

Intitulé :

La relation entre les perturbations des paramètres spermatiques et la fragmentation de l'ADN spermatique

Présenté et soutenu par : MEZIOUT Ikram

Le : 24/06/2014

MERAD Ouahiba

Jury d'évaluation :

Mme ROUBAH L.	Professeur,	Université de Constantine 1	Président
Mr. ROUBAH A.	Professeur,	Université de Constantine 1	Encadreur
Mr. BENZAADA M.	MDS	CCSR	Coencadreur
Mr. TEBBANI F.	Maître assistant	Université de Constantine 1	Examineur

Année universitaire : 2013/2014

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier **Dieu** le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

En préambule à ce mémoire, nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire.

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance à **Monsieur Rouabah** qui nous fait l'honneur d'accepter d'encadrer ce travail. Qu'il soit assuré de notre très haute considération.

Nous remercions **Madame Rouabah** pour l'honneur qu'il nous faite en acceptant de juger ce travail et d'être la présidente de ce jury.

Qu'elle soit assurée de notre plus haute estime.

Nous remercions, tout particulièrement **Dr Tebani**, pour avoir accepté de juger ce travail.

Nous remercions vont aussi au **Pr Benbouhadja**, directeur de la clinique **IBN-ROCHD**, pour nous avoir accueillie au sein de sa clinique.

Qu'il soit assuré de toute notre reconnaissance.

Nous remercions très sincèrement notre Coencadreur, **Dr. BENZAADA Mustapha** pour la confiance qu'il nous a accordé en nous acceptons au sein de son laboratoire, pour la disponibilité dont il a toujours fait preuve, pour nous avoir guidé et conseillé tout au long de ces 3 mois et lors de la rédaction de ce manuscrit.

Qu'il soit assuré de notre reconnaissance la plus sincère.

Nous tenons à remercier très sincèrement le **Dr ZOGHMAR** responsable de service PMA et tous les membres de la clinique **IBN-ROCHD** pour leur sympathie et la bonne humeur. Nous remercions également pour l'aide qu'ils ont pu nous apporter lors de ces trois mois et notamment **Farouk** et **HAMZA** pour leurs aides dans les analyses des paramètres spermatiques et sa gentillesse, et **Mademoiselle Maroua** pour ses conseils et sa gentillesse.

Meziout Ikram

Merad Ouahiba

Dédicace

Je dédie ce modeste travail et ma profonde gratitude à **ma famille** pour leur soutien tout au long de mes études, pour la confiance qu'ils m'ont toujours accordée, pour leurs efforts afin de m'avoir permis d'être toujours dans les meilleures conditions possibles, j'espère que mon travail aura été à la hauteur de leur espérance. Merci **mon Père**, Merci **ma Sœur Leila** pour avoir eu le courage de lire ce manuscrit.

*À la mémoire de **ma Mère**, Que dieu l'accueille dans son vaste paradis.*

*À ma chère tante **Dalila** et ses filles, **Khadidja** et **Aida** pour leurs prières et soutiens*

*À tous mes amis, **Leila, Ahlem, Amel, Lamia, Chahra, Lobna, Sara et Meriem** pour tout ce que nous avons partagé.*

Un dédicace supplémentaire à **Ikram** pour son amitié et parce qu'elle est mon binome !! , merci pour ta confiance ma chère.

- **Merad Ouahiba** -

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

MA très chère et douce mère TOBIB Ouarda qui m'adresse au ciel les vœux les plus ardents pour la conservation de leur santé et de leur vie.

Feu père Boudjemaa, qui n'a pas pu voir ce que je suis devenu.

Pour mes chers frères : Walid, Nourddinne, Abed El-Rahim, Charif.

Pour ma chère sœur et mon binome : Hiba.

Pour mes très chers amis : Farida, Soumia, Lamia, Hanene, Meriem et Moufida.

- Meziout Ikram -

RESUME :

L'homme peut être impliqué dans environ 60% des stérilités du couple et parmi les examens de base de l'exploration de cette infertilité il y a le spermogramme et le spermocytogramme. Néanmoins les seuils donnés par ces deux tests ne permettent pas de différencier un sperme fécond d'un sperme infécond. Si le spermogramme et le spermocytogramme ne prennent pas compte du rôle de la fertilité féminine qui peut compenser un déficit masculin, le rôle du temps, de certaines pathologies ou d'autres facteurs environnementaux, ils ne donnent aucune information sur la qualité de l'ADN spermatique.

Cette dernière décade, plusieurs tests de diagnostics de la qualité de l'ADN spermatique, ont été mis au point pour donner une indication sur l'intégrité du génome spermatique. Parmi ces tests, la technique de SCD (Sperm Chromatin Dispersion) qui permet de mesurer la fragmentation de l'ADN spermatique et définir un indice le DFI ou DNA Fragmentation Index qui permet d'apprécier la qualité de l'ADN spermatique.

Dans notre étude nous avons tenté de démontrer que l'utilisation de la technique de SCD en première intention et en complément des analyses de routines, donne une meilleure appréciation de la qualité du spermatozoïde. Dans ce but nous avons analysé la fragmentation de l'ADN d'individus venus établir au laboratoire de spermologie du CCSR Ibn Rochd de Constantine, un spermogramme suite à une hypofertilité.

Nous avons choisis les individus de notre étude sur la base des indications portées sur le compte rendu final de l'analyse de leur spermogramme. Par la suite, nous avons analysé la corrélation entre les troubles mentionnés sur leur bilan final et la fragmentation de l'ADN spermatique observée par SCD. Pour chaque trouble analysé, nous avons déterminé un DFI et chaque résultat a été analysé par des tests statistiques ; le test de corrélation, le test du Khi-deux et enfin le test de STUDENT.

Les résultats que nous avons obtenus montrent qu'il existe une forte association entre la qualité de l'ADN spermatique et les perturbations touchant la mobilité, vitalité et la numération des cellules germinales. Un lien modéré du DFI avec la numération des cellules leucocytaires. Par contre aucune association n'a été détectée entre DFI et le volume, concentration et le pH. La présence ou non d'agglutinats dans le sperme, n'influence pas la qualité de l'ADN spermatique. Les effets de l'âge et du tabagisme restent importants, même s'ils n'ont pas été très explorés dans notre étude.

Si elle reste préliminaire, notre étude montre bien l'importance de l'analyse de la fragmentation de l'ADN spermatique en complément des tests de routine pour l'exploration de l'infertilité masculine.

Mots clés : Infertilité masculine, Spermatozoïde, Spermogramme, Spermocytogramme, Fragmentation d'ADN, Cellules rondes, DFI.

ABSTRACT :

The man may be involved about 60% of couple sterility and among the exploration basic examination of this infertility there are spermogramme and spermocytogramme, the thresholds of facts provided by these tests don't permit to differentiate a fertile sperm from infertile one. If the spermogramme and the spermocytogramme don't take into account the female fertility which may compensate a male defect, the role of time, of certain pathology or other environmental factors don't give any information about the quality of the spermatic DNA.

During recent decade, several diagnostic tests of the quality of the spermatic DNA have been focused in order to provide any information on the integrity of spermatic genome. Among these tests the technique of Sperm Chromatin Dispersion which allow to measure the fragmentation of the spermatic DNA and to define an index: The DFI .This latter permit to appreciate the quality of spermatic DNA.

In our project we have tried to show that the use of the SCD technique in first-line in addition to analysis routine, give a better assessment of the quality of the spermatozoid. In order to do so, we have analyzed the fragmentation of the DNA of an individual who comes to establish at the lab of spermologie of the CCSR of Ibn Roshd (Constantine), a Spermogramme following hypofertility.

We have chosen our individuals of this project according to information mentioned in the final report of their Spermogramme analysis. Afterwards we have analysed the correlation between the agitations mentioned on their final checkup and the fragmentation of the spermatic DNA observed by the SCD. For every analysed agitation we have determined a DFI and each result have been analysed by statistic tests; the test of correlation, test of Khi-deux and the test of STUDENT.

The results we obtained show that there is a strong association between the quality of spermatic DNA and disturbance of mobility, vitality and count germ cells. A moderate link with DFI leukocyte cell counts. By cons no association was detected between DFI and the volume concentration and pH. The presence or absence of agglutinates in sperm, does not affect the quality of spermatic DNA. The effects of age and smoking are important, even if they were not very explored in our study.

If it remains preliminary, our study shows the importance of the analysis of spermatic DNA fragmentation in addition to routine tests for exploration of male infertility.

Key words: Male Infertility, Spermatozoid, Spermogramme, Spermocytogramme, DNA Fragmentation, Round Cells, DFI.

ملخص:

يمثل الرجل نسبة تقدر بحوالي 60 بالمائة من العقم لدى الأزواج وتحليل خصائص الحيوانات المنوية هو الاختيار الأساسي لتشخيص هذا العقم لكن هذا الأخير لا يسمح لنا بالتمييز بين الحيوانات المنوية الخصبة و الحيوانات المنوية العقم. إذا كان تحليل خصائص الحيوانات المنوية لا تأخذ بعين الاعتبار دور خصوبة الأنثى التي يمكن أن تعوض عجز الذكر يأتي دور الزمن و بعض الأمراض أو العوامل البيئية الأخرى لتحديد ذلك ، إن هذا التحليل لا يوفر أي معلومة عن نوعية الحمض النووي للحيوانات المنوية.

هناك العديد من التقنيات الحديثة التي تسمح لنا بتشخيص نوعية الحمض النووي الريبي للحيوانات المنوية من بينها تقنية تشتت كروماتين النطفة التي تسمح بتحديد نسبة تجزئة الحمض النووي للنطف.

حاولنا من خلال هذه الدراسة أن نبرز أهمية إدراج هذه التقنية كتحليل أولي و متم للاختبارات الروتينية لهدف تقييم أفضل لنوعية النطفة، ولهذا الهدف قمنا بتحليل تجزئة الحمض النووي الريبي لنطف رجال على مستوى عيادة ابن الرشد للجراحة و علوم الإنجاب بقسنطينة.

قمنا باختبار العينات على أساس نتائج التقرير النهائي لتحليل خصائص الحيوانات المنوية لهؤلاء الأشخاص ثم درسنا طبيعة الترابط بين الاختلاف في خصائص السائل المنوي و نسبة التجزئة للحمض النووي الريبي من أجل كل اضطراب. أثبتنا النتائج المحصل عليها رياضيا باستعمال قانون الترابط الخطي، قانون كي دو و قانون ستودنت.

النتائج المتحصل عليها بينت وجود ترابط قوي بين نوعية الحمض النووي للنطفة و الاضطراب في نسبة حركية، حيوية وعدد الخلايا الجرثومية في السائل المنوي، وكذلك ترابط ملموس بين نوعية الحمض النووي و تركيز الخلايا المناعية البيضاء. بالمقابل لم يسجل أي ترابط بين تركيز، حموضة وحجم السائل المنوي و نسبة التجزئة في الحمض النووي للنطفة، و من جهة أخرى وجود أو عدم وجود المركب "جسم مضاد - نطفة" لا يؤثر على نوعية الحمض النووي للنطفة. بينما أثر السن و التدخين يبقى مهم على الرغم من أن دراستنا في هذا الجانب كانت محدودة.

حتى ولو بقيت دراستنا تمهيدية فإنها تبين أهمية تحليل تجزئة الحمض النووي للنطف كتكملة للاختبارات الروتينية لتشخيص العقم عند الرجال.

الكلمات المفتاحية: عقم الرجال، نطفة، تحليل خصائص الحيوانات المنوية، تجزئة الحمض النووي الريبي، خلايا جرثومية، نسبة التجزئة في الحمض النووي الريبي.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN: Acide DésoxyriboNucléique.

AO: Acridine Orange.

BMI: Body Mass Index.

CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator.

CCSR: Clinique de la Chirurgie et des Sciences et de la Reproduction.

CG: Cellules Germinales.

CL: Cellules Leucocytaires.

CR: Cellules Rondes.

DFI: DNA Fragmentation Index.

FSH: Hormone Folliculo-Stimulante.

GnRH: Gonadotropin-Releasing Hormone ou Gonadolibérine.

ICSI: Intra Cytoplasmique Sperm Injection.

LH: Hormone Lutéinisante.

NT: In situ Nick Translation.

OMS: Organisation Mondiale de Santé.

PBS: Phosphate Buffered Saline.

PI: Pièce Intermédiaire.

PP: Pièce Principale.

PRM 1: Protamine de type 1.

PRM 2: Protamine de type 2.

PT: Pièce terminale.

SCD: Sperm Chromatin Dispersion.

SCGE: Single Cell Gel Electrophoresis.

SCSA: Sperm Chromatin Structure Assay.

SOR: Substances Oxygénées Réactives.

SSB: Staining Solution B.

SSA: Staining Solution A.

SSN: Spermogramme Spermocytogramme Normal.

SSP: Spermogramme Spermocytogramme Perturbé.

TdT: Terminal deoxynucleotidyl Transferase.

TNP 1: Transition Nuclear Protein 1.

TNP 2: Transition Nuclear Protein 2.

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling.

Sommaire

Résumé en français

Résumé en anglais

Résumé en arabe

Liste des abréviations

INTRODUCTION.....1

Analyse Bibliographique

I. LES INFERTILITES MASCULINE.....	3
I.1. Définition de l'infertilité.....	3
I.2. Principales étiologies.....	3
I.2.1. Etiologies pré-testiculaires.....	3
I.2.2. Etiologies testiculaires.....	3
I.2.3. Etiologies post-testiculaires.....	4
II. ANATOMIE DE L' APPAREIL GENITAL MSCULIN.....	5
II.1. Les testicules.....	5
II.2. Conduits excréteurs.....	5
II.2.1. Les conduits excréteurs intra testiculaires.....	6
II.2.2. Les conduits excréteurs extra testiculaires.....	6
II.3. Les Glandes annexes.....	6
II.3.1. Les Vésicules séminales.....	6
II.3.2. La Prostate.....	6
II.3.3. Les Glandes de Cooper (Bulbo urétrales).....	7
II.4. Le Pénis (verge).....	7
III. SPERMATOGENESE.....	8
III.1. Formation du spermatozoïde.....	8
III.1.1. La spermatocytogenèse.....	8
III.1.2. La spermiogénèse.....	9
III.2. Contrôle hormonal de la reproduction chez l'homme.....	11
III.3. Le sperme.....	12

III.3.1 Structure et morphologie d'un spermatozoïde.....	12
III.3.2. Structure de la chromatine spermatique.....	14
III.3.3. L'origine de fragmentation de l'ADN spermatique.....	16
III.3.4. Les causes de fragmentation de l'ADN spermatique.....	18
III .3.5. Techniques d'évaluation de l'intégrité de l'ADN spermatique.....	19
IV. LES ETUDES DE L'INVESTIGATION DE L'INFERTILITE MASCULINE.....	21
IV.1. Spermogramme.....	21
IV.1. 1. Examen macroscopique.....	21
IV.1.2. Analyse microscopique.....	22
IV.2. Spermocytogramme.....	24

Matériel et Méthode

I. Aspect de la population cible.....	26
II. Matériel biologique.....	26
III. Condition de recueil du sperme.....	26
IV. La technique de Sperm Chromatin Dispersion.....	27
IV.1. Principe.....	27
IV.2. Méthodologie.....	28
V. Analyse des cellules rondes.....	30
V.1. Principe de test.....	30
V.2. Méthodologie.....	30
V.3. Calcul de la concentration en cellules leucocytaires (CL) et germinales (CG).....	31
VI. L'Analyse statistique.....	32

Résultat et Discussion

I. RESULTAT.....	33
I.1. Accepte générale de la population étudié.....	33
I.2. Résultats du spermogramme.....	33
I.3. Les paramètres spermatiques et le résultat de la SCD.....	35
I.3.1. Test de corrélation.....	37
I.3.2. Test de Khi-deux.....	49
I.3.3. L'âge, le tabagisme et la Fragmentation.....	53
I. 4. Fragmentation et troubles morphologiques du spermatozoïde.....	54
II. DISCUSSION.....	57

Conclusion.....62

Planches

Annexes

Liste des tableaux

Liste des figures

Références bibliographiques

INTRPDUCTION :

La stérilité masculine appelée encore infertilité masculine est définie comme l'impossibilité pour un homme d'assurer une procréation du fait d'une défaillance qualitative ou quantitative de son sperme (liquide séminal et spermatozoïdes). La différence biologique entre sujets fertiles et infertiles est liée à ses paramètres spermatiques avec en premier la morphologie, à savoir les résultats de spermocytogramme, en suite la mobilité et enfin la numération des spermatozoïdes. Tous les degrés d'infertilités existent entre l'absence totale de formation de spermatozoïdes (azoospermie) et une production à la limite de la normalité (oligo-asthénospermie). L'infertilité masculine est à l'origine de plus d'un tiers des infertilités du couple. Elle est en relation avec une altération quantitative et/ou qualitative du sperme d'origine congénitale ou acquise. L'évaluation du sperme se fait à travers deux examens biologiques à savoir le spermogramme et le spermocytogramme. Ces examens définissent un certain nombre de critères spermatiques qui sont le volume de l'éjaculat, le nombre des spermatozoïdes, la mobilité des spermatozoïdes et leur vitalité. Ces différents critères peuvent varier dans des proportions importantes en fonction de l'âge, l'état physiologique de la personne, des saisons et du délai d'abstinence avant de l'analyse (16).

Les limites de ces deux tests sont une grande variabilité intra-individuelle; d'importantes fluctuations des paramètres spermatiques; on ne peut pas tirer de conclusion possible à partir d'un seul spermogramme et présence de facteurs influençant cette variabilité tels que les conditions de recueil et le délai d'abstinence. Pour être informatif, ces tests doivent être interprétés en tenant compte des données de l'interrogatoire et de l'examen clinique.

De plus, si un spermogramme et un spermocytogramme peuvent évaluer les paramètres spermatiques et morphologiques de l'échantillon, ils ne peuvent rendre compte de l'intégrité du matériel génétique. Ainsi dans notre travail de recherche et afin de compléter et d'améliorer l'interprétation des deux tests appliquer jusqu'à présent pour l'évaluation de l'examen du sperme nous avons associé l'analyse de la compaction de l'ADN spermatique en utilisant la technique de Sperm Chromatin Dispersion (SCD). Ce test permet d'apprécier la qualité de l'ADN spermatique et de donner une information sur la qualité du spermatozoïde. Ce test de fragmentation de l'ADN spermatique est indiqué dans plusieurs cas, comme l'infertilité idiopathique souvent de cause inconnue ou encore, des échecs répétés des techniques de reproduction assistée (24).

L'objectif de ce travail est d'une part mettre en évidence l'existence d'une corrélation entre les différents paramètres spermatiques et le degré de compaction de l'ADN et d'autre part de démontrer l'intérêt de la technique Sperm Chromatin Dispersion (SCD) comme technique complémentaire au spermogramme et au spermocytogramme et qu'elle peut être proposée en première intention pour l'investigation de l'infertilité masculine.

I. LES INFERTILITES MASCULINES :

Un homme fertile est un individu qui a la capacité de concevoir, donc la fertilité correspond à une potentialité. A l'inverse l'infertilité correspond à une incapacité totale à obtenir un enfant. Autrement dit, la stérilité signifie qu'aucune thérapeutique curative n'est possible, cependant, cette notion stricte et définitive de la stérilité a changé depuis la possibilité des recueils de spermatozoïdes intratesticulaires et intraépididymaires (18).

I.1. Définition de l'infertilité :

D'une manière générale, on définit comme étant un couple infertile, un couple qui ne peut avoir d'enfants au bout de 12 mois de vie commune avec des rapports sexuels réguliers (32).

I.2. Principales étiologies :

Les facteurs masculins d'infertilité comprennent principalement des altérations quantitatives et/ou qualitatives du sperme. Les étiologies peuvent être pré-testiculaires, testiculaires ou post-testiculaires. Mais l'infertilité masculine peut également être inexplicée, elle est alors dite idiopathique (25).

I.2.1. Etiologies pré-testiculaires :

Les étiologies pré-testiculaires sont très rares. Ces troubles endocriniens touchent l'axe hypothalamus-hypophyse-testiculaire (ex : hypogonadisme ; dysfonctionnement des gonades) (25).

I.2.2. Etiologies testiculaires :

Les étiologies testiculaires sont les causes les plus fréquentes. 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 (25). L'origine testiculaire de l'infertilité peut être en rapport avec des anomalies génétiques. Par ailleurs, l'existence d'anomalies chromosomiques et de cas familiaux montrent qu'un défaut génétique est à l'origine de certains cas de stérilité.

L'infertilité peut également être associée à d'autres phénotypes. C'est le cas de la mucoviscidose, où les hommes porteurs de mutations dans le gène CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) présentent une agénésie des canaux déférents et sont donc stériles (27).

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 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. Cette anomalie est retrouvée fréquemment dans la population générale (15-20%) et chez environ 40% des hommes infertiles (39).

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.). Des causes iatrogènes (chimiothérapies anticancéreuses, stéroïdes anabolisants, médicaments hyperprolactinémisants, cimétidine, anticonvulsivants) et toxicologiques (alcool, tabac, cocaïne) ont été aussi rapportées (29).

I.2.3. Etiologies post-testiculaires :

Les étiologies post-testiculaires sont infectieuses (infections spermatiques ou des voies génitales) et concernent des anomalies de l'éjaculation (hypospadias, éjaculation rétrograde) ou des anomalies canalaire (agénésie congénitale bilatérale des canaux déférents : A B C D, souvent associées à des mutations du CFTR) (25).

II. ANATOMIE DE L'APPAREIL GENITAL MASCULIN :

La plupart des systèmes de l'organisme doivent fonctionner sans arrêt pour maintenir l'homéostasie. La seule exception est le système génital, qui semble « dormir » jusqu'à la

puberté. Bien qu'ils soient très différents, les organes génitaux de l'homme et de la femme partagent la même fonction : la production d'une descendance.

La fonction génitale de l'homme est d'élaborer les gamètes mâles, appelés spermatozoïdes, et de les introduire dans les voies génitales de la femme. L'appareil génital male offre à décrire deux testicules, des conduites excrétrices, des glandes annexes et un pénis (organe copulateur) (13) (Fig. 1).

II.1. Les testicules :

C'est un organe double, logés dans le scrotum (bourse). La gonade mâle, dont les dimensions sont de 30 et 45 mm, est une glande ovoïde délimitée par un tissu conjonctif (albuginée) qui émet des cloisons à l'intérieur formant ainsi entre 200 et 300 lobules. Chaque lobule renferme entre 1 et 4 tubes séminifères, dans lesquels s'effectue la spermatogenèse (Fig. 2) (13). Ils sécrètent une hormone, la testostérone responsable des caractères sexuels secondaires, après la puberté (1).

Le sperme est stocké dans les canaux de l'épididyme. Ce dernière se moule sur la face postérieure du testicule et reçoit du rete testis (Fig. 2). Plusieurs canaux fortement spiralés qui se réunissent pour former le canal épидидymaire, lui aussi fortement spiralé (5). Dans ce dernier, la plus grande partie du liquide séminal produit sera stockée et y sera enrichie avec une sécrétion qui inhibe la mobilité des spermatozoïdes afin d'éviter que l'énergie stockée soit utilisé de manière prématurée. Les spermatozoïdes non fonctionnels seront phagocytés (5).

II.2. Conduits excréteurs :

Les conduits excréteurs sont chargés du transport de sperme des testicules jusqu'à l'urètre (1). Les conduits excréteurs sont de deux types, à savoir :

II.2.1. Les conduits excréteurs intra testiculaires :

Les conduits excréteurs intra testiculaires sont représentés par les tubes droits de 1 mm de longueur. Ils s'ouvrent dans le rete testis. Ces deux structures sont noyées dans un tissu conjonctif dit le corps de High more (13) (Fig. 2).

II.2.2. Les conduits excréteurs extra testiculaires :

Les conduits excréteurs extra testiculaires sont représentés par l'épididyme, constitué par les canaux efférents et le canal épидидymaire, dont la longueur est de 06 mètres en moyenne. Les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité et leur pouvoir fécondant dans le canal épидидymaire. De l'épididyme se détachent deux canaux déférents droit et gauche. Après les deux vésicules séminales les deux canaux déférents constituent les deux canaux éjaculateurs. Après la prostate, ils débouchent dans l'urètre (13) (Fig. 2).

II.3. Les Glandes annexes :

II.3.1. Les Vésicules séminales :

Les vésicules séminales sont au nombre de 2, ressemblent à de petites poches bulbeuses. Elles s'abouchent sur la terminaison des canaux déférents. Elles mesurent environ 5cm de long et font 1,5cm de large (13). Elles sont situées entre la vessie et le rectum, en arrière et juste au dessous de la prostate (5) (Fig. 1). Les sécrétions des deux vésicules séminales constituent 50% du sperme. Ces sécrétions, à pH acide, sont représentées essentiellement par des lipides, des protéines, des sels minéraux, de l'acide ascorbique, du fructose et de la prostaglandine (13).

II.3.2. La Prostate :

La prostate est un glande sexuelle male impaire, située sous la vessie et entoure la partie initiale de l'urètre (1) (Fig. 1). Ses sécrétions alcalines, qui constituent le liquide prostatique, neutralisent l'acidité du liquide séminal. En outre, elles sont riches en zinc qui a un pouvoir bactéricide. Le liquide prostatique renferme la spermine qui est une protéine responsable de l'odeur du sperme (13).

II .3.3. Les Glandes de Cooper (Bulbo urétrales) :

Les glandes de Cooper sont deux formations glandulaires, arrondies, situées de chaque côté du bulbe spongieux, et débouchent dans ce conduit à l'entrée du pénis (40). Elles sécrètent un liquide alcalin qui neutralise l'acidité intra urétrale avant l'éjaculation afin de protéger les spermatozoïdes et d'en faciliter leur transport (13).

II .4 Le Pénis (verge) :

Le pénis est l'organe de la copulation chez l'homme, il est situé en avant de la symphyse pubienne et au dessus des bourses (1) (Fig. 1). Il est constitué de trois corps érectiles: deux corps caverneux et un corps spongieux, dans lequel se trouve l'urètre. Le corps spongieux se dilate à son extrémité formant ainsi le gland du pénis qui est recouvert d'une peau fine et mobile dite le prépuce (13).

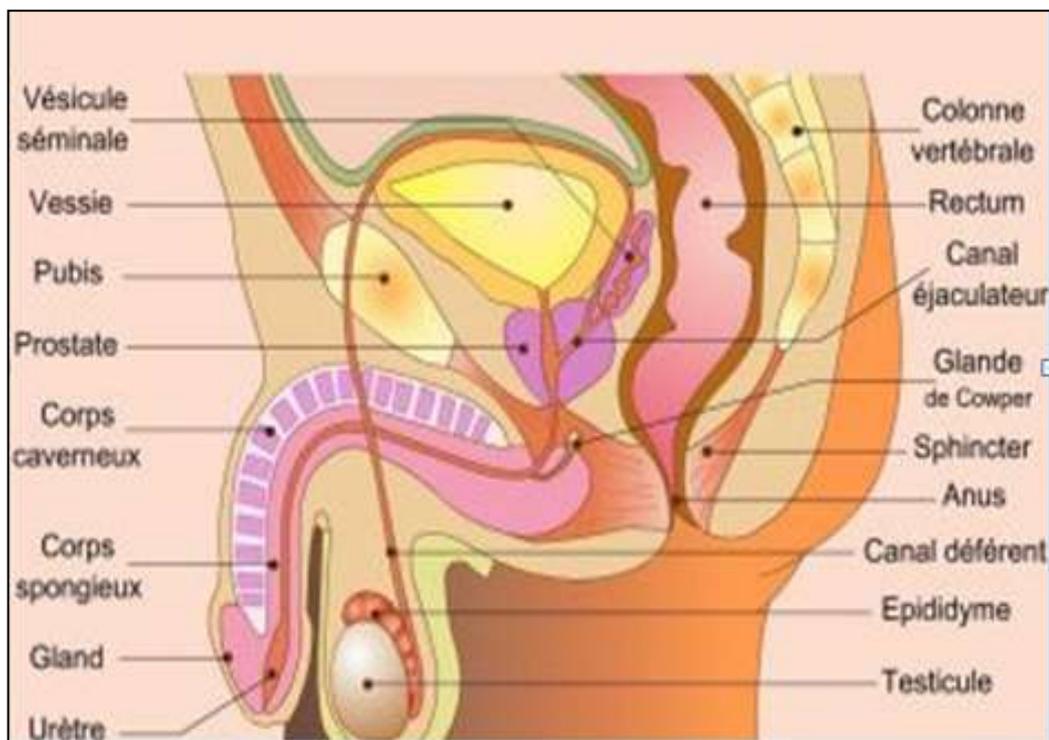


Figure. 1 : Vue latérale de l'ensemble des organes génitaux de l'homme (13).

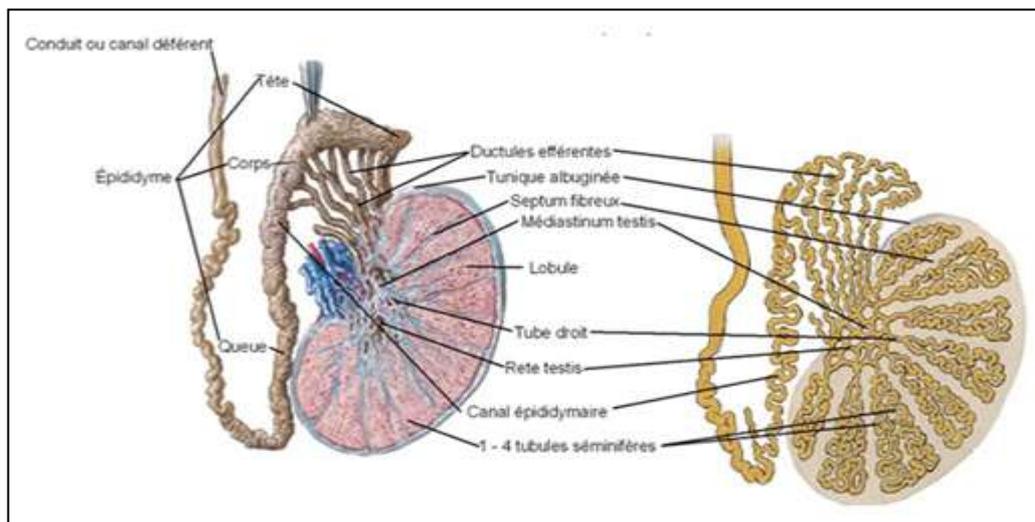


Figure. 2 : Coupe sagittale partielle du testicule (40).

III. SPERMATOGENESE :

La production de spermatozoïdes s'installe au début de la puberté et se poursuit durant toute la vie. Chaque jour, l'organisme de l'homme fabrique des millions de spermatozoïdes.

III.1. Formation du spermatozoïde :

Sous le terme de formation des spermatozoïdes, on entend le développement et la maturation de cellules germinales masculines immatures ou bien les spermatogonies en spermatozoïdes capables de fécondation. Ce processus se produit dans les tubes séminifères des testicules pubères (Fig. 3). La spermatogénèse se déroule en deux étapes successives :

- la spermatocytogénèse (du stade spermatogonie jusqu'au stade spermatocyte secondaire)
- la spermiogénèse (du stade spermatide jusqu'au spermatozoïde).

III.1.1. La spermatocytogénèse :

À ce niveau, les cellules germinales immatures subissent plusieurs divisions de maturation au cours desquelles le matériel chromosomique, initialement diploïde, sera réduit de moitié. Les spermatides ainsi obtenus mûrissent ensuite pendant environ 60-90 jours pour donner des spermatozoïdes fécondant (5). Les spermatogonies se divisent initialement par des mitoses, puis mûrissent en spermatocytes de premier ordre. Seule une partie des cellules issues de ses divisions poursuit leur maturation, laissant les autres en réserve pour de futures répliques. Les spermatocytes de premier ordre, issues des spermatogonies, sont des cellules diploïdes contenant 23 paires de chromosomes homologues subissent la méiose, qui dure chez l'homme environ deux semaines (Fig. 3). (19). La séparation des paires de chromosomes, se parachève par la première division méiotique produisant des spermatocytes de deuxième ordre. Chacun d'entre eux contient la moitié du nombre «normal» de chromosome, c'est-à-dire qu'ils sont maintenant des cellules haploïdes.

III.1.2. La spermiogénèse :

Les spermatides doivent subir un processus de maturation appelé spermiogénèse qui signifie la différenciation de la spermatide en spermatozoïde. Ce phénomène dure trois semaines (74 jours) et à une température inférieure à 34°C. Cette maturation est contrôlée par les cellules de Sertoli. La spermiogénèse fait apparaître la tête, la pièce intermédiaire et la queue du futur spermatozoïde (Fig. 4). La tête contient le matériel chromosomique et est recouverte d'un sac rempli d'enzymes appelé Acrosome. La pièce intermédiaire contient des mitochondries qui fournissent l'ATP nécessaire à la motilité des spermatozoïdes. Cette

motilité est assurée par les mouvements de nage de la queue, produit par l'activité contractile de son centre constitué de microtubules (19). Le mauvais fonctionnement d'une de ces étapes peut causer une infertilité.

Pour chaque stade de la spermatogénèse, il existe un lien étroit entre le sperme en développement et de cellules qui bordent les tubes séminifères, se sont les cellules de Sertoli. Elles ont les fonctions suivantes :

- ✓ Nutrition de sperme.
- ✓ Phagocytose des cellules mortes ou endommagées.
- ✓ Protection du sperme des toxines véhiculées par le sang qui traverse la barrière sang-testiculaire.
- ✓ Formation du liquide des tubes séminifères, se qui fait progresser les spermatozoïdes structurellement matures mais immobiles dans l'épididyme (19).

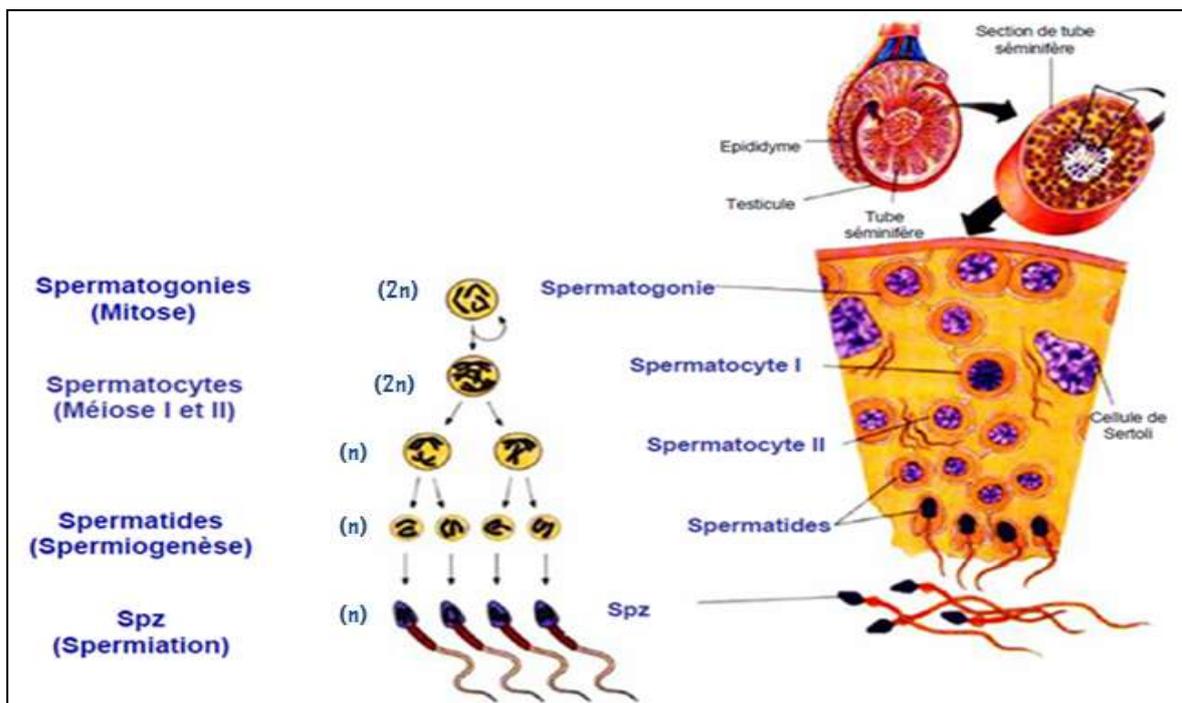


Figure. 3 : Résumé de la séquence des événements survenant dans la spermatogénèse (3).

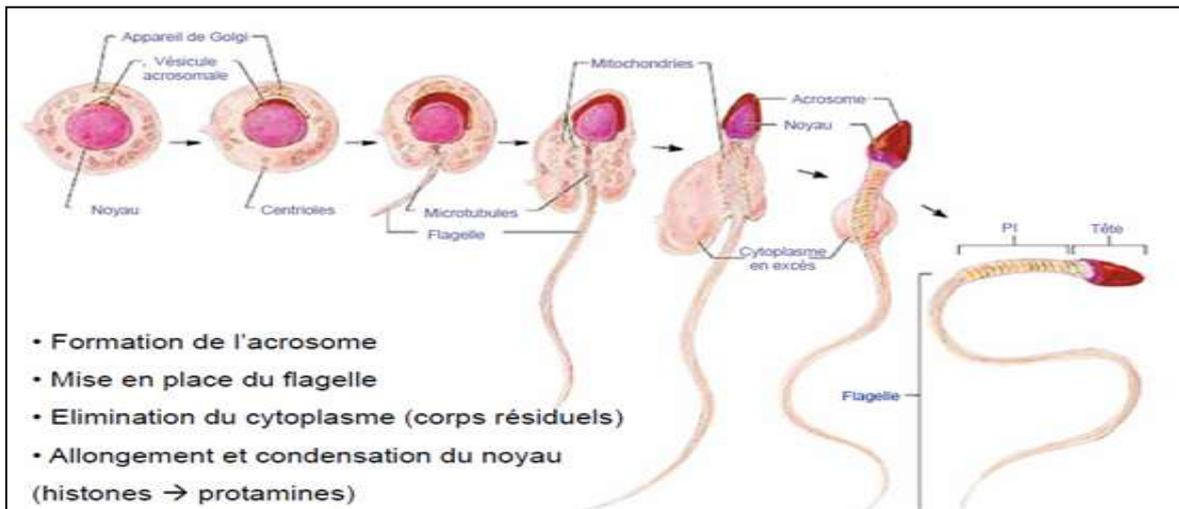


Figure. 4 : Résumé de la séquence des événements survenant dans la spermiogénèse (3).

III.2. Contrôle hormonal de la reproduction chez l'homme :

Le contrôle de la fonction reproductrice masculine est assuré par plusieurs hormones dont la sécrétion est régulée par des boucles de rétrocontrôle négatif (Fig. 5). L'hypothalamus synthétise de la GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone ou Gonadolibérine) qui gagne l'antéhypophyse par le système porte hypophysaire. Il y a alors stimulation de la libération des gonadotrophines FSH (Hormone Folliculo-Stimulante) et LH (Hormone Lutéinisante) qui gagnent les testicules, leur site d'action, par voie sanguine. Chacune agit sur une cellule cible différente : la FSH stimulant la spermatogénèse par ses effets sur la cellule de Sertoli et la LH agit sur les cellules interstitielles de Leydig par la sécrétion de testostérone. Ainsi, la concentration de testostérone dans les testicules est-elle élevée, condition nécessaire à la spermatogénèse. La testostérone circulante exerce un rétrocontrôle négatif en inhibant la sécrétion hypothalamique et antéhypophysaire. Les cellules de Sertoli sécrètent également une hormone peptidique appelée inhibine qui a un effet de réduction de la sécrétion de FSH relativement spécifique (19).

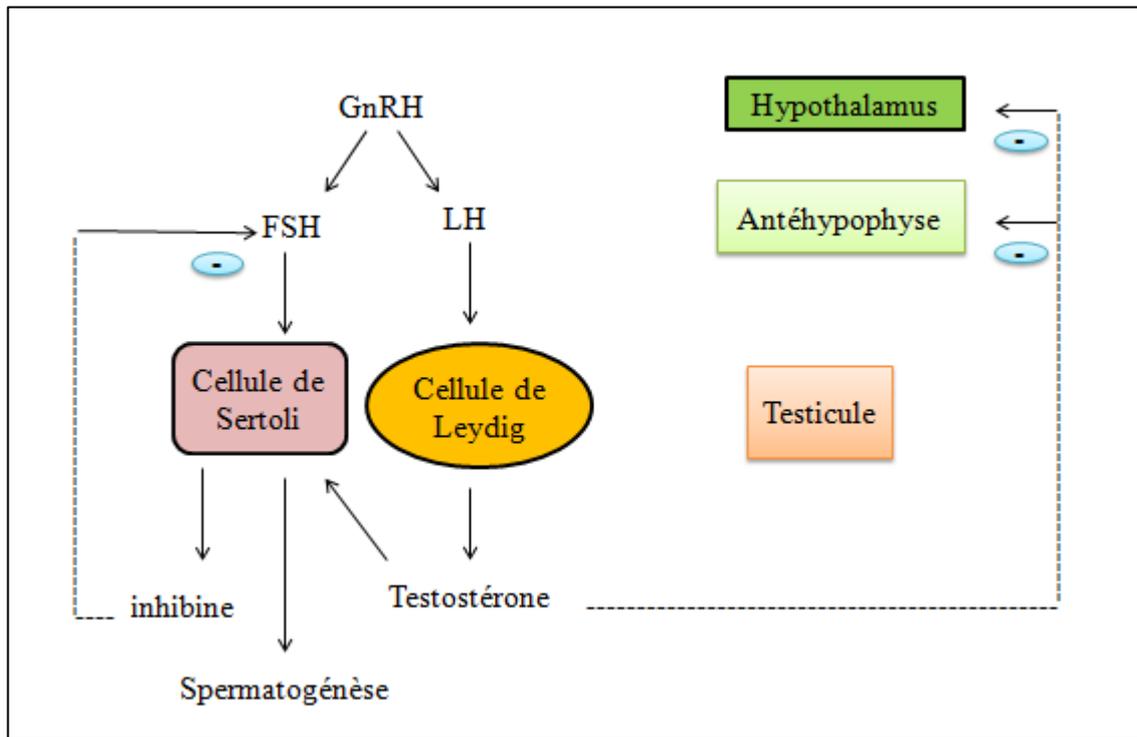


Figure. 5 : Contrôle endocrine de la fonction testiculaire (19).

La testostérone est la principale hormone sexuelle mâle. Ses effets sont les suivants :

- ✓ Stimulation de la différenciation et de la croissance de l'appareil génital masculin, ainsi que la spermatogénèse.
- ✓ Développement des caractères sexuels secondaires à la puberté
- ✓ Induction de la croissance squelettique à l'adolescence et fusion des cartilages de conjugaison.
- ✓ Stimulation du développement des muscles squelettiques.
- ✓ Augmentation du métabolisme basal.
- ✓ Effets comportementaux, avec notamment augmentation de la libido et de l'agressivité (19).

III.3. Le sperme :

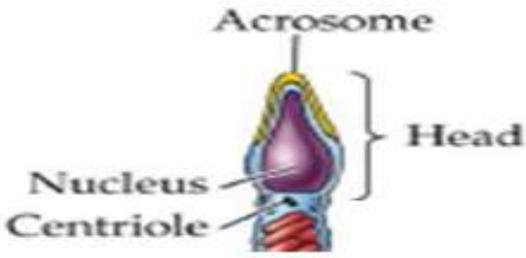
Le sperme ou liquide séminal, est le liquide blanchâtre légèrement collant (13). Il est composé du mélange lors de l'éjaculation de différentes sécrétion du testicule, du tractus génital et des glandes annexes. Il comprend une phase cellulaire ou spermatozoïdes et une phase liquidienne ou plasma séminal (12). Le sperme contient des nutriments ainsi que des substances chimiques qui protègent les spermatozoïdes et facilitent leurs mouvements.

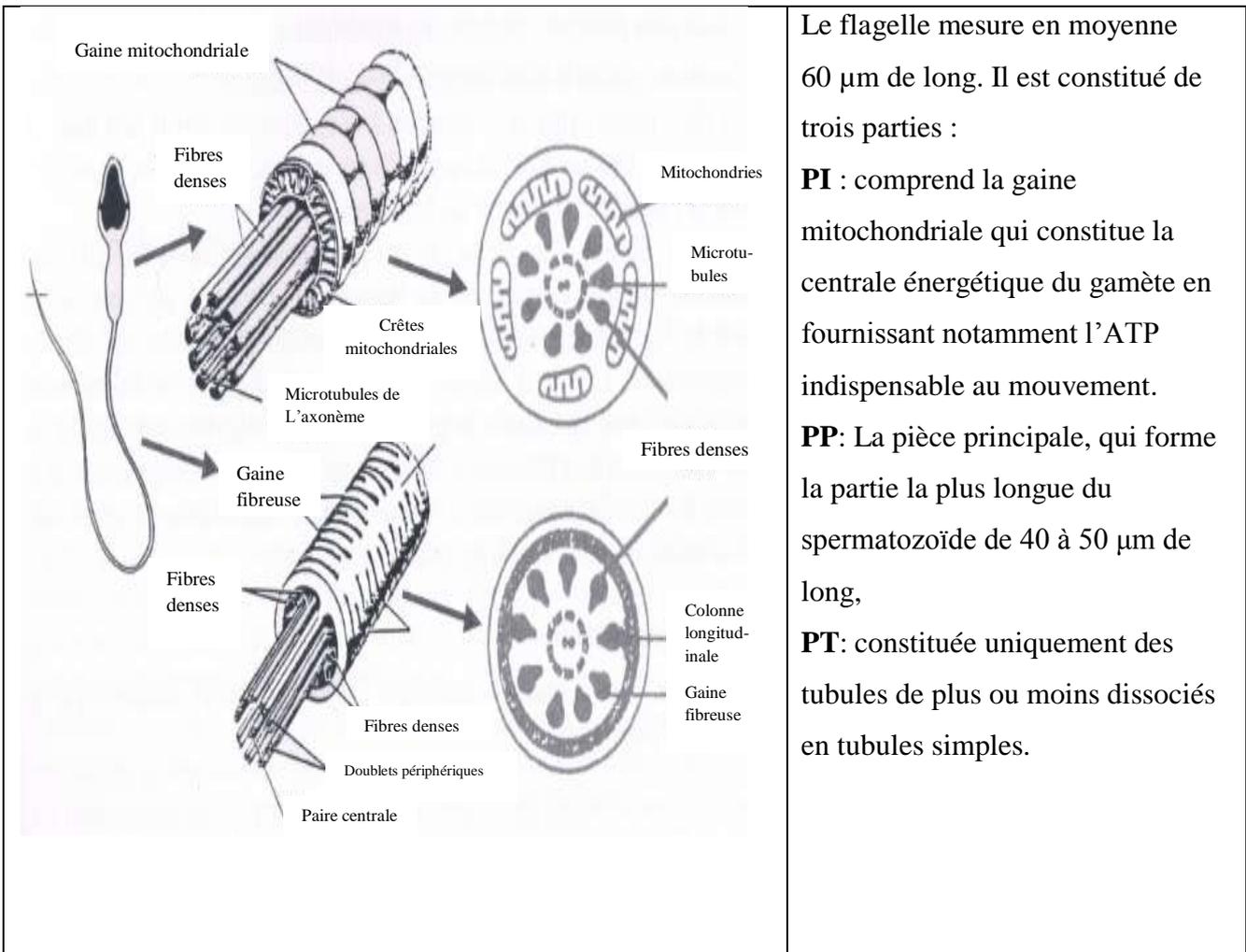
L'alcalinité relative du sperme (pH de 7,2 à 7,6) neutralise l'acidité de l'urètre de l'homme et du vagin de la femme.

III.3.1 Structure et morphologie d'un spermatozoïde :

Un homme adulte produit environ 400 millions de spermatozoïdes par jour. Le spermatozoïde est une cellule haploïde, allongée d'environ 60 µm. Son union avec l'ovule, lui aussi haploïde, permet de constituer une cellule-œuf diploïde, qui contient deux exemplaires (une paire) de chaque chromosome. Un spermatozoïde est composé de deux parties : la tête et le flagelle, séparées par le collet. Il est caractérisé par un minimum de cytoplasme (Tab. 1). C'est pendant la migration dans l'épididyme que les spermatozoïdes acquièrent des sites d'ancrage à la zone pellucide et à la membrane ovocytaire (13).

Tableau. 1 : Structure et morphologie d'un spermatozoïde (23).

Ultrastructure des différentes parties d'un spermatozoïde	Définition
La tête	Le noyau est alors recouvert sur ses deux tiers antérieur par l'Acrosome qui est un sac membranaire riche en enzymes importants lors de la fécondation.
 <p>The diagram shows a cross-section of the head of a sperm cell. At the top is the Acrosome, a yellowish, cap-like structure. Below it is the Nucleus, a large, purple, oval-shaped structure. At the base of the nucleus is the Centriole, a red, cylindrical structure. A bracket on the right side groups the Acrosome, Nucleus, and Centriole together, labeling them as the 'Head'.</p>	
Le flagelle	



Le flagelle mesure en moyenne 60 μm de long. Il est constitué de trois parties :

PI : comprend la gaine mitochondriale qui constitue la centrale énergétique du gamète en fournissant notamment l'ATP indispensable au mouvement.

PP : La pièce principale, qui forme la partie la plus longue du spermatozoïde de 40 à 50 μm de long,

PT : constituée uniquement des tubules de plus ou moins dissociés en tubules simples.

III.3.2. Structure de la chromatine spermatique :

La chromatine d'un spermatozoïde s'organise en une superposition de boucles d'ADN que sont les super-enroulements, qui ont la forme d'un « doughnut » (beignet). C'est au cours de la spermiogénèse 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 (Fig. 6).

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 jusqu'aux voies féminines (24).

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 (Fig. 7) (4). 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 (34).

Au final, dans les spermatozoïdes humains matures, environ 15% d'histones persistent dans le noyau (6) et plus de 70% des protéines nucléaires basiques sont des protamines (37).

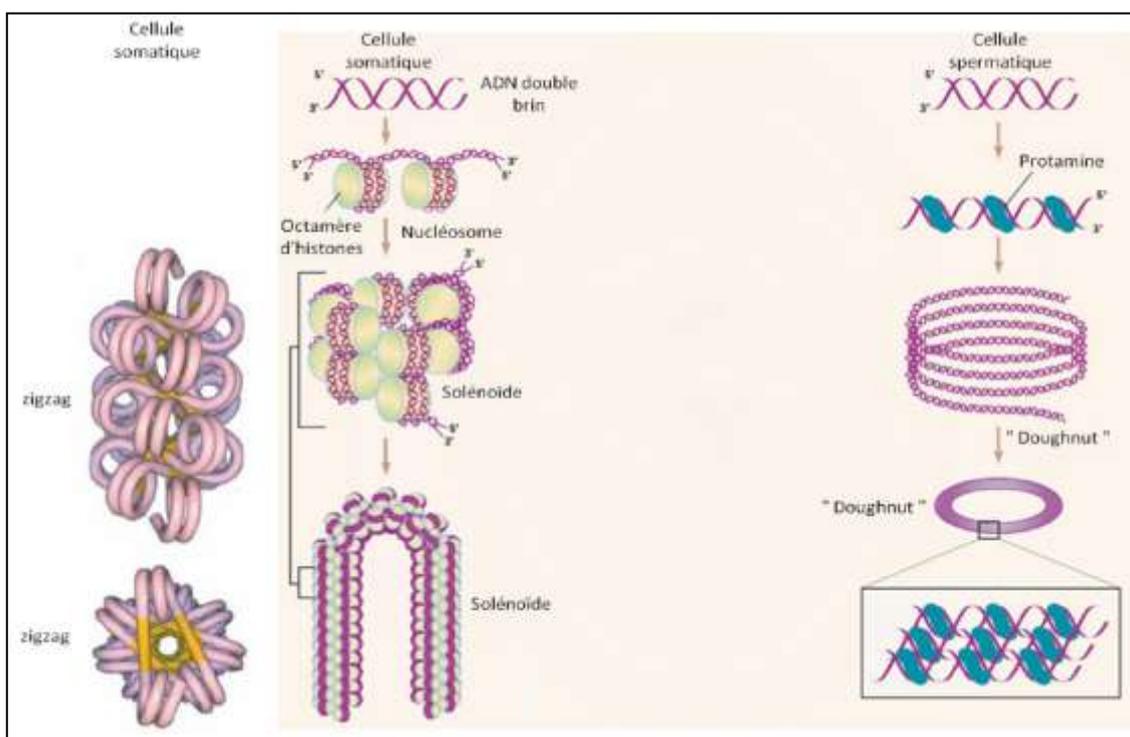


Figure. 6 : Modèles de l'organisation de la chromatine dans une cellule somatique (zigzag ou solénoïde) et dans une cellule spermatique (doughnut) (11).

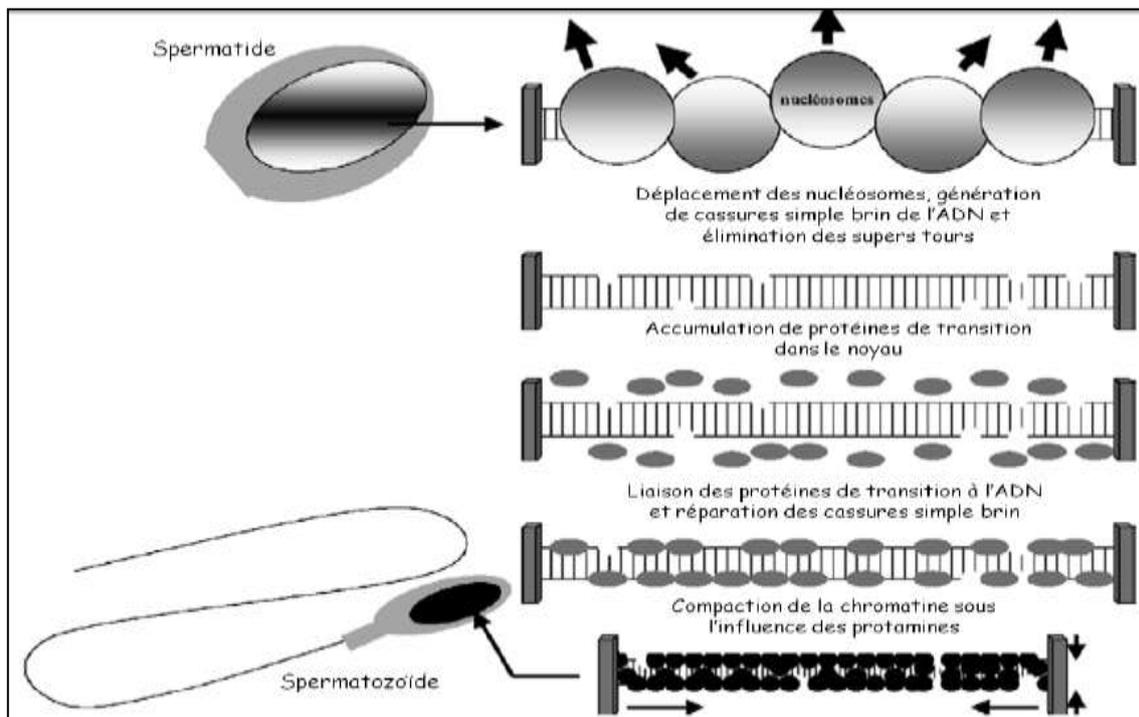


Figure. 7 : Synthèse des différentes étapes du remodelage de la chromatine lors de la spermiogénèse (37).

III.3.3. L'origine de fragmentation de l'ADN spermatique :

Tout au long du processus de spermatogénèse, la chromatine des gamètes est susceptible d'être altérée. Habituellement, le taux de fragmentation est faible dans la plupart des spermatozoïdes (30%). Après fécondation, l'ovocyte peut contribuer à réparer ces coupures anormales, sous réserve qu'elles se trouvent dans une proportion raisonnable. 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 qui aident 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. Seulement 15% de l'ADN est moins fortement condensé car la compaction s'opère grâce à des histones. Un dysfonctionnement de ces endonucléases pourrait entraîner un taux anormal de fragments d'ADN non réparés (27).

- La seconde théorie susceptible d'expliquer la présence de dommages dans l'ADN des spermatozoïdes éjaculés concerne la production de substances oxygénées réactives (SOR). Les SOR jouent un rôle physiologique très important dans la différenciation et les fonctions

des spermatozoïdes. Ils 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. Le processus de capacitation est un pré-requis indispensable pour la réaction acrosomiale.

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), contrôlée par des SOR, ferait intervenir une augmentation des phosphorylations des protéines du flagelle. 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 simples et doubles brins de l'ADN. 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 (30).

- La troisième hypothèse concernerait le rôle de l'apoptose au cours de la spermatogenèse. 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. L'apoptose pourrait permettre l'élimination des spermatozoïdes éjaculés anormaux et potentiellement néfastes. Les voies extrinsèques débutent par un engagement des récepteurs de mort, dont Fas qui serait présent à la surface des spermatozoïdes humains. Après l'engagement de récepteurs de mort cellulaire, les mitochondries sont également impliquées car elles libèrent des facteurs pro-apoptotiques qui activent la caspase 3, conduisant à la fragmentation de l'ADN. 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. (Fig.8) (35).

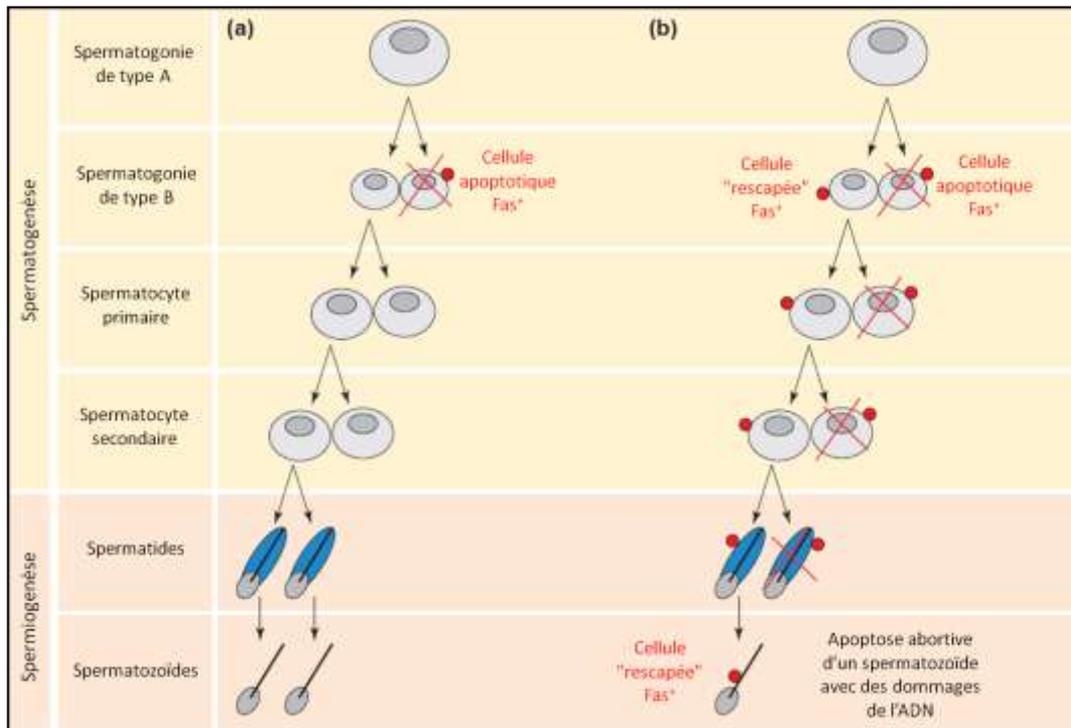


Figure. 8 : Rôle hypothétique de Fas au cours de la spermatogénèse chez des hommes aux paramètres spermatiques normaux (a) et anormaux (b) (35).

III.3.4. Les causes de fragmentation de l'ADN spermatique :

Les causes sont variées et peuvent être de type intrinsèque ou induites par des facteurs externes. Les facteurs intrinsèques incluent :

✓ Sélection non efficace : La production de spermatozoïdes arrive dans les tubes séminifères (testicules) et dans certains cas les spermatozoïdes et leurs cellules progénitrices souffrent d'altérations de type génétique qui se traduisent par des ruptures de l'ADN. Ces spermatozoïdes endommagés sont généralement sélectionnés et éliminés, mais si le mécanisme de sélection est altéré, des spermatozoïdes avec ADN fragmenté apparaissent dans l'éjaculat.

✓ Maturation incorrecte : Les spermatozoïdes passent par un processus de maturation dans l'épididyme qui est connu comme maturation épидидymaire. Ce processus de maturation implique la formation de la chromatine nucléaire et l'acquisition de la motilité spermatique. Si ce processus n'est pas complété correctement, des lésions de l'ADN spermatique peuvent se vérifier. Les facteurs extérieurs incluent :

- Lésions induites par radio/chimiothérapie
- Varicocèle.
- Épisode de forte fièvre.
- Exposition aux températures élevées.

- Maladie inflammatoire aiguë et chronique.
- Tabac.
- Alcool.
- Bains chauds.

✓ Le stress oxydatif post-testiculaire: durant le transport des spermatozoïdes à travers l'épididyme une fragmentation de l'ADN spermatique peut se vérifier. Un des mécanismes est en relation avec la production de radicaux libres, soit à cause de spermatozoïdes immatures, soit à cause de cellules épithéliales de l'épididyme qui endommagent directement le matériel génétique du spermatozoïde. En outre, l'activation de caspase et d'endonucléases spermatiques à la suite de facteurs toxiques et de températures élevées peuvent être des causes de fragmentation de l'ADN (41).

La fragmentation de l'ADN spermatique est réversible, en effet, plusieurs études ont montré qu'après quelques mois de traitement avec de la vitamine C et des antis radicaux libres, le DFI a été amélioré par comparaison avec des cas témoins (26).

III .3.5. Techniques d'évaluation 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 spermatique. 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.

a) Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) :

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) (14).

b) Test à l'acridine orange (AO) :

Acridine Orange test : Il mesure la dénaturation de l'ADN en quantifiant la dérive de la fluorescence du vert (ADN natif) vers le rouge (ADN dénaturé). La quantification est trop approximative pour en faire un test fiable (14).

c) Technique Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) dite COMET :

Il s'agit d'une électrophorèse des spermatozoïdes ayant été préalablement lysés en milieu fortement alcalin. L'ADN est révélé avec un colorant fluorescent. L'intensité de la fluorescence et la longueur de la queue de la comète sont corrélées au niveau de fragmentation. Le traitement alcalin peut artificiellement dégrader l'ADN et induire une surestimation de la fragmentation (14).

d) Sperm Chromatin Dispersion test (SCD) :

En 2003, une équipe a présenté le test Sperm Chromatin Dispersion (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. Au contraire, les gamètes avec un ADN fragmenté ne produisent pas ou peu de halos de dispersion. De plus, les hommes fertiles ont significativement plus de gamètes avec de grands halos que les hommes infertiles (9).

e) 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 (37). 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.

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

Cette technique utilise l'activité exonucléasique de la terminal deoxynucleotidyl transférase (TdT) qui catalyse l'incorporation de nucléotides triphosphates aux extrémités 3' -

OH libres de la molécule d'ADN. Les nucléotides incorporés forment une oligomère composée de nucléotides couplés à la digoxygénine et de nucléotides non marqués. 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.

IV. LES TECHNIQUES DE L'INVESTIGATION DE L'INFERTILITE MASCULINE :

Chez l'homme, le spermogramme associé au spermocytogramme constituent les examens de base dans le cadre de l'exploration de la fertilité.

IV.1. Spermogramme :

Le spermogramme est un **examen médical**, qui sert à mesurer la **quantité des spermatozoïdes**, et vérifier la santé de ceux-ci. Il permet de mettre en évidence une déficience sur la mobilité des spermatozoïdes, sur leur taille et leur forme. Les substances présentes dans le **sperme**, comme le liquide prostatique, sont également analysées, afin d'être sûr que les spermatozoïdes baignent bien dans les fluides adéquats (33).

IV.1. 1. Examen macroscopique :

a) La liquéfaction : Avant de commencer l'analyse du sperme, une période de temps doit être accordée pour la liquéfaction. La durée normale de liquéfaction est de 30 minutes. Si celle-ci n'est pas réalisée à l'intérieur de ce délai, on dira qu'elle est lente plutôt que normale (21).

b) Couleur : Ce paramètre est évalué à l'œil nu, immédiatement après liquéfaction, le sperme devrait avoir un aspect homogène blanchâtre. Il peut également avoir une couleur jaunâtre en cas d'infection ou rougeâtre lorsqu'il y a présence d'hématies (20).

c) Viscosité : la viscosité s'évalue selon 4 niveaux à l'aide d'une pipette :

- ✓ Viscosité normale : si l'échantillon se sépare bien goutte à goutte.
- ✓ Viscosité 1 : si l'échantillon forme un filet liquide entre chaque goutte.
- ✓ Viscosité 2 : si l'échantillon est suffisamment visqueux pour que le filet soit continu.
- ✓ Viscosité 3: si l'échantillon est tellement visqueux qu'il ne peut s'écouler par la pipette (21).

d) Volume : le volume de l'éjaculat est mesuré à l'aide d'une pipette ou d'un cylindre gradué (21).

e) pH : le pH est mesuré à l'aide de papier pH (21).

IV.1.2. Analyse microscopique :

a) Mobilité et qualité de mouvement : Pour évaluer la mobilité, un examen à l'état frais doit être effectué : 10 microlitres (μL) de sperme sont déposés entre une lame et une lamelle. Un décompte est réalisé en visualisant au moins 200 spermatozoïdes (2×100) et l'évaluation des grades se fait comme suit :

- Grade A: progression rapide : les spermatozoïdes bougent bien en ligne droite à travers le champ du microscope;
- Grade B: progression lente : les spermatozoïdes bougent lentement, en zigzaguant;
- Grade C : agitation sans progression : les spermatozoïdes bougent mais n'avancent pas (seules les flagelles bougent);
- Grade D : immobiles : les spermatozoïdes sont complètement immobiles (21).

b) Numération des spermatozoïdes : Cette étape permet de déterminer la concentration de spermatozoïdes dans l'éjaculat à analyser. Une dilution du sperme au $\frac{1}{20}$ est réalisée (10 μL de sperme complété par 190 μL de solution Ringer). L'appréciation de la numération se fait à l'aide de la cellule de Malassez. La concentration est déterminée sous microscope optique au grossissement (40 x) (20).

c) Test de vitalité : Cette coloration est basée sur le principe de la perméabilité des cellules mortes à certains colorants comme l'éosine. Celle-ci nous permet d'évaluer, en faisant un décompte de 200 spermatozoïdes, le pourcentage de spermatozoïdes vivants. Ceux en blanc ont une membrane qui n'est pas lésée, c'est-à-dire qu'ils résistent à la coloration à l'éosine, tandis que ceux en rouge ont une membrane lésée permettant à l'éosine de pénétrer à l'intérieur de la cellule. Quant à la nigrosine, elle sert seulement à colorer le fond du frottis. De plus, ce test nous donne pas l'occasion de faire un contrôle interne en ce qui a trait à l'estimation de la mobilité (20).

d) Concentration des cellules rondes :

- La présence de cellules germinales : Elles sont les cellules de base qui évoluent vers les spermatozoïdes après une transformation complexe. Un taux hors des normes (supérieur à 5 %) doit faire penser à un trouble de la spermatogénèse.

- Le taux des globules blancs : Le taux de leucocytes dans le sperme doit être inférieure à 1 million/ml. C'est un marqueur de l'existence d'une infection (leucospermie) qui a un effet néfaste sur la fécondance des spermatozoïdes (20).

c) Appréciation de l'agglutination : La présence dans le sperme d'anticorps anti-spermatozoïdes va causer l'agglutination des gamètes et altérer fortement leur mobilité et donc leur pouvoir fécondant (20).

Tableau. 2 : Les normes et les anomalies d'un spermogramme selon l'OMS (2010).

Paramètres	Valeurs normales (OMS, 2010)	Valeurs anormales	Pathologie
Volume de l'éjaculat	≥ 1,5 ml	0 ml < 1,5 ml > 6 ml	Aspermie Hypospermie Hyperspermie
PH	7,2 à 8	-	-
Numération des spermatozoïdes	≥ 15 millions / ml	0 / ml < 1 million / ml < 5 millions / ml < 15 millions / ml > 250 million / ml	Azoospermie Oligozoospermie extrême (ou Cryptozoospermie) Oligozoospermie sévère Oligozoospermie Polyzoospermie
Mobilité à 1 heure	≥ 40 % de mobilité progressive	< 40 %	Asthénozoospermie
Vitalité à 1 heure	≥ 60 %	< 60 %	Nécrozoospermie
Formes typiques	≥ 15 %	< 15 %	Tératozoospermie
Leucocytes	< 1 million / ml	≥ 1 million / ml	Leucospermie
Cellules rondes	< 5 millions / ml	-	-
Agglutinats	Absence	-	-
Autres	-	Présence de sang Présence de pus Association Oligo-Asthéno-Tératozoospermie	Hémospemie Pyospermie OATS

IV.2. Spermocytogramme :

Un spermocytogramme est un examen médical correspondant à l'analyse cytologique et morphologique des spermatozoïdes au microscope et permettant de l'évaluation de la fertilité masculine. Les anomalies spermatiques sont répertoriées en quatre classes, selon leur emplacement :

- Tête : base, acrosome, vacuole.
- Pièce intermédiaire : implantation, épaisseur.
- Pièce principale : dimension, linéarité.
- Reste cytoplasmique : présence ou absence.

Une seule anomalie dans une des 4 classes suffit à classer le spermatozoïde comme « Atypique » (22).

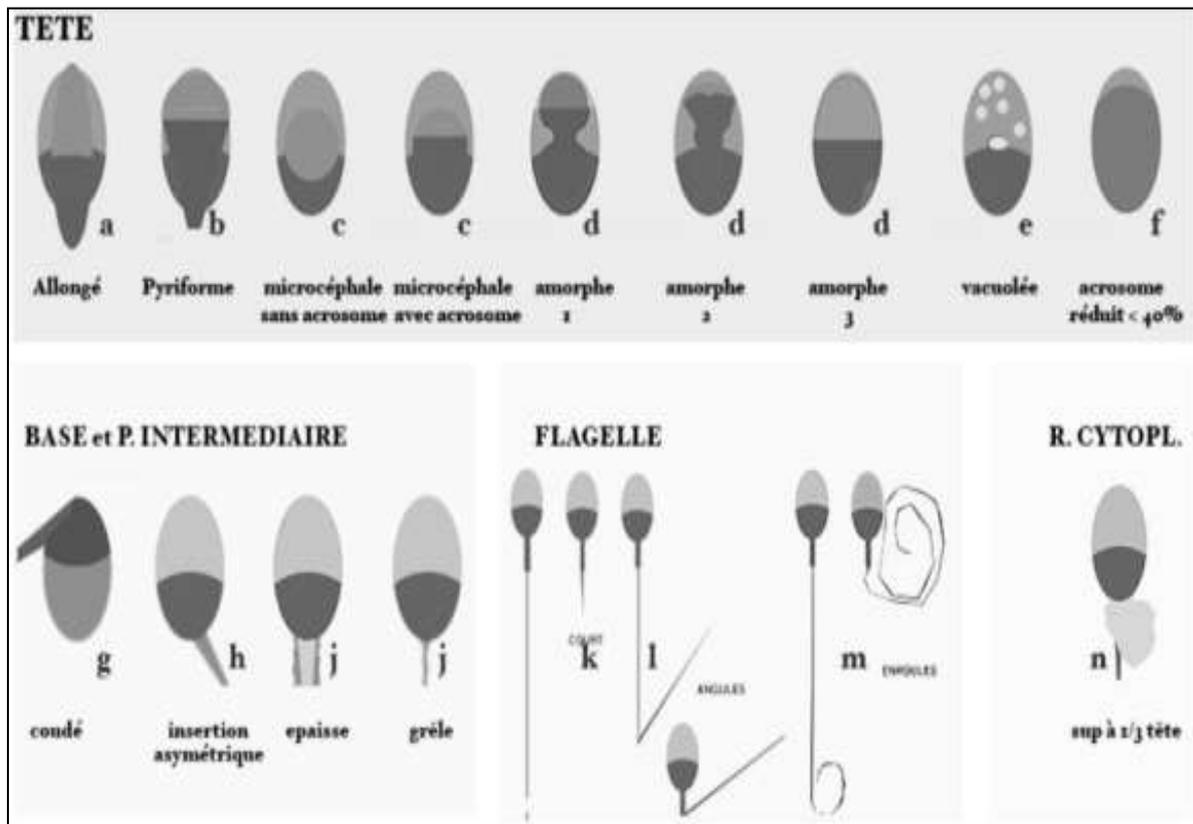


Figure. 9 : Classification des anomalies morphologiques des spermatozoïdes KRUGER selon l'OMS (2010).

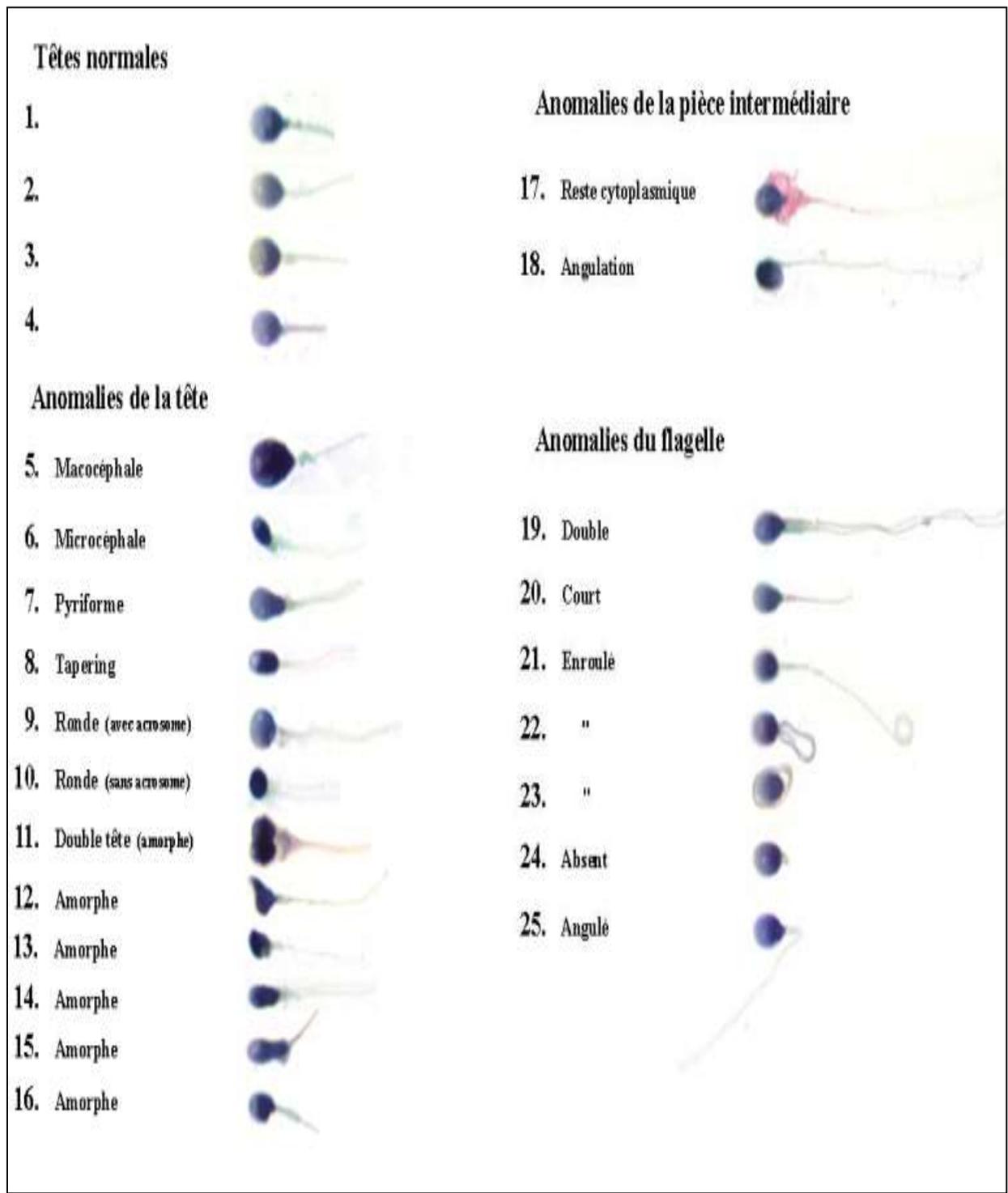


Figure. 10 : Classification des anomalies morphologiques des spermatozoïdes (7).

V. Aspect de la population cible :

Notre étude a porté sur l'analyse de la fragmentation de l'ADN spermatique d'une cohorte de 33 patients des 'hommes infertiles qui se sont présentés au laboratoire de spermologie de

la clinique IBN ROCHD de Constantine, pour une analyse par spermogramme sur une période de deux mois, du 9 mars au 9 mai 2014.

Chaque patient a subi un interrogatoire minutieux permettant ainsi de remplir une fiche de renseignements (Annexe I). Des examens de spermogramme et de spermocytogramme ont été effectués dans le laboratoire de spermologie par les techniciens décrites précédemment. Une fois l'analyse faite, nous recueillons le reste des échantillons de sperme pour analyser la fragmentation de l'ADN spermatique.

Le test de fragmentation d'ADN spermatique a été réalisé par la technique de Sperm Chromatin Dispersion (SCD). Nous avons aussi procédé à la numération des cellules rondes; les cellules leucocytaires et les cellules germinales par le KIT LeucoScreen.

VI. Matériel biologique :

Les échantillons de sperme sont recueillis le jour même de l'analyse sur des individus venus en consultations au service de spermologie de la clinique IBN ROCHD de Constantine. Toutes les analyses sont faites sur du sperme frais.

VII. Condition de recueil du sperme :

Le patient reçoit un certain nombre d'informations et instructions en ce qui concerne les conditions de recueil de son sperme pour assurer le bon déroulement et la précision de l'analyse.

Selon les recommandations d'usages, et dans la mesure du possible, le recueil du sperme se fera au laboratoire. Le laboratoire dispose d'une salle prévue à cet effet.

- ✓ Respect du délai d'abstinence (L'OMS propose un délai d'abstinence jusqu'à 7 jours). Quatre jours selon les usages de la clinique IBN ROCHD.
- ✓ Miction avant recueil (boire les 2 - 3 jours précédents).
- ✓ Nettoyage des mains et des ongles, séchage des mains avec une serviette papier à usage unique.
- ✓ Toilette intime avec savon liquide ou une solution antiseptique (Dakin, Chlohexidine) et rinçage abondant à l'eau.
- ✓ Recueil par masturbation dans un récipient à col large.



Figure. 11 : Exemple d'une salle prévue pour le recueil de sperme.

VIII. La technique de Sperm Chromatin Dispersion :

IV.1. Principe :

Cette méthode est basée sur un test de dispersion de la chromatine spermatique. Les spermatozoïdes sont immergés dans un gel d'agarose où ils subissent un premier traitement de dénaturation qui est responsable de l'élimination des protéines de cohésion de l'ADN spermatique. Un deuxième traitement qui permet la lyse de la membrane plasmique des cellules spermatiques. Après ces deux traitements, les gamètes avec un ADN non fragmenté relâchent des boucles de chromatine qui forment de grands halos. Au contraire, les gamètes avec un ADN fragmenté ne produisent pas ou peu de halos de dispersion. Nous avons utilisé un KIT dit HALOSPERM commercialisé par **Halotech DNA, SL Madrid Espagne** (Annexe II).

IV.2. Méthodologie :

- Préparer à l'avance le gel d'Agarose à 1%. Ajouter 1g de poudre d'Agarose dans 100 ml d'eau distillée.
- Faire fondre le mélange dans un bain marie à 96 °C pendant 30 min.
- Conserver le gel dans des tubes contenant soit 50 µl ou 25 µl de solution d'Agarose. Ces tubes seront utilisés en fonction de la concentration spermatique de l'échantillon.
- Garder le stock de tubes fermés dans un endroit sec et hors de la poussière.

- Fluidifier l'Agarose en plongeant le tube (50µl ou 25 µl) dans un bain marie à 85-90°C jusqu'à ce que le contenu devienne translucide (au moins 15 min).
- Transférer le tube avec l'Agarose fondue dans un bain à 37°C.
- Le sperme frais est lavé dans une solution de PBS (Phosphate Buffered Saline) pour éliminer le liquide interstitielle et les cellules épithéliales. 2 lavages sont faits. Dans le premier en ajoutant la solution de PBS (le double du volume spermatique). Pour 1 ml de sperme par exemple on rajoute 2 ml de PBS. Puis on centrifuge pendant 10 min à 20000 rpm.
- Eliminer le surnageant et conserver le culot.
- Effectuer un deuxième lavage en ajoutant le même volume de PBS que précédemment, puis, on centrifuge pendant 10 min à 20000 rpm.
- Eliminer le surnageant et conserver le culot.
- Enfin, on ajoute et selon la concentration de l'échantillon de sperme de départ ; soit 300 µl de PBS si la concentration du spermatozoïde est supérieure à 10 million/ml, soit 100 µl de PBS si elle est inférieure. Homogénéiser le contenu de tube à l'aide d'un vortex.
- 5 min avant de déposer le mélange sperme Agarose sur la lame, on met sur une plaque chauffante une lame et une lamelle pour éviter ainsi la solidification rapide de gel d'agarose au moment du dépôt.
- Selon la concentration de l'échantillon de sperme de départ nous rajoutons rapidement un volume de sperme suffisant au gel d'Agarose. Si la concentration est supérieure à 10×10^6 , nous prélevons 25 µl de sperme qui seront mélangés à 50 µl d'Agarose. Si la concentration est plus faible, les 25 µl de spermatozoïdes sont mélangés à 25 µl d'Agarose. Attention avant de procéder au mélange du sperme, l'Agarose doit être à 37 °C pour éviter de dégrader l'ADN spermatique.
- Bien mélanger rapidement le contenu à l'aide d'une micropipette, puis déposer 20µl du mélange Agarose-Spermatozoïdes sur la lame préalablement mise sur une plaque chauffante (voir plus haut).
- Laisser quelques minutes avant de déposer la lamelle sur la goutte du mélange Sperme-Agarose, ainsi libérer les bulles d'air formées.
- Déposer la lamelle délicatement.
- Retirez la lame de la plaque chauffante et la laisser refroidir quelque second à température ambiante.
- Placer ensuite la lame sur une plaque métallique et la mettre à 4°C pendant 5 à 30 minutes.

- Pendant ce temps sortir la solution de lyse (+4°C) et la laisser à une température ambiante pendant 5 min.
- Une fois les 30 min passées, plonger la lame dans l'eau pour enlever la lamelle, par glissement, puis laisser la lame sécher sous la hôte.
- Vérifier sous microscope la présence des spermatozoïdes fixés sur le gel. Attention cette étape est importante pour la suite de la manipulation. En l'absence de spermatozoïdes sur la lame il faut reprendre à zéro.
- La solution de dénaturation est stockée elle aussi à + 4 °C. En premier la laisser à température ambiante durant 15 min, puis prélever 16 µl de la solution et la rajouter à 2 ml d'eau distillé.
- A l'aide d'une pipette pasteur recouvrir la surface entière du gel d'Agarose avec la solution de dénaturation. Laisser agir 7 minutes, sous une hôte. On égoutte la lame par la suite on l'inclinant.
- Ensuite et de la même manière que le premier traitement recouvrir la surface du gel par la solution de lyse et on laisse agir pendant 20 minutes. La solution de lyse est vendu prête à l'emploi.
- Rincer la lame on l'incubant dans de l'eau distillée durant 5 min, l'en égoutte par la suite on l'inclinant.
- Déshydrater la lame dans des bains d'alcool de 70%, 90%, 100% pendant 2 min pour chaque bain. Au dernier bain, on égoutte la lame on l'inclinant et on la laisse sécher à l'air libre ou sous la hôte.
- Placer la lame horizontalement dans une boite de pétri. A l'aide d'une pipette pasteur déposer quelques gouttes de la solution de SSA EOSINE sur la surface de gel d'Agarose, (bien recouvrir la surface). Laisser agir 7 min. Egoutter la lame on l'inclinant.
- Appliquer la solution SSB THIAZINE de la même manière que le premier colorant. laisser agir 7 min sous une hôte puis égoutter la lame on l'inclinant.
- Laisser sécher la lame à température ambiante.
- Observer la lame au microscope optique à un grossissement (40 x).

Effectuer la lecture sur 500 spermatozoïdes dans des champs déférents. Calculer enfin les pourcentages de spermatozoïdes fragmentés et ceux non fragmentés.

IX. Analyse des cellules rondes :

Il s'agit d'analyser les cellules germinales immatures et les leucocytes qui se trouvent dans le liquide séminal.

V.1 Principe de test :

Les granules des leucocytes polynucléaires neutrophiles contiennent de la peroxydase qui, en présence de peroxyde d'hydrogène, forme de l'eau et des ions oxygènes libres. Ces derniers oxydent alors la benzidine, qui prend une couleur marron et donne ainsi sa couleur aux cellules. Au contraire, les cellules germinales ne renferment pas de peroxydase et prennent une coloration rosée. Ce qui permet de distinguer les 2 classes de cellules.

Nous avons utilisé un KIT : LeucoScreen By FertiPro NV, Belgium (Annexe III).

V.2 Méthodologie :

- Préparation de la solution de travail : Le kit est sous forme de 2 réactifs. Nous avons adapté le protocole proposé dans le KIT à nos conditions de travail.
- Ajouter 300 µl du réactif 1 ; composé du colorant LeucoScreen (contenant de la Benzidine, la Cyanosine et de l'Ethanol), à 10 µl de réactif 2 lui-même composé ; de peroxyde d'hydrogène à 30 %. La solution ainsi préparée est stable pendant 24 h, si elle est conservée à +4°C.
- Mélanger une goutte (10 µl) de sperme frais lavé (voir plus haut), avec une goutte (10 µl) de la solution de travail. Mélanger soigneusement durant au moins une minute. Utiliser pour cela, le bord de la lamelle, ou l'embout ayant servi au dépôt du sperme.
- Couvrir le mélange avec la lamelle couvre-objet deux minutes environ, en évitant de piéger des bulles d'air. L'apparition de petites bulles d'air est normale, elle est due à la réaction catalysée par la peroxydase. Plus la concentration en cellules positives à la peroxydase sera élevée, plus le nombre de bulles formées sera important.
- Lire le résultat sous microscope à un grossissement de 40 x (examiner au moins 10 champs différents). Compter les cellules leucocytaires et germinales de chaque champ.

V.3. Calcul de la concentration en cellules leucocytaires (CL) et germinales (CG) :

La concentration en cellules leucocytaires (CL) et en cellules germinales (CG) peut être déterminée en multipliant le nombre de ces cellules par un facteur connu basé sur la taille d'un

champ de microscope et sur la hauteur entre la lame porte-objet et la lamelle couvre-objet (soit la profondeur de l'échantillon de sperme). Le diamètre du champ de microscope peut être mesuré à l'aide d'un micromètre. La surface d'un champ est égale au carré de son rayon multiplié par pi ($S = \pi r^2$).

La distance entre la lame porte-objet et la lamelle couvre-objet peut être calculée avec la formule suivante :

Hauteur (en μm) = volume (en μl) / (longueur \times largeur de la lamelle couvre-objet en mm).

Lorsque l'on connaît ces chiffres, un facteur peut être calculé avec la formule suivante :

Facteur = $1 \times 10^6 / (S \times \text{hauteur})$.

Dans notre étude les valeurs obtenues sont les suivants :

$$S = 3,14 \times 80^2 = 20096 \mu\text{m}^2$$

Le rayon de l'objectif qui équipe le microscope du laboratoire est de 80 μm .

$$\text{Facteur} = 1 \times 10^6 / (20096 \times 20 / 22 \times 22) \times 10^3 = 1,21$$

- Compter le nombre des cellules leucocytaires et le nombre des cellules germinales dans les 10 champs différents puis calculer la concentration de ces deux derniers à l'aide de la formule suivante : (Nombre de CL/10 et CG/10) \times 1,21 (millions/ml).

X. L'Analyse statistique :

L'étude statistique a été réalisée à l'aide du logiciel XLSTAT version Mais 2014. Les corrélations des paramètres quantitatifs ont été réalisées avec le test de corrélation (nuages de points avec courbe tendance et coefficient de corrélation) et pour affiner nos résultats nous avons soumis les données à un test de khi-deux qui permet de tester l'indépendance ou non entre deux variables. Les corrélations des paramètres qualitatifs ont été réalisées par le test de STUDENT.

I. RESULTAT :

I.1. Accepte générale de la population étudié :

Sur la base des résultats du spermogramme rendu par les analyses du laboratoire de spermologie, nous avons sélectionné 33 individus dont 29 présentaient un spermogramme perturbé selon le compte rendu médical (SSP). Les 4 individus restant sont des cas décrits comme normaux (SSN) (Tab. 3), soit des taux de 88 % SSP et 12 % SSN (Fig. 12).

Tableau. 3 : Répartition des sujets SSP et SSN.

Résultat de l'analyse spermatique	Effectif	%
SSN	4	12 %
SSP	29	88 %
Total	33	100 %

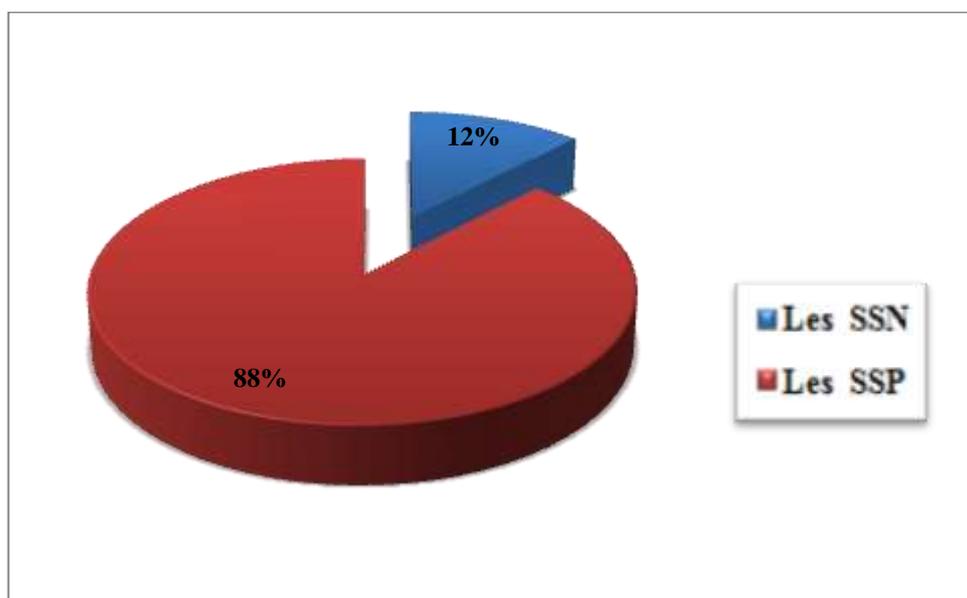


Figure. 12 : Répartition en pourcentage des SSP et SSN.

I.2. Résultats du spermogramme :

Les comptes rendus des résultats du spermogramme sont consignés dans le tableau 4.

Parmi les 29 cas SSP (Tab .4), une anomalie majeure du spermogramme a été observée ; il s'agit de l'asthénozoospermie (problème de mobilité) avec 62,06 % des cas, suivie, par la nécrozoospermie (problème de vitalité) et l'oligozoospermie (problème de concentration), avec un taux respectivement de 55,17 % et de 48,27 %.Trois autres anomalies à moindre fréquences il s'agit d'hypospermie (problème de volume) avec 27,58 %, 24,13 % des cas de sperme avec un pH basique, 20,68 % des spermés avec un taux des cellules rondes élevée (cellules leucocytaires et cellules germinales). Enfin un cas isolé avec présence d'agglutinats, il représente 6,89 % des cas étudiés (Fig. 13).

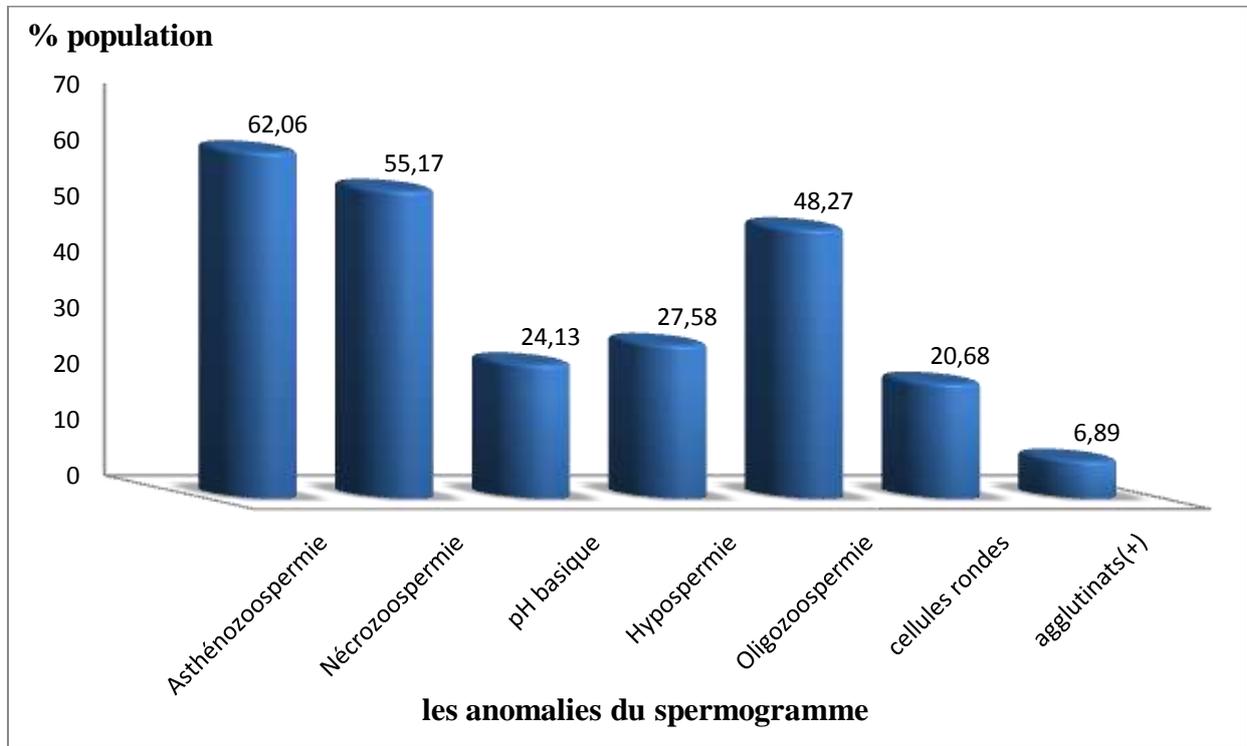


Figure. 13 : Distribution de la fréquence des anomalies spermatiques.

I.3. Les paramètres spermatiques et le résultat de la SCD :

Selon le protocole SCD, l'analyse doit être faite par la lecture de 500 spermatozoïdes par individus. Pour quelques cas d'oligospermies, où le nombre de spermatozoïdes était très faible, l'analyse a été faite sur moins de 500 spermatozoïdes. Ces individus sont indiqués par un (*) dans le tableau 5. L'analyse microscopique des l'échantillon est rapporté dans la planche I.

Tableau.5 : Résultat global du test de fragmentation dans notre échantillon.

(*) Cas d'oligospermie ; faible concentration.

Les patients	Test de fragmentation	
	sans F(%)	avec F(%)
1	29	71
2	36	64
3	61	39
4	46	54
5	59	41
6	68	33
7	81	19
8	81	19
9	95	5
10	73	27
11	53	47
12	67	33
13	45	55
14	40	60
15	71	29
(*) 16	31	69
(*) 17	37	63
18	30	70
19	30	70
20	71	29
21	76	24
22	96	4
23	8	92
24	13	87
25	2	98
26	71	29
27	85	15
28	94	6
29	83	17
30	49	51
31	35	65
32	52	48
33	58	42

Afin d'affiner nos résultats, nous avons répartie les individus SSP selon les différents troubles observés avec le spermogramme. Nous avons consigné nos différents résultats dans des tableaux qui regroupent chaque perturbation avec le taux de fragmentation de l'ADN spermatique obtenu. L'indice de fragmentation d'ADN (DFI) établis est calculé selon la formule :

$$DFI(\%) = \frac{\text{Spermatozoides fragmentés}}{\text{Nomre total des spermatozoides comptés}} \times 100$$

D'après les résultats obtenus on note que la perturbation globale des critères du spermogramme est accompagnée d'une perturbation globale de la fragmentation de l'ADN spermatique des individus SSP par rapport aux individus SSN.

I.3.1. Test de corrélation :

a) La Vitalité et la Fragmentation :

La vitalité est un critère important dans l'analyse du spermogramme, car elle donne une idée sur le potentiel fécondant du spermatozoïde.

Tableau. 6 : DFI (%) des individus représentant une nécrozoospermie (n = 17)
vitalité < 60%, seuil OMS (2010).

Vitalité %	DFI %	Vitalité %	DFI %
20	71	58	15
35	64	45	51
45	59	15	65
30	19	45	48
45	19	40	42
49	29	<u>75</u>	<u>27</u>
0	69	<u>72</u>	<u>29</u>
0	63	<u>88</u>	<u>24</u>
10	92	<u>70</u>	<u>17</u>
20	87	58	15
40	98		

Tableau. 7 : Statistiques descriptives de DFI-vitalité.

Variable	Observations	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type	<i>P-valeur</i>
Vitalité %	20	0,000	88,000	40,100	24,717	0,001
DFI %	20	15,000	98,000	49,400	26,452	

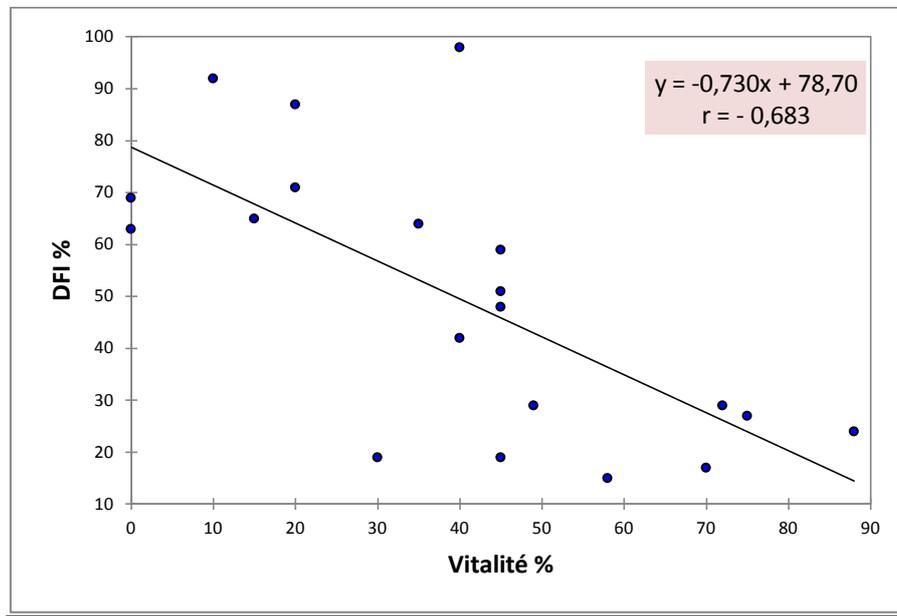


Figure. 14 : Nuage des pointes avec la courbe de tendances de DFI-vitalité.

Les résultats observés chez les individus SSP et dont la vitalité est en dessous du seuil défini par l'OMS 2010 (60%), montrent un DFI élevé au-delà du seuil de 30 %. Les valeurs maximales sont observées pour des pourcentages de vitalité compris entre 0% et 20% (Fig. 14). Ces résultats sont en faveur d'un lien très hautement significatif ($P \leq 0,001$) entre le DFI et la vitalité. Un coefficient de corrélation négatif a été trouvé $r = -0,683$ et $P = 0,001$, ce qui signifie que plus la vitalité est faible plus le DFI est élevé et inversement.

b) La mobilité et la Fragmentation :

L'analyse de la mobilité des spermatozoïdes nous informe sur leurs qualités cinétiques essentielles : la vitesse et la progressivité en ligne droite. Ces facteurs sont indispensables à la fécondation de l'ovocyte.

Tableau. 8 : DFI (%) des individus représentant une asthénozoospermie (n = 18)

mobilité < 40 %, seuil OMS (2010).

Les individus	mobilité %	DFI %
SSP	0	71
	18	64
	32	39
	37	33
	16	19
	28	19
	38	5
	12	60
	25	29
	0	69
	0	63
	5	92
	17	87
	21	98
	39	15
	21	51
	10	65
	15	48
SSN	<u>62</u>	<u>27</u>
	<u>50</u>	<u>29</u>
	<u>60</u>	<u>24</u>
	<u>45</u>	<u>17</u>

Tableau. 9: Statistiques descriptives de DFI-mobilité.

Variable	Observations	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type	<i>P-valeur</i>
mobilité %	22	0,000	62,000	25,045	18,492	0,001
DFI %	22	5,000	98,000	46,545	27,106	

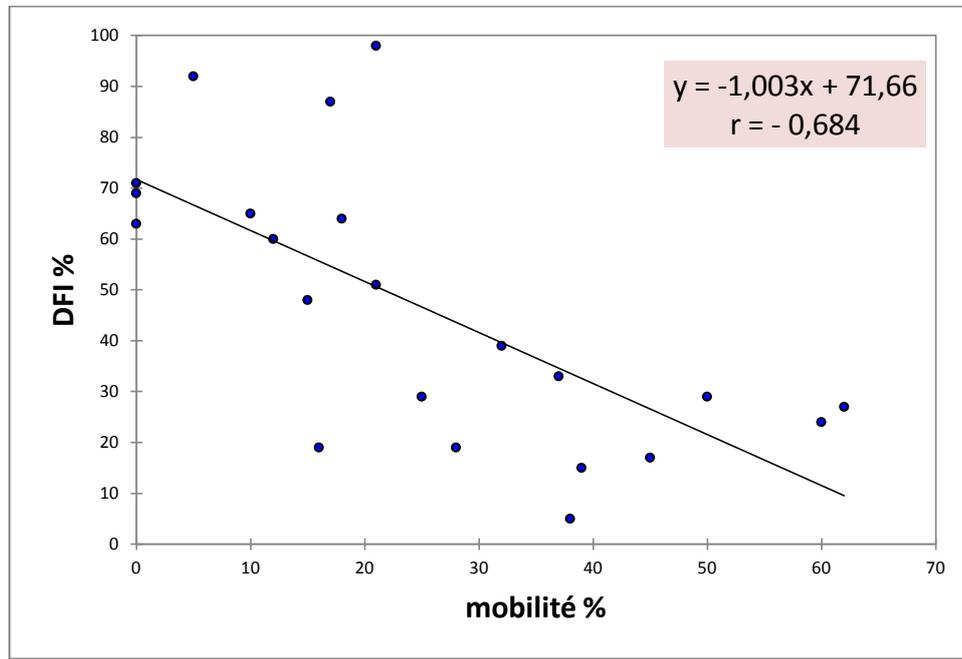


Figure. 15: Nuage des pointes avec courbe tendance entre le DFI-mobilité.

Nous observons chez les individus avec une très faible mobilité (inférieure à 10%) une augmentation du DFI (≥ 60). Ceci montre une corrélation hautement significative entre le DFI et la mobilité et avec un coefficient de corrélation négatif ; $r = -0,684$ et $P = 0,001$. Ce qui signifie que, plus la mobilité est faible, plus le DFI est élevé et inversement (Fig. 15).

c) La valeur du pH et la Fragmentation :

La variation du pH du liquide spermatique est un double indicateur : il permet à la fois de savoir si l'individu ne souffre pas d'une infection, ou qu'il ne souffre pas de troubles des sécrétions des glandes annexes (prostate et vésicule séminale). Une variation du pH spermatique modifie donc l'environnement direct du sperme qui pourrait influencer la qualité de l'ADN spermatique.

Tableau. 10 : DFI (%) des individus à un pH basique (n = 7)
 pH > 8, seuil OMS (2010).

Les individus	PH	DFI %
SSP	9	64
	9	70
	9	87
	8,5	15
	9	6
	8,5	51
	10	42
SSN	<u>8</u>	<u>27</u>
	<u>8</u>	<u>29</u>
	<u>8</u>	<u>24</u>
	<u>8</u>	<u>17</u>

Tableau. 11 : Statistiques descriptives de DFI-pH.

Variable	Observations	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type	<i>P-valeur</i>
pH	11	8,000	10,000	8,636	0,636	0,197
DFI %	11	6,000	87,000	39,273	25,807	

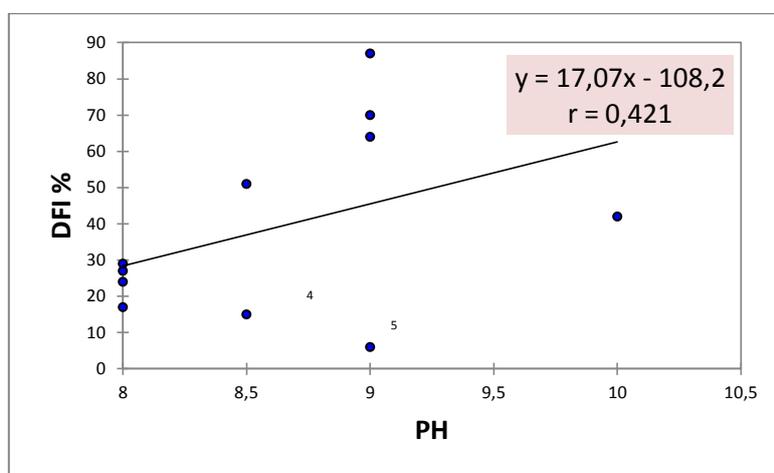


Figure. 16: Nuage des pointes avec courbe tendances de DFI-pH.

Les résultats que nous avons observés donnent des DFI hétérogènes. En effet, nous avons obtenus des résultats contradictoires concernant l'effet du pH sur la fragmentation, chez les individus N° 4 et 5 (Fig. 16), par rapport aux autres individus. Ces dernier semblent présenter

un DFI très faible 15% et 6% et ce malgré un pH respective de 8,5 et 9 ce qui demeure contradictoire comparé aux autres résultats obtenue. Ce résultat est confirmé par la valeur du coefficient de corrélation, $r = 0,421$ et la valeur de $P = 0,197 > \alpha = 0,05$.

d) La concentration et la Fragmentation :

La numération spermatique est un élément d'analyse de l'infertilité masculine, il est un indicateur du bon déroulement de la spermatogénèse.

Tableau. 12 : DFI (%) en fonction de la numération, individus à oligozoospermie (n = 14)
concentration < 15 ; seuil OMS (2010).

Les individus	concentration (mill/ml)	DFI %
SSP	1,6	71
	1,36	64
	0,52	39
	8	47
	5,2	29
	0,2	69
	0,6	63
	8,5	70
	8	92
	8	87
	4	6
	8,5	51
	3	65
	5	48
SSN	<u>93</u>	<u>27</u>
	<u>38</u>	<u>29</u>
	<u>60</u>	<u>24</u>
	<u>103</u>	<u>17</u>

Tableau. 13 : Statistiques descriptives de DFI-concentration:

Variable	Observations	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type	<i>P-valeur</i>
concentration (mill/ml)	18	0,200	103,000	19,804	32,231	0,020
DFI %	18	6,000	92,000	49,889	24,461	

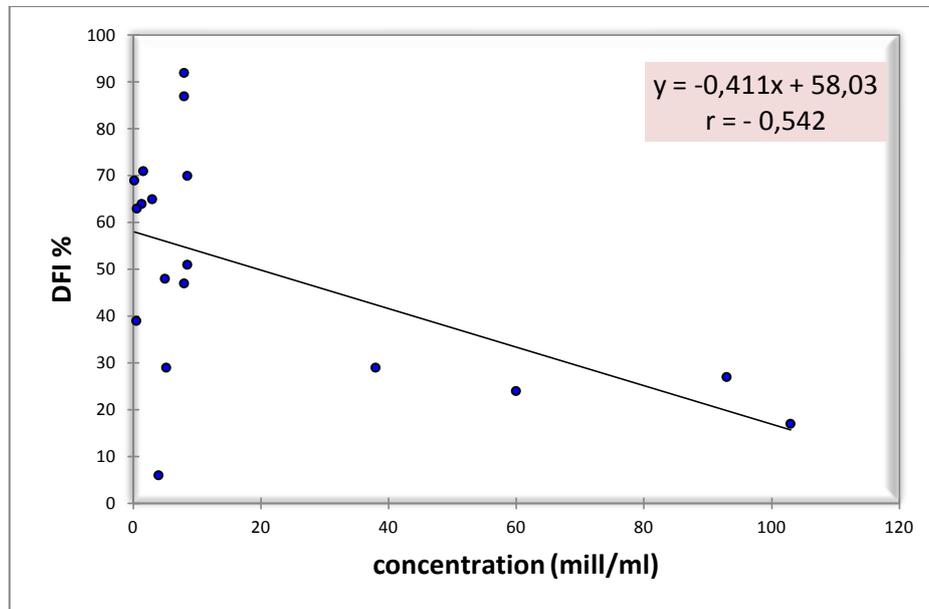


Figure. 17 : Nuage des pointes avec courbe tendances DFI-concentration.

Nous avons observé une faible homogénéité dans la distribution du nuage des points. Ceci est en faveur d'une corrélation faiblement significative entre DFI-concentration, avec un coefficient, $r = -0,542$ et $P = 0,020$) (Fig. 17).

e) Le volume et la Fragmentation :

Le volume de l'éjaculat est produit par chacune des sécrétions des glandes annexes. Les perturbations du volume indiquent donc un désordre fonctionnel de ces deux glandes.

Tableau. 14 : DFI (%) des individus avec l'hypospermie (n = 7), volume de l'éjaculat < 1,5 ; seuil OMS (2010).

Les individus	Volume %	DFI %
SSP	0,3	71
	0,5	69
	1	70
	1	70
	0,5	29
	1	6
	1	42
SSN	<u>7,5</u>	<u>27</u>
	<u>4</u>	<u>29</u>
	<u>4</u>	<u>24</u>
	<u>3</u>	<u>17</u>

Tableau. 15 : Statistiques descriptives de DFI-volume.

Variable	Observations	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type	P-valeur
Volume %	11	0,300	7,500	2,164	2,244	0,142
DFI %	11	6,000	71,000	41,273	24,372	

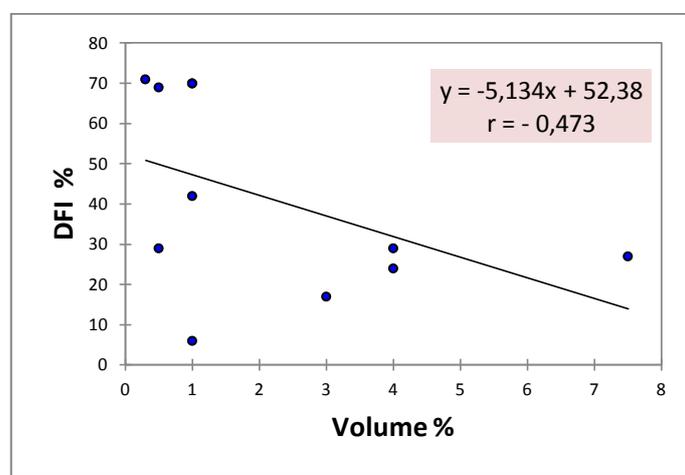


Figure. 18 : Nuage des points avec courbe tendances de DFI-volume.

Nous avons observé une hétérogénéité des résultats, puisque certains individus avec un faible volume spermatique ont montré des DFI en dessous du seuil des 30 %, alors que d'autres avec des volumes plus élevés, ont montré des DFI au-dessus des 30 %. Ceci est en

faveur d'une influence minime de la variation de volume sur la qualité d'ADN spermatique. Donc une moindre corrélation entre la fragmentation d'ADN et le volume. La valeur négative du coefficient de corrélation $r = -0,473$, $P = 0,142 > \alpha = 0,05$, confirme nos observations (Fig. 18).

f) Les cellules leucocytaires et la Fragmentation :

Les cellules leucocytaires font partie des globules blancs qui sont des cellules immunitaires augmentées lors d'une infection des voies génitales.

Tableau. 16 : Cas des leucospermie (n = 16). Des leucocytes > 1 million, seuil OMS (2010).

CL (mill/ml)	DFI %
2,79	71
1,57	64
3,02	54
3,26	41
1,93	33
1,57	19
1,75	29
2,42	69
3,63	63
2,66	70
3,75	70
1,93	29
2,7	24
8,1	92
2,05	51
18,13	65

Tableau. 17 : Statistiques descriptives de DFI-cellules leucocytaires.

Variable	Observations	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type	<i>P-valeur</i>
CL (mill/ml)	16	1,570	18,130	3,829	4,118	0,041
DFI %	16	19,000	92,000	52,750	21,199	

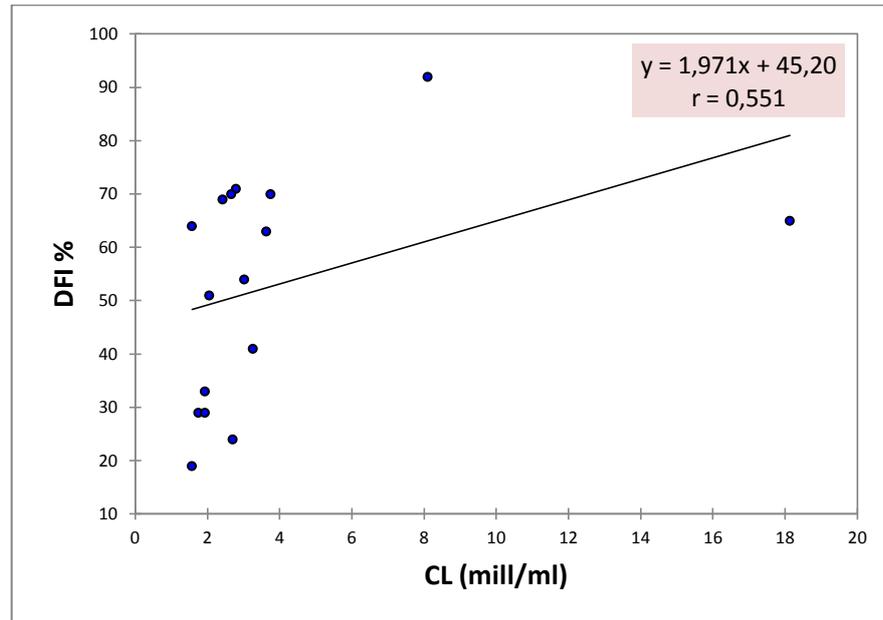


Figure. 19 : Nuage des pointes avec courbe tendances de DFI-cellules leucocytaires.

Nous avons observé une homogénéité des résultats, plus le nombre de cellules leucocytaires est élevé, plus de DFI est fort. Une corrélation significative entre le DFI et le nombre des cellules leucocytaires est observée, avec un coefficient de corrélation positif, $r = 0,555$ et $P = 0,041$. Ceci signifie que plus le nombre des cellules leucocytaires est élevé plus DFI est augmenté et inversement (Fig. 19).

g) Les cellules germinales et la Fragmentation :

Les cellules germinales sont à l'origine des spermatozoïdes, la numération de ces cellules nous informe sur le bon déroulement ou non de la spermatogénèse.

Tableau. 18 : Individus avec un nombre de cellules germinales > 5mill/ml (n = 8); seuil OMS (2010).

Les individus	CG (mill/ml)	DFI %
SSP	12,1	63
	50	98
	7,99	15
	6,29	17
	27,3	65
SSN	<u>3,63</u>	<u>27</u>
	<u>3,9</u>	<u>29</u>
	<u>1,97</u>	<u>24</u>

Tableau. 19: Statistiques descriptives de DFI-cellules germinales.

Variable	Observations	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type	<i>P-valeur</i>
CG (mill/ml)	8	1,970	50,000	14,148	16,588	0,002
DFI %	8	15,000	98,000	42,250	29,707	

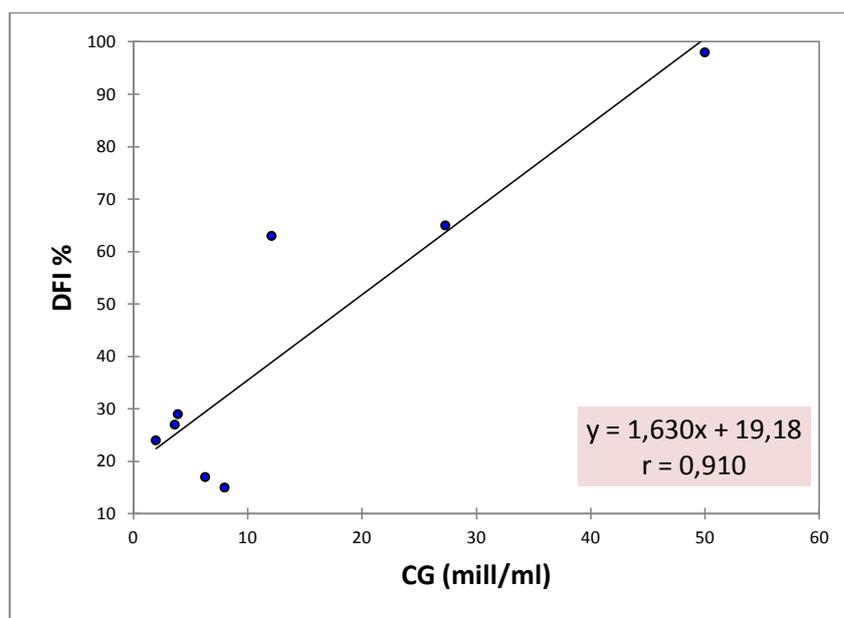


Figure. 20 : Nuage des pointes avec courbe tendances de DFI-cellules germinale.

Nous avons observé que les individus avec un nombre de cellules germinales supérieur à 10 millions donnent un DFI ≥ 50 %. Au contraire, les individus avec un nombre de cellules germinales inférieur à 10 millions, montrent un DFI ≤ 30 %. Le coefficient de corrélation

retrouvé, $r = 0,91$ et $P = 0,002 < \alpha = 0,01$. Donc la corrélation DFI-CG est hautement significative. Plus le nombre de CG est élevé, plus le DFI est augmenté et vis-versa (Fig. 20).

h) Les cellules rondes et la Fragmentation :

Habituellement dans les laboratoires lors de l'établissement du spermogramme on ne distingue pas les cellules germinales des leucocytaires, elles sont regroupées pour le calcul des cellules rondes. Leur nombre est alors apprécié globalement. Pour être en conformité avec les conditions de l'analyse du spermogramme, nous avons donc regroupé ces valeurs. Pour analyser l'effet de la perturbation des CR, nous avons comptabilisé les individus avec des concentrations élevées pour les CL et les CG en même temps.

Tableau. 20 : Cellules rondes et DFI% (n = 5).

Les individus	CR (mill/ml)	DFI %
SSP	15,73	63
	45,43	65
	6,78	27
	5,83	29
	8,58	17
SSN	<u>4,67</u>	<u>24</u>

Tableau. 21 : Statistiques descriptives de DFI-cellules rondes.

Variable	Observations	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type	<i>P-valeur</i>
CR (mill/ml)	6	4,670	45,430	14,503	15,650	0,063
DFI %	6	17,000	65,000	37,500	20,936	

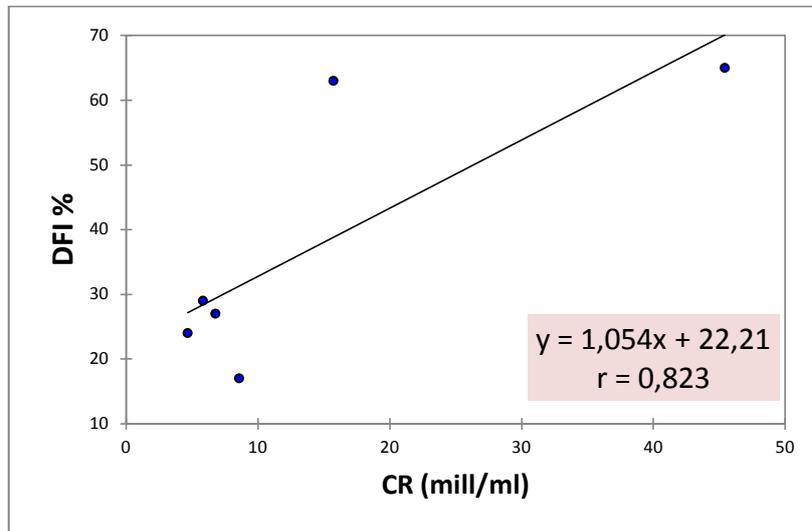


Figure. 21 : Nuage des points avec courbe tendances de DFI- cellules rondes.

Nous avons observé une relation entre une augmentation du DFI et la numération des CR, avec un coefficient de corrélation très hautement significatif ; $r = 0,823$.

I.3.2. Test de Khi-deux :

Afin d'affiner les résultats statistiques que nous avons obtenus avec le test de corrélation, nous avons soumis nos résultats au test du Khi-deux pour tester l'indépendance ou non de deux variables ; DFI et les différents paramètres du spermogramme.

Notre hypothèse H_0 :

Y a-t-il une indépendance des caractères, il n'existe donc aucune corrélation entre les différents paramètres et le DFI.

Si la valeur de probabilité $p \leq 0.05$, nous considérerons qu'il existe une corrélation entre les différents paramètres analysés et par conséquent notre hypothèse de départ est rejetée.

Nous avons défini des intervalles de DFI selon le seuil des 30% retenu par l'OMS en 2010 et nous avons adapté pour les paramètres spermatiques les normes recommandées par le même organisme.

Tableau. 22 : Résultat du test de Khi-deux (mobilité/fragmentation)

		taux de fragmentation	
		≤ 30	>30
% mobilité	< 40	5	13
	≥ 40	3	11
Khi-deux Théorique	3,841	Dégréé de liberté	1
Khi-deux calculé	0,167	Très hautement significative $P = 0,0001$	

Tableau. 23 : Résultat du test de Khi-deux (vitalité/fragmentation)

		taux de fragmentation	
		≤ 30	>30
% vitalité	< 60	4	12
	≥ 60	7	10
X théorique	3,841	Dégréé de liberté	1
X calculé	0,972	Très hautement significative $P = 0,001$	

Tableau. 24 : Résultat du test de Khi-deux (cellules germinales /fragmentation)

		taux de fragmentation	
		≤ 30	> 30
Numération des CG (mill/ml)	≤ 5	10	2
	>5	16	4
X théorique	3,841	Dégréé de liberté	1
X calculé	0,052	hautement significative $P = 0,002$	

Tableau. 25 : Résultat du test de Khi-deux (Cellules leucocytaires /fragmentation)

		taux de fragmentation	
		≤ 30	> 30
Numération des CL (mill/ml)	≤ 1	3	4
	> 1	9	16
X théorique	3,841	Dégréé de liberté	1
X calculé	0,124	Significatif $P = 0,041$	

Tableau. 26 : Résultat du test de Khi-deux (cellules rondes /fragmentation)

		taux de fragmentation	
		≤ 30	> 30
Numération des CR (mill/ml)	≤ 6	8	12
	> 6	4	8
X théorique	3,841	Dégréé de liberté	1
X calculé	0,141	Significatif $P = 0,049$	

Tableau. 27 : Résultat du test de Khi-deux (concentration/fragmentation)

		taux de fragmentation	
		≤ 30	>30
Concentration (mill/ml)	≤ 15	2	12
	> 15	10	8
X théorique	3,841	Dégréé de liberté	1
X calculé	5,355	Non Significatif $P = 0,020$	

Tableau. 28 : Résultat du test de Khi-deux (Volume/fragmentation)

		taux de fragmentation	
		≤ 30	> 30
Volume (ml)	$\leq 1,5$	2	4
	$> 1,5$	10	17
X théorique	3,841	Dégréé de liberté	1
X calculé	0,0634	Non significatif $P = 0,142$	

Tableau. 29 : Résultat du test de Khi-deux (pH/fragmentation)

		taux de fragmentation	
		≤ 30	> 30
pH	≤ 8	10	16
	> 8	2	5
X théorique	3,841	Dégréé de liberté	1
X calculé	0,230	Non Significatif $P = 0,146$	

Les tests de Khi-deux indiquent qu'il existe une forte dépendance entre le DFI et la mobilité ($P = 0,0001$) d'une part et le DFI et la vitalité ($P = 0,0001$) l'autre part. Les mêmes résultats ont été observé avec DFI et cellules germinales ($P = 0,0002$). Par ailleurs, nous avons obtenue une dépendance significative à savoir la numération des cellules leucocytaires ($P = 0,041$) et la numération des cellules rondes ($P = 0,049$). Concernant le volume de l'éjaculat ($P = 0,142$), le pH ($P = 0,146$) ainsi que la concentration en spermatozoïdes ($P = 0,020$) le test de Khi-deux à révélé qu'il n'existe pas de dépendance entre le DFI et les paramètres cités. Ces résultats confirment les tendances retrouvées par le test de corrélation, à l'exception de la concentration en spermatozoïdes où le test de Khi-deux ne montre aucun dépendance avec le DFI.

I.3.3. L'âge, le tabagisme et la Fragmentation :

Dans notre étude, nous n'avons pas pris en considération ces 2 facteurs malgré leurs impacts sur la qualité spermatique. Nous avons retenu juste les éléments analysés lors du spermogramme ou le spermocytogramme. Néanmoins, nous avons jugé intéressant d'analyser l'impact de ces 2 paramètres sur un certain nombre d'individus décrits comme des fumeurs réguliers.

Nous avons départagé nos patients, à savoir $n = 8$ selon la valeur du DFI en deux groupes. Le premier groupe renferme 1 individu avec un $DFI \leq 30\%$, alors que le deuxième regroupe est formé de 7 individus avec un $DFI > 30\%$ (Tab. 30).

L'étude de l'agglutinats se effectuée sur l'échantillon globales (les 33 patients).

Tableau. 30 : Répartition des sujets selon l'âge, le tabagisme et l'agglutinats.

	Moyenne d'âge (ans)	% des cas fumeurs	Valeur moyenne de DFI %	Agglutinats +
Groupe 1 ($DFI \leq 30\%$)	24	0	15	6,06
Groupe 2 ($DFI > 30\%$)	34	25	59,71	3,03

D'après les résultats reportés au tableau 30, il ressort que :

- Les individus avec une moyenne d'âge de 34 ans montrent un $DFI > 30\%$ par contre ceux de 24 ans leur DFI est $\leq 30\%$.
- Dans notre échantillon, deux sur huit (25%) sont des fumeurs avec un $DFI > 30\%$.
- Les individus non fumeurs présentent 75% de l'échantillon ont des DFI déférents et de plus ils présentent d'autres troubles spermatiques qui influencent certainement la qualité de l'ADN du spermatozoïde.
- Trois individus sur les 33 montrent une présence d'agglutinats sont 9,09 % dont 6,06% du groupe 1 ($DFI \leq 30\%$) et 3,03% sont du groupe 2 ($DFI > 30\%$).

Les résultats obtenus montrent un effet notable de l'âge et du tabagisme.

I.3. Fragmentation et troubles morphologiques du spermatozoïde :

Nous avons voulu savoir si l'analyse stricte de la fragmentation sur des spermatozoïdes avec des perturbations morphologiques donnerait une meilleure appréciation de l'impact sur l'intégrité du génome spermatique. Aussi nous avons comptabilisé 100 spermatozoïdes pour chaque individu on ne présent en considération que ceux avec un trouble de la tête ou du flagelle. Pour le choix des individus, nous avons suivis les indications retenues à travers les résultats des analyses du spermogramme (Tab. 31).

Tableau. 31: Les différentes classes de troubles notés sur le compte rendu des résultats du spermogramme.

Patients	Indication
1	35 % Macrocéphale et Flagelle
2	30 % Flagelle
3	30 % Flagelle
4	30 % Tératospermie (+++ Flagelle)
5	35 % Macrocéphale
6	35 % Macrocéphale et 40 % Flagelle
7	55 % Macrocéphale et 70 % Flagelle
8	65 % Macrocéphale et 40 % Flagelle
9	100 % Tératospermie (100 % double Flagelle)
10	100 % Macrocéphale et 100 % double Flagelle
11	Tératospermie
12	Tératospermie

Selon les données, nous avons classés les tératospermies en trois catégories (Fig. 22):

La première catégorie concerne des patients avec spermatozoïdes représentant des anomalies de la tête uniquement ou Macrocéphales, ils représentent une prévalence de 7%. Deuxième catégorie, regroupe des patients représentant des spermatozoïdes avec anomalies du flagelles uniquement sans ou avec doubles flagelles et/ou enroulés, la prévalence est de 13%. La troisième catégorie sont des patients aux spermatozoïdes présentant les deux anomalies à la fois leur prévalence est de 73%.

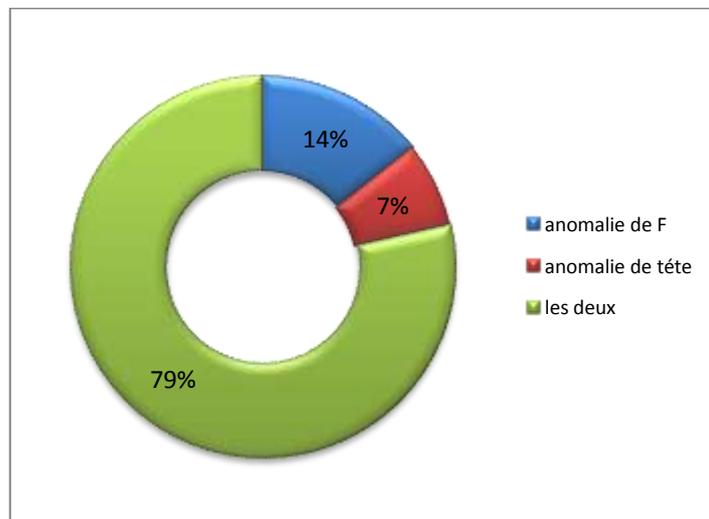


Figure. 22 : Distribution en pourcentage des anomalies morphologique des spermatozoïdes.

Tableau. 32: Les différentes classes de troubles notés sur le compte rendu des résultats du spermogramme.

N	Avec fragmentation %	Sans fragmentation %
1	64	36
2	41	59
3	33	68
4	81	19
5	47	53
6	33	67
7	55	45
8	60	40
9	69	31
10	63	37
11	92	8
12	98	2

Nos résultats montrent qu'une perturbation globale des critères morphologiques à de grandes influences sur le taux de fragmentation de l'ADN spermatique des individus SSP. En effet, le DFI des individus SSP est nettement supérieur aux SSN. Les résultats de l'analyse statistique par le test de « STUDENT », sont représentés dans tableau suivant :

Tableau. 33: Résultats du test du STUDENT selon les différentes classes de troubles notés sur le compte rendu des résultats du spermogramme.

	Tête		Flagelle		Tête et Flagelle	
	500	100	500	100	500	100
Lecture sur	500	100	500	100	500	100
Nombre des P	4	4	3	3	3	3
DFI (%)	47	71	41	64	64	81
	92	93				
	33	60	33	66	55	67
	39	76	19	31	60	61
moyenne de F	52,75	75	31	53,67	59,66	69,66
Test STUDENT	0,189828976		0,157226047		2,50	
T des table	2,3646		2,5706		2,5706	
Indications	Hautement significatif		Très hautement significatif		Significatif	

D'après les résultats obtenus suite au test statistique appliqué à savoir le test de STUDENT, il semble que l'augmentation de DFI est très hautement significatif dans les cas des spermatozoïdes avec anomalie du flagelle, elle est hautement significatif dans les cas des spermatozoïdes avec anomalie de tête et significatif dans les cas des spermatozoïdes avec les deux anomalies à savoir tête et flagelle.

II. DISCUSSION :

L'exploration de l'infertilité masculine en première intention repose sur l'analyse du spermogramme et le spermocytogramme. Ces deux examens donnent une idée globale sur le potentiel fécondant du spermatozoïde, mais ne nous informe pas sur la qualité de l'ADN spermatique. Nous avons entrepris l'analyse de la fragmentation de l'ADN spermatique d'un échantillon d'individus par la technique de SCD. Cette fragmentation est conséquence à plusieurs phénomènes physiologiques, génétiques et environnementaux (Fig. 23). La fragmentation de l'ADN spermatique a été analysée pour expliquer l'infertilité masculine et plusieurs études ont montrés une dégradation de l'indice de fragmentation DFI chez des hommes infertiles (26).

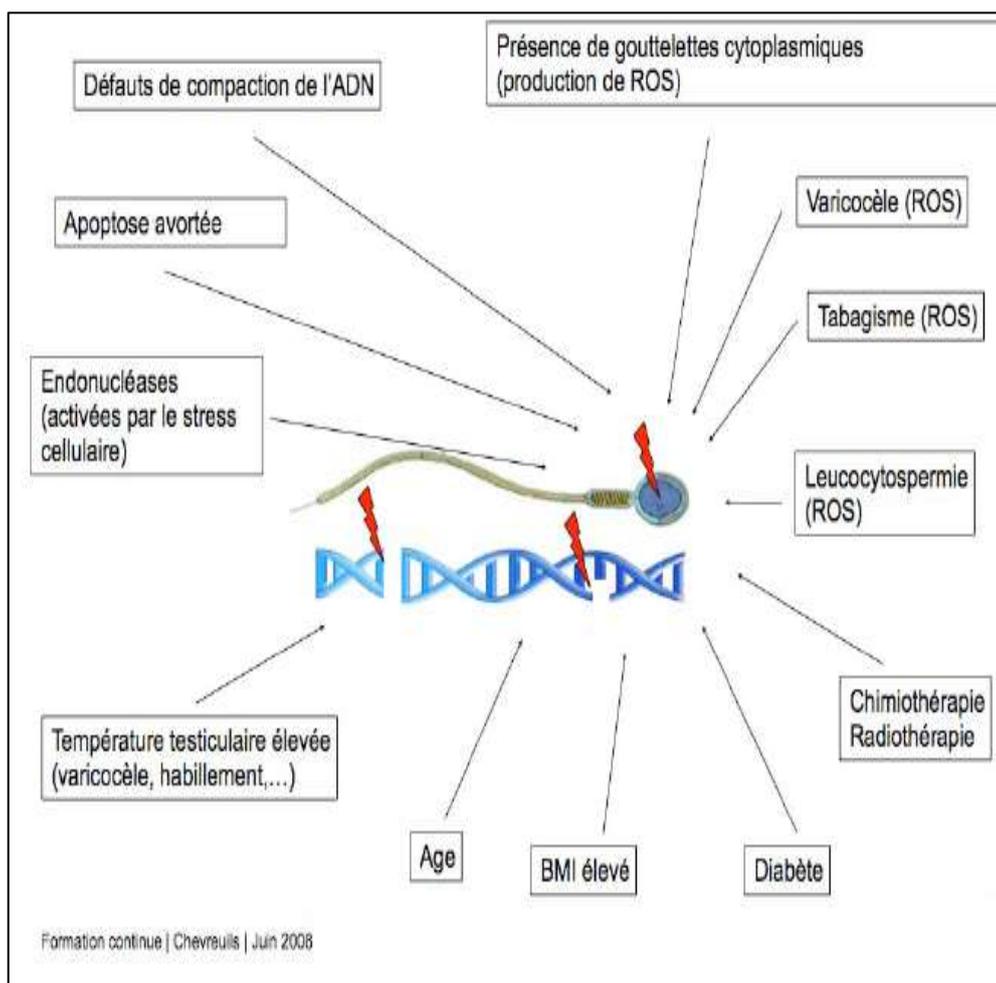


Figure. 23 : Les différents facteurs qui influencent la fragmentation d'ADN spermatique (26).

D'après les résultats que nous avons obtenus, il en sort qu'un trouble de la mobilité ou de la vitalité est un indicateur fort de la qualité de l'ADN spermatique ; un trouble de numération des cellules germinales a un effet majeur sur cette dernière, un trouble dans le nombre de cellules leucocytaires a un impact modéré sur la qualité de l'ADN spermatique, la concentration, le pH et le volume n'a pas d'effet sur la qualité de l'ADN spermatique, un trouble de la morphologie touchant la tête a un effet moindre qu'un trouble affectant les flagelles.

Les résultats que nous avons obtenus à travers l'étude statistique montrent une relation négative entre la vitalité et le DFI ainsi qu'entre la mobilité et le DFI. Pour le DFI-vitalité, $r = -0,683$ avec $P = 0,001$. Alors que pour le DFI-mobilité, $r = -0,684$ et $P = 0,0001$. Ces résultats s'expliquent certainement comme rapporté par plusieurs travaux, d'une part; par l'effet délétère qu'exercent les ROS lorsqu'ils sont présents en grande concentration qui induit une peroxydation des lipides de la membrane spermatique et mènent à la détérioration des structures axonémales des spermatozoïdes réduisant ainsi leur mobilité (asthénospermie) (36), à d'autre part; par les Caspases, médiateurs de l'apoptose qui sont retrouvées en grandes concentrations dans les spermatozoïdes d'individus caractérisés par une asthénospermie (17). Les individus 4, 5, 30 et 45 rapportés par les tableaux 4 et 5; le phénomène semble inverse. Nous attribuons ce résultat à un biais de l'analyse lors de l'appréciation de la mobilité et de la vitalité par les techniciens lors de l'établissement du spermogramme. Ce phénomène a été déjà observé et décrit. Entre une lecture du spermogramme et une autre, des variations des résultats finaux peuvent aller jusqu'à 30 % (26).

Concernant la corrélation entre le DFI-Cellules Rondes, DFI-Cellules Germinales, DFI-Cellules Leucocytaires; nos résultats montrent une forte corrélation entre les troubles de la numération des Cellules Germinales et des Cellules Leucocytaires, et la qualité du génome spermatique. Pour le DFI-CG les tests statistiques révèlent un $r = 0,91$ avec $P = 0,002$, alors que pour DFI-CL; $r = 0,551$ avec $P = 0,047$. Dans le cas des Cellules Germinales, l'augmentation de leur nombre dans le sperme est un indicateur d'un dysfonctionnement lors de la spermatogénèse (26). Ce dysfonctionnement peut intervenir à n'importe quel niveau du processus de maturation du spermatozoïde et il a pour conséquence la présence dans l'éjaculat d'une part importante des spermatozoïdes immatures. Ce dysfonctionnement peut engendrer un accroissement dans le sperme de spermatozoïdes fragmentés (38). L'augmentation de la concentration des Cellules Leucocytaires est un indicateur de la présence d'infection des voies génitales, ce qui modifie l'environnement du sperme. Ceci a un effet délétère sur les spermatozoïdes ce qui augmente aussi leur niveau de fragmentation (38). L'effet cumulé des désordres en concentrations des Cellules Germinales et des Cellules Leucocytaires engendre

une augmentation significative du DFI ; $r = 0.788$ $P = 0.063$. Il semble y avoir un effet dominant du trouble des CG par comparaison au CL (Tab. 34).

La corrélation entre le DFI et la concentration en spermatozoïdes, montrent une faible association ($r = -0,542$ avec $P = 0,020$). Alors que le test du Khi-deux ; exclut tous liens entre un trouble de la concentration et le DFI. Le résultat obtenu avec le test de corrélation donne une valeur proche de 0,500 limite pour laquelle il y a exclusion d'une corrélation entre deux variables. Le test du Khi-deux semble plus précis dans ce cas que le test de corrélation. Il n'en demeure pas moins qu'une diminution de la numération des spermatozoïdes, ou l'oligospermie peut être secondaire à des pathologies testiculaires, déficits hormonaux, inflammations des glandes annexes ou à la chimio/radiothérapie (16). En l'absence d'une autre indication médicale, sur les individus qui sont analysés dans cette étude, nous ne pouvons conclure à une absence d'une corrélation entre la concentration et le DFI.

Cependant pour la corrélation entre le DFI-pH, DFI-volume, DFI-agglutinats, les résultats obtenus montrent que l'impact du volume et du pH sur le DFI sont mineurs. Le coefficient de corrélation du couple DFI-Volume n'est pas significatif ; $r = 0.421$ et $P = 0.142$, de même pour le couple DFI-pH ; $r = 0.421$ et $P = 0.197$. Pour ce qui concerne le volume, un individu avec un faible volume de sperme (≤ 1.5 ml) peut avoir une bonne qualité spermatique $DFI \geq 30\%$ et inversement. Un $pH > 8$, reflète des infections ou/et des troubles prostatiques (Zinc, Acide Citrique, Phosphatase acides/sécrétions acides). Alors qu'un $pH < 7$ indiquerait de faibles sécrétions des vésicules séminales (fructose/sécrétion basiques) ainsi que d'éventuelles obstructions des conduits éjaculateurs (15). Ces troubles peuvent créer des altérations spermatiques non significatives. Une remarque s'impose pour le pH, ce dernier semble avoir un impact sur de DFI en fonction du temps. Nos résultats montrent une dégradation du DFI seulement avec des échantillons traités 4 heures après leur prélèvement, à l'inverse de ceux qui sont traités instantanément. Pour les individus 27 et 28 (Tab. 10), les échantillons ont été traités par la technique SCD, quelques minutes après leur recueil, alors que les autres échantillons ont été traités après avoir terminé l'analyse des paramètres des patients précédents à savoir 4 heures après le prélèvement.

Quant à la corrélation entre le DFI-âge et le DFI-tabagisme il est clairement établi que le tabagisme et l'âge influencent la qualité spermatique. Si l'effet du tabagisme semble réversible, l'effet de l'âge est irréversible. Les résultats que nous avons obtenus confirment les données de la littérature. Si le tabagisme augmente l'effet des SOR par l'accroissement des effets des radicaux libres sur l'ADN, l'effet de l'âge intervient sur la qualité de l'ADN par la réduction des télomères et l'augmentation des anomalies chromosomiques (10).

Parrailleurs les agglutinats spermatiques ont pour origine la présence dans le sperme d'anticorps anti spermatiques qui agissent contre les flagelles et les pièces intermédiaires

réduisant ainsi la mobilité spermatique. La conséquence de ce phénomène est l'élimination complète du spermatozoïde par l'action des mécanismes immunitaires (15).

Tout fois pour pouvoir apprécier les effets cumulés des paramètres spermatiques nous avons regroupé les individus en trois classes, selon qu'ils présentent : 1 ou 2 troubles, avec 3 troubles et avec plus de trois troubles (Tab. 34). Nos résultats montrent que les effets cumulés augmentent le DFI. Nous constatons que, les individus ayant plus de trois troubles cumulés montrent une moyenne de DFI très élevée ($x = 64,58 \%$). On note qu'à chaque fois qu'il y a intervention des troubles vitalité-mobilité-CG, le DFI est maximal (98%). Ceci confirme bien que la combinaison vitalité-mobilité-CG est un majeur indicateur de la dégradation de l'ADN spermatique.

Tableau. 34 : Les différentes classes de l'effet cumulé des troubles spermatiques.

Les classes selon le nombre des troubles	La valeur moyenne de DFI (%)
Les individus avec ≤ 2 troubles	37,75
Les individus avec 3 troubles	53
Les individus avec > 3 troubles	64,58

Concernant l'étude des effets spécifiques des perturbations spermatiques. Les résultats du DFI sur des sous populations de spermatozoïdes (comptage de 100 spermatozoïdes au lieu de 500) avec des anomalies morphologiques de la tête et de flagelles, montrent une augmentation significative du DFI. D'autre part, les troubles de flagelles donnent des résultats de DFI plus élevés que ceux observés chez des individus avec des troubles de la tête. L'augmentation du DFI dans le cas des sous populations est certainement dûe au fait que nous avons pris en considération dans notre analyse que des spermatozoïdes avec 100 % de troubles morphologiques, puisque le comptage sur 500 rassemble les 2 sous populations normale et perturbée. Le résultat de la comparaison entre les troubles de la tête et du flagelle, semblent dissemblable. Néanmoins, ils peuvent s'expliquer d'une part, que les troubles de la tête ont plusieurs causes à savoir la présence de nombreuses vacuoles, des vacuoles de grandes tailles, des acrosomes de tailles anormales, ainsi que des causes génétiques (7), et d'autre part les troubles des flagelles sont par contre, causaient par des infections et des causes génétiques. Il a été admis que l'effet cumulé de l'infection et/ou des troubles génétiques augmente le taux de DFI (7).

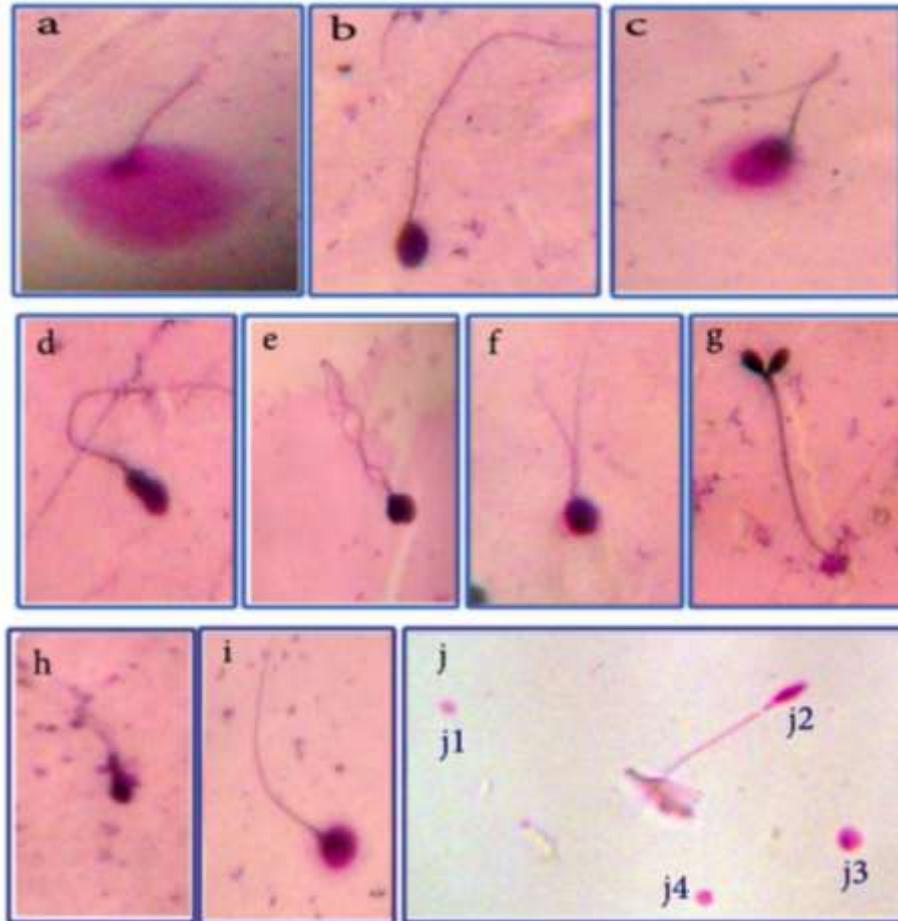


Planche I :

- Technique SCD : . les photos sont prises sous microscope à X 40.

(a). Spermatozoïde sans fragmentation (grand halo). (b). avec fragmentation.

(c) sans fragmentation (petit halo). (d). macrocéphale fragmenté. (e-f). macrocéphale fragmenté flagelle double. (g). bicéphale fragmenté. (h). microcéphale multi-flagelles fragmenté.

(i). macrocéphale sans fragmentation.

- Technique LeucoScreen : Les photos sont prises sous microscope à X 40.

(j1-j4). Cellules germinales. (j2) spermatozoïdes. (j3). cellule leucocytaire.

ANNEXE I :

ميادة ابن رشيد للجراحة و علوم الانجاب

مركز طب التلقيح و الوراثة الخلوية

Clinique de Chirurgie et des Sciences de la reproduction
Centre de Médecine de la Reproduction et de Cytogénétique

ID :

Questionnaire

Mr: _____ Age : ____ ans

Profession : _____

Fumeur : Oui Non Combien _____ / jour

Maladie connue _____

Remarques :

ID :

Mr: _____ Age : ____ ans

Profession : _____

Fumeur : Oui Non Combien _____ / jour

Maladie connue _____

Remarques :

ANNEXE II :



Kit to analyze sperm DNA fragmentation

halosperm[®]
Kit **REF** HT-HS 10 for 10 determinations

-  No special instructions of use
-  **REF** product reference
-  **LOT** kit number
-  10 tests
-  Manufacturer
-  Health surveillance device for in vitro diagnostics
-  Certified according to ISO 13485
-  **IVD** - **CE** - **MD**
-  **MD** - **CE** - **MD**

Application

halosperm[®] kit from Halotech DNA, S.L. is a simple test that allows assessment of sperm DNA fragmentation in humans.

Principle of the method:
The method is based on the Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test (Fernández et al., J. Androl 24: 69-66, 2003; Fertíl Steril 84: 833-842, 2005). Intact unfixed spermatozoa (fresh, frozen/unthawed, diluted samples) are immersed in an inert agarose microgel on a pretreated slide. An initial acid treatment denatures DNA in those sperm cells with fragmented DNA. Following this, the lysing solution removes most of the nuclear proteins, and in the absence of massive DNA breakage produces nucleoids with large halos of spreading DNA loops, emerging from a central core. However, the nucleoids from spermatozoa with fragmented DNA either do not show a dispersion halo or the halo is minimal.

Description of kit reagents:
Each kit is sufficient for 10 tests:

- SCS (Super Coated Slides), 10 units
- ACS (Agarose Cell Support), 10 app.
- DA: 1 Tube with Acid Denaturation Solution, Tube of 1 ml.
- LS (Lysis Solution), Bottle of 100 ml.

Material and equipment required not provided with the kit:
Bright field or fluorescence microscope, 4°C fridge, 90-100°C and 37°C incubation bath(s), Plastic gloves, Glass slide covers (18 x 18 mm or 22 x 22 mm), Micropipettes, Trays for horizontal incubations, Distilled water, Ethanol 70%, 90%, 100%, Microwave oven and fume hood.

Recommended solution for microscopy visualization:

- Bright field microscopy: Diff-Quik[®] stain (several trademarks) or Wright solution (Merck 101383.0500).
- Fluorescence microscopy: Fluorochromes for DNA staining.
- Phosphate buffer solution pH 8.88 (Merck 1.07294.1000)
- Mounting medium: Eukitt[®] (Panreac 253681).

Specimen:
Samples should be collected in clean containers and the assay should be done as soon as possible. Cryopreserved and frozen samples at -20°C could be also processed. In this case, the sample will be totally thawed, and brought to room temperature before testing, which should be done right after thaw out.

Instructions for use

1. Set the lysis solution (LS) at room temperature (22°C).
2. Dilute the semen sample in culture medium or sperm extender or PBS to a concentration of 5-10 million per milliliter. Be careful that solvent is not extremely dense.
3. Put the agarose eppendorf (ACS) provided through a float; the float should be at the level of the top of the tube. Leave floating in water 5 minutes at 90° - 100°C, until the agarose dissolves. Alternatively, the agarose can be melted in a microwave oven.
4. Transfer the agarose eppendorf, with the float, to a temperature controlled water bath maintained at 37°C and leave for 5 minutes until the temperature is even.
5. Add 25 microliters of the semen sample to the agarose eppendorf and mix well. Place the cell suspension from the agarose eppendorf (SCS) on to the treated side of the slide and cover with a glass coverslip, being careful to avoid air bubbles. A drop of 10 or 15 µl for an 18 x 18 mm or 22 x 22 mm coverslip respectively, is recommended. If liquid does not spread till the edge of the coverslip, press gently with the tip of the micropipette.
6. Take care to keep the slide in a horizontal position throughout the entire process.
7. Place the slide on a cold surface (for example, a metal or glass plate pre-cooled at 4°C). Put the cold plate with the slide/s into the fridge at 4°C and leave the sample to gel for 5 minutes.
8. Prepare the denaturant solution (DA). To do this, add 80 microliters of the contents of the acid denaturation solution (tube labelled DA) to 10 millilitres of distilled water, mix and place in the incubation tray.
9. Remove the slide cover by sliding it off gently. From now on, wear gloves and use slide horizontally with the help of a lancet.
10. Immediately, immerse the slide into the DA solution from step 8 in a horizontal position, leaving it to incubate for 7 minutes.
11. Afterwards, place it in another incubation tray containing 10 ml of tempered LS. incubate for 25 minutes.
12. Pick the slide up and set up horizontally into a tray containing abundant distilled water in order to wash the lysis solution. Leave to incubate for 5 minutes.
13. Place the slide horizontally into a tray with 70% ethanol (2 minutes), followed by 90% ethanol (2 minutes) and finally, 100% ethanol (2 minutes).
14. Leave to dry at room temperature and stain.
15. After drying, the processed slides may be kept in archive boxes at room temperature, in the dark, for months.

Microscopic visualization

For bright field microscopy, it is recommended two types of stain:

- **Diff-Quik stain:** Through the following guide: incubate the slide in horizontal position in the Eosin solution (red colour) for 7 minutes. Afterwards, incubate the slide in horizontal position in the Azur B solution (blue colour) for 7 minutes.
- **Wright stain:** Prepare the Wright solution by mixing it in phosphate buffer (1:1). While keeping the slide in horizontal position, cover the sample with a gentle layer of the dyeing solution. Leave it for 10-15 min blowing on it from time to time. Remove the dyeing solution, wash briefly and carefully in tap water and air dry.

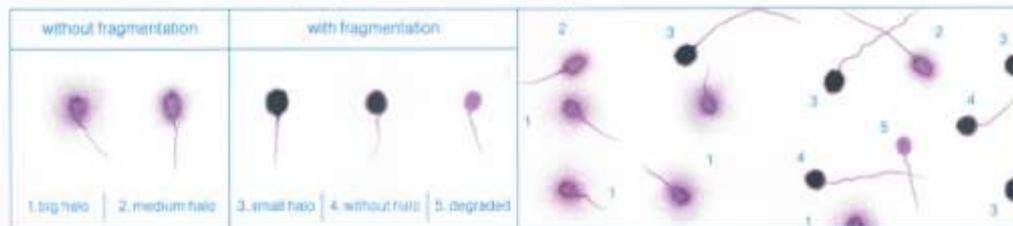
Check colouring level under the microscope. Strong staining is preferred, to clearly discriminate the peripheral border of the halo. If staining results are very weak, especially on the region of chromatin dispersion halos, the slide can be re-stained. If colouration is too strong, the slide can be discoloured by washing gently in tap water, or 10% ethanol if preferred. After air dried, it can be dyed again with reduced colouring exposure time. Once the desired level of colouration is achieved and the slide is perfectly dried, it can be mounted in a permanent mounting medium such as Eukit®.

Visualization under fluorescence microscopy is also possible using standard DNA directed fluorochromes. 20x and 40x objectives are the optimum for visualization and classification of spermatozoa.

Sperm classification

Removal of sperm nuclear proteins results in nucleoids with a central core and a peripheral halo of dispersed DNA loops. The sperm tails remain preserved. For sperm classification we must take into account that sperm DNA fragmentation is a continuous process which produces a series of different halo sizes. Initially, the study of a minimum of 500 spermatozoa per sample is recommended, adopting the criteria of Fernández et al. (Fertil Steril 84: 833-842, 2005). Avoid scoring cells close to the edge of the microgel. Classification:

- **Spermatozoa without dna fragmentation:**
 - **spermatozoa with big halo:** those whose halo width is similar or higher than the minor diameter of the core (Figure 1).
 - **spermatozoa with medium-sized halo:** their halo size is between those with large and with very small halo (Figure 2).
- **Spermatozoa with fragmented dna:**
 - **spermatozoa with small halo:** the halo width is similar or smaller than 1/3 of the minor diameter of the core (Figure 3).
 - **spermatozoa without halo:** (Figure 4).
 - **spermatozoa without halo and degraded:** those that show no halo and present a core irregularly or weakly stained (Figure 5).
 - **"others":** cell nuclei which do not correspond to spermatozoa. One of the morphological characteristics which distinguish them is the absence of tail.



Positive and negative controls

Positive control: sperm cells with halo. Follow the instructions for use, omitting steps 8 and 10.

Negative control: sperm cells without halo. Follow the instructions for use, but omit steps 8 and 10, after step 9 apply a denaturation treatment on the microgel with 10 microliters of DA (undiluted), and gently place a cover slide without pressure, during 5 minutes. Continue the instructions for use from step 11 onwards.

Limitations

This test provides presumptive quantitative information of DNA fragmentation in spermatozoa. This parameter should be analysed by a specialist. The results should be evaluated taking into account all clinical and laboratory findings related to the same sample.

Safety and the environment

Attention! Slide processing must be performed under fume hood.

Avoid inhalation and contact with the solutions supplied. The acid solution (DA) contains Hydrochloric acid, and the lysing solution (LS) contains Dithiothreitol and Triton X-100. Consult specifications supplied by manufacturers.

Do not release the products used into the environment. Follow center guidelines for the storage and disposal of toxic substances.

Biological samples must be handled as potentially infectious.

Precautions

For professional use only.

1. All patient samples and reagents should be treated as potentially infectious and the user must wear protective gloves, eye protection and laboratory coats when performing the test.
2. The test should be discarded in a proper biohazard container after testing.
3. Do not eat, drink or smoke in the area where specimens and kit reagents are handled.
4. Do not use beyond the expiration date which appears on the package label.
5. It is recommended the use of gloves and face mask.

Storage conditions

The kit should be stored at room temperature (2-30°C). Once open, store LS in the fridge protected from the light. Expiry date is printed on the outside of the box.

halosperm® is a trade mark by Halotech DNA, S.L.

Halotech DNA, S.L.

C/ Faraday, 7 Parque Científico de Madrid / Edificio CLAUD / Campus de Cantoblanco / 28049 Madrid, Spain.
Tel. + 34 91 279 69 50 / www.halotechdna.com / info@halotech.es

Patent nº: ES26049163

10 del 4 HALOSPERM REV07
Version: 07/2012 06 16

ANNEXE III :

LeucoScreen

Ref. doc.: FP09 I05 R01B .7. Update: 03/06/2013



Introduction

Most human ejaculates contain leucocytes (Wolff and Anderson, 1988; Aitken and West, 1990; Barratt et al, 1990), the predominant cell type being the neutrophil. Excessive presence of these cells (leucocytospermia) may indicate the existence of reproductive tract infection.

Furthermore, leucocytospermia may be associated with defects in the semen profile, including reductions in the volume of the ejaculate, sperm concentration, and sperm motility, as well as loss of sperm function as a result of oxidative stress (Aitken et al, 1989; Aitken and West, 1990) and/or secretion of cytotoxic cytokines (Hill et al, 1987).

It is difficult to define a threshold concentration of leucocytes beyond which fertility will be impaired. The impact of these cells depends upon the site at which the leucocytes enter the semen, the type leucocyte involved, and their state of activation.

As a general rule, a normal ejaculate should not contain more than 5×10^6 round cells/ml, while the number of leucocytes should not exceed 1×10^6 /ml (WHO, 1992).

When the semen contains more than 1×10^6 /ml white blood cells, microbiological tests should be performed to investigate if there is an accessory gland infection.

Note: the absence of leucocytes does not exclude the possibility of an accessory gland infection.

Material included with the test

Reagent 1 - 20ml of LeucoScreen stain (contains: benzidine, cyanosine and methanol)

Reagent 2 - 1ml of 30% Hydrogen peroxide

Material not included with the test

Object glasses

Cover glasses

Pipettes

Principle of the test

The granules in the neutrophilic polymorphous leucocytes contain peroxidase, which together with the hydrogen peroxide form water and free oxygen ions, these oxygen ions oxidize the benzidine which colours brown, thus staining the cells brown. Reagent 1 also contains a red contrast fluid to differentiate peroxidase positive roundcells from peroxidase negative roundcells.

Method (Endtz, 1972)

- Preparation of work solution:
Add 30 μ l of reagent 2 to 1 ml of reagent 1. This working solution remains stable for 1 day.
- Mix 1 drop (10 μ l) of sperm with 1 drop (10 μ l) of working solution, using the edge of the cover slip. Mix thoroughly for at least 1 minute.
- Cover with the cover slip approximately two minutes after initial mixing, avoiding air bubbles. Formation of small air bubbles is normal and due to peroxidase reaction. The higher the concentration of peroxidase positive cells, the more bubbles will form.
- Read the result after 2 minutes at a magnification of 400 x (read at least 20 separate microscope fields).

Calculation of the concentration of white blood cells

KNOWN CONCENTRATION OF SPERMATOZOA

Count the number of WBC and the number of spermatozoa. Calculate the concentration of WBC based on this formula:

$(\text{Number of WBC} / \text{Number of spermcells}) \times \text{Spermconcentration (mil/ml)}$

This method will only work if the semen sample contains spermcells (preferably more than 10 mil/ml).

UNKNOWN CONCENTRATION OF SPERMATOZOA

In this case the concentration of WBC can be determined by multiplying the number of WBC with a known factor based on the size of a microscope field and the height between the object glass and the cover glass (or the depth of the semen sample).

The diameter of the microscope field can be measured using a micrometer. The surface area in one field is equal to the square of the radius multiplied with pi ($S = \pi r^2$).

e.g. Diameter = 250 μ m \Rightarrow radius = 125 μ m \Rightarrow surface area = 49086 μ m²

The distance between the object glass and the cover glass can be calculated using the formula:

height (in μ m) = volume (in μ l) / (length x width of cover glass in mm)

e.g. volume of the sample = 20 μ l, coverglass = 24 x 40 mm

Height = 20 / (24 x 40) = 0.0208 mm or 20.8 μ m

Knowing these figures a factor can be determined using this formula:

Factor = 1 000 000 / (surface area x height)

e.g. Factor = 1 000 000 μ m³ / (49086 μ m² x 20.8 μ m) = 0.98

This means that if one counts 5 WBC in one microscope field, the corresponding concentration would be 4.9 mil/ml.

Interpretation

* Yellow to brown stained cells are peroxidase positive cells: neutrophilic polymorphous leucocytes.

* Pink stained cells: all other cells.

Storage

Store reagents between: 2°C-25°C

Remarks

Formation of a sediment in Reagent 1 is normal. Simply pour Reagent 1 over filter paper to eliminate sediment.

Limitations of the method

LeucoScreen only stains peroxidase positive white blood cells, other types of white blood cells (e.g. lymphocytes and monocytes) can not be detected.

Sensitivity and specificity

In a comparative study Politch, et al (Politch, 1993) conclude the sensitivity and specificity for leucocytospermia of the peroxidase stain is 90%, compared with the immunohistological test.

With a threshold for the peroxidase stain of 1 mil. WBC / ml and for the immunohistological test of 2 mil. WBC / ml.

Warnings and precautions

All semen samples should be considered potentially infectious. Handle all specimens as if capable of transmitting HIV or hepatitis.

Reagent 1 contains benzidine and cyanosine and methanol. Very poisonous by inhalation, skin contact or swallowing. Risk of unrepairable damage. Take off contaminated clothing immediately. Wear protective clothing. In case of an accident, seek medical attention.

Reagent 2 contains H₂O₂, corrosive, causes burns. After contact with skin wash immediately with water and soap. Wear eye / face protection.

Bibliography

Aitken, R.J., West, K.M. (1990) Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *International Journal of Andrology*, 13:433-51.

Aitken, R.J., Clarkson, J.S., Fishel, S. (1989) Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biology of Reproduction*, 41:183-7.

Barratt, C.L.R., Bolton, A.E., Cooke, I.D. (1990) Functional significance of white blood cells in the male and female reproductive tract. *Human Reproduction*, 5:639-44.

Endtz, A.W. (1972) Een methode om het vochtige urinesediment en het vochtige menselijke sperma rechtstreeks te kleuren. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, 116(17): 681-5.

Hill, J.A., Haimovici, F., Politch, J.A., Anderson, D.J. (1987) Effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages (lymphokines and monokines) on human sperm motion parameters. *Fertility and Sterility*, 47:460-5.

Politch, J.A., et al (1993) Comparison of methods to enumerate white blood cells in semen. *Fertility and Sterility*, 60(2): 372-5.

WHO (1992) WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, Third Edition, Cambridge University Press, Cambridge, p. 107.

Wolff, H., Anderson, D.J. (1988) Immunohistological characterization and quantification of leukocyte subpopulation in human semen. *Fertility and Sterility*, 53:528-36.

FertiPro N.V. - Industriepark Noord 32
8730 Beemem, Belgium
URL: <http://www.fertipro.com>
E-mail: info@fertipro.com



Device ID: LEUCO

ANNEXE IV : Matériels et Réactifs utilisés.

✚ Matériels :

- Gants.
- Micropipettes.
- Pipettes Pasteur.
- Les lames.
- Les lamelles (22×22 mm).
- Les tubes.
- Les pinces.
- Centrifugeuse.
- Vortex.
- Bain maries.
- Microscope optique.
- Chronomètre.
- La hôte.



+ Réactifs :

- L'eau distillé.
- Ethanol.
- PBS.



- **La Solution de Dénaturation (79%) :**

Constitue de : 8µl NaOH+1ml d'eau.

- **La Solution de Lyse :**

Constitue de: 1, 4 Dithithreitol (DTT), Use under Fume Hood.

- **LeucoScreen :**



LISTE DES TABLEAUX

Tableau. 1 : Structure et morphologie d'un spermatozoïde (23).....	13
Tableau. 2 : Les normes et les anomalies d'un spermogramme selon l'OMS 2010.....	23
Tableau. 3 : Répartition des sujets SSP et SSN.....	33
Tableau.4 : Résultat du spermogramme de notre échantillon. (Les valeurs soulignées et en gras sont celles des individus SSN, c'est le cas de l'ensemble des tableaux).....	34
Tableau.5 : Résultat global du test de fragmentation dans notre échantillon. (*) Cas d'oligospermie ; faible concentration.....	36
Tableau. 6 : DFI (%) des individus représentant une nécrozoospermie (n = 17) vitalité < 60%, seuil OMS (2010).....	37
Tableau. 7 : Statistiques descriptives de DFI-vitalité.....	38
Tableau. 8 : DFI (%) des individus représentant une asthénozoospermie (n = 18) mobilité < 40 %, seuil OMS (2010).....	39
Tableau. 9 : Statistiques descriptives de DFI-mobilité.....	39
Tableau. 10 : DFI (%) des individus à un pH basique (n = 7) pH > 8, seuil OMS (2010).....	41
Tableau. 11 : Statistiques descriptives de DFI-pH.....	41
Tableau. 12 : DFI (%) en fonction de la numération, individus à oligozoospermie (n = 14) concentration < 15 ; seuil OMS (2010).....	42
Tableau. 13 : Statistiques descriptives de DFI-concentration.....	43
Tableau. 14 : DFI (%) des individus avec l'hypospermie (n = 7), volume de l'éjaculat < 1,5 ; seuil OMS (2010).....	44
Tableau. 15 : Statistiques descriptives de DFI-volume.....	44
Tableau. 16 : Cas des leucospermie (n = 16). Des leucocytes > 1 million, seuil OMS (2010).....	45
Tableau. 17 : Statistiques descriptives de DFI-CL.....	46
Tableau. 18 Individus avec un nombre de cellules germinales > 5mill/ml (n = 8); seuil OMS (2010).....	47
Tableau. 19 : Statistiques descriptives de DFI- CG.....	47
Tableau. 20 : Cellules rondes et DFI% (n = 5).....	48
Tableau. 21 : Statistiques descriptives de DFI-cellules rondes.....	48
Tableau. 22 : Résultat de test de Khi-deux (mobilité/fragmentation).....	50
Tableau. 23 : Résultat de test de Khi-deux (vitalité/fragmentation).....	50

<u>Tableau. 24</u> : Résultat de test de Khi-deux (cellules germinales /fragmentation).....	50
<u>Tableau. 25</u> : Résultat de test de Khi-deux (Cellules leucocytaires /fragmentation).....	51
<u>Tableau. 26</u> : Résultat de test de Khi-deux (cellules rondes /fragmentation).....	51
<u>Tableau. 27</u> : Résultat de test de Khi-deux (concentration/fragmentation).....	51
<u>Tableau. 28</u> : Résultat de test de Khi-deux (Volume/fragmentation).....	52
<u>Tableau. 29</u> : Résultat de test de Khi-deux (pH/fragmentation).....	52
<u>Tableau. 30</u> : Résultat de test de Khi-deux (agglutinats /fragmentation).....	53
<u>Tableau. 31</u> : Répartition des sujets selon l'âge, tabagisme et l'agglutinats.....	54
<u>Tableau. 32</u> : Les différentes classes de troubles notés sur le compte rendu des résultats du spermogramme.....	55
<u>Tableau. 33</u> : Résultats de test du STUDENT selon Les différentes classes de troubles notés sur le compte rendu des résultats du spermogramme.....	56
<u>Tableau. 34</u> : Les différentes classes de l'effet cumulé des troubles spermatiques.....	60

LISTE DES FIGURES

Figure. 1 : Vue latérale de l'ensemble des organes génitaux de l'homme (13).....	7
Figure. 2 : Coupe sagittale partielle du testicule (40).....	8
Figure. 3 : Résumé de la séquence des événements survenant dans la spermatogénèse (3).....	10
Figure. 4 : Résumé de la séquence des événements survenant dans la spermiogénèse (3).....	10
Figure. 5 : Contrôle endocrine de la fonction testiculaire (19).....	11
Figure. 6 : Modèles de l'organisation de la chromatine dans une cellule somatique (zigzag ou solénoïde) et dans une cellule spermatique (doughnut) (11).....	15
Figure. 7 : Synthèse des différentes étapes du remodelage de la chromatine lors de la spermiogénèse (37).....	15
Figure. 8 : Rôle hypothétique de Fas au cours de la spermatogénèse chez des hommes aux paramètres spermatiques normaux (a) et anormaux (b) (35).....	17
Figure 9 : Classification des anomalies morphologiques des spermatozoïdes KRUGER (OMS 2010).....	24
Figure 10 : Classification des anomalies morphologiques des spermatozoïdes (7).....	25
Figure. 11 : Exemple d'une salle prévue pour le recueil de sperme.....	27
Figure. 12 : Répartition en pourcentage des SSP et SSN.....	33
Figure. 13 : Distribution de la fréquence des anomalies spermatiques.....	35
Figure. 14 : Nuage des pointes avec la courbe de tendances de DFI-vitalité.....	38
Figure. 15 : Nuage des pointes avec courbe tendance entre le DFI-mobilité.....	40
Figure. 16 : Nuage des pointes avec courbe tendances de DFI-pH.....	41
Figure. 17 : Nuage des pointes avec courbe tendances DFI-concentration.....	43
Figure. 18 : Nuage des pointes avec courbe tendances de DFI-volume.....	44
Figure. 19 : Nuage des pointes avec courbe tendances de DFI-cellules leucocytaires.....	46
Figure. 20 : Nuage des pointes avec courbe tendances de DFI-cellules germinale.....	47
Figure. 21 : Nuage des pointes avec courbe tendances de DFI -et cellules rondes.....	49
Figure. 22 : Distribution en pourcentage des anomalies morphologique des spermatozoïdes.....	55
Figure. 23 : Les déférents facteurs qui influencé sur la fragmentation d'ADN spermatique (26).....	57

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) **Ahmed Mellal. (2010).** " Application Pratique de L'anatomie Humaine". Tome 1- viscères du troc. Editions Publibook. Paris- France, 229-236.
- (2) **Aitken, R. J., G. N. De Iuliis and R. I. McLachlan (2009).** "Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line." *Int J Androl* **32**(1): 46-56.
- (3) **Anne-Karen FAURE. (2011).** "Généralité sur la procréation, la méiose, la spermatogénèse. " *Histologie - Biologie du développement et de la Reproduction.* Université Joseph Fourier de Grenoble.
- (4) **Aoki et al., (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.
- (5) **Arne Schäffler, Nicole Menche. (2004).** "Anatomie Physiologie Biologie." 2^{ème} Ed, 387.
- (6) **Braun, R. E. (2001).** "Packaging paternal chromosomes with protamine." *Nat Genet* **28**(1): 10-2.
- (7) **Burello N, Arcidiacono G, Vicari E, Asero P, Di BD, De PA, et al. (2004).** Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligo-asthenoteratozoospermia have an increased aneuploidy rate. *Hum. Reprod.* 19, 2298-2302.
- (8) **Chanson. P, Guillaudeau P-J. (2000).** "endocrinologie et maladie gonadiques. Le livre de l'interne endocrinologie et maladie métabolique". Ed Flannarion, 15-202, 46-230.
- (9) **Chohan, K. R., J. T. Griffin, M. Lafromboise, C. J. De Jonge and D. T. Carrell (2006).** "Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm." *J Androl* **27**(1):53-9.
- (10) **Dakouane M, Albert M, Bergère M, Sabbagh C, Brayotel F, Vialard F, Lombroso R, Bicchieray L, Selva J. (2005).** "Influence du vieillissement sur la spermiogénèse: évaluation histologique, risqué chromosomique et apoptose des spermatozoïdes". *Gynécologie obstétrique et fertilité*, 33, 659-664.
- (11) **Dorigo et al., (2004).** "Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber." *Science* **306**(5701): 1571-3.
- (12) **Elaine N.Marieb, René Lachaine. (2006).** " Biologie humaine, principales d'anatomie et de physiologie. " 8^{ème} Ed, 110.

- (13) **Elaine N. Marieb, René Lachaine. (2008).** "Biologie humaine, principales d'anatomie et de physiologie". 8^{ème} Ed, 574-576.
- (14) **Evenson, D. P., L. K. Jost, R. K. Baer, T. W. Turner and S. M. Schrader (1991).** "Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay." *Reprod Toxicol* **5**(2): 115-25.
- (15) **Grizard G, Jimenez C. (1997).** "Les examens du sperme dans l'exploration de la fertilité masculine". *Progrès en Urologie*, 07, 496-504.
- (16) **Hamamah S, Barthelemy C. (1997).** "Spermogramme et test fécondance : intérêt et limites". *JTA Fertilité et stérilité masculine*, 05, 456-465.
- (17) **Hamamah S, Corcia L, Entezami G, El Wией H. (2000).** "Technique d'AMP et leurs indications dans l'hypofertilité masculine". *Andrologie*, 10, 03, 279-283.
- (18) **Hamamah S., Saliba E., Benhamed M., Glod F. (1999).** "Médecine et Biologie de la reproduction". Collgynécol obstéte., Ed Masson, 3-50.
- (19) **J.G.McGeown. (2003).** " Physiologie L'essentiel." Edition Maloine. Paris-France 343-344-345.
- (20) **JMJ Plouchart. (2010).** " Les Techniques de laboratoire en Biologie de la reproduction OMS ".
- (21) **Johanne Dussault. (2009).** "Sommaire scientifique avec questionnaire, Spermogramme." T.M, ordre professionnel des Technologistes Médicaux du Québec: 2.
- (22) **Kruger TF et col (1986).** "Sperm morphology features as a pronostic factor in vitro fertilization". *Fertil and Steril.*" 46, 1118-1123. (OMS 2010).
- (23) **Louis Bujan. (2011).** "Biologie de la Reproduction et du Développement." Collège Hospitalo-Universitaire de biologie et médecine du développement et de la reproduction 47- 48.
- (24) **Manicardi et al., (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.
- (25) **Marc de Braekeller. (2013).** "Analyse de l'équipement chromosomique et de la fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes d'homme infertiles", 35-37.
- (26) **M. Bungum, P. Humaidan, A. Axmon, M. Spano, L. Bungum, J. Erenpreiss and A. Giwercman. (2007).** "Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome" *Human Reproduction Vol.22*, No.1 pp. 174–179.

- (27) **McPherson, S. and F. J. Longo (1993)**. "Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids." *Eur J Histochem* **37**(2): 109-28.
- (28) **Nguyen MT, Delaney DP, Kolon TF. (2009)**. "Gene expression alteration in cryptorchid males using spermatozoa microarray analysis. *Fertil. Steril.* 92, 01, 182-187.
- (29) **O'Flaherty C, Vaisheva F, Hales BF, Chan P, Robaire B. (2008)**. "Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy". *Hum. Reprod.* 23, 1044-1052.
- (30) **Ozmen et al., (2007)**. "DNA damage of human spermatozoa in assisted reproduction: origins, diagnosis, impacts and safety." *Reprod Biomed Online* **14**(3): 384-95.
- (31) **Pujol (2008)**. "Anatomie – Appareil génital masculin. "Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes.
- (32) **Ravel. C, Berthant.I, Siffroi.J.P. (2009)**. "infertilité masculine". *Encycl Médchir : endocrine-Nutrit.*,10-32.Ed 10 : 1-19.
- (33) **Robin G, et al. (2010)**. "Cryptorchidie : de la physiopathologie à l'infertilité". *Gynécologie obstétrique et fertilité*, 38, 588-599.
- (34) **Roux, C., C. Tripogney, C. Joanne and J et al., (2004)**. "Nuclear quality of the spermatozoon: exploration tests of the chromatin of human spermatozoa (nuclear proteins)." *Gynecol Obstet Fertil* **32**(9): 792-8.
- (35) **Sakkas, D., E. Mariethoz, G. Manicardi, D. Bizzaro, P, et al., (1999a)**. "Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa." *Rev Reprod* **4**(1): 31-7.
- (36) **Saleh A, Agarwal A. (2002)**. "Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice". *J. Androl.* 23, 737-752.
- (37) **Sergerie, M., G. Bleau, R. Teule, M. Daudin and L. Bujan (2005a)**. "Sperm DNA integrity as diagnosis and prognosis element of male fertility." *Gynecol Obstet Fertil* **33**(3): 89-101.
- (38) **Smit M. (2010)**. "La structure de la chromatine spermatique est associée à la qualité de la spermatogénèse". *Fertil. Steril.* 90, 06, 134-137.
- (39) **White, W. M., E. D. Kim and J. D. Mobley III (2007)**. "Varicocèle". www.emedicine.com.
- (40) www.medecine.ups-tlse.fr/dcem1/histologie/courtade/appareil_genetal_masculin_sp.pdf.

(41) www.ivf-embryo.gr/fr/fragmentation-de-ladn-spermatique.

(42) **Zini A, Dohle G. (2011).** Are varicoceles associated with increased DNA fragmentation? *Fertility and sterility*, 96, 06, 1283-1287.