

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE**

SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri- Constantine 1



*Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale*

Mémoire de fin d'études

Présenté par : Mme Essma BOUKERZAZA

En vue de l'obtention du diplôme : Master en Génétique

THEME

***Etude de la qualité du génome spermatique : cas
de la tératozoospermie***

Président de jury :	Pr. Dalila SATTA	Professeur	UMC1
Examineur :	Dr. Mohamed Larbi REZGOUNE	MCA	UMC
Encadrant :	Dr. Mostefa BENSAADA	MCB	Université de Khenchela

Année Universitaire 2020-2021

Remerciements

*Je souhaite tout d'abord exprimer ma gratitude et mes remerciements à mon encadrant, Docteur **BENSAADA Mostefa**, de m'avoir accueillie chaleureusement au sein son laboratoire et d'avoir dirigé ce travail. Je lui suis également reconnaissante pour le temps qu'il m'a accordé, ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa disponibilité et sa sympathie. J'ai beaucoup appris à ses côtés, pour cela je lui adresse mes remerciements les plus sincères. J'adresse mes reconnaissances profondes aux membres de jury, Docteur **REZGOUNE Mohamed Larbi** et Professeur **SATTA Dalila**, pour le grand honneur qu'ils nous font en acceptant de juger ce travail. Mes remerciements à mon chef d'équipe, Docteur **MABREK Saad**, de sa générosité et sa disponibilité à tout moment où j'avais besoin de conseil ou de produits réactifs. Je lui remercie sincèrement de m'avoir permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions possibles. Je tiens à remercier Docteur **LAHMADI Zakaria** pour sa gentillesse de m'avoir accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire de cytogénétique et de m'avoir permise d'utiliser l'équipement dans son laboratoire. Mes grands remerciements vont aux personnes de **la clinique Rotaby d'Alger** : qui nous ont fourni du matériel biologique et des données nécessaires. A mes chères amies **Hanine et Amina**, de m'avoir toujours encouragée et soutenue dans les moments difficiles... Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes grands remerciements envers ma famille, ma très chère **maman**, mes **sœurs** et mon **frère** pour leur amour, leur confiance, leur soutien et leurs encouragements. Je souhaite remercier particulièrement mon mari, **SAIFI Boubekour** pour son amour, ses encouragements et son soutien volontaire pendant tout mon cursus de master jusqu'à l'arrivée enfin à ce travail de fin d'étude.*

Sommaire

<i>Liste des abréviations</i>	6
<i>Liste des figures</i>	7
<i>Liste des tableaux</i>	8
Chapitre I :Synthèse bibliographique	3
1 Infertilité masculine	5
1.1 Définition de l'infertilité	5
1.2 Causes génétiques de l'infertilité masculine	5
1.2.1 Troubles quantitatifs de la spermatogenèse.....	5
1.2.1.1 Anomalies détectées par l'analyse du caryotype	5
1.2.1.1.1 Syndrome de Klinefelter.....	5
1.2.1.1.2 Le syndrome du mâle 46, XX.....	6
1.2.1.2 Anomalies structurelles chromosomiques :.....	7
1.2.1.3 Microdélétions du chromosome Y :	7
1.2.1.4 Causes monogéniques	8
1.2.1.5 Obstruction ou dysfonctionnement canalaire	8
1.2.1.6 Perturbations qualitatives de la spermatogenèse	9
1.2.1.7 Causes épigénétiques.....	9
1.2.2 Causes non génétiques de l'infertilité masculine	9
2 Exploration de l'infertilité masculine	10
2.1 Analyse du sperme : Spermogramme et spermocytogramme	10
3 La teratozoospermie	11
3.1 Définition	11
3.2 Types de défauts de morphologie du sperme tératospermique (anomalies de la tête, de la partie médiane et du flagelle).	11
3.3 Causes générales de la tératospermie :	13
3.4 Génétique et bases moléculaire de la tératospermie.....	13
3.4.1 Macrozoospermie	13
3.4.1.1 Le gène <i>AURKC</i>	14
3.4.2 Globozoospermie.....	16
3.4.2.1 Le gène <i>SPATA 16</i>	17
3.4.2.2 Le gène <i>DPY19L2</i>	18
3.4.3 Spermatozoïdes acéphales.....	19
3.4.3.1 Le gène <i>SUN5</i>	19
3.4.3.2 Le gène <i>PMFBP1</i>	19
3.5 Les caractéristiques d'un spermogramme chez les individus avec tératozoospermie	20
4 La Fragmentation de l'ADN spermatique et infertilité masculine	24

4.1	Structure de la chromatine spermatique	24
4.2	Origines de la fragmentation de l'ADN spermatique.....	27
4.2.1	Défaut du remodelage de la chromatine spermatique	27
4.2.2	Substances oxygénées réactives (SOR).....	28
4.2.3	L'apoptose.....	29
4.2.4	Autres facteurs.....	30
4.3	Evaluation de la fragmentation de l'ADN dans les gamètes mâles.....	31
4.3.1	La coloration en bleu de toluidine	31
4.3.2	La coloration CMA3	31
4.3.3	Le test Comet.....	31
4.3.4	Dosage TUNEL.....	31
4.3.5	Test SCSA	32
4.3.6	Le test SCD	32
4.3.6.1	Etapas de la SCD.....	32
4.3.6.1.1	Enrobage des spermatozoïdes dans une matrice de microgel inerte :	32
4.3.6.1.2	Incubation dans un acide et une solution de lyse spécifique à l'espèce :	32
4.3.6.1.3	Visualisation par la coloration.....	33

Chapitre II: Matériel et méthodes

1	Matériel biologique	36
1.1	Origine du sperme utilisé	36
1.2	Origine du sang utilisé pour la préparation des sondes fluorescentes	36
2	Méthodologie de travail.....	36
2.1	Méthode du test SCD	36
2.1.1	Préparation des échantillons spermatiques	36
2.1.2	Le test SCD	37
2.1.3	Etablissement du taux de DFI.....	38
2.2	Hybridations FISH sur sperme des sondes commerciales.....	38
2.2.1	Décondensation de la tête du sperme	38
2.2.2	Hybridation des sondes	39
2.2.3	Lavage post hybridation	39
2.2.4	Enumération et analyse des lames par microscope à fluorescence.....	39
3	Méthode de Préparation des sondes préparées au laboratoire fluorescentes.....	39
3.1	Extraction de l'ADN génomique.....	40
3.1.1	Lyse et élimination des globules rouges.....	40
3.1.2	Lyse des globules blancs :	40
3.1.3	Extraction et collecte d'ADN.....	40
3.1.4	Dosage de l'ADN	41
3.2	PCR primaire pour l'amplification de séquences alpha satellites spécifiques des chromosomes 13, 21, 18 X et Y.	41
3.2.1	Préparation de la réaction PCR.....	41

3.2.2	Caractéristiques des amorces utilisées.....	41
3.2.3	Programme thermocycleur	42
3.2.4	Vérification des amplifications PCR.....	42
3.3	PCR secondaire pour le marquage des séquences des produits d'amplification des chromosomes 13, 21, 18 X et Y	42
3.3.1	Préparation de la réaction PCR.....	42
3.3.2	Analyse du profil de la PCR de marquage	43
3.4	Précipitation des produits PCR.....	43
3.5	Hybridation FISH des sondes d'ADN alpha satellite préparées au laboratoire	43

Chapitre III : Résultats et discussion

1	Résultats.....	45
1.1	Résultat DFI	45
1.2	Résultat de la FISH avec les sondes commerciales.....	46
1.3	Résultat de la préparation des sondes fluorescentes.....	47
1.3.1	Résultat de l'extraction d'ADN génomique	47
1.3.2	Dosage de l'ADN extrait au Nanodrop :	48
1.3.3	Résultat de la PCR Primaire.....	48
1.3.4	Résultat de la PCR de marquage fluorescent :	48
1.4	Résultats de FISH par les sondes préparées au laboratoire	50
2	Discussion.....	50

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique

AURKC: Aurora Kinase C

AZF: Azoospermia Factor

CAVD: Congenital Absence of Vas Deferens

CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

CMA3: Chromomycine A3

CPC: Chromosomal Passenger Complex

DAPI : 4',6-diamidino- 2-phénylindole

DFI : DNA Fragmentation Index

DMPK: Dystrophie Myotonica-Protéine Kinase

DNAH5: Dynein, Axonemal Heavy Chain 5

DNAI1: Dynein, Axonemal, Intermediate Chain 1

FISH: Fluorescence In Situ Hybridization

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

KASH: Klarsicht, ANC-1, Syne Homologie

LINC: Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P1: Protamine 1

PAR: PseudoAutosomique Region

PCR : Polymerase chain reaction

PMFBPI: Polyamine Modulated Factor 1 Binding Protein 1

SCD: Sperm DNA Dispersion

SCO: Syndrome Sertoli Cell-Only

SCSA: Sperm Chromatin Structure Assay

SDF: Sperm DNA Fragmentation

SOR : Substances oxygénées réactives

SPATA16: Spermatogenesis-Associated Protein 16

SRY: Sex-determining Region Y

SSA : Syndrome des Spermatozoïdes Acéphales

SUN5 : Sad1 et UNC84 contenant 5 domaines

TdT: Terminal deoxynucleotidyl transferase

TNP1: Transition Protein 1

TPR: Tetra-trico-peptide repeat

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labelling

UTP: Uridine Triphosphate

Liste des figures

Figure 01 : Anomalies des chromosomes ; caryotype d'un homme normal (46, XY), avec le syndrome de Klinefelter (47, XXY), avec syndrome du male 46, XX (SRY+).....	6
02 : les microdélétions du facteur d'azoospermie complète (AZF).....	8
03 : Localisation des mutations AURKC.....	14
04 : AURKC contrôle la méiose et la cytokinèse des spermatocytes.....	15
05 : Analyse par microscopie électronique de spermatozoïdes globozoospermique typique d'un patient déficient de DPY19L2.....	16
06 : Etapes La biogenèse de l'acrosome	17
07 : Illustrations du spermatozoïde humain normal ou subnormal, considéré comme normal, et rappel des définitions.....	20
08 : Anomalies de taille de la tête des spermatozoïdes humains	21
09 : Anomalies de forme et de texture de la tête des spermatozoïdes humains ...	21
10 : Anomalies de la pièce intermédiaire des spermatozoïdes humains.....	22
11 : Anomalies du flagelle des spermatozoïdes humains	23
12 : Représentation schématique de la structure de l'ADN dans les cellules somatiques et les spermatozoïdes.....	24
13 : Remplacement des histones par les protamines dans les spermatozoïdes humains	25
14 : Espèces réactives de l'oxygène produites par des facteurs intrinsèques et externes et leur impact sur l'ADN du sperme pour perturber son intégrité affectant les résultats de la reproduction.....	28
15 : Rôle de Fas pendant la spermatogenèse chez l'homme avec des paramètres spermatiques normaux et anormaux (oligozoospermie, asthénozoospermie et tératozoospermie)	29
16 : Images en fond clair (a) et au microscope à fluorescence (b) de spermatozoïdes humains traités par le test SCD.....	33
17 : Sperme humain traité par le test SCD et visualisé au microscope à fond clair... ..	34
18 : Image du test SCD : spermatozoïde fragmenté –spermatozoïde non fragmenté ...	45
19 : Image FISH sur le sperme du témoin normo sperme.	47
20 : Image FISH sur le sperme des patients avec teratospermie.	47
21 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1% de l'ADN génomique brut extrait.....	48
22 : Dosage de l'ADN extrait au Nanodrop.....	48
23 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits PCR primaires.....	49
24 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits PCR de marquage.....	49
25 : Image de la FISH préparées au laboratoire par la sonde qui cible le centromère du chromosome X marqué par le Cy5-dUTP et le FITC-Dutp.....	51

Liste des tableaux

Tableau 1 : Valeurs normales des paramètres du spermogramme.....	12
1 : Concentrations prises pour la PCR d'amplification primaire dans le but de préparer des sondes fluorescentes.....	41
3 : Caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification des régions alphoides des chromosomes 13, 21, 18, X, Y.....	42
4 : La réaction de la PCR de marquage.	43
5 : Résultat de la DFI	45
6 : Résultats de l'énumération des spermatozoïdes aneuploïdes et normaux pour chacun des patients suite à la FISH avec sondes commerciales des chromosomes 13, 21, 18, X, Y	46
7 : Résumé des résultats des amplifications PCR spécifiques des 5 des séquences alphaoïdes et leur marquage par incorporation d'un d'UTP marqué par le FITC (vert) ou d'un d'UTP marqué Cy5 (Rouge).	50

Résumé

Afin d'améliorer l'évaluation de la qualité du génome spermatique, plusieurs paramètres ont été étudiés et rapportés dans la littérature. Le but de cette étude est, non seulement, d'estimer les taux de fragmentation du génome spermatique et d'aneuploïdie chez des hommes atteints de tératozoospermie, mais aussi de voir s'il y a corrélation entre les deux phénomènes.

Nous avons analysé dans cette étude, 03 hommes avec une tératozoospermie et un homme témoin normal pris comme contrôle. L'indice de la fragmentation de l'ADN spermatique « DNA Fragmentation Index » ou DFI est calculé après utilisation de la technique SCD (Sperm Chromatin Dispersion) alors que l'analyse de l'aneuploïdie des spermatozoïdes a été faite par Hybridation in situ en Fluorescence (FISH). Pour la FISH nous avons utilisés deux types de sondes : En premier lieu, par les sondes commerciales spécifiques aux chromosomes 13, 18, 21, X et Y et en second lieu des sondes préparées au laboratoire. L'utilisation de ces dernières est dans le but d'augmenter la taille de notre cohorte. Le taux de la fragmentation d'ADN ou DFI moyen pour les 4 patients été autour de 83% par rapport à l'homme témoin normal qui était de 30%. Le même constat a été fait concernant le taux d'aneuploïdie chez patient, puisque la moyenne de spermatozoïdes aneuploïdes observée était de 78%.

Nos résultats, même s'ils restent préliminaires confirment ce qui a été observé sur des cohortes de patients plus importantes. Les tests des sondes fluorescentes préparées au laboratoire sont encourageants et sont en cours d'optimisation pour pouvoir élargir notre expérience à plus grands nombre de patients.

En conclusion, les tests SCD et FISH sont deux outils importants pour évaluer la qualité du génome spermatique et doivent être généralisés dans la pratique clinique.

Mots clés : infertilité masculine, fragmentation de l'ADN, aneuploïdie, FISH, Tératozoospermie, test SCD

Abstract

In order to improve the evaluation of the quality of the sperm genome, several parameters have been studied and reported in the literature. The aim of this study is not only to estimate the rates of sperm genome fragmentation and aneuploidy in men with teratozoospermia, but also to see if there is a correlation between the two phenomena.

We analyzed in this study, 03 men with teratozoospermia and a normal control man taken as a control. The sperm DNA fragmentation index “DNA Fragmentation Index” or DFI is calculated after using the SCD (Sperm Chromatin Dispersion) technique while the analysis of the aneuploidy of the spermatozoa was carried out by in situ hybridization in Fluorescence (FISH). For FISH we used two types of probes: First, commercial probes specific for chromosomes 13, 18, 21, X and Y and second, homemade probes. The use of in-house probes is aimed at increasing the size of our cohort. The average DNA fragmentation rate or DFI for the 4 patients was around 83% compared to the normal control man, which was 30%. The same observation was made regarding the rate of aneuploidy in patients, since the average aneuploidy sperm observed was 78%.

Our results, although still preliminary, confirm what has been observed in larger patient cohorts. Homemade fluorescent probe testing is encouraging and is being optimized to extend our experience to larger numbers of patients.

In conclusion, SCD and FISH tests are two important tools to assess the quality of the sperm genome and should be generalized in clinical practice.

Keywords: Male infertility ,DNA fragmentation, aneuploidy, FISH, Teratozoospermia, SCD test

المخلص

من أجل تحسين تقييم جودة جينوم الحيوانات المنوية، تمت دراسة العديد من الادوات ونشرها في العديد من الدراسات الهدف من هذه الدراسة ليس فقط تقدير معدلات تجزئة جينوم الحيوانات المنوية واختلال الصيغة الصبغية لدى الرجال المصابين بثيراتوزوزبيرميا ، ولكن أيضًا لمعرفة ما إذا كان هناك ارتباط بين الظاهرتين في هذه الدراسة، تم تقييم 03 رجال يعانون من ثيراتوزوزبيرميا ورجل عادي يتم حساب مؤشر تجزئة الحمض النووي للحيوانات المنوية "مؤشر تجزئة الحمض النووي" بعد استخدام اختبار تشتت كروماتين الحيوانات المنوية بينما تم إجراء تحليل عدم توازن الصبغيات في الحيوانات المنوية عن طريق التهجين الموضعي المتألق بالنسبة إلى التهجين الموضعي المتألق ، استخدمنا نوعين من المجسات: أولاً ، مجسات تجارية خاصة بالكروموسومات 13 و 1 و 2 و 18 و 21 و مجموعتنا. كان معدل تفتيت الحمض النووي للمرضى حوالي 83% مقارنة بالرجل العادي الذي كان 30%. تم إجراء نفس الملاحظة فيما يتعلق بمعدل اختلال الصيغة الصبغية في المرضى، حيث أن متوسط عدد الحيوانات المنوية التي تمت ملاحظتها كان 78%.

تؤكد النتائج التي توصلنا إليها ، حتى لو ظلت أولية ، ما لوحظ على مجموعات أكبر من المرضى ، كما أن اختبارات المسجات المشعة المخبرية الصنع مشجعة ويتم تحسينها لتكون قادرة على توسيع خبرتنا لتشمل أعدادًا أكبر من المرضى في الختام، تعتبر اختبارات تشتت كروماتين الحيوانات المنوية والتهجين الموضعي المتألق أداتين مهمتين لتقييم جودة جينوم الحيوانات المنوية ويجب دراستها من أجل الممارسة السريرية

الكلمات المفتاحية: عقم الذكور، تفتيت الحمض النووي ، اختلال الصيغة الصبغية ، تشتت كروماتين الحيوانات المنوية ،
ثيراتوزوزبيرميا ، التهجين الموضعي المتألق

Introduction générale

L'infertilité est un problème de santé publique important qui affecte environ 1 couple sur 6 dans le monde (Harton & Tempest, 2012). Le facteur masculin contribue pour environ 50 % des cas (Di Santo et *al.*, 2016). De nombreux facteurs sont impliqués dans l'infertilité masculine, parmi lesquels les facteurs génétiques qui jouent un rôle majeur. Cependant, l'utilisation de la procréation médicalement assistée (PMA) a grandement aidé les couples à concevoir et contribuer à la naissance réussie de plus de 5 millions de naissances. En particulier, il a été démontré que l'infertilité masculine a un effet significatif négatif sur la reproduction des résultats en PMA, malgré l'application de techniques capables de sélectionner les spermatozoïdes de meilleure qualité parmi l'ensemble de la population. Une interprétation potentielle derrière ce phénomène pourrait être l'introduction de spermatozoïdes matures « pas en bonne santé » au cours de la procédure de PMA, avec une organisation de la chromatine et/ou un ADN fragmenté, même si ils sont mobiles et morphologiquement normaux (Sakkas et *al.*, 1999). Les causes génétiques de l'infertilité masculine sont multiples : chromosomiques ; un taux plus élevé d'aneuploïdies des chromosomes du sperme chez les hommes infertiles par rapport aux hommes fertiles (Muriel et *al.*, 2007), les remaniements chromosomiques affectants le chromosome Y et les microdélétions du locus AZF. Les causes géniques sont elles aussi nombreuses. Un facteur bien défini influençant l'infertilité masculine est l'intégrité de l'ADN spermatique, donc la qualité de l'ADN spermatique a été décrite comme cause de cette infertilité masculine (Afrim et *al.*, 2018). Certains auteurs ont postulé une corrélation potentielle entre les aneuploïdies des chromosomes du sperme et l'intégrité de l'ADN (Vendrell et *al.*, 2013).

En effet certains auteurs ont rapporté une corrélation significative positive entre les aneuploïdies des chromosomes du sperme et l'intégrité de l'ADN dans des échantillons de sperme de patients infertiles, suggérant un effet potentiel de l'aneuploïdie sur l'intégrité de l'ADN pendant la maturation des spermatozoïdes. Au contraire, d'autres études ont exprimé une opinion différente (Balasuriya, 2011).

Par conséquent, la question est : la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes et l'aneuploïdie, sont-elles vraiment corrélatives ? Malheureusement, les données disponibles sont insuffisantes concernant la base biologique de cette corrélation pour amener à une conclusion finale. La cause majeure de ce peu de résultat est que les protocoles utilisés dans ces études sont lourds et contraignants. Notre étude vise à mettre en place un nouveau protocole pour évaluer le taux d'aneuploïdie dans le sperme à génome fragmenté. Pour cela nous avons choisi d'analyser la corrélation entre la fragmentation de l'ADN spermatique chez des hommes avec tératospermie en comparaison avec un sperme normal.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

1 Infertilité masculine

1.1 Définition de l'infertilité

L'infertilité est définie par l'échec d'obtenir une grossesse après 12 mois ou plus de rapports sexuels réguliers non protégés (OMS, 2018). Elle affecte 10 à 15% des couples à travers le monde. Selon les dernières statistiques de l'OMS, environ 50 à 80 millions de personnes souffrent d'infertilité. Des études à grande échelle ont montré que dans 20 à 30 % des cas sont dues à des facteurs masculins (Kumar et *al.*, 2015). Le diagnostic de l'infertilité masculine est généralement basé sur l'analyse standard du sperme.

1.2 Causes génétiques de l'infertilité masculine

1.2.1 Troubles quantitatifs de la spermatogenèse

Les troubles quantitatifs de la spermatogenèse sont dus à des troubles testiculaires primaires qui peuvent engendrer plusieurs phénotypes séminaux venant de l'azoospermie jusqu'à à l'oligozoospermie. La multitude de facteurs génétiques connus et validés comprend des anomalies chromosomiques structurelles et quelques mutations génétiques.

1.2.1.1 Anomalies détectées par l'analyse du caryotype

Le caryotype est le premier test génétique effectué pour des patients présentant des troubles quantitatifs de la spermatogenèse. Environ 15 % des hommes atteints d'azoospermie non obstructive et 4% des hommes avec oligozoospermie modérée (<10 millions de spermatozoïdes par ml) présentent des anomalies chromosomiques (Jungwirth et *al.*, 2012). L'anomalie chromosomique la plus fréquente dans l'azoospermie non obstructive est le syndrome Klinefelter et ses variantes (47, XXY et mosaïques 46,XY/47,XXY) (**Figure 1**), tandis que les anomalies autosomiques structurelles (translocations et inversions) sont plus fréquentes chez les hommes oligozoospermie. Dans la majorité des cas, les altérations structurelles et numériques provoquent des défauts chromosomiques de la spermatogénèse via leur interférence avec la synapsis des chromosomes pendant la méiose (Sun et *al.*, 2007).

D'autres mécanismes pathogènes potentiels sont liés aux effets directs sur l'expression des gènes lorsque les gènes sont des cibles des réarrangements chromosomiques (tels que les points d'arrêt, duplications et suppressions) (Harewood & Fraser, 2014). Ces réarrangements pourraient supprimer des promoteurs ou interrompre des séquences de gènes impliqués dans la spermatogenèse.

1.2.1.1.1 Syndrome de Klinefelter

Le syndrome de Klinefelter a une fréquence de 1 sur 600 dans la population générale, alors que chez les patients atteints d'azoospermie non obstructive, la fréquence est plus élevée, 1

sur 7 (Punab et al. ;2018). Le diagnostic à l'âge adulte est principalement fait lors de l'évaluation de l'infertilité et/ou de la dysfonction sexuelle. Les investigations suggèrent qu'une dose supplémentaire de gènes liés à l'X et d'altérations épigénétiques sont susceptibles d'être impliqués dans cette maladie. Une analyse de sperme de patients atteints du syndrome de Klinefelter ou syndrome de Klinefelter en mosaïque évalué par fluorescence l'hybridation in situ (FISH) a montré des taux d'aneuploïdie allant de 2 % à 25 % et de 1,5 % à 7,0 %, respectivement (Shi et al., 2001).

1.2.1.1.2 Le syndrome du mâle 46, XX

Le syndrome du mâle 46, XX a une fréquence de 1 enfant sur 20 000 selon « Genetics Home Référence ». Les hommes atteints de ce syndrome peuvent se présenter avec des organes génitaux ambigus. Le transfert du gène *SRY* (Vorona et al., 2007) (Codant un facteur de transcription essentiel pour la différenciation de la gonade embryonnaire en testicules) sur le chromosome X est responsable de 80 à 90 % de ce syndrome. Le

SRY est situé en dessous la région pseudoautosomique (PAR) du bras court du chromosome Y, et la translocation erronée peut se produire pendant la méiose lorsque les deux chromosomes sexuels se recombinent entre leurs régions PAR (Bashamboo et al., 2016).

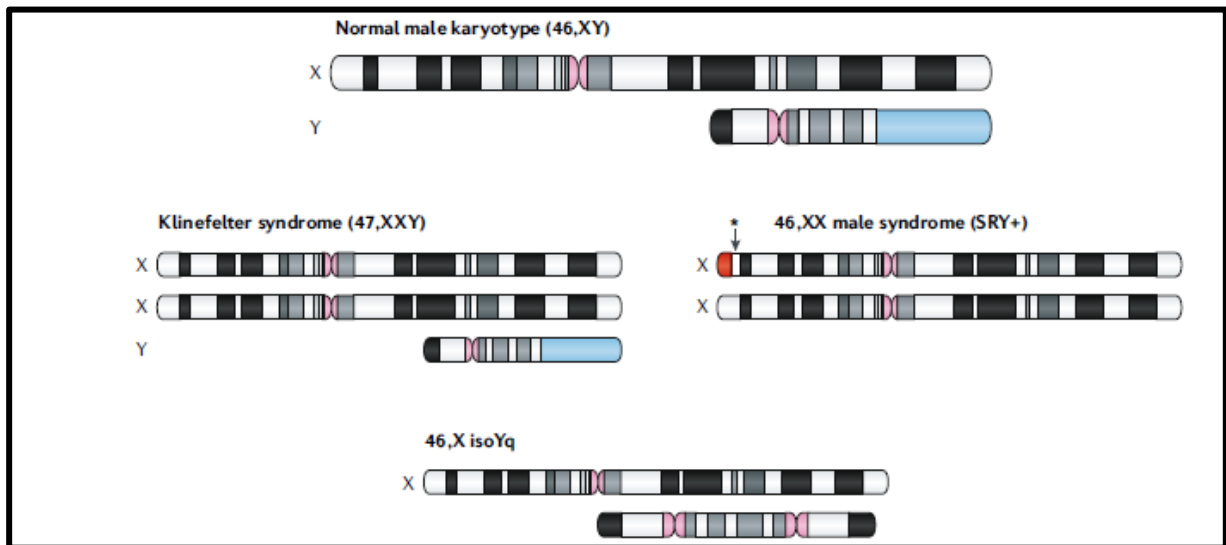


Figure 1 : Anomalies des chromosomes ; caryotype d'un homme normal (46,XY), avec syndrome de Klinefelter (47 ,XXY), avec syndrome du male 46,XX (SRY+) (* translocation du *SRY* sur le X chromosome se produit dans 80% des cas) et 46, XisoYq. Le rouge indique la région pseudoautosomique liée à l'X transloquée dans le chromosome Y. Le bleu indique la région hétérochromatique du chromosome Y. (Ramasamy et al. ; 2015)

1.2.1.2 Anomalies structurelles chromosomiques :

Certaines mutations génétiques associées à des syndromes pathologiques peuvent également être liées à l'infertilité. Par exemple, l'absence congénitale bilatérale du canal déférent conduit à une azoospermie obstructive et dans 80 à 90 % des cas, elle est causée par des mutations du gène régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique (CFTR) (Bobadilla et *al.*, 2002). La dyskinésie ciliaire primitive, également connue sous le nom de syndrome des cils immobiles, est une maladie génétique autosomique récessive résultant de la perte de la fonction ciliaire normale. La moitié de ses patients de sexe masculin sont infertiles en raison d'une asthénozoospermie (Liabers et *al.*, 2014). Les mutations génétiques les plus courantes incluent la Dynein, Axonemal, Heavy Chain 5 (DNAH5 – dans 15-28% des cas) et la Dynein, Axonemal, Intermediate Chain 1 (DNAI1 - dans 2-10% des cas) (Boon et *al.*, 2013). Un autre exemple d'une pathologie autosomique dominante est la Dystrophie myotonique de type 1 qui est causée par l'expansion des répétitions de trinuécléotides CTG dans le gène de la dystrophie myotonica-protéine kinase (DMPK).

1.2.1.3 Microdélétions du chromosome Y

Le rôle important que joue le chromosome Y dans la spermatogenèse a été établi par Tiepolo et Zuffardi lors de l'analyse du caryotype, lorsqu'ils ont détecté de grandes délétions du bras long du chromosome Y (Yq) chez six hommes atteints d'azoospermie (Tiepolo & Zuffardi, 1976). Ils ont nommé la région définie comme facteur d'azoospermie AZF. Initialement, trois régions AZF ont été définies : AZFa, AZFb et AZFc (facteurs d'azoospermie a, b et c). Ces régions se situent sur le bras long (Yq) à partir du centromère vers le télomère et ne se chevauchent pas (Vogt et *al.*, 1996). Cependant, des études ultérieures ont montré que AZFb et AZFc se chevauchent de 1,5 Mb (Repping et *al.*, 2003) (**figure 2**).

Les microdélétions dérivent de la recombinaison homologue de segments identiques au sein des séquences palindromiques. La prévalence des microdélétions Yq est de 9,7 % dans une population d'azoospermiques, tandis que chez les hommes avec oligozoospermie; la prévalence est de 6,0 %. Les sous-types de délétion les plus fréquents comprennent la région AZFc (~ 80%) suivie des régions AZFa (0,5-4%), AZFb (1-5%) et AZFb+c (1-3%) (Krausz et *al.*, 2014). Les délétions englobant l'AZFa complète produisant généralement le phénotype sévère du syndrome Sertoli cell-only (SCO) mais ceci est basé sur un nombre limité de cas à ce jour . Les délétions interstitielles ou terminales qui incluent AZFb et/ou AZF b+c sont médiés par une recombinaison entre des répétitions palindromiques : P5/proxP1, P5/distP1, ou P4/distP1. Ces délétions sont rares et entraînent généralement une azoospermie .La délétion partielle d'AZFb qui supprime tout le palindrome P4 diminue la maturation des spermatozoïdes et peut être transmise. Les délétions interstitielles communes ou terminales qui incluent uniquement AZFc sont médiées par une recombinaison entre les répétitions palindromiques b2/b4 et entraînent un

phénotype d'infertilité variable, allant d'azoospermie et SCO à oligozoospermie sévère ou légère (Repping et al, 2003).

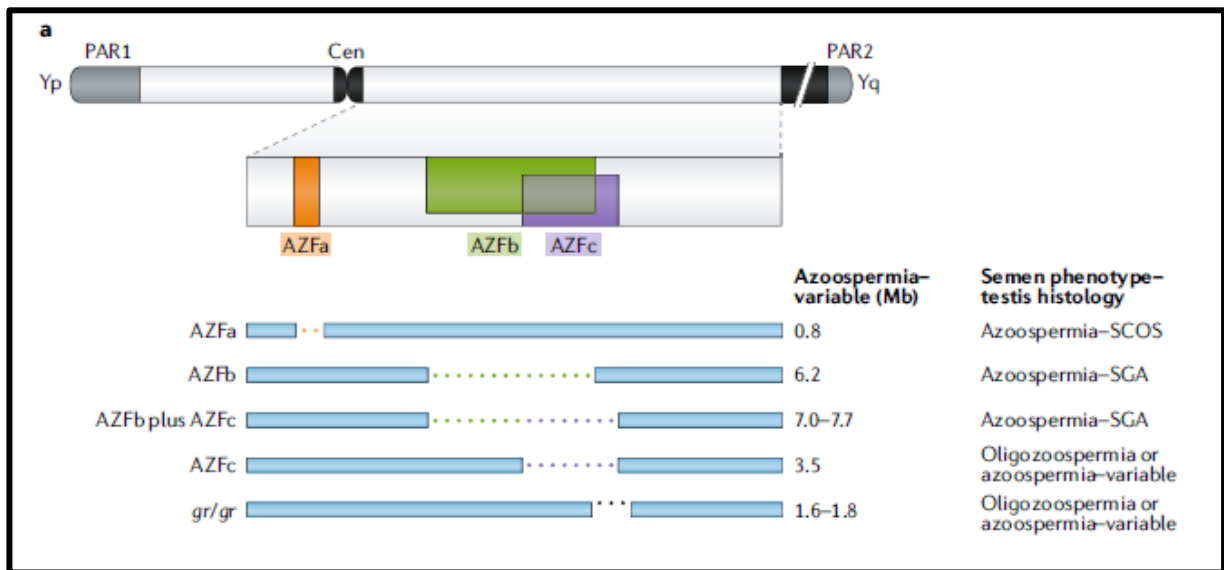


Figure 2 : les microdélétions du facteur d'azoospermie complète (AZF), une cause directe d'altération de la spermatogénèse, et la délétion gr/gr, un facteur de risque d'altération de la spermatogénèse (Krausz, 2011).

1.2.1.4 Causes monogéniques

Certaines mutations génétiques associées à des syndromes pathologiques peuvent également être liées à l'infertilité. Par exemple, l'absence congénitale bilatérale du canal déférent conduit à une azoospermie obstructive et dans 80 à 90 % des cas, elle est causée par des mutations du gène *régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique* (CFTR) (Bobadilla et al., 2002). La dyskinésie ciliaire primitive, également connue sous le nom de syndrome des cils immobiles, est une maladie génétique autosomique récessive résultant de la perte de la fonction ciliaire normale. La moitié de ses patients de sexe masculin sont infertiles en raison d'une asthénozoospermie (Liabers et al., 2014). Les mutations génétiques les plus courantes incluent la Dynein, Axonemal, Heavy Chain 5 (DNAH5 – dans 15-28% des cas) et la Dynein, Axonemal, Intermediate Chain 1 (DNAI1 - dans 2-10% des cas) (Boon et al., 2013). Un autre exemple d'une pathologie autosomique dominante est la Dystrophie myotonique de type 1 qui est causée par l'expansion des répétitions de trinuécléotides CTG dans le gène de la dystrophie myotonica-protéine kinase (DMPK).

1.2.1.5 Obstruction ou dysfonctionnement canalaire

L'obstruction ou le dysfonctionnement canalaire fait référence à toute interférence avec le système de transport des spermatozoïdes et peut se produire à différents niveaux dans le tractus. Ces modifications pourraient conduire à l'oligozoospermie ou à l'azoospermie et se caractérisent par une histologie testiculaire normale. La seule forme congénitale d'étiologie

génétiq ue connue est l'absence congénitale des déférents (CAVD) avec anatomie rénale normale, alors que les facteurs génétiques impliqués dans la CAVD avec agénésie rénale unilatérale restent inconnus.

1.2.1.6 Perturbations qualitatives de la spermatogenèse

Les altérations qualitatives peuvent concerner la morphologie des spermatozoïdes et/ou la motilité et les paramètres fonctionnels (l'intégrité de chromatine) et peuvent être induits par des facteurs congénitaux et acquis ; parmi ces phénotypes : la tératospermie qu'on va détailler par la suite.

1.2.1.7 Causes épigénétiques

Bien que les cellules possèdent le même génome, la différence entre elles résulte du modèle différentiel d'expression des gènes. L'expression différentielle des gènes est produite par la variabilité de la protéine associée à l'ADN et ses modifications (méthylation, déméthylation, acétylation et désacétylation). Ces modifications sont responsables d'une expression génique variable et font partie de l'épigénétique qui joue un rôle essentiel dans le développement et la fonction des spermatozoïdes, la fécondation et les événements post-fécondation. Lors de la spermatogenèse, les protéines de transition (TNP1 et TNP2) remplacent les histones, qui à leur tour sont remplacées par des protamines. Au cours de la substitution des histones aux protéines de transition, la queue des histones du noyau est hyperacétylée. Le modèle d'acétylation détermine le statut transcriptionnel d'un gène, l'hyperacétylation marquant le gène avec une activité transcriptionnelle élevée. Une légère anomalie de ce processus peut entraîner une dysgénésie des spermatozoïdes ou une aberration dans l'emballage de la chromatine dans les spermatozoïdes, conduisant à l'infertilité. Le rapport entre la protamine1 (P1) et la protamine2 (P2) agit comme un marqueur de la fertilité masculine. Chez les hommes fertiles normaux, ce rapport (P1/P2) est de 0,8 à 1,2. (Balhorn et *al.*, 1999). Tout écart par rapport à ce rapport indique une susceptibilité accrue aux dommages à l'ADN et une mauvaise qualité du sperme (Chevaillier et *al.*, 1987). La Phosphorylation et la déphosphorylation des protamines jouent également un rôle vital dans la fonction des spermatozoïdes. Des anomalies dans l'emballage de la protamine de l'ADN provoquent une expression génique aberrante entraînant soit une hypertranscription, soit un arrêt transcriptionnel, entraînant un échec de la spermatogenèse (Kleene & Patterns, 2003). Des études suggèrent que les spermatozoïdes transmettent une grande variété d'informations épigénétiques à l'ovocyte, qui a un rôle important dans les événements post-fécondation.

1.2.2 Causes non génétiques de l'infertilité masculine

L'infertilité masculine a de nombreuses autres causes non génétiques ; allant du déséquilibre hormonal jusqu'aux problèmes physiques, des perturbations du mode de vie, des

problèmes psychologiques et enfin des causes génétiques. Cependant, environ 40 % des hommes cherchant de l'aide dans une clinique d'infertilité, l'étiologie reste inconnue (Chianese et *al.*, 2014), l'infertilité dans ce cas est classée comme idiopathique. Les causes connues de l'infertilité masculine peuvent être regroupées en cinq catégories principales : Hormonales (Babu et *al.*, 2004), Physiques (Senanayake, 2008), Coïtal (Hamada et *al.*, 2012), environnement et mode de vie (Mendiola et *al.*, 2008).

2 Exploration de l'infertilité masculine

2.1 Analyse du sperme : Spermogramme et spermocytogramme

Le spermogramme et le spermocytogramme constituent les examens clés pour l'exploration de l'infertilité masculine qui permettent d'apprécier les caractéristiques du sperme. Ces examens fournissent différentes informations sur le volume de l'éjaculat, le nombre de spermatozoïdes, la mobilité et la morphologie de spermatozoïdes.

2.1.1 Le Spermogramme standard (OMS, 2010) (Tableau 1)

- **Le volume**

Il renseigne sur le fonctionnement du système glandulaire :

-Un faible volume (hypospermie) < 1,5 ml peut traduire un hypogonadisme, une testostérone plasmatique basse ou une agénésie vésiculaire.

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

- **Le pH**

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

- Un pH acide < 7,2 évoque une insuffisance ou une absence de sécrétions vésiculaires

- Un pH basique > 7,8 évoque une insuffisance prostatique (prostatite chronique).

- **La numération des spermatozoïdes :**

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

- Une azoospermie ou l'absence totale de spermatozoïdes ou (0 / ml) : peut être d'origine obstructive

(obstruction des voies séminales) ou non obstructive (absence de production par les testicules).

- Une oligospermie ou oligozoospermie ou nombre de spermatozoïdes < 15 millions par ml ou.

Le seuil de fécondité est de 5 millions par ml.

- **La mobilité :**

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

- **La vitalité :**

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

3 La teratozoospermie

3.1 Définition

La tératozoospermie, comme définis précédemment, est une altération du sperme dans laquelle un grand nombre de spermatozoïdes ont une morphologie anormale avec moins de 4% de spermatozoïdes morphologiquement normaux. Ces anomalies peuvent toucher la tête, la pièce médiane, ou le flagelle.

Une spermatogenèse défectueuse, une augmentation de la fragmentation de l'ADN, une incidence accrue d'aberrations chromosomiques structurales, une chromatine immature et aneuploïdie (OMS, 2010) ainsi que certaines pathologies épipidymaires sont couramment associée à une proportion accrue de spermatozoïdes de forme anormale. Les défauts morphologiques sont généralement mixtes. Les spermatozoïdes anormaux ont généralement un potentiel fertilisant plus faible.

3.2 Types de défauts de morphologie du sperme tératospermique (anomalies de la tête, de la partie médiane et du flagelle).

Selon les critères définis par Kruger TF et al, un spermatozoïde normal a des dimensions spécifiques avec une configuration de tête ovale présentant une forme lisse et aucun défaut dans la pièce médiane et la queue (Kruger et *al.*, 1986). Il n'y a pas assez d'informations dans la littérature sur les types de défauts dans la morphologie des spermatozoïdes. Des exemples de tératozoospermie couramment observées comprennent la globozoospermie (sperme à tête ronde dépourvu d'acrosome), la macrocéphalie (sperme à grosse tête), les spermatozoïdes à deux têtes ou à deux queues, une pièce médiane courbée ou la présence d'une gouttelette cytoplasmique

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

Valeurs normales selon l'OMS-2010		Définitions de l'anomalie	
Volume du sperme : > 1,5 ml (1,4 - 1,7) < 1,5 ml :		Hypospermie	
Numération des spermatozoïdes (par ml): > 15 millions/ml (12 - 16)		0: Azoospermie	
Numération des spermatozoïdes (par éjaculat): > 39 millions (33 - 46)		< 15 millions/ml : Oligozoospermie	
Mobilité des spermatozoïdes à la première heure après l'éjaculation. - Grade (a) : mobilité en trajet fléchissant rapide (>25 µm/s) - Grade (b) : mobilité lente et progressive (5-25 µm/s). - Grade (c) : mobilité sur place. - Grade (d) = immobile	Mobilité progressive de type (a+b) des spermatozoïdes : > 32 % (31 à 34) (ou > 30 %)	<32%	Asthénospermie
	- Mobilité de type (a+b+c) des spermatozoïdes : > 40 % (38 - 42)	< 40 %	
Mobilité à la quatrième heure après l'éjaculation	Chute de mobilité inférieure à 50 % comparativement aux chiffres de la première heure	Chute de mobilité supérieure à 50%	
Morphologie normale des spermatozoïdes : >30 % > 4 % (3,0 - 4,0) (se rapproche de la classification Kruger) Ou : > 15 % (selon la classification de David modifiée par Auger et Eustache).		< 4 %: Tératospermie	
Leucocytes < 1 million/ml		> 1 million/ml : Leucospermie	
Vitalité des spermatozoïdes : > 58 % (55 - 63)		<58 %: Nécrosospermie	
-D'autres valeurs normales (consensus) : o pH : > 7,2 o MAR test (anticorps anti spermatozoïdes de type IgA, IgG, IgM fixés sur les spermatozoïdes) : < 50 %. o Immunobead test (motile spermatozoa with bound particules) (ou spermatozoïde mobile avec anticorps antispermatozoïde) : < 50 % o Peroxidase-positive leukocytes : < (1,0) million/ml). o Fructose séminal : > (13) µmol/éjaculat o Phosphatase acide séminale : > 200 U/éjaculat. o Acide citrique séminal : > 52 µmol/éjaculat. o Zinc séminal : > (2,4) µmol/ejaculat o Seminal neutral glucosidase : > (20) mU/éjaculat o L-carnitine séminale : 0.8-2.9 µmol/éjaculat			

3.3 Causes générales de la tératospermie :

Les causes de la tératozoospermie ne sont pas encore tout à fait claires pour la communauté scientifique. Cependant, certaines études suggèrent que les facteurs suivants peuvent jouer un rôle dans le développement des spermatozoïdes présentant une morphologie anormale :

- Mode de vie.
- Infections du sperme.
- Médicaments pharmaceutiques qui interagissent avec les niveaux de testostérone, de FSH et de GnRH.
- Traumatisme ou autres problèmes testiculaires.
- Varicocèle.
- Méningite.
- Diabète sucré.
- Forte fièvre.
- Abus d'alcool et de drogues.

3.4 Génétique et bases moléculaire de la tératospermie

A ce jour, plusieurs gènes ont été identifiés dans la plupart de ces tératozoospermies spécifiques chez l'humain. L'identification et l'étude de ces gènes ont permis de mieux comprendre la physiopathologie de la tératozoospermie dans le but d'améliorer la prise en charge des patients, et développer des solutions thérapeutiques adaptées aux défaut génétique et fournir un conseil génétique adéquat .

3.4.1 Macrozoospermie

La macrozoospermie, également connue sous le nom de spermatozoïdes à grosse tête, est une cause rare de l'infertilité observée dans moins de 1 % des cas (Nistal et al .,1977). Ce phénotype est caractérisé par la présence d'une majorité de spermatozoïdes multiflagellaires à grosse tête dans l'éjaculat. Les spermatozoïdes à grosse tête ont un contenu en ADN génomique anormal et sont soit diploïdes, triploïdes ou tétraploïdes (Perrin et al., 2008) . Ces constatations suggéraient que les deux divisions méiotiques étaient probablement affectées par une ségrégation incomplète des chromosomes homologues pendant la méiose I et les chromatides sœurs pendant la méiose II. Cette altération de la ségrégation est suivie d'un échec du clivage nucléaire et de la cytokinèse. De plus, il était montré que le très petit nombre de spermatozoïdes à tête de taille normale trouvés dans l'éjaculat de certains patients macrozoospermiques présentent également un taux élevé d'aneuploïdie, démontrant que la

morphologie de la tête des spermatozoïdes n'était pas corrélée avec le contenu chromosomique des macrozoospermies (Guthauser et *al.*, 2005). De plus, des études de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes ont révélé un niveau élevé de spermatozoïdes apoptotiques chez les hommes macrozoospermiques par rapport à celui des témoins (Brahem, 2012).

3.4.1.1 Le gène *AURKC* (AURAURA kinase C)

Le gène *AURKC* est situé au 19q13,3-qter. Il a sept exons et est fortement exprimé dans les cellules germinales masculines. À ce jour, c'est le seul gène responsable de la macrozoospermie chez l'homme et les deux mutations récurrentes c.114delC et p.Y248 représentent presque toutes les mutations *AURKC* identifiées. Le taux élevé d'aneuploïdie et de fragmentation de l'ADN, en plus d'autres anomalies des paramètres spermatiques des patients macrozoospermiques sont les principales causes d'infertilité. Les chercheurs ont identifié chez 14 individus macrozoospermiques une délétion homozygote d'une seule paire de bases dans le gène *AURKC* (c.144delC ; p.Leu49TrpfsTer23), et cela, dans tous les cas étudiés (Dieterich et *al.*, 2007) (**Figure 3**).

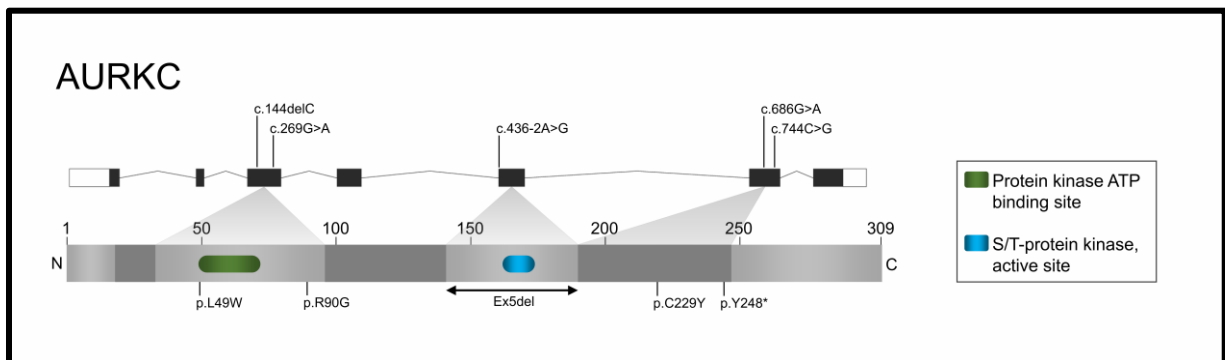


Figure 3 : Localisation des mutations *AURKC*, les exons sont indiqués par une boîte noire, la région non traduite comme boîte claire et la localisation des mutations ponctuelles lignes verticales. L'étendue des délétions génomiques identifiées lignes avec flèches. (Ben Khelifa et *al.* ; 2012)

La protéine codée est un membre de la sous-famille Aurora des protéines kinases à sérine/thréonine. Le génome humain contient trois Aurora kinases : *AURKA*, *AURKB* et *AURKC* qui partagent une structure et activité kinase similaires, mais présentent un profil d'expression cellulaire et une localisation subcellulaire distincte. La protéine *AURKA* est active au niveau des centrosomes et des microtubules fusiformes dans les cellules mitotiques, alors que les protéines *AURKB* et *AURKC* sont toutes deux des composantes de l'ADN

chromosomique complexe de passagers (CPC) (Slattery et al., 2008). Le CPC est impliqué dans la liaison des chromosomes à kinétochores et joue ainsi un rôle important lors de la division cellulaire pour assurer un bon alignement et ségrégation des chromosomes et activation du point de contrôle de l'assemblage du fuseau (**Figure 4**).

Contrairement aux cellules mitotiques qui nécessitent uniquement AURKA et AURKB, les cellules germinales ont également besoin de la protéine AURKC pour assurer une méiose efficace (Quartuccio & Schindler, 2015). La perturbation du CPC dans les cellules en culture donne lieu aux erreurs de ségrégation chromosomique et à l'échec de la cytokinèse. Par conséquent, la perte de fonction des mutations d'AURKC, la composante catalytique du CPC dans les cellules germinales méiotiques, pourraient conduire à une méiose altérée et à une macrozoospermie

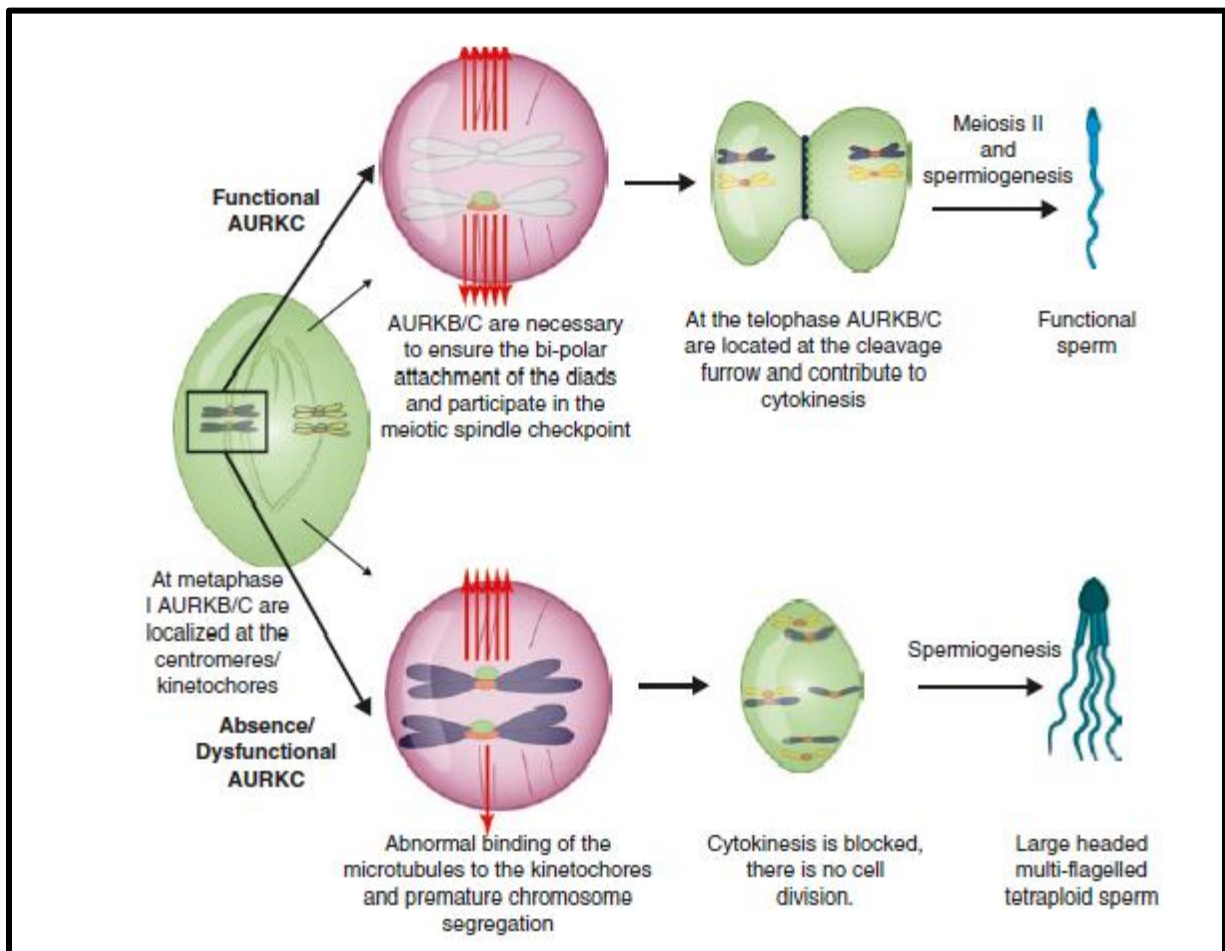


Figure 4: AURKC contrôle la méiose et la cytokinèse des spermatocytes (Dieterich et al. ; 2007)

3.4.2 Globozoospermie

Décrit pour la première fois chez l'homme en 1971, la globozoospermie est une forme rare (incidence 0,1 %) et sévère de tératozoospermie caractérisé par la présence dans l'éjaculat d'une grande majorité de spermatozoïdes ronds avec le manque d'acrosome (Dam et *al.*, 2007) (Figure 5).

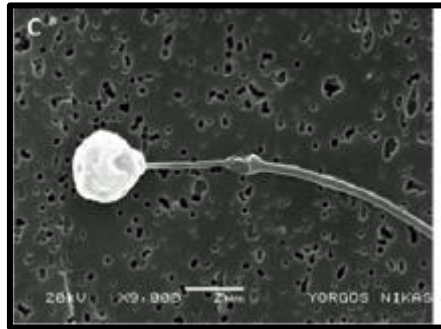


Figure 5 : Analyse par microscopie électronique de spermatozoïdes globozoospermique typique d'un patient déficient de DPY19L2 qui présente une tête arrondie, un acrosome absent ou atrophié et une absence de mitochondries dans la pièce intermédiaire (Sun et al. ;1997)

Les spermatozoïdes globozoospermiques sont incapables d'adhérer ou pénétrer dans la zone pellucide, provoquant une infertilité primaire. Ce phénotype présente deux formes :

globozoospermie « totale » : se référant aux patients avec un phénotype homogène avec ~ 100 % de spermatozoïdes à tête ronde, et **globozoospermie « partielle »**, caractérisée par une mosaïque de spermatozoïdes normaux et à tête ronde dans l'éjaculat même si aucun seuil précis n'a été clairement établi. Cependant, étant donné que les spermatozoïdes globozoospermiques peuvent être trouvés avec une proportion allant jusqu'à 9 % dans la population générale fertile (Auger et al., 2016), la globozoospermie est en pratique diagnostiquée par analyse de sperme lorsqu'un minimum de 20 % à 50 % de spermatozoïdes à tête ronde est trouvé dans l'éjaculat (Oud et al., 2020). Une augmentation du taux d'aneuploïdie ainsi que des dommages à l'ADN sont liés à la qualité de la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN par rapport aux spermatozoïdes normaux (Yassin et al. ; 2015). L'exploration génétique de la globozoospermie décrit une longue liste de gènes candidats. Cependant, actuellement, seuls cinq gènes sont en toute confiance associés à la globozoospermie chez l'humain : SPATA16, DPY19L2, PICK1, ZBP1 et CCDC62.

3.4.2.1 Le gène SPATA 16 (Spermatogenesis-associated protein 16)

La protéine 16 associée à la spermatogenèse est une protéine fortement exprimée dans le testicule humain. Elle est située dans l'appareil de Golgi et dans des vésicules pro-acrosomales qui fusionnent pour former l'acrosome au cours de la spermiogénèse et sa fonction est impliquée dans le maintien de l'intégrité de l'acrosome spermatique (Dam et al., 2007) (**Figure 6**).

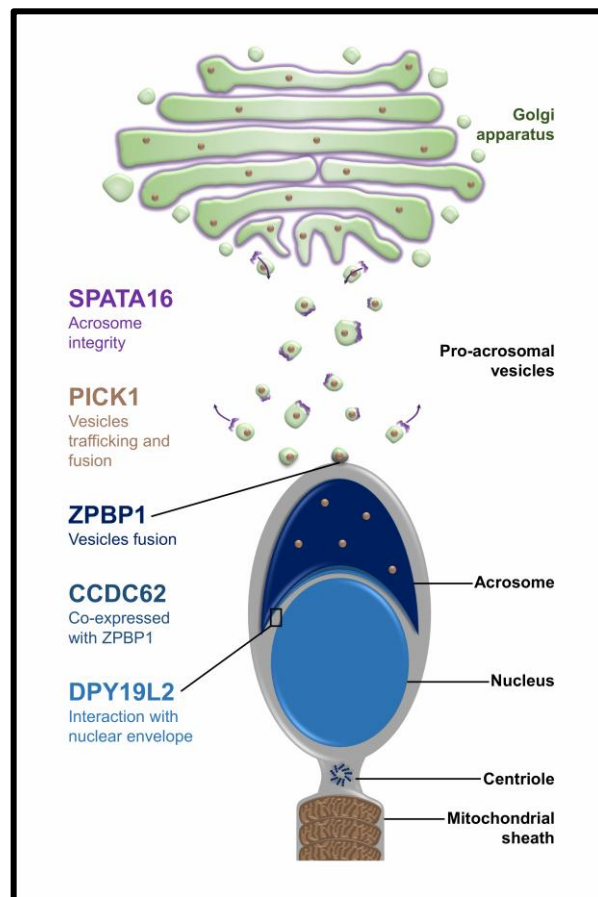


Figure 6 : Etapes de la biogenèse de l'acrosome :le traitement des protéines au sein du réticulum endoplasmique, trafic de vésicules depuis l'appareil de Golgi, fusion des vésicules, intégrité de l'acrosome, interaction des membranes acrosomique et nucléaire avec l'acroplaxome et le maintien de l'intégrité de la matrice acrosomique. (Alvarez et *al.* ; 2012)

SPATA16 était le premier gène responsable de la globozoospermie humaine en 2007. Une mutation homozygote (c.848G>A, p.R283Q) donnant des protéines connues impliquées dans la biogenèse des acrosomes dont l'absence fonctionnelle conduit à la globozoospermie. La protéine SPATA16 a été identifiée chez trois frères atteints issus d'une famille consanguine (Dam et *al.*, 2007) et cette variante induit le saut du quatrième exon qui provoque une perturbation du tétratricopeptide C-terminal domaine répété (domaine TPR) de SPATA16 .

En plus de la globozoospermie totale, cette nouvelle mutation a conduit à 39 % des spermatozoïdes à têtes doubles ou multiples, 26 % des spermatozoïdes à flagelles multiples, un taux élevé d'aneuploïdie (6 % chez les patients mutés SPATA16 contre 2,38 % chez les témoins) avec une fragmentation accrue de l'ADN spermatique (44 % chez les patients mutés par SPATA16 contre 10,25 % chez les témoins) (Ghedir et *al.*,2019). Les mutations de SPATA16 peuvent ainsi perturber le domaine TPR, désorganiser de nombreuses interactions protéine-protéine, et conduisent à une méiose anormale, ce qui pourrait expliquer ce phénotype particulier de la globozoospermie totale. Dans l'ensemble, des mutations SPATA16 ont été trouvées dans 0,77% des cas de globozoospermie en Europe et en Afrique du Nord suggérant que les mutations de SPATA16 sont une cause récurrente mais rare de globozoospermie chez l'homme (ElInati et *al.*,2016)

3.4.2.2 Le gène DPY19L2

Dans les spermatozoïdes, la protéine DPY19L2 est située dans la membrane nucléaire et ancre l'acrosome en développement à l'enveloppe nucléaire par une plaque cytosquelettique appelée acroplaxome (**Figure 06**). En 2011, une délétion du gène entier de DPY19L2 a été signalée dans 15 des 20 patients globozoospermiques. En effet, dans les spermatozoïdes de patients mutés, la membrane nucléaire interne est déstabilisée puis séparée de la membrane nucléaire externe, conduisant au détachement complet de l'acrosome. De plus, il a été montré que d'autres protéines nucléaires, telles que les protéines SUN, exprimaient au cours de la spermatogenèse, ont été impliquées dans la formation de la tête des spermatozoïdes. Une fois stabilisé à l'intérieure membrane nucléaire des spermatozoïdes, les protéines SUN enrôlent KASH (Klarsicht, ANC-1, Syne Homologie) (Pasch et *al.*, 2015) situées dans la membrane nucléaire externe, formant ainsi le LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton), un complexe liant les deux enveloppes nucléaires, assurant le maintien de la rigidité et de l'ancrage de la membrane nucléaire à la structure cytoplasmique à travers le domaine cytoplasmique des protéines KASH. DPY19L2 a également un grand domaine intranucléaire N-terminal, qui peut se lier en même temps à la lame dense nucléaire. Une étude récente utilisant l'hybridation in situ par fluorescence (FISH) a démontré que les déficiences en DPY19L2 chez les patients globozoospermiques présentent une organisation altérée du chromocentre du sperme et une organisation spatiale altérée des chromosomes 7, 18 et X (Abdelhedi et *al.*, 2019). Concernant les altérations génétiques de DPY19L2 causant la globozoospermie, la délétion homozygote de 200 kb est l'événement le plus fréquemment

rapporté dans la variable des proportions allant en moyenne de 19 % à 75 % des patients globozoospermiques et plusieurs mutations ponctuelles et de petites délétions ont ensuite été décrites comme causales (Alimohammadi et *al.*, 2020)

3.4.3 Spermatozoïdes acéphales

Les hommes infertiles touchés par le syndrome des spermatozoïdes acéphales (SSA) présentent un éjaculat contenant majoritairement des spermatozoïdes acéphales associés à quelques spermatozoïdes sans flagelles. Le SAA était auparavant connu sous le nom de syndrome des spermatozoïdes à tête d'épingle parce que la rétention de la gouttelette cytoplasmique a été confondue avec une tête de petite taille Zaneveld & Polakoski, 1977).

3.4.3.1 Le gène SUN5

La protéine SUN5 est un membre des protéines des domaines SUN, situés sur le chromosome 20 et elle est spécifiquement exprimée dans les cellules germinales mâles en développement (Frohnert et al., 2011). L'apparition des spermatozoïdes acéphales au cours de la spermiogénèse est causée par des anomalies de développement de la pièce intermédiaire. Très récemment, il a été l'identification de 17 bi-mutations alléliques dans le gène SUN5 (Sad1 et UNC84 contenant 5 domaines) trouvées chez 22 patients parmi 60 patients. Les protéines du complexe SUN sont des protéines transmembranaires interagissent directement avec les protéines des domaines KASH pour former des complexes LINC entre la membrane nucléaire externe et interne afin de relier le noyau à la cellule cytosquelette et les souris mâles KO pour SUN, sont totalement stériles (Tzur et al., 2003). La plupart des mutations identifiées étaient localisées au domaine SUN (**Figure 5**) induisent un codon stop prématuré dans l'ARNm et une protéine SUN5 tronquée, perturbant ainsi l'interaction avec ses partenaires (Shang et al., 2017).

3.4.3.2 Le gène *PMFBP1* (polyamine modulated factor 1 binding protein 1)

Des études sur des patients infertiles atteints d'acéphalie de spermatozoïdes ont identifié 10 mutations bi-alléliques dans le gène spécifique des testicules *PMFBP1* (polyamine modulated factor 1 binding protein 1) chez huit individus (Liu et al., 2020). Ces études ont mis en évidence le rôle de *PMFBP1* dans la fixation de la pièce intermédiaire à l'enveloppe nucléaire et ainsi de maintenir l'intégrité de la tête et de la queue du sperme. La production de souris mâles KO a confirmé le phénotype d'infertilité avec production de spermatozoïdes

acéphales avec une gaine mitochondriale et microtubules anormaux de l'axonème (Zhu et al., 2018).

3.5 Les caractéristiques d'un spermogramme chez les individus avec tératozoospermie

La méthode de David pour le classement des anomalies morphologiques des spermatozoïdes humains a été proposée en 1972. Elle comporte en dehors des spermatozoïdes morphologiquement normaux :

-7 anomalies de la tête : têtes allongées, amincies, microcéphales, macrocéphales, multiples, présentant un acrosome anormal ou absent, présentant une base (région postacrosomique) anormale.

- 3 anomalies de la pièce intermédiaire (PI) : reste cytoplasmique, PI grêle, PI angulée.

- 5 anomalies de la pièce principale : absente, écourtée, de calibre irrégulier, enroulée et Multiple.

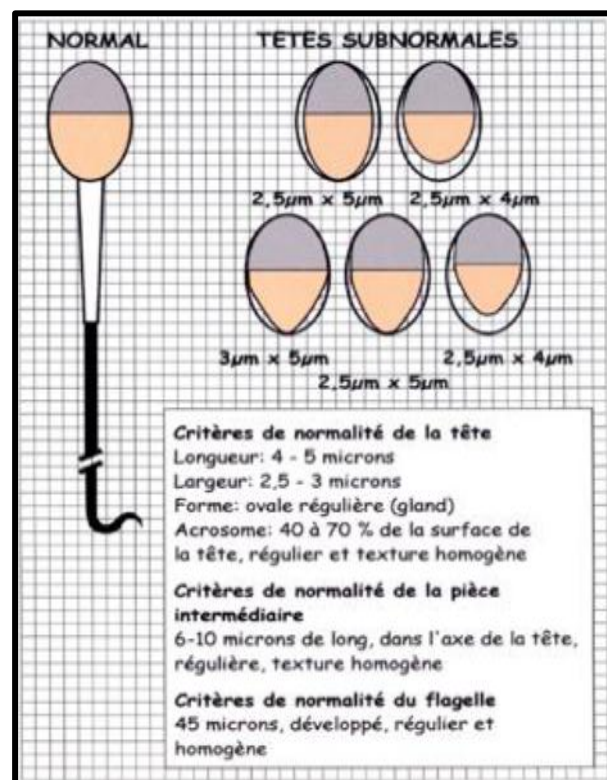


Figure 7 : Illustrations du spermatozoïde humain normal ou subnormal, considéré comme normal, et rappels des définitions (Auger & Eustache, 2000).

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

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

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

Macrocéphale: Le grand axe et le petit axe sont plus grands que la normale Normale (**figure 8**).



Figure 08 : Anomalies de taille de la tête des spermatozoïdes humains (Auger et Eustache, 2000).

Têtes multiples : Il y a plus d'une tête par spermatozoïde. Elles peuvent être accolé et occupe une surface totale similaire à celle d'une seule tête ou bien être parfaitement dissociées .

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

Anomalies de la base de la tête ou région post-acrosomique : Toutes les anomalies de contour et de texture de la région post-acrosomique. (**Figure 9**).

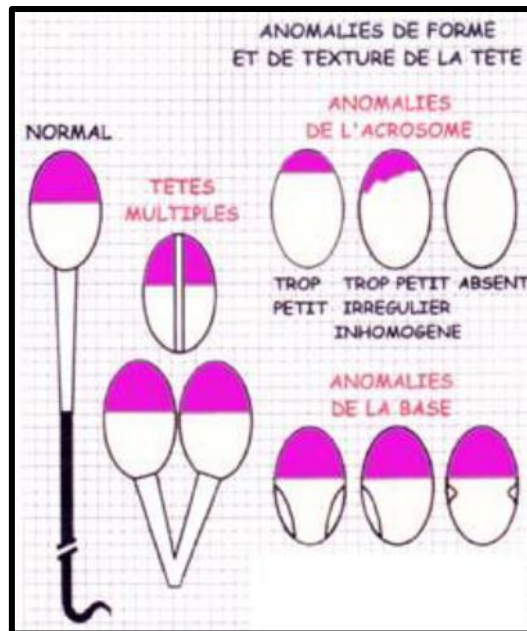


Figure 9 : Anomalies de taille de la tête des spermatozoïdes humains (Auger et Eustache, 2000).

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

Pièce intermédiaire grêle: le diamètre de la pièce intermédiaire est égal ou inférieur au diamètre de la pièce principale dans sa partie initiale. Cette anomalie correspond à une gaine mitochondriale qui ne s'est pas constituée (Figure 10)

Angulations du flagelle : l'axe de la pièce intermédiaire et l'axe de la tête ou l'axe de la pièce principale forment un angle net ou encore le flagelle n'est pas implanté dans l'axe de la tête. Les angulations sont bien visibles en microscopie électronique. Elles se présentent sous la forme d'une plicature à la jonction de la pièce intermédiaire et de la pièce principale ou plus loin sur le flagelle et régulièrement les structures axonémales et périaxonémales en regard sont désorganisées (**Figure 10**).

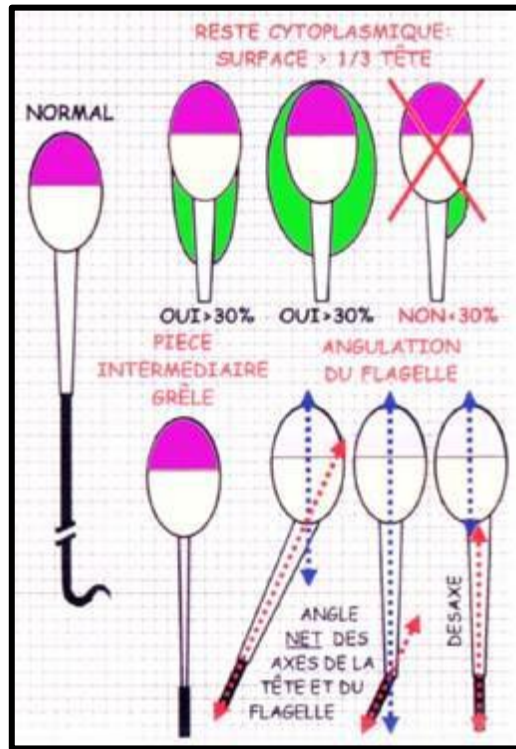


Figure 10 : Anomalies de forme et de texture de la tête des spermatozoïdes humains (Auger et Eustache, 2000).

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

Flagelle court : le flagelle est significativement écourté (<5 fois la longueur de la tête) et on observe le plus souvent des flagelles courts et épaissis avec une prolifération des éléments composant la gaine fibreuse. Ces flagelles ne sont pas fonctionnels (**figure 11**)

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

Flagelle enroulé : Le flagelle est enroulé autour de la tête ou en dehors de la tête, on observe sur les coupes transversales de flagelle, on observe des désorganisations de la disposition circulaire stricte des différents éléments de l'axonème et du périaxonème dont certains manquent.

Flagelles multiples : il y a plus d'un flagelle par spermatozoïde, la pièce intermédiaire étant commune ou multiple. En microscopie électronique à transmission, on observe des têtes spermatiques bien isolées avec deux (et plus) plaques basales et deux (et plus) pièces connectives (**Figure 11**) (Ounis, 2015).

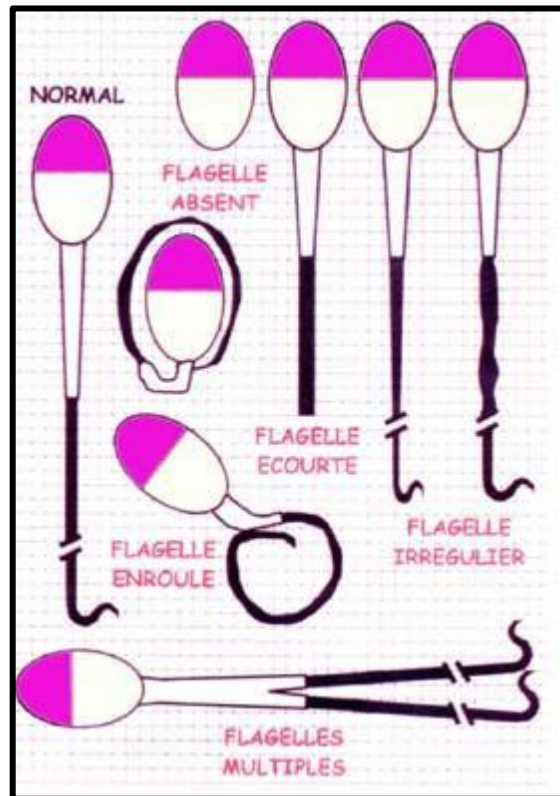


Figure 11 : Anomalies du flagelle des spermatozoïdes humains (Auger et Eustache,2000).

4 La Fragmentation de l'ADN spermatique et infertilité masculine

4.1 Structure de la chromatine spermatique

L'emballage de l'ADN dans des cellules somatiques est un processus efficace pour que le génome paternel soit protégé de la dégradation pendant le transit dans les organes génitaux masculins et féminins. Afin de livrer un génome paternel « sûr » à l'ovocyte, les spermatozoïdes compactent leur ADN d'environ dix fois par rapport à une cellule somatique (**Figure 12**). Un tel niveau de compactage est atteint au cours de la spermatogenèse par le remplacement de la plupart des histones du sperme avec des protéines riches en arginine et en cystéine appelées protamines (Ward.,2010).

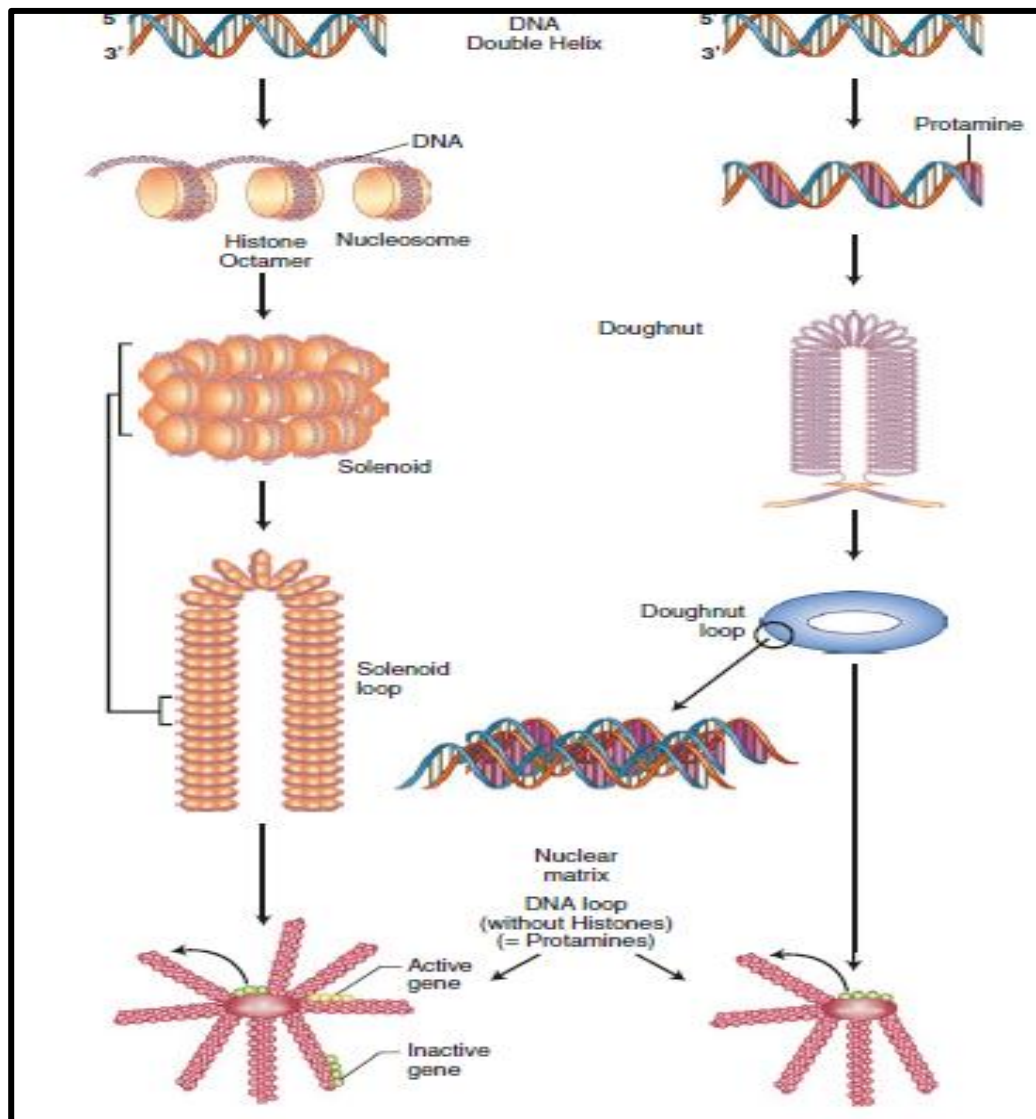


Figure 12 : Représentation schématique de la structure de l'ADN dans les cellules somatiques (gauche) et les spermatozoïdes (droite) (Ward, 2018)

Le remodelage de la chromatine est un processus graduel qui commence par l'incorporation de variantes d'histones, puis se produit l'hyperacétylation des histones, facilitant ainsi le désassemblage des nucléosomes et le remplacement des histones, dans un premier temps, par des protéines nucléaires de transition (TP) et, enfin, par des protamines (Oliva & Mezquita, 1986) (**Figure 13**).

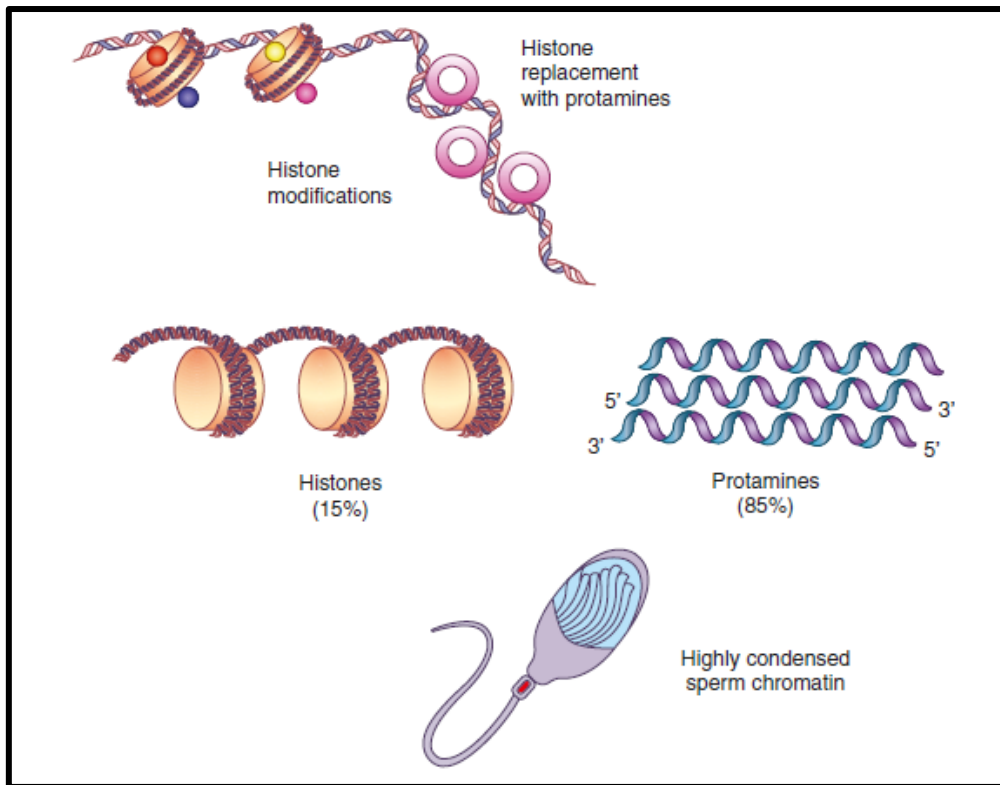


Figure 13 : Remplacement des histones par les protamines dans les spermatozoïdes humains (Ward, 2018)

Afin de faciliter la transition histone-protamine, les variantes d'histones s'expriment de façon différente à fois dans le temps et dans l'espace au cours du développement des cellules germinales . De plus, les histones subissent des modifications post-traductionnelles telles que l'ubiquitination, l'acétylation, la méthylation et phosphorylation) à l'extrémité amino-terminale qui interviennent dans la modulation de leur activité. En particulier, les histones H2A, H2B et H4 sont acétylées dans les cellules pré-méiotiques (spermatogones et spermatocytes primaires) et sous-acétylées pendant la méiose (spermatocytes secondaires) et dans la plupart des spermatides ronds. Les histones deviennent hyperacétylée dans les dernières phases de la spermiogenèse (spermatides allongées) afin de favoriser la condensation de la chromatine (Govin et *al.*, 2004). Chez l'homme, le rapport P1/P2 est d'environ 0,9-1,0, et il est strictement réglementé du fait de son importance pour l'état de fécondité. Les histones et les protamines ont des fonctions spécifiques et différentes au cours du processus de reproduction. En effet, les protamines sont consacrées à protéger le génome paternel comme démontrée également par la résistance de l'ADN des spermatozoïdes aux agressions mécaniques (Kuretake et *al.*,1996).

4.2 Origines de la fragmentation de l'ADN spermatique

La fragmentation de l'ADN ou un ADN cassé est un processus physiologique qui survient pendant la maturation des spermatozoïdes (Sakkas et al. , 1999). La topoisomérase a été considéré comme un élément principale qui permet l'accès à la structure hyper enroulée de l'ADN (Laberge & Boissonneault, 2005). Les topoisomérases de type II sont impliquées dans plusieurs processus, y compris la réplication de l'ADN, la transcription, la séparation des chromatides, et la condensation des chromosomes. Elles modifient la topologie de l'ADN par des coupures double-brin et sa nouvelle ligature ultérieure .Chez l'homme, il y a deux isoformes de la topoisomérase : topoisomérase II α et topoisomérase II β . Il a été montré que l'hyperacétylation des histones H3 et H4 était une condition préalable pour que la topoisomérase II β cause les cassures double brin de l'ADN (Laberge& Boissonneault, 2005a). L'hyperacétylation des histones diminue l'affinité des histones à l'ADN permettant de retirer les nucléosomes et ainsi de relâcher l'ADN superenroulé .

L'intégrité de l'ADN spermatique peut être affectée tout au long de la différenciation depuis les spermatogonies jusqu'aux spermatozoïdes matures. Dans un éjaculat, il subsiste toujours quelques spermatozoïdes présentant un ADN fragmenté. Mais pour diverses raisons, il est possible d'avoir un taux anormalement élevé de spermatozoïdes avec un ADN fragmenté. La fragmentation de l'ADN peut se faire pendant le processus de production ou bien lors du transport des spermatozoïdes. Plusieurs mécanismes responsables de la fragmentation de l'ADN sont proposés : le défaut de la compaction de l'ADN spermatique, l'apoptose abortive pendant la spermatogenèse, les substances oxygénées réactives (SOR) et des facteurs environnementaux (pesticides, tabac, toxique. . .)

4.2.1 Défaut du remodelage de la chromatine spermatique

Les altérations du remodelage de la chromatine pendant la spermiogénèse peuvent provoquer une fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes éjaculés. La compaction de la chromatine spermatique nécessite des activités endonucléasiques afin de créer et ligaturer des cassures dans le but de faciliter la protamination. Les altérations dans le contrôle de ce processus peuvent causer des anomalies du remodelage de la chromatine et des cassures de l'ADN non réparées persistant dans les gamètes matures (Sakkas et al. ;1999). Le ratio incorrect des protamines peut provoquer une diminution de la quantité de protamines liées à l'ADN, par conséquent, un nombre trop faible de ponts disulfures rend la chromatine

spermatique moins bien protégée. Une chromatine moins protégée et des cassures endogènes non réparées rendent les spermatozoïdes plus susceptibles aux attaques post-testiculaires.

4.2.2 Substances oxygénées réactives (SOR)

Les substances oxygénées réactives sont des agents oxydants dont le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion super oxyde (O_2^-) et des radicaux libres. Ils peuvent se combiner avec d'autres molécules provoquant directement l'oxydation qui induit des changements de la structure et de la fonction cellulaire. La production des SOR est un processus physiologique normal, mais le déséquilibre entre la génération des SOR et leur activité peut être nuisible pour les spermatozoïdes et être associé à l'infertilité masculine. Il a été démontré qu'une faible dose de stress oxydatif peut avoir des effets bénéfiques comme stimuler la fusion du spermatozoïde avec l'ovocyte et réguler la capacitation des spermatozoïdes et la réaction acrosomiale (Agarwal et al. 2015). Pourtant, avec un stress oxydatif plus important, la chromatine spermatique commence à être fragmentée avec une perte de la capacité de fécondation des spermatozoïdes .

De plus, les défauts lors du remodelage de la chromatine donnent aux spermatozoïdes une susceptibilité accrue aux attaques par des SOR. Ensuite, à leur tour, les SOR vont attaquer la chromatine spermatique, qui n'est pas bien protégée à cause d'un mauvais remodelage, et vont induire la formation de bases oxygénées (8OHdG), ce qui résulte en des cassures de l'ADN (Aitken et al. 2016). **(Figure 14)**

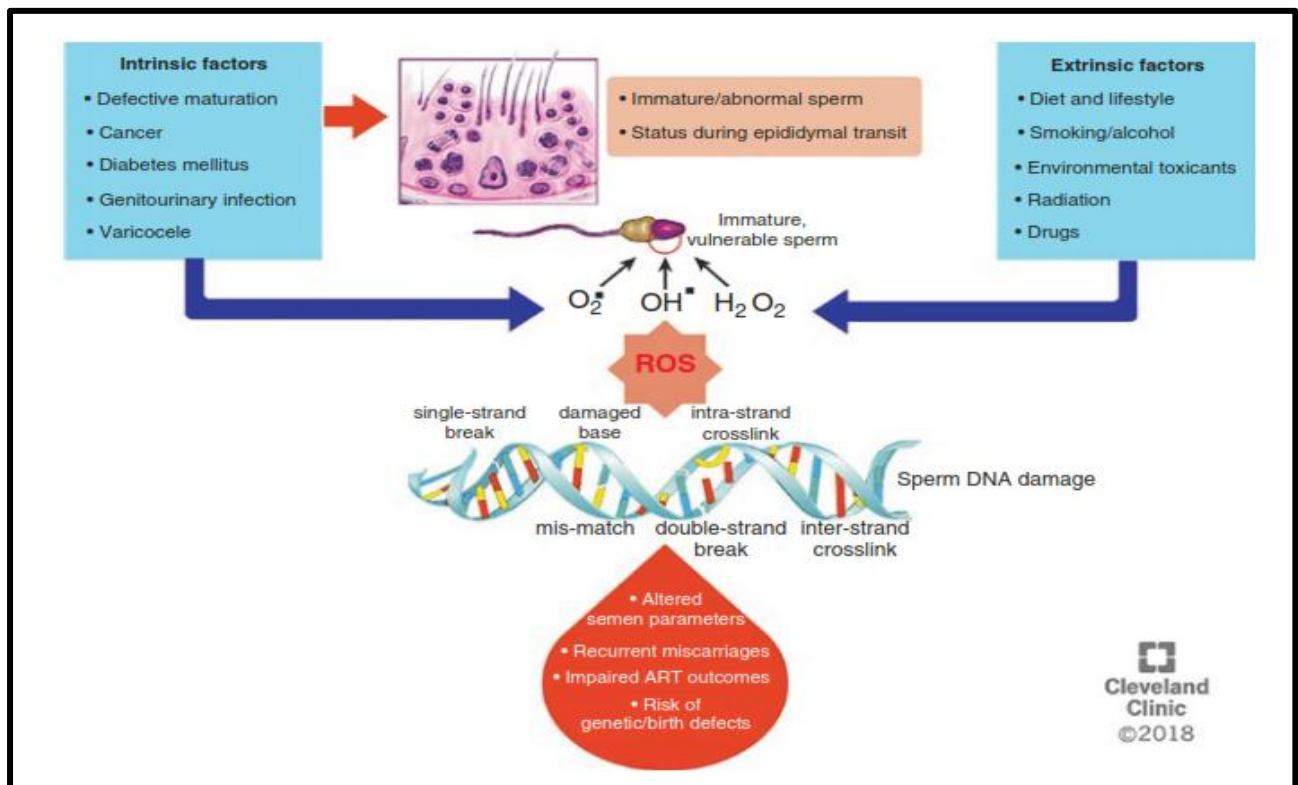


Figure 14 : Espèces réactives de l'oxygène produites par des facteurs intrinsèques et externes et leur impact sur l'ADN du sperme pour perturber son intégrité affectant les résultats de la reproduction (Aitken et al. 2016).

4.2.3 L'apoptose

L'homéostasie cellulaire

L'homéostasie cellulaire est régulée par le développement et la différenciation des cellules mais également par la mort cellulaire programmée appelée "apoptose". L'apoptose est indispensable lors d'une spermatogenèse fonctionnelle. Dans le testicule, les cellules germinales se multiplient via des séries de mitoses avant la différenciation pour former les spermatozoïdes matures. Par conséquent, environ 50-70% de cellules germinales subissent l'apoptose aux différents stades de la spermatogenèse (Billig et al, 1995). L'apoptose abortive pourrait être liée au défaut de remodelage du cytoplasme lors de la spermatogenèse (Sakkas et al, 2002). (Figure15).

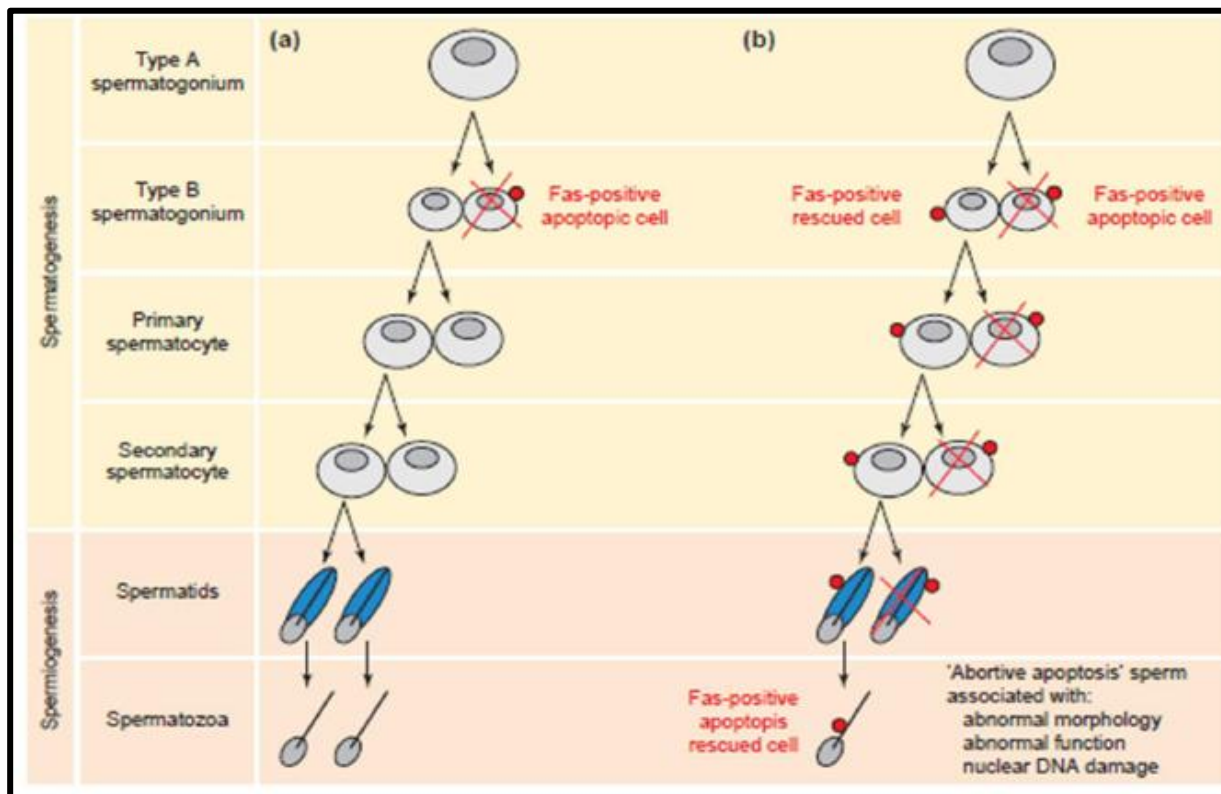


Figure 15 : Rôle de Fas pendant la spermatogenèse chez l’homme avec des paramètres spermatiques normaux et anormaux (oligozoospermie, asthénozoospermie et tératozoospermie) (selon Sakkas *et al.* 1999b).

D’ailleurs, d’autres intervenants de la voie apoptotique sont des caspases enzymatiques. Les caspases 8 et 9 sont activées via Fas-Fas ligant dans la membrane interne de la mitochondrie. Ils transmettent un signal à leur effecteur comme la caspase 3 ce qui active les DNases résultant en la dégradation de l’ADN spermatique et l’apoptose. La corrélation entre le taux de la fragmentation de l’ADN et les caspases apoptotiques (caspases 3, 8, 9) a été démontrée dans l’éjaculat des hommes infertiles suggérant que l’apoptose serait un phénomène dépendant des caspases (Brugnon et al,2010).

4.2.4 Autres facteurs

Il est évident que le cancer et le traitement du cancer affectent négativement la fertilité masculine. Les agents alkylants ainsi que les radiations anticancéreuses peuvent induire des cassures de l’ADN simple brin (Bujan et al. 2013). En fait, la spermatogenèse est réduite par le traitement. Les spermatogonies sont affectées par les agents cytotoxiques en induisant des dommages de l’ADN. Les toxiques environnementaux comme les pesticides, la pollution de l’air, les métaux lourds affectent aussi l’intégrité de la chromatine spermatique (Sakkas et al., 2010).

4.3 Evaluation de la fragmentation de l'ADN dans les gamètes mâles

Une multitude de tests ont été développés pour évaluer la fragmentation de l'ADN spermatique (SDF). Ces tests mesurent directement ou indirectement l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes.

4.3.1 La coloration en bleu de toluidine

Ce test colore la structure nucléaire endommagée de la chromatine des spermatozoïdes et le degré d'endommagement est visualisé par microscopie optique. Les têtes des spermatozoïdes avec une intégrité élevée de l'ADN de la chromatine sont colorées en bleu et l'ADN endommagé est coloré en violet. C'est un dosage simple et rapide (Pourmansum et al. ; 2019)

4.3.2 La coloration CMA3 (Chromomycine A3)

La chromomycine A3 est un fluorochrome spécifique pour les séquences riches en G-C et se lie avec l'ADN aux mêmes sites que les protamines. Ainsi, l'intensité du CMA3 indique le degré de la protamination (Shamsi et al. 2011).

4.3.3 Le test Comet

Le test de COMET (aussi appelé Single Cell Gel Electrophoresis Assay) est une technique d'électrophorèse sur microgel d'agarose permettant de détecter et quantifier la détérioration de l'ADN dans des spermatozoïdes individualisés. Les cassures simples ou doubles brins peuvent être détectées ainsi que les sites de réparation incomplets. L'équipe de Singh a modifié avec succès cette technique qui été initialement appliquée seulement sur les cellules somatiques pour l'adapter aux spermatozoïdes (Singh et al. 1998). L'ADN intact apparaît comme une sphère, au contraire, l'ADN cassé s'étire proportionnellement au nombre de cassures et forme l'aspect d'une comète (d'où le nom de la technique)

4.3.4 Dosage TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labelling)

Le principe de ce test est basé sur la présence des extrémités 3'-OH libres lorsque l'ADN est fragmenté. Une enzyme TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) qui est capable d'ajouter des UTP à ces extrémités 3'-OH, est ajoutée. Ces UTP sont couplés à la digoxygénine qui va être capturée par les anticorps anti-digoxygénine. Ces derniers sont

couplés à un fluorochrome qui permet l'observation au microscope à fluorescence. La fragmentation de l'ADN spermatique détectée par TUNEL est associée à la morphologie anormale des spermatozoïdes (Brahem et al. 2009).

4.3.5 Test SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay)

Le test SCSA est basé sur la dénaturation de l'ADN avec un tampon acide ou avec de la chaleur au sein des sites de cassures simple ou double brin, tandis que l'ADN double brin normal reste intact. Par la suite, la chromatine spermatique est colorée avec de l'acridine orange qui va colorer de manière différentielle l'ADN double et simple brin. Sous l'excitation de la lumière bleue en cytométrie en flux, l'ADN intact (double brin) émet une fluorescence verte, tandis que l'ADN cassé (simple brin) émet une fluorescence rouge.

4.3.6 Le test SCD (Sperm DNA Dispersion)

Plusieurs techniques ont été appliquées pour analyser la fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes, Ces procédures sont toutes utiles et fiables lorsqu'elles sont correctement exécutées. Néanmoins, ils sont relativement complexes à réaliser de façon routinière car ils sont difficiles à mise en œuvre, longue, techniquement exigeante, relativement coûteuse et nécessitant un personnel qualifié. Dans de nombreux cas, les échantillons de sperme doivent être livrés hors site vers un centre spécialisé pour y être traité. Par conséquent, la plupart de ces procédures ne sont pas idéales pour être effectuées en routine dans le laboratoire d'analyse de sperme conventionnel. Le test de dispersion de la chromatine du sperme (SCD) surmonte certaines de ces limitations, offrant une procédure conviviale qui est rentable et facile à mener pour l'évaluation de routine du SDF.

4.3.6.1 Etapes de la SCD

Le test SCD est composé de trois étapes principales :

4.3.6.1.1 Enrobage des spermatozoïdes dans une matrice de microgel inerte :

les spermatozoïdes indigènes non fixés sont immergés dans une matrice d'agarose sur une lame de microscope, qui fournit un substrat inerte semblable à une suspension pour manipuler les cellules

4.3.6.1.2 Incubation dans un acide et une solution de lyse spécifique à l'espèce :

Les cellules sont incubées dans une solution de déroulement d'ADN acide suivie par une solution de lyse. La solution acide est un dénaturant doux de l'ADN, qui "fond" la double hélice d'ADN uniquement lorsqu'elle contient une rupture massive d'ADN. Ces Les cassures

d'ADN se comportent comme des points de départ de dénaturation qui se déplacent ensuite le long de l'hélice d'ADN (Ahnström, 1998). Si la molécule d'ADN du sperme est massivement brisée, la majeure partie du génome sera dénaturée, tandis que l'ADN non fragmenté restera intact. Ceci dit, des dénaturants plus forts peuvent également affecter l'ADN non-fragmentés du sperme; par conséquent, une incubation précise avec la solution acide pour une durée précise permet une meilleure discrimination entre les deux.

Deuxièmement, les spermatozoïdes sont immergés dans une solution de lyse spécifique pour éliminer les protéines nucléaires, en particulier les protamines. Ces protéines hautement basiques emballent fortement les boucles d'ADN ensemble dans le noyau du sperme. L'élimination de la protamine entraîne la propagation des boucles d'ADN dans le microgel environnant, dans un phénomène semblable à ce que se produit dans le noyau des cellules somatiques après l'élimination des histones (Cook & Brazell, 1978) ces noyaux déprotéinés sont appelés nucléoïdes, les boucles dispersées constituant un halo périphérique d'ADN-chromatine émergeant d'un noyau central ou résiduel. Par conséquent, les nucléoïdes des spermatozoïdes sans ADN fragmenté (c'est-à-dire sans dénaturation significative de l'ADN par le traitement acide précédent) montrent de grands halos d'ADN dispersé. A l'inverse, lorsque la lyse est effectuée sur des nucléoïdes de spermatozoïdes avec un ADN brisé massivement, susceptible de dénaturation, la dispersion de l'ADN dans le microgel n'est pas observé ou n'apparaît que dans une mesure limitée ; ces nucléoïdes donc apparaissent sans halo ou ne possèdent qu'un très petit halo. Ce comportement particulier est probablement lié à la structure caractéristique de la chromatine du sperme.

4.3.6.1.3 Visualisation par la coloration

Enfin, après un bref lavage et déshydratation dans des bains d'éthanol croissants, les nucléoïdes sont colorés pour la visualisation sous microscopie à fond clair en utilisant la Coloration de Wright ou Diff-Quik (**Figure 16.a**). Alternativement, ils peuvent également être observés en utilisant le microscope à fluorescence après coloration avec tout fluorochrome d'ADN approprié (**Figure 16.b**). Parfois, certains nucléoïdes sans halos peuvent également apparaître légèrement ou irrégulièrement taché; ces nucléoïdes révélés par le test SCD sont désignés comme « dégradés » et sont associés à des dommages nucléaires plus graves affectant à la fois l'ADN et la matrice protéique. Les spermatozoïdes à ADN fragmenté donc correspondent à ceux avec un petit halo, pas de halo, ou dégradés.

La visualisation microscopique de ces différentes catégories de nucléotides est facile à différencier (**Figures. 16 et 17**). Un élément important du test SCD est que la solution de lyse

spécifique à l'espèce préserve également la morphologie de la queue du sperme qui peut être colorée avec le colorant à fond clair ou en utilisant des fluorochromes pour des protéines comme le 2,7-dibrom-4-hydroxymercury- fluorescéine (Santiso, 2007). En utilisant ces fluorochromes, la queue ou toute protéine résiduelle dans le noyau sera fluorescent en vert, tandis que le nucléoïde peut être contrasté en rouge ou fluorescence bleue utilisant GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA) ou 4',6-diamidino- 2-phénylindole (DAPI), respectivement. La visualisation de la queue aide à distinguer les spermatozoïdes des autres types de cellules présentés dans l'éjaculat.

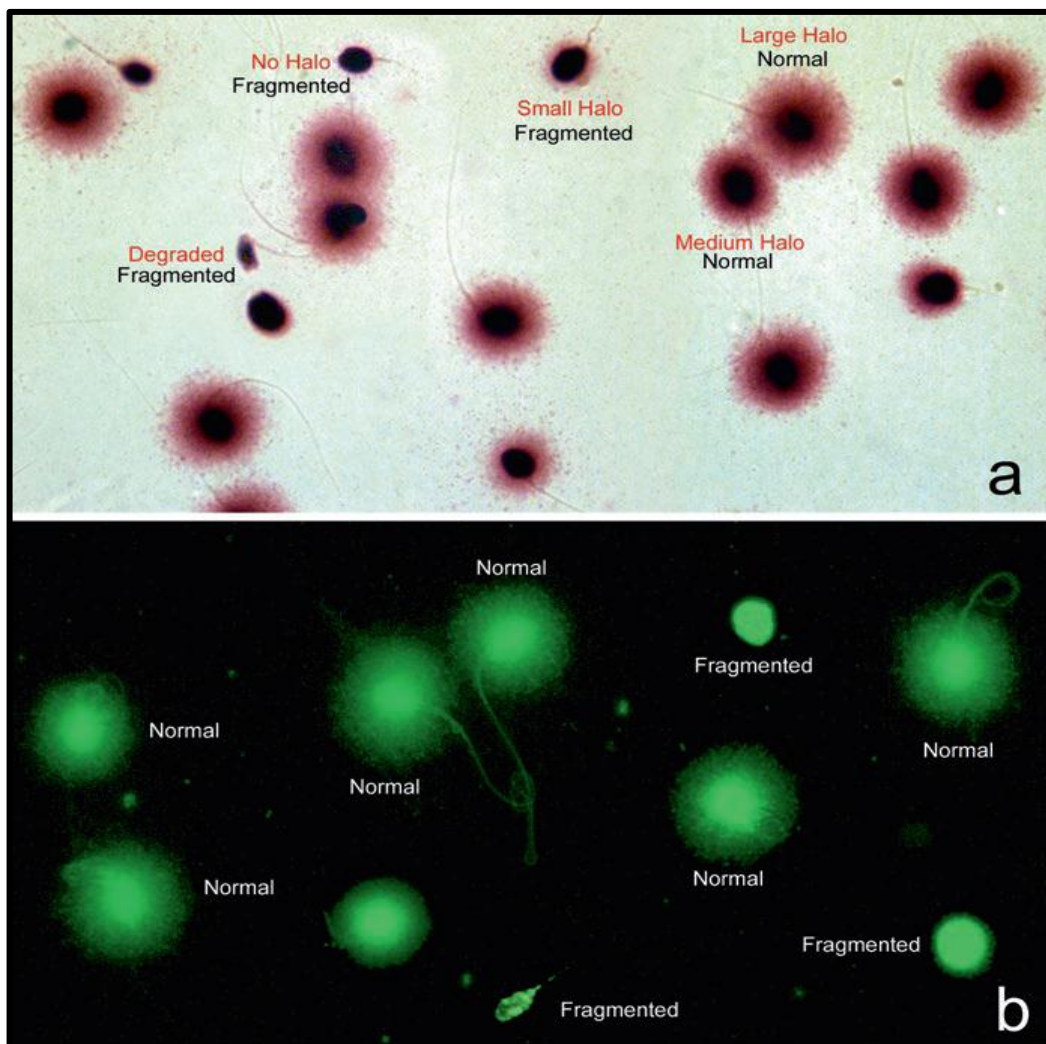


Figure 16. Images en fond clair (a) et au microscope à fluorescence (b) de spermatozoïdes humains traités par le test SCD. Les spermatozoïdes présentant des halos de dispersion de chromatine de grande et moyenne taille contiennent ADN, tandis que ceux qui présentent de petits ou pas de halos portent un ADN fragmenté. Les spermatozoïdes dégradés ont un ADN fragmenté, ne montrant aucun halo et une tache irrégulière ou faible du noyau.

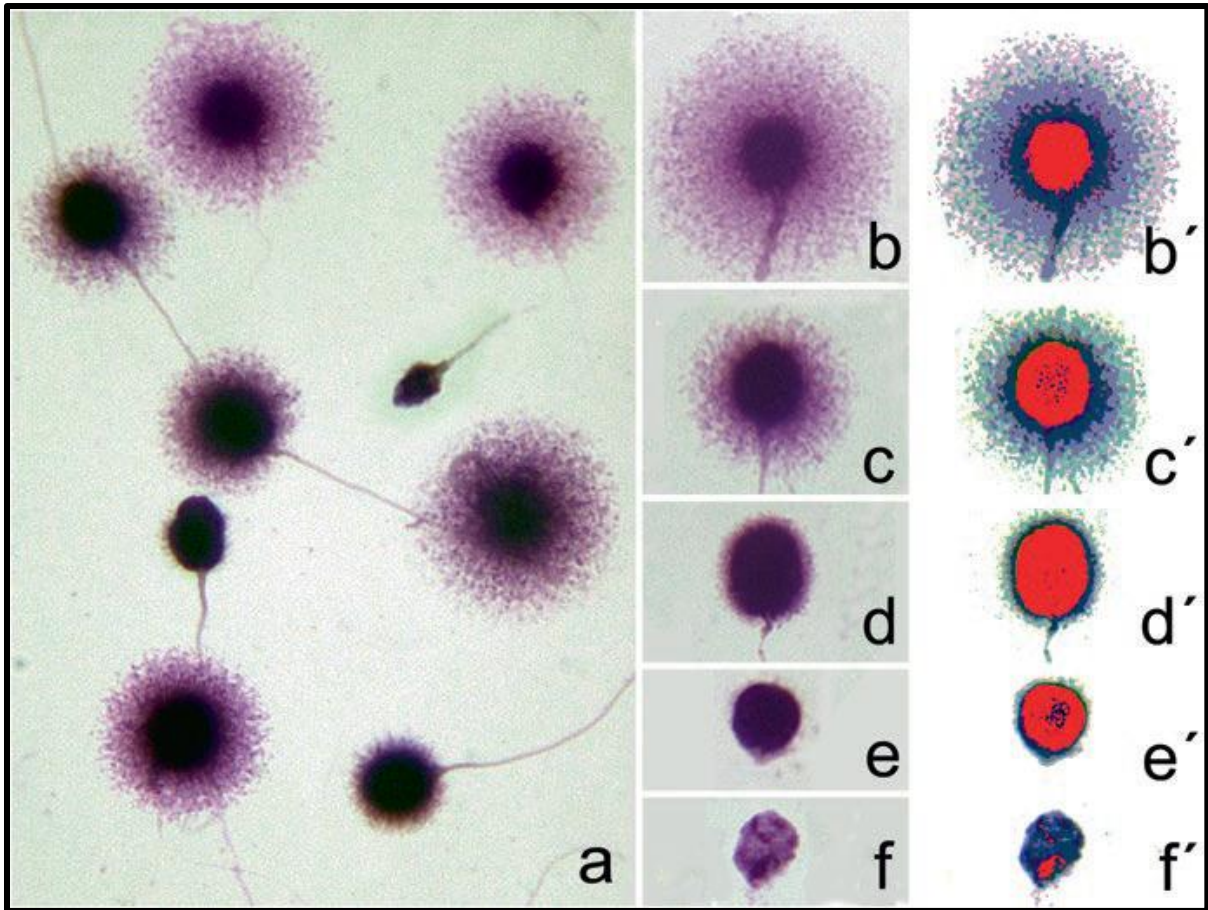


Figure 17 Sperme humain traité par le test SCD et visualisé au microscope à fond clair(a). Sperme représentatif avec un grand halo (b), un halo de taille moyenne (c), un petit halo (d), pas de halo(e) et dégradé (f). (b'–f') Filtrage électronique pour améliorer les domaines du halo (bleu) et du noyau (rouge)

Chapitre II

Matériel et méthodes

1 Matériel biologique

1.1 Origine du sperme utilisé

Trois échantillons de sperme d'hommes venant consultés au centre médical d'aide à la procréation - clinique Rotaby - d'Alger pour des problèmes de fertilité et dont les examens affirment une tératospermie sont recrutés. Un échantillon normal, ne présentant aucun problème de fertilité a été pris comme témoin expérimental. Après la réalisation du spermogramme et spermocytogramme (**Annexe1**), une fraction du sperme a été utilisée pour notre technique ; le test de la fragmentation d'ADN spermatique a été fait par la technique de SCD (Sperm Chromatin Dispersion).

1.2 Origine du sang utilisé pour la préparation des sondes fluorescentes (préparées au sein du laboratoire)

Le prélèvement du sang a été fait au niveau du laboratoire d'analyses médicales El FARABI de Constantine sur un homme volontaire ne présentant aucune maladie afin d'extraire son ADN et procéder aux tests de la préparation des sondes fluorescentes utilisées pour la FISH. Nous avons veillé à la confidentialité des prélèvements, chaque échantillon était anonyme, raison pour laquelle nous n'avons pas demandé de consentement des patients.

2 Méthodologie de travail

2.1 Méthode du test SCD

2.1.1 Préparation des échantillons spermatiques

Dans la mesure du possible, le recueil du sperme se fera au laboratoire. Le laboratoire dispose d'une salle prévue à cet effet avec :

- le respect du délai d'abstinence (L'OMS propose un délai d'abstinence jusqu'à 5 jours).
- La miction avant recueil (boire les 2 - 3 jours précédents).
- Le nettoyage des mains et des ongles, séchage des mains avec une serviette papier à usage unique.
- La toilette intime avec savon liquide ou une solution antiseptique et rinçage abondant à l'eau.
- Le recueil par masturbation dans un récipient stérile à col large.
- Le sperme frais est lavé dans une solution de PBS (Phosphat Saline Buffer) (**Annexe 2**) pour éliminer le liquide interstitielle et les cellules épithéliales comme suit :

- Ajouter un volume de sperme pour deux volumes de PBS et bien mélanger
- Centrifuger à 300 g pendant 5 min
- Reprendre le culot dans 2 ml de PBS
- Centrifuger à 300 g pendant 5 min
- Reprendre le culot dans 100 µl de PBS
- Déposer 25 µl au centre d'une lame et laisser sécher à l'abri de la poussière
- Éliminer le surnageant et conserver le culot.
- Selon la concentration de l'échantillon du sperme et si elle est supérieure à $5 \cdot 10^6$, nous déposons moins de 25 µl ; si la concentration est plus faible, nous déposons plus afin de travailler sur des lames riches en spermatozoïdes.

2.1.2 Le test SCD

Avant de procéder au test SCD, il est important de vérifier sous microscope la présence des spermatozoïdes fixés sur la lame. En l'absence de spermatozoïdes, il faut reprendre à zéro les différentes étapes.

- Déposer avec une pipette pasteur la solution de dénaturation (0.05 M HCL) et laisser agir 07 minutes à l'abri de la lumière, sous une hôte. On égoutte la lame par la suite ou on l'inclinant. Ensuite, et de la même manière que le premier traitement, recouvrir la surface des lames par la solution de lyse (**Annexe 2**) et on laisse agir pendant 10 minutes
- Rincer les lames on l'incubant dans de l'eau distillée durant 5 min, l'en égoutte par la suite on l'inclinant.
- Déshydrater les lames 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.
- Placer la lame horizontalement dans une boîte de pétri pour la coloration. Quelques gouttes de la solution de l'éosine sont déposées sur la surface de la lame à l'aide d'une pipette pasteur, laisser pendant 5 min et égoutter la lame on l'inclinant.
- Appliquer la solution du bleu d'aniline par la suite de la même manière que le premier colorant et laisser agir 5 min sous une hôte puis égoutter la lame on l'inclinant.
- Laisser sécher les lames à température ambiante.
- Observer les lames au microscope optique à un grossissement (20 x) et effectuer la lecture sur 500 spermatozoïdes dans des champs différents. Calculer enfin les pourcentages de spermatozoïdes fragmentés et ceux non fragmenté.

2.1.3 Etablissement du taux de DFI (DNA Fragmentation Index)

L'indice de fragmentation de l'ADN spermatique (DFI) reflète l'intégrité et les dommages du matériel génétique du sperme, détectant ainsi les dommages potentiels aux spermatozoïdes. Il est considéré comme un indicateur crucial dans l'évaluation de la qualité du sperme.

$$DFI = \frac{\text{Spermatozoïdes fragmentés}}{\text{le nombre total de spermatozoïdes lus}} \times 100$$

Un DFI \leq 30%, l'ADN spermatique est considéré comme non fragmenté

Un DFI $>$ 30%, l'ADN spermatique est considéré comme fragmenté.

2.2 Hybridations FISH sur sperme des sondes commerciales

Dans le but d'évaluer le taux d'aneuploïdie chez nos patients, nous avons réalisé la FISH en utilisant des sondes commerciales qui ciblent les chromosomes : 13, 18, 21, X ainsi qu'une FISH sur la lame témoin avec des sondes commerciales qui ciblent les chromosomes X et Y.

Les sondes commerciales utilisées sont :

-La sonde de triple couleurs **SPEC 13/CEN 18/SPEC 21** de « **ZytoLight** » qui cible respectivement les séquences spécifiques du chromosome humain 13q12.11 en couleur verte, ainsi que la séquence de 18p11.1-q11.1 particulière pour la région centromérique alpha satellite D18Z1 du chromosome 18 qui la marque en couleur bleue et des séquences spécifiques du chromosome humain 21q22.13-q22.2 en couleur rouge-orange

-la sonde double couleur **CEN X/Yq12** de « **ZytoLight** » qui cible une séquence de Xp11.1-q11.1 particulière pour la région centromérique alpha-satellite DXZ1 du chromosome X qui la marque en orange et la séquence Yq12 chez l'homme particulière pour la région centromérique des satellites classiques III DYZ1 du chromosome Y et la marque en couleur verte.

La technique FISH a été réalisée selon les étapes suivantes :

2.2.1 Décondensation de la tête du sperme

Afin de rendre la chromatine du sperme accessible aux sondes d'ADN, les lames ont été incubées dans du NaOH (1M) à température ambiante pendant 1 minutes, puis dans

2XSSC pendant 2 minutes , lavé à l'eau distillé pendant 05 minutes .Ensuite, les lames ont été déshydratées par une série de bains d'éthanol de 70% ,90% ,100% respectivement pendant 02 minutes chacun et séchées à l'air libre .

2.2.2 Hybridation des sondes

Cinq µl de sondes ont été ajoutées sur les lames et dénaturées simultanément à 72°C pendant 03 minutes dans le système d'hybridation « **Dako StatSpin** ». Par la suite, elles ont été recouvertes d'une lamelle 20mm x 20mm et scellés. Les lames sont retirées délicatement et placées dans une chambre sombre, hermétique et humide pour favoriser l'hybridation dans un incubateur à 37°C pendant une nuit.

2.2.3 Lavage post hybridation

Tous les lavages post-hybridation ont été effectués dans l'obscurité. Les lamelles sont retirées délicatement et les lames sont immergées dans un jar contenant du 0,4 X SSC pendant 01 minute dans un bain mari à 72C° puis plongées dans un jar contenant du (2XSSC,0,1% Tween 20) pendant 02 minute à température ambiante avec agitation de temps en temps et laisser sécher à l'air libre. Par la suite, les lames ont été contre-colorés avec du 4',6-diamidino2-pheneylindole (DAPI) et conservées à l'obscurité à 4°C avant d'effectuer une observation microscopique.

2.2.4 Enumération et analyse des lames par microscope à fluorescence

Les lames ont été examinées avec un microscope à fluorescence « **Laïca DM 6000 B** ». Au total, 100 spermatozoïdes ont été évalués par échantillon. Le comptage de spots fluorescents indique la présence du nombre de chromosomes présents par spermatozoïde.

3 Méthode de Préparation des sondes fluorescentes préparées au laboratoire

Dans le but de déterminer le taux d'aneuploïdie des chromosomes 13, 18,21, X et Y est augmenter la taille de notre échantillon et nous affranchir des sondes FISH commerciales très onéreuses, nous avons procédé à la fabrication de sondes fluorescentes par amplification PCR de régions centromériques conservées (monomère alphoïdes spécifiques) de chacun des, 13, 18, 21, X et Y.

L'ADN alpha satellite (alpoïdes) est une famille spécifique de séquences répétées inversées présentes dans les régions centromériques de tous les chromosomes humains (Manuelidis 1978). L'unité de base est une répétition de monomère d'environ 170 pb. En plus de régions fortement conservées parmi les différents chromosomes, ce monomère contient également des régions variables, les blocs de monomères consécutifs comprennent une plus grande répétition qui peut atteindre une taille de plusieurs kilobases. Des unités multimères répétées d'ordre supérieur spécifique ont été décrites pour la plupart des chromosomes humains (Willard & Waye 1987a). Les sondes que nous aurons préparé par amplification PCR seront utilisé en FISH sur sperme et les contrôler par des sondes commerciales.

3.1 Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique a été extrait à partir du sang total humain frais selon la méthode de ([Wajhul et al.,2017](#)) en suivant ces étapes :

3.1.1 Lyse et élimination des globules rouges (RBC)

Dans un tube à centrifuger de 15 ml, 2 ml de sang ont été prélevés et 8 ml de solution de lyse de RBC (**Annexe 3**) ont été ajoutés qui contenaient du NH_4Cl (chlorure d'ammonium), du NaHCO_3 (bicarbonate de sodium) et de l'EDTA disodique. Les tubes ont été placés dans un rotor de tube pendant 5 min. Tous les tubes ont été centrifugés pendant 10 min à 300 g. Le surnageant a été jeté et le culot de globules blancs a été remis en suspension dans 500 μl de solution saline tamponnée au phosphate (PBS) et le pH est ajusté à 7,4. Cette étape de lyse et d'élimination des GR a été répétée trois fois et à la fin, un culot blanc propre et sans GR a été obtenu et remis en suspension dans 500 μl de PBS.

3.1.2 Lyse des globules blancs :

Dans la suspension de globules blancs, 1,5 ml de tampon de lyse (pH 8,0) (**Annexe 3**) a été ajoutés avec 500 μl de déodécyl sulfate de sodium (SDS) et 50 μl protéinase K (2mg/mL) fraîchement préparée. Ce mélange a été incubé à 50°C dans un bain-marie pendant deux heures. Cette incubation est une période minimale pour obtenir une solution cellulaire lysée claire, si le culot cellulaire est visible après deux heures d'incubation, le temps peut être prolongé jusqu'à l'obtention d'une solution claire.

3.1.3 Extraction et collecte d'ADN

Après incubation, les échantillons sont retirés du bain-marie et refroidis à température ambiante. 500 μl d'acétate d'ammonium 7,5 M ont été ajoutés dans chaque échantillon et

doucement vortexés jusqu'à ce que la solution soit homogène. Dans ce mélange, qui est d'environ 3 ml, 7 ml d'éthanol absolu glacial ont été ajoutés et les tubes d'échantillons ont été inversés jusqu'à ce qu'un culot d'ADN condensé soit visible. Ce culot d'ADN a été collecté à l'aide d'une pointe de pipette fixée à une micropipette de 100 µl. Le culot d'ADN a été transféré dans un tube Eppendorf de 1,5 ml et lavé avec 500 µl d'éthanol à 70 %. L'éthanol a été soigneusement éliminé à l'aide d'une micropipette et le culot d'ADN a été laissé dans le tube et séché à l'air à température ambiante. Une fois le culot séché, 100 à 200 µl de tampon tris-EDTA (TE) à pH 8,0 (**Annexe 3**) ont été ajoutés et les tubes ont été incubés à 37 °C pour permettre au culot d'ADN de former une solution claire et homogène. Les échantillons ont été conservés à -20 °C.

3.1.4 Dosage de l'ADN

Un volume de 2µl de chaque tube a été dosé par le NanoDrop « **ThermoScientific NanoDrop** » pour déterminer la concentration et la pureté de l'ADN extrait. Le tampon TE a été utilisé comme échantillon à blanc.

3.2 PCR primaire pour l'amplification de séquences alpha satellites spécifiques des chromosomes 13, 21, 18 X et Y.

3.2.1 Préparation de la réaction PCR

Tableau 2: Concentrations prises pour la PCR d'amplification primaire dans le but de préparer des sondes fluorescentes.

Réactif	Concentration initiale	Concentration finale / 1 réaction
ADN template	-	50-100 ng/µl
Tampon Taq	10X	1 X
dNTP	10mM	200 µM
Amorces	10 mM	25 µM
Taq Polymerase	5U/µL	2,5 U
H ₂ O		QSP 25ul

3.2.2 Caractéristiques des amorces utilisées

Tableau 3 : Caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification des régions alphoides des chromosomes 13, 21, 18, X, Y.

Locus	Chr*	Séquence de l'amorce (5'-3')	T° d'hybridation théoriques
Asat-13	13	TGATGTGTGTACCCAGCT	60 C°
Asat-18	18	ATGTGTGTCCTCAACTAAAG	43C°
Asat-21	21	TGATGTGTGTACCCAGCC	60C°
Asat-X	X	G TTCAGCTCTGTGAGTGAAA	68 C°
Asat-Y	Y	TCCATTCGATTCCATTTTTTTCGAGAA	56C°

Chr* : Chromosome

3.2.3 Programme thermocycleur :

Puis, le thermocycleur « Biorad » a été programmé comme suit :

92°C 3 min.	}	30 cycles
92°C 50 Sec.		
Selon l'amorce 02 min.		
72°C 3 min.		
72°C 05 min.		

3.2.4 Vérification des amplifications PCR

Prendre 5 µl du produit PCR et vérifier par une électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Les amplicons doivent apparaître à la taille attendue (170 pb ou un multiple de cette taille).

3.3 PCR secondaire pour le marquage des séquences des produits d'amplification des chromosomes 13, 21, 18 X et Y

3.3.1 Préparation de la réaction PCR

Tableau 4 : La réaction de la PCR de marquage.

(*) Le volume de la matrice d'amplification est en fonction de la concentration de l'ADN

Réactif	Concentration initiale	Concentration finale
ADN template (produit PCR 1)	-	1 µl*
Tampon Taq	10X	1 X
dATP, dGTP, dCTP, (FITC-dUTP)	10mM	200 µM chacune
dATP, dGTP, dCTP, (Cy5-dUTP)	10mM	200 µM chacune
Amorces	10X	1X
Taq Polymerase	5U/µL	2,5 U
H ₂ O	-	QSP 25 µl

extrait. Il faut avoir une quantité d'ADN entre 50 et 100 ng finale.

La réaction de PCR de marquage est faite dans les mêmes conditions que la PCR primaire. La seule différence est la présence de dUTP au lieu du dTTP. Les dUTP sont marqués en rouge par le fluorochrome Cy5 «AAT Bioquest» et en vert par le fluorochrome FITC «AAT Bioquest» séparément pour chaque chromosome.

3.3.2 Analyse du profil de la PCR de marquage

Sur un gel d'agarose 1%, une électrophorèse est faite sans cyber green afin de visualiser l'incorporation des d'UTP marqués en rouge par le Cy5 ou en vert par le FITC qui fluorèscent sous UV.

3.4 Précipitation des produits PCR

Précipiter le second produit de PCR et ressuspendre dans 25 µl de tampon d'hybridation préparé de 60% de formamide et 2XSSC et laisser à 37°C quelques heures avant utilisation.

3.5 Hybridation FISH des sondes d'ADN alpha satellite préparées au laboratoire

L'hybridation FISH sur sperme en utilisant les sondes préparées au laboratoire a été faite dans les mêmes conditions que la FISH réalisée par les sondes commerciales.

CHAPITRE III

Résultats et Discussion

1 Résultats

1.1 Résultat DFI

Selon la formule citée dans la partie matériel et méthode, le calcul du DFI sur 500 spermatozoïdes a donné les résultats suivants :

Tableau 5 : résultats de la DFI.

Patient	Age (ans)	% fraction fragmentée
Patient 1 avec tératospermie	54	92%
Patient 2 avec tératospermie	36	82%
Patient 3 avec tératospermie	42	75%
Témoin normosperme	36	30 %

Un DFI \leq 30%, l'ADN spermatique est considéré comme non fragmenté

Un DFI $>$ 30%, l'ADN spermatique est considéré comme fragmenté.

L'observation microscopique au grossissement 20 X des lames traitées par SCD montrent les différents spécimens attendus :

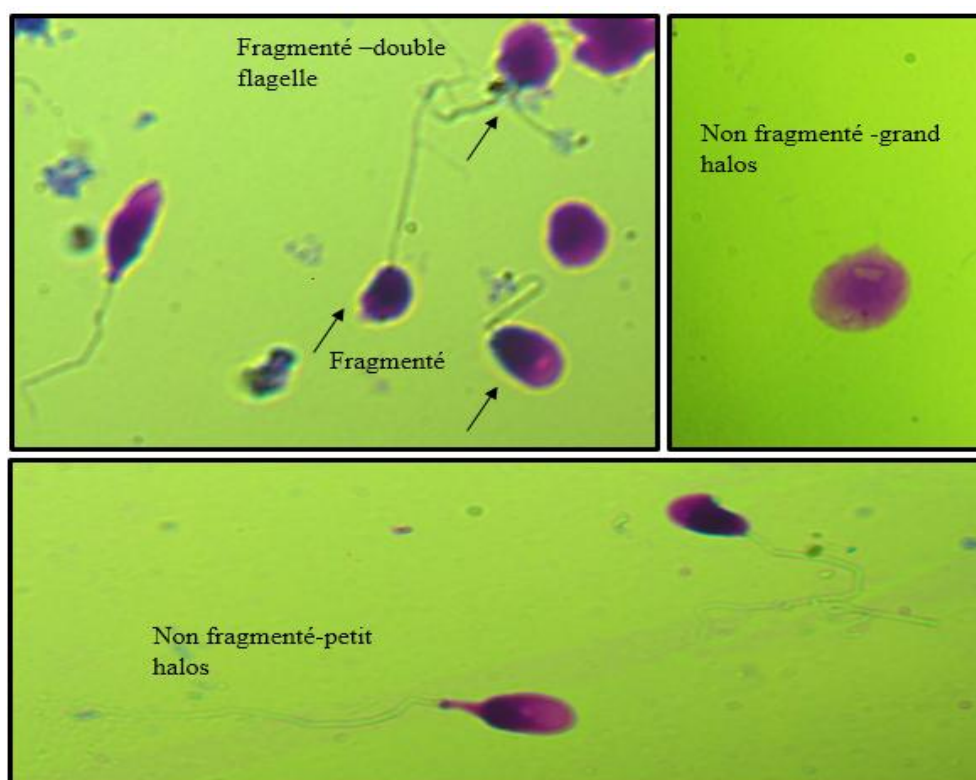


Figure 18 : Image du test SCD : spermatozoïde fragmenté –spermatozoïde non fragmenté (Grossissement X 20)

1.2 Résultat de la FISH avec les sondes commerciales

Ces sondes spécifiques aux centromères 13, 18, 21, X et Y, ont donnés des résultats partiels, et cela, pour la raison essentielle, que la sonde du chromosome 18 est marquée avec un fluorochrome (Aqua) qui est marqué dans le bleu et ne peut donc être observé à cause de la contre coloration avec le DAPI (bleu) qui couvre alors le signal du 18. Les autres centromères 13,21, X et Y ont donnés les résultats attendus (**tableau 06**)

Nous avons analysé les spermatozoïdes d'un cas décrit comme à spermogramme normal seulement avec les sondes X et Y.

Tableau 6 : Résultats de l'énumération des spermatozoïdes aneuploïdes et normaux pour chacun des patients suite à la FISH avec sondes commerciales des chromosomes 13, 21, 18, X, Y

	Patient 1		Patient 2		Patient 3		Témoin	
	Nbr de spz*		Nbr de spz*		Nbr de spz*		Nbr de spz*	
	Aneuploïde	normal	Aneuploïde	Aneuploïde	Aneuploïde	normal	Aneuploïde	normal
X	65	35	58	42	47	53	20	80
Y	55	45	50	50	53	47	15	85
13	57	43	50	50	42	58	-	-
21	50	50	47	53	55	45	-	-
18	ND**							
moyenne	56,7	43,25	51,25	48,75	49,25	50,75	17,5	82,5

(*) Nous avons comptabilisé 100 spermatozoïdes au total.

(**) Non défini

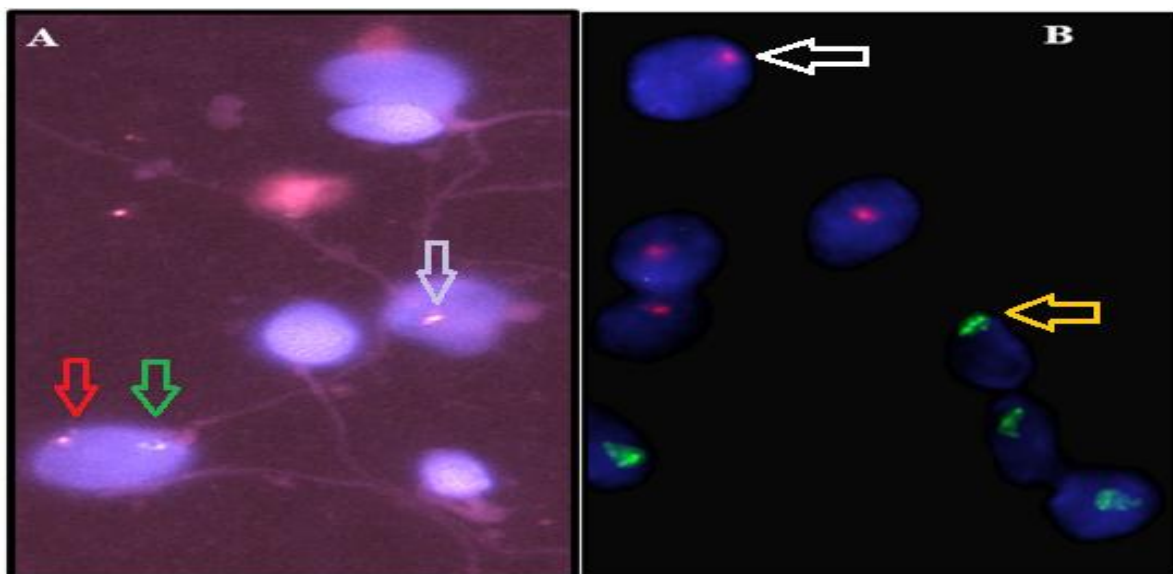


Figure 19 : Image FISH sur le sperme du témoin normo sperme avec la sonde X/Y (Grossissement X100)

(A) Flèche rouge : chromosome X, Verte : Y (aneuploïdie). Flèche blanche : chromosome X unique
 (B) Flèche blanche chromosome X, jaune : Y spermatozoïdes normaux un seul signal par cellule.

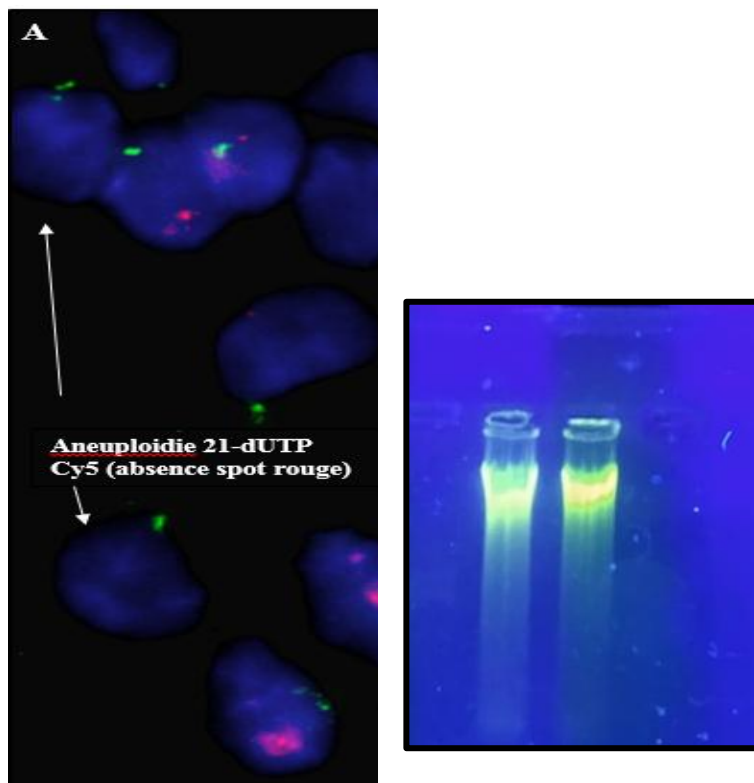


Figure 20 : Image FISH sur le sperme des patients avec tératospermie. (A, D) : Hybridation de la sonde 13/18/21 : spot rouge: chromosome 21, spot vert: chromosome 31.
 (B, C) : Hybridation de la sonde X/Y. Spot rouge: chromosome X, Spot vert: chromosome Y

1.3 Résultat de la préparation des sondes fluorescentes

1.3.1 Résultat de l'extraction d'ADN génomique

Les ADNs extraits sont quantifiés et leur qualité est analysée sur un gel d'agarose à 1%. Un ADN dégradé ne sera pas retenu pour la suite de la technique. Sur un gel l'ADN génomique de qualité montre des profils de migration montrant des fragments de hauts poids moléculaire (**Figure 21**).

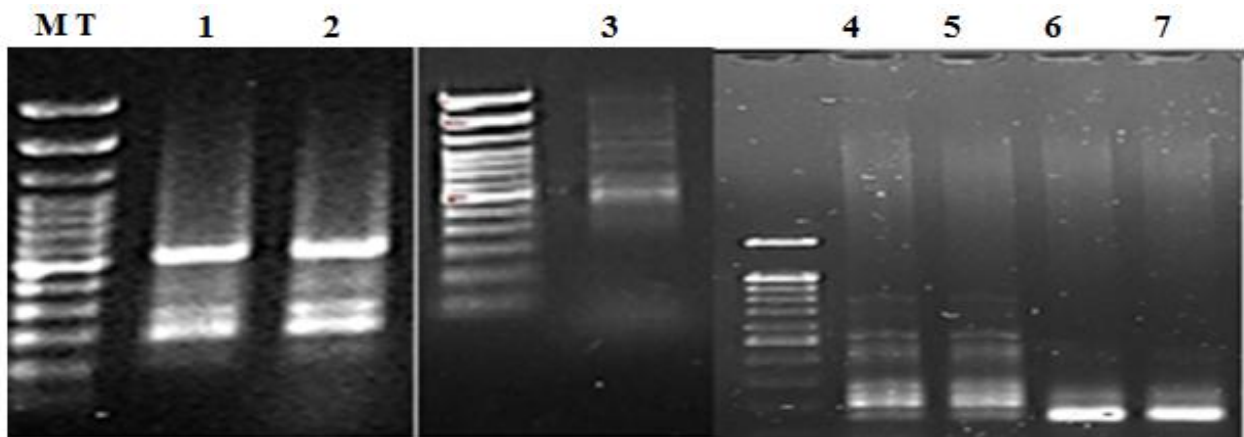


Figure 21 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1% de l'ADN génomique brut extrait

1.3.2 Dosage de l'ADN extrait au Nanodrop :

Sample #	1	nm 1 abs.	10,952	A-260	10,952	ng/ul 547,6
A-280	6,373	260/280	1,72	260/230	1,40	

Figure 22 : Dosage de l'ADN extrait au Nanodrop

1.3.3 Résultat de la PCR Primaire

Nous avons procédé par une technique d'amplification de sondes fluorescentes par amplification des séquences Alphaïdes spécifiques aux centromères des chromosomes les plus impliqués dans les aneuploïdies observée dans les naissances viables à savoir :

13, 18, 21, X et Y. La figure ci-dessous montre la présence des bandes uniques (18 et 21) et des

bandes multiples pour les autres chromosomes (13 et X). Nous n'avons pas réussi à obtenir une amplification des séquences Alphaïdes de l'Y.

Figure 23 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits PCR primaires. **M T** : marqueur de taille 1200 pb. **(1,2)** : Chr X, **2** : Chr X, **3** :Chr 18, **(4,5)** : Chr 13, **(6,7)** :Chr 21

1.3.4 Résultat de la PCR de marquage fluorescent :

Les amplicons obtenus par PCR d'amplification à partir de l'ADN génomique sont eux même utilisés et dans les mêmes conditions pour être marqués pour la technique FISH. Après amplification les produits sont contrôlés sur un gel d'agarose à 1%.

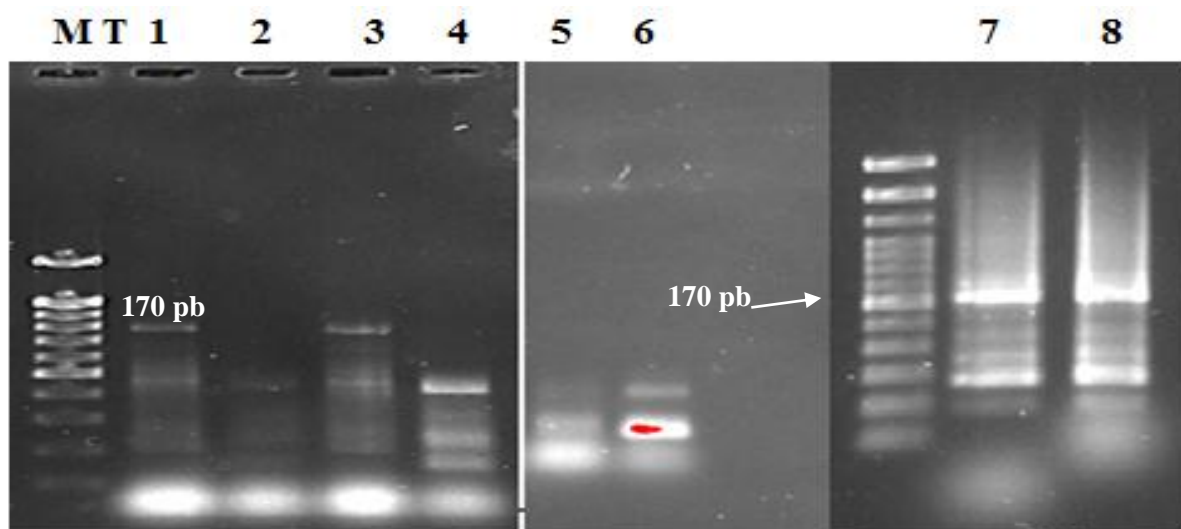


Figure 24 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits PCR de marquage.
MT : marqueur de taille 1200 pb. **1 :** Chr 13 marqué en FITC ; **2 :** Chr 13 marqué en Cy5 ; **3 :** Chr 21 marqué en FITC ; **4 :** Chr 21 marqué en Cy5 ; **5 :** Chr 18 marqué en FITC ; **6 :** Chr 21 marqué en Cy5 ; **7 :** Chr X marqué en FITC ; **8 :** Chr 21 marqué en Cy5

Tableau 7 : Résumé des résultats des amplifications PCR spécifiques des 5 des séquences Alphaïdes et leur marquage par incorporation d'un d'UTP marqué par le FITC (vert) ou d'un d'UTP marqué Cy5 (Rouge).

Chromosome	PCR primaire	PCR de marquage
13	Positive	Positive
18	Positive	Positive
21	Positive	Positive
X	Positive	Positive
Y	Négative	Négative

Les conditions de PCR d'amplification des séquences Alphaïdes, pour les centromères des chromosomes 13, 18, 21 et X ont donné des résultats satisfaisants, nous avons réussi à les marqués à la fois par l'incorporation lors de la PCR des d'UTP FITC ou CY5

Concernant le centromère du chromosome Y, les essais n'ont pas été concluants car la séquence spécifique des alphaïdes du l'Y est de plus grande taille que les autres séquences et demanderais certainement de faire d'autres essais pour obtenir le produit d'amplification spécifique.

1.4 Résultats de FISH par les sondes préparées au laboratoire

Les sondes préparées au laboratoire n'ont pas donné les mêmes résultats que ceux obtenus avec les sondes commerciales. En effet, juste la sonde correspondant au centromère du chromosome X a donné un résultat insatisfaisant, car il y avait beaucoup de bruit de fond sur la lame. Les résultats des sondes 13,18 et 21, ont donné des amplifications sur ADN génomique et un marquage des sondes positif, malheureusement les hybridations FISH n'ont pas donné satisfaction.

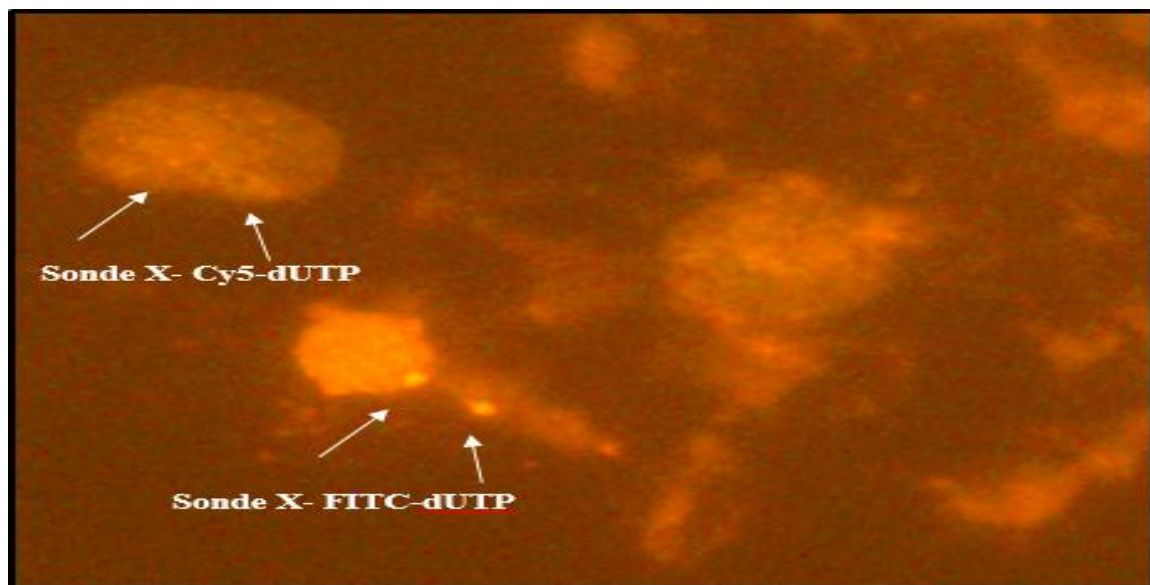


Figure 25: Image de la FISH préparées au laboratoire par la sonde qui cible le centromère du chromosome X marqué par le Cy5-dUTP et le FITC-dUTP

2 Discussion

L'objectif de notre travail est d'établir une corrélation entre le taux d'aneuploïdie et la qualité du génome spermatique chez des hommes avec une térazoospermie.

Bien que nous n'avons pas pu avoir un nombre suffisant de cas de teratospermie, les résultats obtenus montrent une corrélation positive entre la DFI et le taux d'aneuploïdie par FISH ce qui correspond à la littérature (Muriel et al .;2006). Nos résultats montrent que le taux d'aneuploïdie est élevé chez les individus présentant un DFI élevé, confirmant ce qui a été déjà décrit dans la littérature (Muriel et al .;2006).

Les principaux mécanismes responsables de la fragmentation de l'ADN peuvent être délétères pour les mécanismes régissant la méiose, en particulier durant le changement de la topologie

de l'ADN lors du remplacement des histones par les protamines pendant la spermatogénèse. Ce phénomène est largement décrit chez les patients avec des anomalies dans le spermogramme et en particulier en cas de tératospermie. Les anomalies de l'empaquetage de la chromatine au cours de la spermatogénèse peuvent conduire à un processus menant à une chromatine non mature et qui entraînent des cassures de l'ADN, qui persistent sa réparation dans les spermatozoïdes différencié. De plus, l'existence de défauts lors du remodelage de la chromatine rend les spermatozoïdes très susceptibles aux attaques par des SOR (Aitken et al. 2016). Les désordres génétique sont liés au défaut de la spermatogénèse chez les individus atteints de tératozoospermie .Ces défaut de remodelage, restent indépendants des erreurs de ségrégations chromosomiques lors de la méiose.

Conclusion et perspectives

Conclusion

L'infertilité est un problème de santé publique qui touche près de 15% de la population mondiale selon l'OMS. Le facteur masculin est identifié dans environ 50% de ces cas. L'infertilité masculine est causée par différents facteurs, notamment des facteurs génétiques ; des troubles chromosomiques et bien d'autres facteurs non génétiques. L'évaluation de l'infertilité masculine est importante pour identifier la cause et fournir un traitement si l'étiologie pourrait être corrigée.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la corrélation entre l'aneuploïdie et la qualité de l'ADN spermatique en utilisant les techniques FISH et SCD. Par ces deux techniques, nous avons réussi à évaluer le DFI et le taux d'aneuploïdie en utilisant des sondes centromériques commerciales chez les patients présentant une tératospermie. Afin d'élargir notre cohorte et faire face au manque de sondes fluorescentes commerciales, nous avons fabriqué nous-mêmes les sondes utilisées dans l'analyse courante de l'aneuploïdie. Bien que nous n'ayons pas eu des signaux spécifiques lors de l'hybridation des sondes préparées au laboratoire les étapes d'amplifications sont satisfaisantes et reste à valider les conditions d'hybridation ; tampon et conditions techniques. Pour le chromosome Y nous n'avons pas encore obtenu d'amplification nous soupçonnons la dégradation des amorces vu leur taille.

Nos résultats mêmes s'ils sont préliminaires, confirment ce qui a été déjà décrit dans la littérature pour ce qui concerne la dégradation du génome spermatique et le taux élevés d'aneuploïdies chez les individus avec tératospermie. Ce résultat confirme l'étiologie de ces patients, qui souffrent de défaut de procréation ou d'avortements précoces répétés.

Perspectives

Au vu des résultats concluants dans l'amplification de l'ADN génomique dans la fabrication de sondes que nous avons préparées au laboratoire, nous pouvons espérer augmenter la taille de notre cohorte et prouver cette corrélation positive en test statistique, chez des patients avec tératospermie. Dans ce cas nous pourrions alors généraliser notre approche à l'ensemble des patients présentant des échecs de procréation y compris ceux considérés comme normaux spermes.

Références bibliographiques

Ageroual, A. *et al.* (2015) 'A unique view on male infertility around the globe', *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. *Reprod Biol Endocrinol*, 13(1).

Abdelhedi, F. *et al.* (2019) 'Altered three-dimensional organization of sperm genome in DPY19L2-deficient globozoospermic patients', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36(1), pp. 69–77.

Auger, J., Jouannet, P. and Eustache, F. (2016) 'Another look at human sperm morphology', *Human Reproduction*, 31(1), pp. 10–23.

Babu, S. R. *et al.* (2004) 'Evaluation of FSH, LH and testosterone levels in different subgroups of infertile males', *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 19(1), pp. 45–49.

Balhorn, R. (2007) 'The protamine family of sperm nuclear proteins', *Genome Biology*, 8(9).

Bashamboo, A. and McElreavey, K. (2016) 'Mechanism of Sex Determination in Humans: Insights from Disorders of Sex Development', *Sexual Development*, 10(5–6), pp. 313–325.

Billig, H. *et al.* (1995) 'Apoptosis in Testis Germ Cells: Developmental Changes in Gonadotropin Dependence and Localization to Selective Tubule Stages*'.^{*}

Bobadilla, J. L. *et al.* (2002) 'Cystic fibrosis: A worldwide analysis of CFTR mutations - Correlation with incidence data and application to screening', *Human Mutation*, 19(6), pp. 575–606.

Boon, M. *et al.* (2013) 'Primary ciliary dyskinesia, an orphan disease', *European Journal of Pediatrics*, 172(2), pp. 151–162.

Brahem, S. *et al.* (2011) 'Detection of DNA fragmentation and meiotic segregation in human with isolated teratozoospermia', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(1), pp. 41–48.

Brahem, S. *et al.* (2012) 'Study of aneuploidy rate and sperm DNA fragmentation in large-headed, multiple-tailed spermatozoa', *Andrologia*, 44(2), pp. 130–135.

Bronet, F. *et al.* (2012) ‘Sperm DNA fragmentation index does not correlate with the sperm or embryo aneuploidy rate in recurrent miscarriage or implantation failure patients’, *Human Reproduction*, 27(7), pp. 1922–1929.

Chianese, C. *et al.* (2014) ‘X chromosome-linked CNVs in male infertility: Discovery of overall duplication load and recurrent, patient-specific gains with potential clinical relevance’, *PLoS ONE*, 9(6), pp. 1–7.

Cook, P. R. and BRAZELL Sir William, I. A. (1978) ‘Spectrofluorometric Measurement of the Binding of Ethidium to Superhelical DNA from Cell Nuclei’, *Eur. J. Biochem*, 84, pp. 465–477.

D, S. *et al.* (1999) ‘Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa’, *Reviews of reproduction*. *Rev Reprod*, 4(1), pp. 31–37.

Dam, A. H.D.M. *et al.* (2007) ‘Globozoospermia revisited’, *Human Reproduction Update*, 13(1), pp. 63–75.

Dam, Anika H.D.M. *et al.* (2007) ‘Homozygous mutation in SPATA16 is associated with male infertility in human globozoospermia’, *American Journal of Human Genetics*, 81(4), pp. 813–820.

Dieterich, K. *et al.* (2007) ‘Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility’, *Nature Genetics*, 39(5), pp. 661–665.

ElInati, E. *et al.* (2016) ‘A new mutation identified in SPATA16 in two globozoospermic patients’, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33(6), pp. 815–820.

Eniola, W., Adetola, A. and Abayomi, T. (2012) ‘A review of Female Infertility; Important Etiological Factors and Management’, *Journal of Microbiology and Biotechnology Research Scholars Research Library J. Microbiol. Biotech. Res*, 2(3), pp. 379–385.

F, Z. *et al.* (2018) ‘Mutations in PMFBP1 Cause Acephalic Spermatozoa Syndrome’, *American journal of human genetics*. *Am J Hum Genet*, 103(2), pp. 188–199.

G, A. (1988) 'Techniques to measure DNA single-strand breaks in cells: a review', *International journal of radiation biology*. Int J Radiat Biol, 54(5), pp. 695–707.

G, Liu *et al.* (2020) 'Novel mutations in PMFBP1, TSGA10 and SUN5: Expanding the spectrum of mutations that may cause acephalic spermatozoa', *Clinical genetics*. Clin Genet, 97(6), pp. 938–939.

Ghédir, H. *et al.* (2019) 'Comparison of sperm morphology and nuclear sperm quality in SPATA16- and DPY19L2-mutated globozoospermic patients', *Andrologia*, 51(6), pp. 1–7.

Guthauser, B. *et al.* (2006) 'Chromosomal analysis of spermatozoa with normal-sized heads in two infertile patients with macrocephalic sperm head syndrome', *Fertility and Sterility*, 85(3), pp. 750.e5-750.e7.

Hamada, A. *et al.* (2012) 'Unexplained male infertility: Diagnosis and management', *International Braz J Urol*, 38(5), pp. 576–594.

Harewood, L. and Fraser, P. (2014) 'The impact of chromosomal rearrangements on regulation of gene expression', *Human Molecular Genetics*, 23(R1), pp. 1–24.

Harton, G. L. and Tempest, H. G. (2012) 'Chromosomal disorders and male infertility', *Asian Journal of Andrology*, 14(1), pp. 32–39.

J, G. *et al.* (2004) 'The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis', *European journal of biochemistry*. Eur J Biochem, 271(17), pp. 3459–3469.

Jungwirth, A. *et al.* (2012) 'European association of urology guidelines on male infertility: The 2012 update', *European Urology*, 62(2), pp. 324–332.

Kim, J. W. *et al.* (2012) 'Molecular and clinical characteristics of 26 cases with structural y chromosome aberrations', *Cytogenetic and Genome Research*, 136(4), pp. 270–277.

Kleene, K. C. (2003) 'Patterns, mechanisms, and functions of translation regulation in mammalian spermatogenic cells', *Cytogenetic and Genome Research*, 103(3–4), pp. 217–224.

Krausz, C. *et al.* (2014) 'EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-

chromosomal microdeletions: State-of-the-art 2013', *Andrology*, 2(1), pp. 5–19.

Kruger, T. F. *et al.* (1986) 'Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization', *Fertility and Sterility*. Elsevier Masson SAS, 46(6), pp. 1118–1123.

Mendiola, J. *et al.* (2008) 'Exposure to environmental toxins in males seeking infertility treatment: A case-controlled study', *Reproductive BioMedicine Online*. Reproductive Healthcare Ltd, Duck End Farm, Dry Drayton, Cambridge CB23 8DB, UK, 16(6), pp. 842–850.

Muriel, L. *et al.* (2007) 'Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH analysis', *Journal of Andrology*, 28(1), pp. 38–49.

N, K. and AK, S. (2015) 'Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature', *Journal of human reproductive sciences*. J Hum Reprod Sci, 8(4), pp. 191–196.

Nistal, M., Paniagua, R. and Herruzo, A. (1978) 'Multi-tailed spermatozoa in a case with asthenospermia and teratospermia', *Virchows Archiv B Cell Pathology*, 26(1), pp. 111–118.

Olive, P. L. *et al.* (1998) 'The comet assay: A new method to examine heterogeneity associated with solid tumors', *Nature Medicine 1998 4:1*. Nature Publishing Group, 4(1), pp. 103–105.

Oud, M. S. *et al.* (2020) 'Exome sequencing reveals novel causes as well as new candidate genes for human globozoospermia', *Human Reproduction*, 35(1), pp. 240–252.

Pasch, E. *et al.* (2015) 'The LINC complex component Sun4 plays a crucial role in sperm head formation and fertility', *Biology Open*, 4(12), pp. 1792–1802.

Perrin, A. *et al.* (2008) 'Study of aneuploidy in large-headed, multiple-tailed spermatozoa: case report and review of the literature', *Fertility and Sterility*, 90(4), pp. 1201.e13-1201.e17.

Pourmasumi, S. *et al.* (2019) 'Evaluation of Sperm Chromatin Integrity Using Aniline Blue and Toluidine Blue Staining in Infertile and Normozoospermic Men', *Journal of*

Reproduction & Infertility. Avicenna Research Institute, 20(2), p. 95.

Punab, M. *et al.* (2017) 'Causes of male infertility: A 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts', *Human Reproduction*, 32(1), pp. 18–31.

Quartuccio, S. M. and Schindler, K. (2015) 'Functions of Aurora kinase C in meiosis and cancer', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3(AUG).

R, O. and C, M. (1986) 'Marked differences in the ability of distinct protamines to disassemble nucleosomal core particles in vitro', *Biochemistry*. *Biochemistry*, 25(21), pp. 6508–6511.

R, S. *et al.* (2007) 'Evidence of modified nuclear protein matrix in human spermatozoa with fragmented deoxyribonucleic acid', *Fertility and sterility*. *Fertil Steril*, 87(1), pp. 191–194.

Repping, S. *et al.* (2003) 'Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection', *Nature Genetics*, 35(3), pp. 247–251.

RJ, A. *et al.* (2016) 'Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa', *Reproduction, fertility, and development*. *Reprod Fertil Dev*, 28(1–2), pp. 1–10.

RM, L. and G, B. (2005) 'On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids', *Biology of reproduction*. *Biol Reprod*, 73(2), pp. 289–296.

Sakkas, D., Mariethoz, E., Manicardi, G., Bizzaro, D., Bianchi, Patrizia G., *et al.* (1999) 'Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa', *Reviews of Reproduction*, 4(1), pp. 31–37.

Sakkas, D., Mariethoz, E., Manicardi, G., Bizzaro, D., Bianchi, Patrizia G, *et al.* (1999) 'Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa', *Reviews of Reproduction*, 4, pp. 31–37.

Sakkas, D. *et al.* (2002) 'Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the

possible involvement of apoptosis', *Biology of Reproduction*, 66(4), pp. 1061–1067.

Santo, M. Di and Tarozzi, N. (2016) 'Analysis of Sperm DNA Fragmentation and Aneuploidy in 109 Infertile Patients: Are the Two Parameters Correlated?', *Gynecology & Obstetrics Case report*, pp. 1–5.

Sermon, K. and Viville, S. (2014) 'Textbook of Human Reproductive Genetics', *Textbook of Human Reproductive Genetics*. Cambridge University Press, 9781107683587, pp. 1–222.

Shamsi, M. B., Imam, S. N. and Dada, R. (2011) 'Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. Springer, 28(11), p. 1073.

Shang (2019) 'Novel *DPY19L2* variants in globozoospermic patients and the overcoming this male infertility', *Asian Journal of Andrology*. Medknow Publications and Media Pvt. Ltd., 21(2), p. 183.

Shi, Q. and Martin, R. H. (2001) 'Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men', *Reproduction*, 121(5), pp. 655–666.

Slattery, S. D. *et al.* (2008) 'Aurora-C and Aurora-B share phosphorylation and regulation of CENP-A and Borealin during mitosis', *Cell Cycle*, 7(6), pp. 787–795.

Spermogramme: normes de l'OMS (2010). Available at: https://www.aly-abbara.com/echographie/biometrie/scores/spermogramme_normes_oms.html

Sun, F. *et al.* (2007) 'Abnormal progression through meiosis in men with nonobstructive azoospermia', *Fertility and Sterility*, 87(3), pp. 565–571.

Tiepolo, L. and Zuffardi, O. (1976) 'Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human y chromosome long arm', *Human Genetics*, 34(2), pp. 119–124.

Vendrell, X. *et al.* (2014) ‘Correlation between aneuploidy, apoptotic markers and DNA fragmentation in spermatozoa from normozoospermic patients’, *Reproductive BioMedicine Online*, 28(4), pp. 492–502.

Vogt, P. H. *et al.* (1996) ‘Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11’, *Human Molecular Genetics*, 5(7), pp. 933–943.

Vorona, E. *et al.* (2007) ‘Clinical, endocrinological, and epigenetic features of the 46,XX male syndrome, compared with 47,XXY Klinefelter patients’, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(9), pp. 3458–3465.

‘WHO | World Health Organization’ (2020) WHO. World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/reproductivehealth/topics>

World Health Organization (2018). ‘International Classification of Diseases’, 11th Revision (ICD-11) Geneva. available at: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/infertility#:~:text=Infertility%20is%20a%20disease%20of,on%20their%20families%20and%20communities.>

WS, W. (2010) ‘Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development’, *Molecular human reproduction*. Mol Hum Reprod, 16(1), pp. 30–36.

Yassine, S. *et al.* (2014) ‘Dpy19l2-deficient globozoospermic sperm display altered genome packaging and DNA damage that compromises the initiation of embryo development’, *Molecular Human Reproduction*, 21(2), pp. 169–185.


YL, S. *et al.* (2019) ‘Novel DPY19L2 variants in globozoospermic patients and the overcoming this male infertility’, *Asian journal of andrology*. Asian J Androl, 21(2), pp. 183–189.

Zaneveld, L. *et al.* (1977) ‘Collection and physical examination of the ejaculate. In Techniques of human andrology’. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands. pp. 147–172.

Zequiraj, A. *et al.* (2018) ‘Male infertility and sperm dna fragmentation’, *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 6(8), pp. 1342–1345.

Annexes

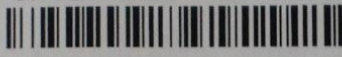
Annexe 1 : le spermogramme et le spermocytogramme



المركز الطبي للمساعدة على الإنجاب

Nom: ██████████ Age: 35 ans
 Date prélèvement: 07/08/2021 à 09:14
 Prescrit par Dr. : ██████████
 Date mariage. : //
 C1 : LOMW8IS616 ***C2 :

ALGER, le : 18/09/2021



RESULTATS ANALYSES

SPERMOGRAMME

Volume : 3.5 ml (N: 1,5-6ml)	Liquéfaction : 30min (N: 20-60min)	PH : 7.5 (N: 7,2-7,8)
Aspect : Normal (N: gris opalescent)	Odeur : / (N: acre)	Viscosité : Normale

Mobilité	Après 1 heure	Après 3 heures
Rapide et progressif (a)	01%	00%
Lent et progressif (b)	56%	53%
Mobile non progressif (c)	05%	04%
Immobile (d)	38%	43%

(N: a+b>=32% ou a+b+c>=40%)

Concentration des spermatozoïdes :	250 millions/ml	(N: >= 15-250 millions/ml)
Numérotation totale des spermatozoïdes :	875 millions/ejaculat	(N: >= 39 millions/ejaculat)
Cellules rondes :	inférieur 1 millions/ml	(N: =< 2 millions/ml)
Vitalité : 80% (N: >= 50%)	Agglutinats : +	Agglomérats : Absence

SPERMOCYTOGRAMME (Classification de David modifiée)

Anomalie de la tête

Allongé :	01	Aminci :	01
Microcéphale :	31	Macrocéphale :	01
Tête Multiple :	00	Base anormale :	10
Acrosome anormal ou absent :	11	Région post-acrosomique anormale :	00
Région acrosomique anormale :	00	Flagalles isolés :	00
SPZ en lyse :	00	Cellules de la lignée germinale :	00

Anomalies de la pièce intermédiaire

Reste cytoplasmique :	01	Amincie :	00
Grêle :	00	Angulée :	08

Anomalies de flagelle

Absent :	01	Court :	00		
Irrégulier :	00	Enroulé :	05	Multiple :	00
IAM :	1.63	SPZ typiques :	10%	SPZ atypiques :	90%

Conclusion :

Tératozoospermie.

68, rue ALLAL Mokhtar, Ben Omar - Kouba - Alger

Mob : +213 560 570 306 / Tél : +213 23 78 17 17 / FAX : +213 237 815 46 www.clinique-rotaby.dz contact@clinique-rotaby.dz

Page 1/1

Annexe 2 : Préparation des solutions du test SCD

Solution de dénaturation

HCL.....0.05 M

Solution de lyse

Tris.....0.4 M
DTT.....0.5M
SDS.....1 %
EDTA.....50mM

Annexe 3 : Préparation des solutions d'extraction de l'ADN génomique

Solution de lyse des globules rouges (RBC)

NH₄Cl..... (150 Mm)
NaHCO₃(10 mM)
EDTA disodique..... (0,1 mM).

Solution PBS

NaCl (137 mM)
KCl..... (2,7 mM)
Na₂HPO₄(10 mM)
KH₂PO (1,8 mM),
pH7,4

Tampon de lyse des globules blancs (WBC)

Tris-HCl..... (20 mM)
EDTA disodique..... (0,1 mM)
NaCl(25 mM)
SDS.....(10 %)
protéinase K..... (10 mg/ml de PBS).
PH.....08

Tampon Tris-EDTA

Tris(50 mM)
EDTA(50 mM)
H₂O.....QS
PH.....08