

N° d'ordre :

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

## *Mémoire*

*De fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master*

*Domaine : Sciences de la nature et de la vie (S.N.V.)*

*Filière : sciences biologiques*

*Spécialité : Biologie et Physiologie de la Reproduction*

Intitulé du thème

Liens entre la numération, la morphologie, vitalité, mobilité et condensation de la chromatine spermatique chez les hommes infertiles

**Présenté par : Me Ile SABEUR Fatima Zohra**

**Me Ile SAFI Souad**

Président de jury : **Mme MOLESSHOUL. Soraya** (Professeur/UDL/SBA)

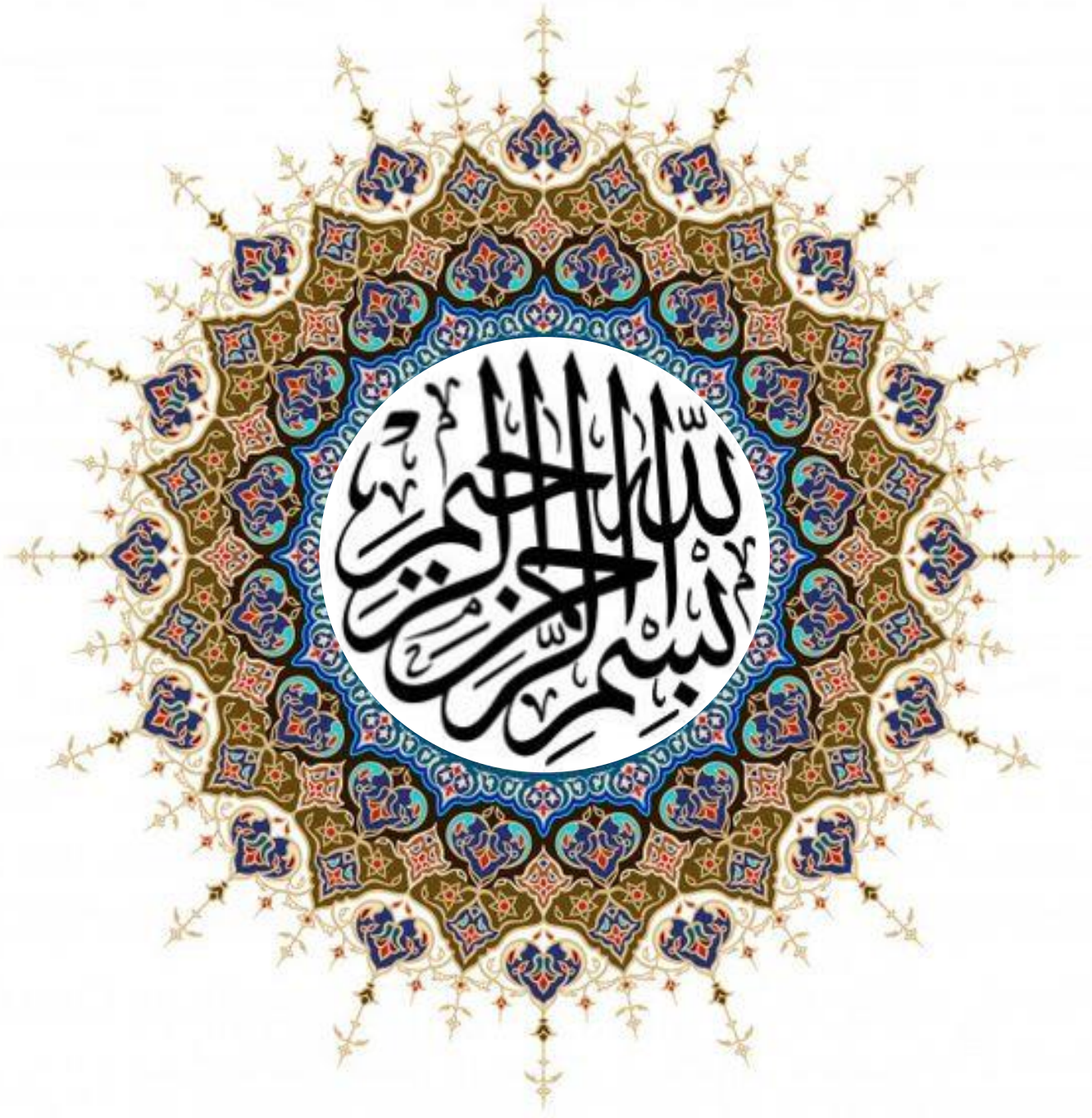
Examineur : **Mme Ouramdane Refka MCB UDL SBA** (MCB/UDL/SBA)

Encadreur : **Mme Zemri Khalida** (MCA/UDL/SBA)

Co-encadreur : **Mme Liamani Ouafia** (Docteur/UDL/SBA)

**Année universitaire 2020-2021**

**Session : "Juin"**



## ***Remerciements***

*Je remercie, tous d'abord le bon dieu ALLAL, le tous puissant nous avoir données la patience, l'espoir, la volonté et le courage de réaliser ce travail.*

*Un remerciement spécial avec nos respects a notre encadreur **Mme ZEMRI Khalida.***

*Nous tenons à remercier tout, particulièrement notre co-encadreur **Dr LIAMANI Ouafia** de nous avoir fait l'honneur d'assurer le suivie de notre travail jusqu'à son achèvement.*

*Mes remerciements spéciaux au médecin qui nous a beaucoup aidés **Dr BENZEGUIR** et son équipe .*

*Je tiens à remercier infiniment toutes les personnes qui ont contribués au succès de notre stage.*

*Enfin mon remerciement s'adresse toute ma famille et mes collègues.*

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail*

*Mes chers parents qui m'ont toujours soutenu dans mes choix et qui ont tous mis en œuvre pour que je puisse mener à bien mes études, merci pour tout ce que vous m'avez transmis, pour votre soutien, vos encouragements et votre confiance en moi, vous êtes un exemple pour moi, je vous en serai toujours reconnaissante.*

*Ma sœur NAÏMA et qui est toujours là pour m'aider et rendre ma vie agréable.*

*Tous les membres de la grande famille, merci d'avoir savouré avec moi les victoires et de m'avoir réconfortée dans les moments difficiles, votre soutien indéfectible, votre générosité et votre indulgence m'ont été très précieux, et signifient bien plus pour moi que je ne saurai jamais l'exprimer.*

*Atout la promotion de biologie et physiologie de la reproduction de l'année 2020-2021.*

*Mes meilleurs amis (es) : FATIMA, HANANE.*

**SAFI SOUAD**

## *Dédicace*

*A ce que j'aime surtout*

*A l'homme de ma vie. Mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, qui éclaire mon chemin et illumine de douceur et d'amour, que dieu te garde pour nous papa.*

*A ma très chère maman en signe d'amour, de reconnaissance et de gratitude pour tous les soutiens et les sacrifices dont elle a fait preuve à mon égard.*

*A mes adorables frères : MOHAMED et ZOUBIR*

*A mes chers sœurs : ASSIA et son marie Miloud, MERIEM*

*A ma nièce : Radjaa.*

*A tout ma famille sans exception.*

*A mes amies de cœur : HANANE, IKRAME, HALIMA, AICHA, IBTISSEM*

*A mes anciens voisins : HAYET, MANEL, SAFAA, ATIKA.*

*A mes amis plus proches : DAOUIA, SOUAD. IMENE.*

*A tout la promotion de Biologie et physiologie de la reproduction de l'année 2020-2021*

**SABEUR FATIMA ZOHRA**

## Résumé

L'infertilité touche environ 15 % des couples qui cherchent à obtenir une grossesse, L'homme est impliqué dans près de 60% des cas d'infertilité du couple.

L'exploration biologique de l'infertilité masculine est basée sur l'étude du sperme elle permet d'apprécier l'ensemble des événements qui se produisent depuis le démarrage de la spermatogénèse jusqu'à l'éjaculation. Le spermogramme et le spermocytogramme restent des examens de première intention, d'autres techniques évaluées l'intégralité de l'ADN spermatique viennent les compléter.

Notre étude a été effectuée sur des recueils de sperme de 52 hommes infertiles, qui ont été soumis à un examen spermatique, L'objectif de notre recherche est d'évaluer L'état de l'intégralité et la maturité de la chromatine spermatique par la technique de la coloration au bleu d'aniline, et étudier le lien entre le taux de la condensation de la chromatine spermatique et les paramètres du sperme, les données ont été analysées à l'aide du logiciel spss 22.0. Des tests statistiques comprenant le test de khi<sup>2</sup>, la corrélation de Pearson ont été utilisés, la signification statistique a été prise en compte pour les valeurs  $p < 0,05$ .

Les résultats obtenus ne montrent aucune association entre les deux paramètres, Donc la relation entre la condensation de la chromatine spermatique et la morphologie du sperme humain reste discutable et des investigations plus appropriées et approfondies sont nécessaires pour répondre adéquatement à cette question.

### **Mots clés :**

Infertilité, chromatine spermatique, bleu d'aniline.

## Abstract

Infertility affects about 15% of couples who seek pregnancy. Men are involved in almost 60% of couples' infertility cases.

The biological exploration of male infertility is based on the study of sperm; it allows us to appreciate all the events that occur from the start of spermatogenesis until ejaculation. The spermogram and the spermocytogram remain examinations of first intention, other techniques evaluated the entirety of the spermatic DNA come to supplement them.

Our study was carried out on collections of sperm from 52 infertile men, who were subjected to a sperm examination, The objective of our research is to assess the state of completeness and maturity of the sperm chromatin by the aniline blue staining technique, and to study the link between the rate of sperm chromatin condensation and sperm parameters, the data were analyzed using the spss 22.0 software. Statistical tests including chi-square test, Pearson's correlation were used, statistical significance was taken into account for values  $p < 0.05$ .

The results obtained do not show any association between the two parameters, therefore the relationship between the condensation of sperm chromatin and the morphology of human sperm remains questionable and more appropriate and in-depth investigations are necessary to adequately answer this question.

### **Key words:**

Infertility, sperm chromatin, aniline blue.

## ملخص

يصيب العقم حوالي 15% من الأزواج الذين يسعون إلى الحمل ، ويشارك الرجال في ما يقرب من 60% من حالات عقم الأزواج.

يعتمد الاستكشاف البيولوجي لعقم الذكور على دراسة الحيوانات المنوية ؛ فهو يسمح لنا بتقدير جميع الأحداث التي تحدث منذ بداية تكوين الحيوانات المنوية حتى القذف. لا تزال دراسة (سباغموغرام) و دراسة (سبارموسيتوغرام) من أولى الاختبارات، و انت اختبارات اخرى تدرس الكروماتين لتكاملها.

أجريت دراستنا على مجموعات السائل المنوي من 52 رجلاً مصاباً بالعقم ، خضعوا لفحص الحيوانات المنوية والهدف من بحثنا هو تقييم حالة اكتمال ونضج كروماتين الحيوانات المنوية باستخدام تقنية التلوين الأزرق الأنيلين ، ودراسة ربط معدل تكاثف كروماتين الحيوانات المنوية مع معاملات الحيوانات المنوية ، تم تحليل البيانات باستخدام برنامج spss 22.0. تم استخدام الاختبارات الإحصائية بما في ذلك اختبار  $Khi2$  ، واستخدمت علاقة بيرسون ، وأخذت الدلالة الإحصائية في الاعتبار لقيم  $p > 0.05$ .

النتائج التي تم الحصول عليها لا تظهر أي ارتباط بين المعلمتين ، وبالتالي فإن العلاقة بين تكثيف كروماتين الحيوانات المنوية ومورفولوجيا الحيوانات المنوية البشرية تظل موضع تساؤل وأن التحقيقات الأكثر ملاءمة والمتعمقة ضرورية للإجابة على هذا السؤال بشكل مناسب.

كلمات مفتاحية :

عقم – كروماتين منوي – ازرق الانيلين .

## Table des matières

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

<b>Introduction</b> .....	2
<b>Chapitre 01: la fonction génital male</b> .....	5
I. Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur masculine.....	6
II. Spermatogénèse.....	16
III. spermatozoïdes.....	25
IV. Régulation hormonale de la fonction de reproduction chez l'homme.....	27
<b>Chapitre 02 : exploration de l'infertilité masculine</b> .....	30
I. Généralité.....	31
II. Définition de l'infertilité masculine.....	31
III. Etiologie de l'infertilité masculine.....	35
IV. Exploration de l'infertilité masculine.....	39
IV.1. L'examen clinique .....	39
IV.2. Analyse du sperm.....	40
IV.3. Exploration cytogénétique.....	52
V. Traitement.....	60
<b>Chapitre 03: patients et méthodes</b> .....	67
I- Patients et méthodes .....	68
II- Etude statistique.....	72
<b>Chapitre 04: résultats et discussion</b> .....	73
Résultats.....	74
Discussion.....	82
<b>Conclusion</b> .....	86
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	

## Liste des abréviations

**ABP:** Androgen binding protein

**ACAS :** Anticorps anti-spermatozoïdes

**ADN:** Acide désoxyribonucléique

**ARN:** Acide ribonucléique

**AZF:** Facture d'azoospermie

**CFTR:** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.

**CGH :** L'hybridation comparative génomique

**Cm:** Centimètre

**CMA 3:** Chromomycine A3

**CO2:** Dioxyde de carbone

**DAZ:** Delete in azoospermie

**DFI:** DNA Fragmentation index

**DHT:** Dihydrotestostérone.

**DNC. :** Délai nécessaire pour concevoir.

**EVX1:** Gene (Protein Coding)

**FGF9:** Fibroblast growth factor-9

**FISH:** Hybridation in situ en fluorescence

**FIV:** Fécondation in Vitro

**FSH:** Follicule stimulating Hormone

**G:** Gramme

**GnRG:** Gonadotrophine-releasing Hormone

**H:** Histone

**H:** Heure

**IAM:** Index d'anomalies multiples

**ICSI:** Intra Cytoplasmic Sperm Injection

**ID1:** Inhibitor of DNA Binding 1

**IGF-2:** Insulin-like growth factor 2

**IMAO :** inhibiteurs de monoamine oxydase

**INSL3 :** Insulin-like 3

**ISRS :** Inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine.

**KLF5:** Kruppel Like Factor 5

**LH:** Luteinizing Hormone

**Mb:** Mégabit

**MESA:** Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration

**Mn :** Minute

**MI :** Millilitre

**Mm:** Millimètre

**OH :** Hydroxyde

**OMS:** Organisation mondiale de la Santé

**P:** protamine

**Pb :** Paire de bases

**PH:** Phényle

**PT :** Protéines de transition

**S:** Seconds

**SCD:** Sperm Chromatin Dispersion

**SCSA:** Sperm Chromatin Structure Assay

**SKY:** Spectral Karyotype

**SNV:** Système nerveux végétatif

**SOCS:** Acronyme de suppressor of cytokine signalling

**SOR :** Les substances oxygénées réactives

**SOX9:** SRY-Box Transcription Factor 9

**SPSS:** Statistical Package for the Social Sciences

**SPZ:** Spermatozoïdes

**SRD5A2:** Steroid 5 alpha-reductase 2

**SRY:** Sex-determining region of Y chromosome

**STAT3:** Signal transducer and activator of transcription 3

**TDF :** Facteur de détermination testiculaire

**TDT:** Terminal Deoxynucleotidyl Transferase

**TESE:** Testicular Sperm Extraction

**TNP2 :** Transition Protein 2

**UTP :** Uridine triphosphate

**µm:** Micromètre

**%:** Pourcentage

**°C:** Degré Celsius

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : l'appareil génital masculin (coupe sagittale).....	06
<b>Figure 02</b> : coupe transversal du pénis. ....	07
<b>Figure 03</b> : scrotum.....	08
<b>Figure 04</b> : vue antérieure des deux testicules.....	09
<b>Figure 05</b> : coupe sagittale du testicule.....	10
<b>Figure 06</b> : la vésicule séminale.....	13
<b>Figure 07</b> : la prostate.....	14
<b>Figure 08</b> : coupe histologique de tube séminifère.....	15
<b>Figure 09</b> : Schématisation de la spermatogenèse chez l'homme et du contenu chromosomique des cellules au cours des différentes étapes.....	17
<b>Figure 10</b> : Les cellules de la lignée germinale.....	18
<b>Figure 11</b> : Principe de la méiose I avec 4 chromosomes (1/prophase, 2/métaphase, 3/anaphase, 4/télophase).....	20
<b>Figure 12</b> : Principe de la méiose II avec 4 chromosomes (1/prophase, 2/métaphase, 3/anaphase, 4/télophase).....	21
<b>Figure 13</b> : Schéma de la spermiogenèse.....	22
<b>Figure 14</b> : structure de spermatozoïde.....	26
<b>Figure 15</b> : régulation hormonale de la fonction de reproduction chez l'homme.....	29
<b>Figure 16</b> : Orchidomètre de Prader permettant d'évaluer le volume testiculaire en consultation.....	40
<b>Figure 17</b> : Illustrations du spermatozoïde humain normal ou subnormal, considéré comme normal, et rappel des définitions.....	47
<b>Figure 18</b> : Anomalies de taille de la tête des spermatozoïdes humains.....	48
<b>Figure 19</b> : Anomalies de forme et de texture de la tête des spermatozoïdes humains.....	49
<b>Figure 20</b> : Anomalies de la pièce intermédiaire des spermatozoïdes humains. ....	50
<b>Figure 21</b> : Anomalies de la pièce principale des spermatozoïdes humains.....	51
<b>Figure 22</b> : Modèles de l'organisation de la chromatine dans une cellule somatique (zigzag ou solénoïde) et dans une cellule spermatique (doughnut).....	55
<b>Figure 23</b> : des spermatozoïdes immatures colorer au bleu d'aniline.....	57
<b>Figure 24</b> : Principes de la technique TUNEL sur les spermatozoïdes.....	60
<b>Figure 25</b> : Insémination intra utérine.....	62
<b>Figure 26</b> : Les différentes étapes de la fécondation in vitro.....	63

<b>Figure 27</b> : Les différentes étapes d'une injection intra cytoplasmique de spermatozoïdes.....	64
<b>Figure 28</b> : Anomalies morphologiques des spermatozoïdes des patients.....	75
<b>Figure 29</b> : Répartition des patients en fonction De la normalité ou la pathogénicité des résultats du spermogramme et du spermocytogramme.....	76
<b>Figure 30</b> : Distribution de la fréquence des anomalies spermatiques.....	77
<b>Figure 31</b> : Distribution du pourcentage des deux groupes selon le taux de la condensation de la chromatine des Spermatozoïdes des patients.....	79
<b>Figure 32</b> : Observation microscopique des spermatozoïdes colorés au bleu d'aniline GX1000.....	79
<b>Figure 33</b> : Corrélation entre la condensation de la chromatine spermatique et la morphologie des spermatozoïdes.....	81

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Durée de vie moyenne des cellules germinales humaines.....	23
<b>Tableau 2</b> : Les valeurs normales du spermogramme selon les normes de l’OMS 2010.....	43
<b>Tableau 3</b> : Résultats spermogramme et spermocytogramme des patients .....	74
<b>Tableau 4</b> : Résultats globaux des données des spermogrammes et spermocytogrammes .....	76
<b>Tableau 5</b> : Répartition de la fréquence des cas pathologiques.....	77
<b>Tableau 6</b> : Répartition des patients en groupe selon le taux de la condensation de la chromatine des Spermatozoïdes des patients .....	78
<b>Tableau 7</b> : comparaison des paramètres de sperme entre les groupes G1 et G2 .....	80

---

# *Introduction*

---

## Introduction

L'infertilité est définie comme un problème majeur de santé publique, c'est l'incapacité définitive pour un couple à concevoir un enfant, malgré les progrès récents dans le diagnostic précoce et la prise en charge des couples infertiles, la non procréation demeure la première cause de divorce en Algérie. Le pourcentage des couples concernés par des problèmes d'infertilité est estimé à environ 15% et dans 1/3 des cas elle se révèle être d'origine masculine (Martin, 2008). Les statistiques du ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme hospitalière, l'Algérie compte plus de 300.000 couples souffrant d'infertilité, soit 15 % des couples (Hamdi, 2013).

Parmi les principales causes de l'infertilité masculine c'est l'altération quantitative et /ou qualitative du sperme, du plasma séminal ou des spermatozoïdes, comme des oligo et/ou asthénospermies et/ou tératozoospermies, plus rarement une azoospermie. Les causes de ces altérations peuvent être chromosomiques, génétiques ou liées à des altérations de la qualité de l'ADN spermatique

Une perturbation de la condensation de la chromatine et de l'ADN spermatique peut perturber les paramètres standard du sperme (Sivanarayana et al., 2014; Agarwal et Said, 2003).

Les études récentes montrent que les défauts de la chromatine spermatique est dû à de nombreuses raisons, qui sont associées à une diminution des taux de fécondation et des échecs d'AMP (Lewis et al., 2005) et une incidence élevée de fausse couche (Zini et al., 2008). La chromatine spermatique transporte la moitié du matériel génétique vers la descendance et l'intégrité de la chromatine joue un rôle fondamental pour la transmission équilibrée aux générations futures (Pourmasumi et al., 2018).

L'exploration de l'infertilité masculine reste avant tout basée sur l'analyse classique des paramètres du sperme. Néanmoins, d'autres techniques visant à évaluer l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes, et la maturité de la chromatine spermatique viennent aujourd'hui la compléter (Varghese et al., 2009 ; Fellous et Siffroi, 2003 ; Guérin et Benchaib, 2004 ; Hamadehh et al., 2001 ; Sellami et al., 2003 ; Pourmasumi et al., 2019 , Mohammdi et al., 2020 ).

Le bleu d'aniline a une forte affinité pour les résidus lysines des histones nucléaires. La persistance des histones dans le noyau spermatique indique une protamination incomplète de la chromatine spermatique. Les noyaux riches en histones des spermatozoïdes immatures prennent plus le bleu d'aniline tandis que les noyaux riches en protamines des spermatozoïdes matures ne sont pas colorés (Irez et al., 2015; Kim et al., 2013).

De nombreuses études ont montré des corrélations négatives entre les défauts d'intégrité de la chromatine des spermatozoïdes et le potentiel de fertilité masculine (Foresta et al., 1992). Alors que d'autres montrent une bonne association entre la maturité du noyau des spermatozoïdes évaluée par coloration au bleu d'aniline et certains paramètres du sperme d'une part et la capacité de fécondation du sperme et la qualité de l'embryon d'autre part. D'autres rapports ont trouvé que le compactage nucléaire a un caractère prédictif dans l'issue de la grossesse pendant le traitement par AMP (Agarwal et Said, 2003). Ainsi, l'objectif des techniques de sélection des spermatozoïdes appliquées dans les techniques de procréation assistée n'est pas seulement basé sur l'évaluation de paramètres classiques comme la mobilité, la numération et la morphologie des spermatozoïdes, mais implique également d'autres caractéristiques du sperme telles que l'intégrité nucléaire (Sellami et al., 2013).

L'objectif de notre travail a été de mettre en évidence le lien entre la condensation de la chromatine spermatique et les paramètres du sperme dans l'infertilité masculine, pour cela nous avons évalué la maturité de la chromatine des spermatozoïdes chez les hommes normospermiques et des hommes à paramètres spermatiques anormaux en utilisant une coloration au bleu d'aniline.

---

*Revue bibliographique*

---

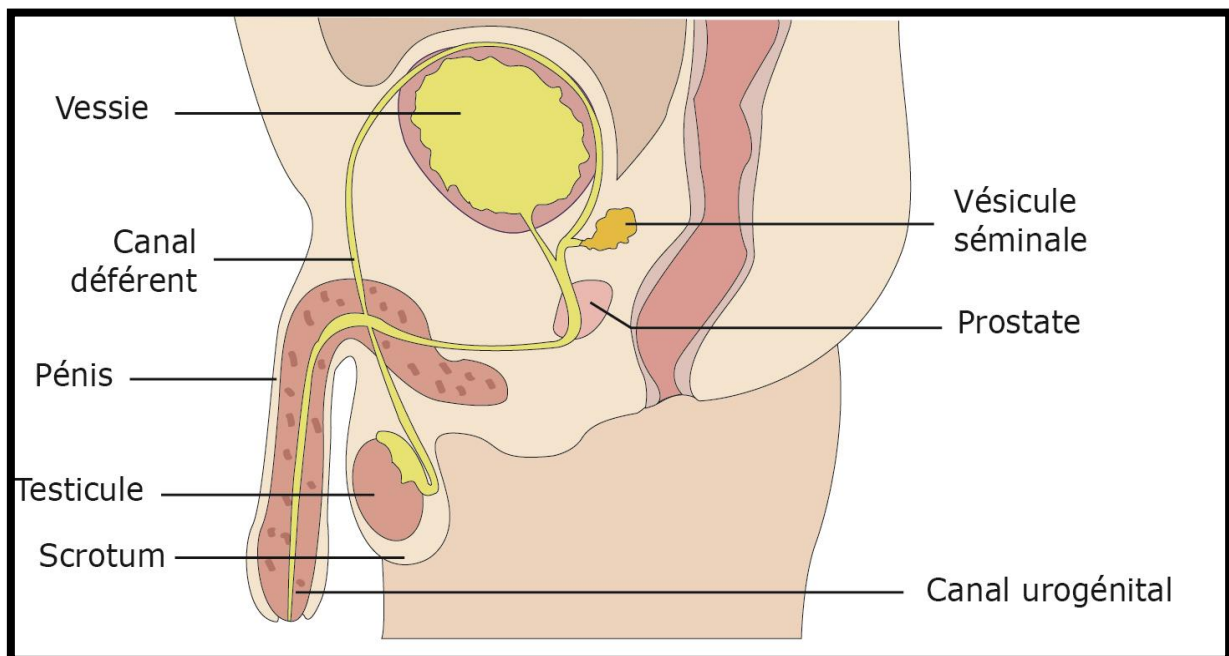
---

# *Chapitre 1 : la fonction génital male*

---

## I. Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur masculin

Les gonades mâle sont les testicules, ils comprennent un système de conduits et sont suspendus dans le scrotum. Une fois sortis des testicules, les spermatozoïdes s'engagent dans une série de conduits qui débouchent à l'extérieur du corps ; ce sont, dans l'ordre, l'épididyme, le conduit déférent, le conduit éjaculateur et l'urètre . À ceux-ci se greffent les glandes sexuelles annexes, soit les vésicules séminales, la prostate et les glandes bulbo-urétrales, responsables de la production de la partie liquide de sperme. Ce dernier est un liquide blanchâtre dans lequel baignent les spermatozoïdes lorsqu'ils sont expulsés, par le pénis, à l'extérieur du corps de l'homme (Oberline et al. ,2004), (Figure 1).



**Figure 01** : l'appareil génital masculin (coupe sagittale)\*

\* <https://www.maxicours.com/se/cours/devenir-homme-ou-femme/>

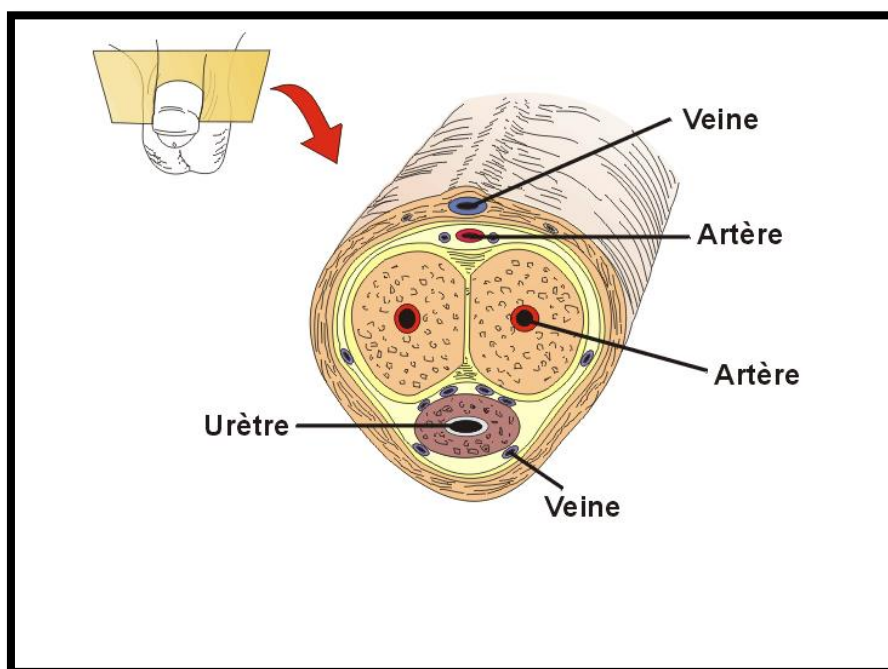
## I.1. Les organes génitaux externes

### I.1.1. La verge ou le pénis

Organe de copulation, il comprend 3 parties qui sont : la racine, le corps, et le gland.

Il est constitué de deux corps caverneux et d'un corps spongieux qui participent à l'érection, il permet aussi l'évacuation non seulement du sperme mais aussi de l'urine.

La vascularisation artérielle est assurée par l'artère honteuse interne qui est une branche de l'artère hypogastrique (Terriou et al. , 2000).



**Figure 02:** Coupe transversal du pénis. (Terriou et al, 2000).

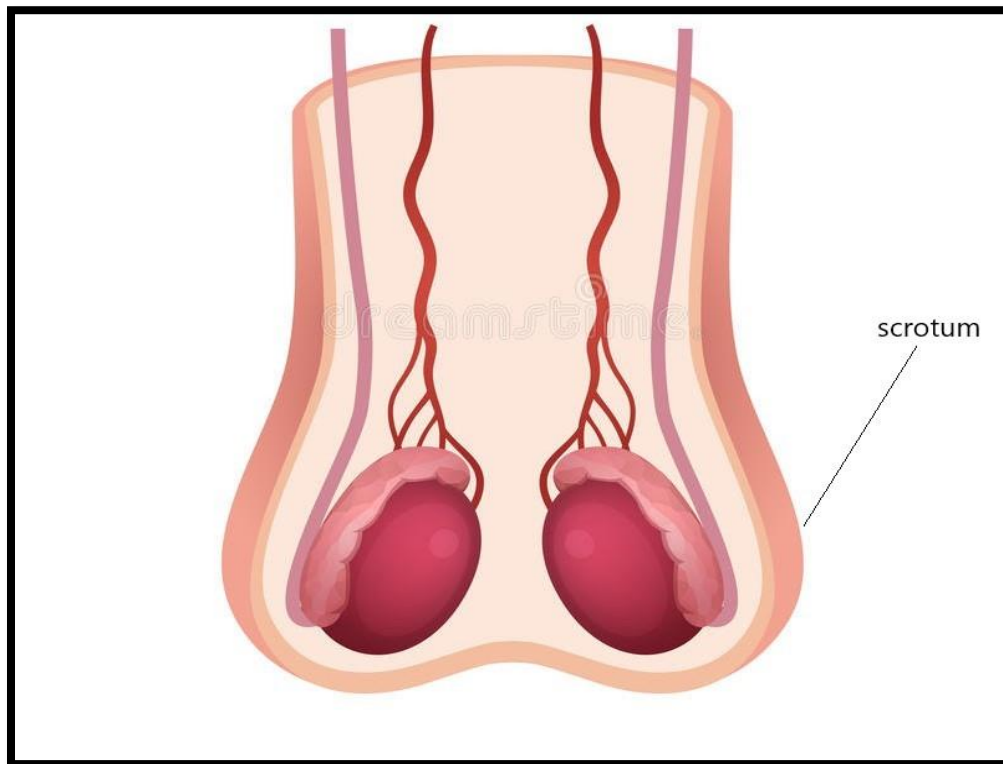
Le drainage veineux est relativement complexe et se fait grâce à 3 systèmes :

- ✓ Le système veineux superficiel qui correspond au territoire de l'artère dorsale de la verge.
- ✓ Le système veineux profond qui intéresse seulement le drainage du sang des corps caverneux.
- ✓ Le système vasculaire postérieur est assuré par les veines caverneuses

### I.1.2. Le scrotum

Le scrotum est un sac fait de peau. Le divise en deux compartiments, chacun soutenant un testicule. Son emplacement et la contraction de certains muscles avoisinants permettent de régler la température des testicules afin d'assurer une production adéquate de spermatozoïdes.

En effet, la production et la survie des spermatozoïdes nécessitent une température inférieure à celle du corps d'environ 3 degrés Celsius. Quand un homme se baigne dans l'eau froide de la mer, son scrotum se rétrécit à cause de la contraction d'un muscle, le dartos, tandis qu'un autre muscle, le crémaster, élève les testicules vers la cavité pelvienne, où ils peuvent absorber la chaleur corporelle, L'exposition à des conditions chaudes renverse le processus (Cabrol et al. , 1979).



**Figure 03 : Scrotum\***

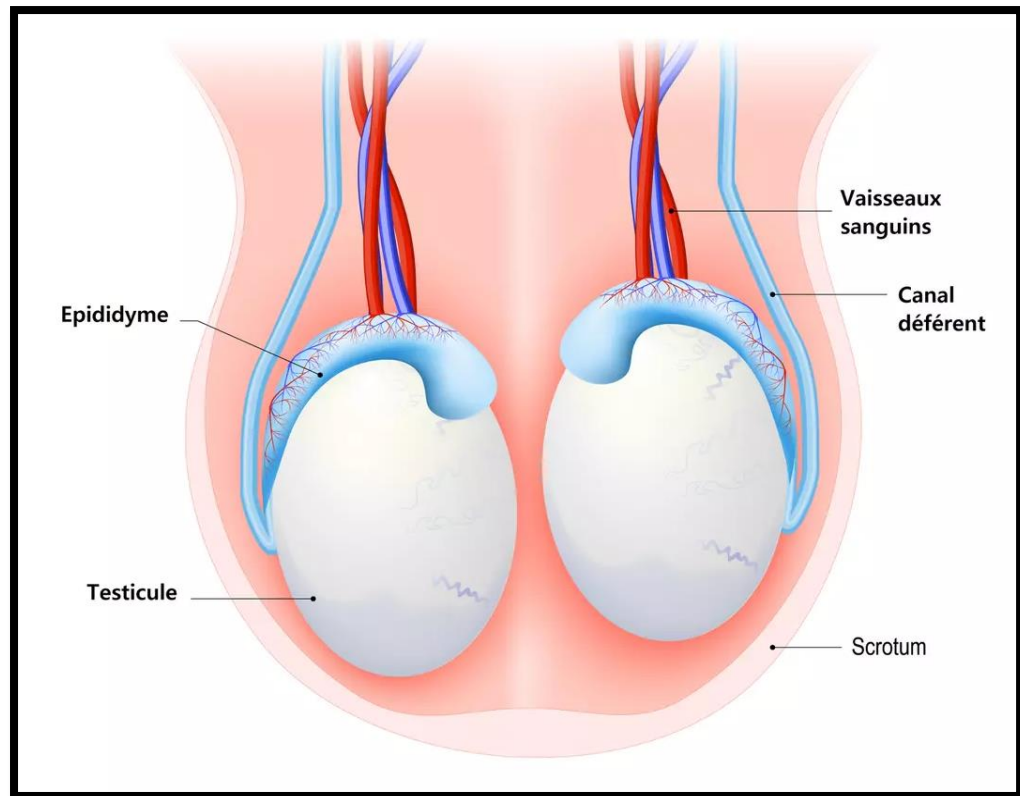
[\\*https://fr.dreamstime.com/illustration-stock-image-masculine-testicules-image96658806](https://fr.dreamstime.com/illustration-stock-image-masculine-testicules-image96658806)

## **I.2. Les organes génitaux internes**

### **I.2.1. Testicule**

Le testicule assure une double fonction, l'une gamétogène se traduisant par la production de spermatozoïdes, l'autre endocrine visant à élaborer les diverses hormones testiculaires et en particulier les androgènes. La fonction gamétogène ou spermatogénèse se déroule à l'intérieur des tubes séminifères qui renferment l'épithélium séminal constitué par les éléments de la lignée germinale et les cellules de sertoli.les espaces intertubulaires contiennent les cellules de leydig qui forment la glande interstitielle, support de l'activité

endocrine. Les échanges entre les tubes séminifères (compartiment tubulaire) et les espaces interstitiels (compartiments interstitiel) sont sous le contrôle d'une barrière structurale interposée entre l'épithélium séminal et le sang : la barrière hémato-testiculaire (Oberline et al. , 2004).



**Figure 04** : Vue antérieure des deux testicules\*

\* <https://sante.journaldesfemmes.fr/fiches-anatomie-et-examens/2557058-testicule-role-schema-symptomes-douleur-maladies/>

#### ➤ Anatomie du testicule

Les deux testicules sont situés dans les bourses, les testicules au nombre de deux sont des organes, producteurs de spermatozoïdes. Ils sont aussi des glandes à sécrétion interne. Chaque testicule a la forme d'un petit œuf aplati transversalement et dont le grand axe est oblique de haut en bas et d'avant en arrière.

Le testicule pèse 20g, mesure 4cm de long, 2,5cm d'épaisseur et 3cm de hauteur.

La consistance est très ferme, on la compare à celle du globe oculaire. Les testicules sont placés au-dessous de la verge dans les bourses. Le testicule gauche descend généralement plus bas que le testicule droit. Une coupe verticale du testicule menée suivant le grand axe

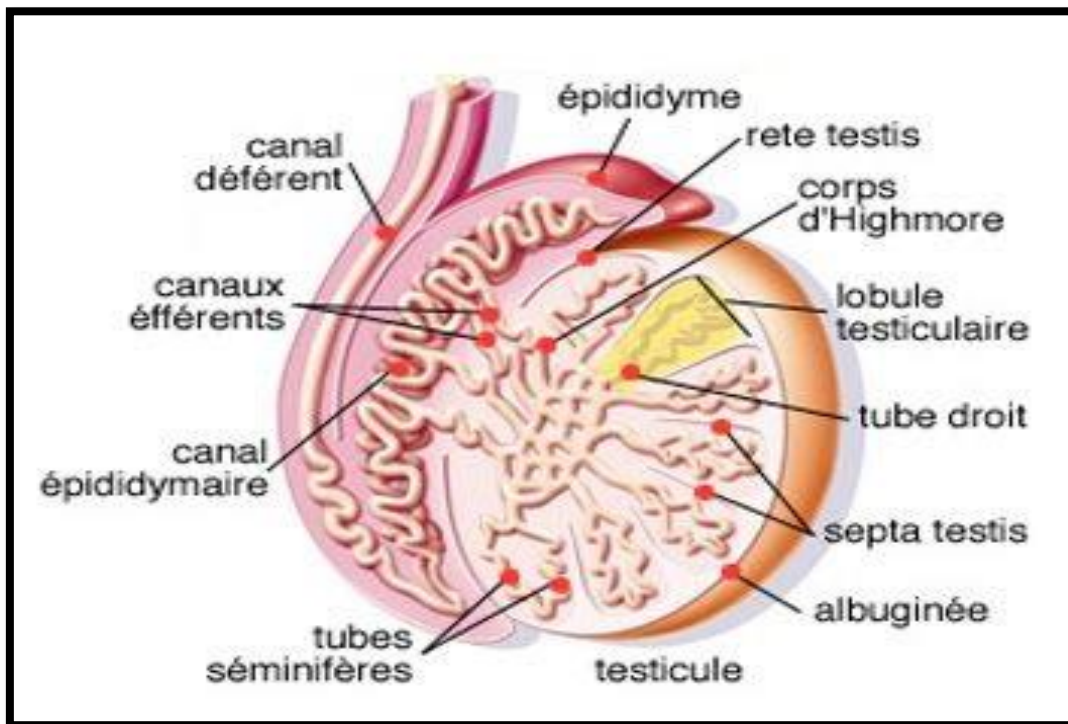
montre que l'organe est entouré d'une membrane fibreuse appelée « albuginée ». Cette membrane est résistante, inextensible et donne au testicule sa coloration blanc-nacrée

On décrit aux testicules :

✓ deux faces : une externe et une interne

✓ deux bords : l'un postéro supérieur et l'autre postéro-inferieur

Le testicule entre en rapport immédiat avec la séreuse vaginale, l'épididyme, le déférent et les divers vaisseaux et nerfs (Blanc et al. , 2002).



**Figure 05** : Coupe sagittale du testicule\*

\*<https://www.pinterest.fr/pin/676525175252055427/>

### I.3. Les voies spermatiques

#### I.3.1. L'épididyme (Figure 5)

L'épididyme (epi: sur; didumos: testicule) est un organe en forme de virgule qui repose sur le bord postérieur de chaque testicule. Sa plus grande partie est le conduit épидидymaire. Un long conduit pelotonné sur lui-même. Star le plan fonctionnel, ce conduit est le siège de la maturation des spermatozoïdes, processus au cours duquel les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité et leur capacité à féconder un ovocyte. La maturation des spermatozoïdes se déroule sur une période de 10 à 14 jours. Le conduit épидидymaire emmagasine les spermatozoïdes

pendant un rapport sexuel. Il favorise l'expulsion de ces derniers dans le conduit déférent par les contractions péristaltiques de ses myocytes lisses.

Les spermatozoïdes peuvent être emmagasinés dans le conduit épидидymaire et y restent viables pendant quelques mois. Tous les spermatozoïdes qui ne sont pas éjaculés dégèrent et finissent par être phagocytés et réabsorbés (Cabrol et al. , 1979).

### **I.3.2. Les cônes efférents (Figure 5)**

Ce sont des canaux pelotonnés sur eux-mêmes qui relient le rete testis au canal épидидymaire. Par l'intermédiaire du rete testis les spermatozoïdes pénètrent dans 12 à 20 canalicules efférents qui représentent la majeure partie de la tête de l'épididyme. Chaque canalicule efférent a une longueur d'environ 20cm mais il se tortille en un petit peloton conique de 2cm dont le sommet commence à la pointe du rete testis et dont la base s'abouche dans le canal épидидymaire. Histologiquement ils sont tapissés par un épithélium reposant sur une membrane basale (Langman. , 1984).

### **I.3.3. Le conduit déférent (Figure1, 5)**

Le canal déférent est un organe pair constitué d'un tube cylindrique qui présente une augmentation de diamètre dans sa terminaison pour former l'ampoule différentielle. Sa longueur moyenne est de 40 cm, son diamètre est de 2 mm sauf au niveau de l'ampoule où il atteint 5 à 6 mm.

Partant de la queue de l'épididyme, il traverse le canal inguinal et la fosse iliaque, puis il se recourbe vers le bas fond vésical ou il se continue par le canal éjaculateur, il présente une dilatation allongée ; l'ampoule du canal déférent ou ampoule différentielle située au-dessus du point d'abouchement des vésicules séminales dans le canal déférent.

Le canal déférent n'est pas une simple voie vectrice du sperme ; la présence des cellules de type glandulaire le rapproche du canal épидидymaire ; il est parcouru d'ondes péristaltiques qui assurent la progression des sécrétions testiculo-épидидymaires.

Quant à l'ampoule du canal déférent, elle apparait comme un réservoir à l'intérieur duquel s'accumule le sperme dans l'intervalle des éjaculations ( Oberline et al. , 2004) .

### **I.3.4. Le conduit éjaculateur**

Long de 2cm sur 1 mm de diamètre, il s'étend du point d'abouchement de la vésicule séminale dans le canal déférent à l'urètre prostatique ; son calibre diminue progressivement de son origine à sa terminaison. C'est un simple conduit vecteur (Langman ,1984).

### **I.3.5. Urètre**

L'urètre est la portion terminale des voies génitales de l'homme, parce qu'il transporte l'urine et le sperme (à des moments différents), l'urètre fait partie à la fois du système urinaire et du système génital. Il se divise en trois parties: (a) la partie prostatique de l'urètre, qui est enveloppée par la prostate; (b) la membranacée de l'urètre, qui se trouve dans le diaphragme uro-génital; et (c) la partie spongieuse de l'urètre (**partie pénienne**), qui passe dans le pénis et s'ouvre sur l'extérieur par le méat urétral. La partie spongieuse de l'urètre mesure à peu près 15 cm elle compte pour environ **75 %** de la longueur totale de l'urètre ( Schlosser et al. ,2006).

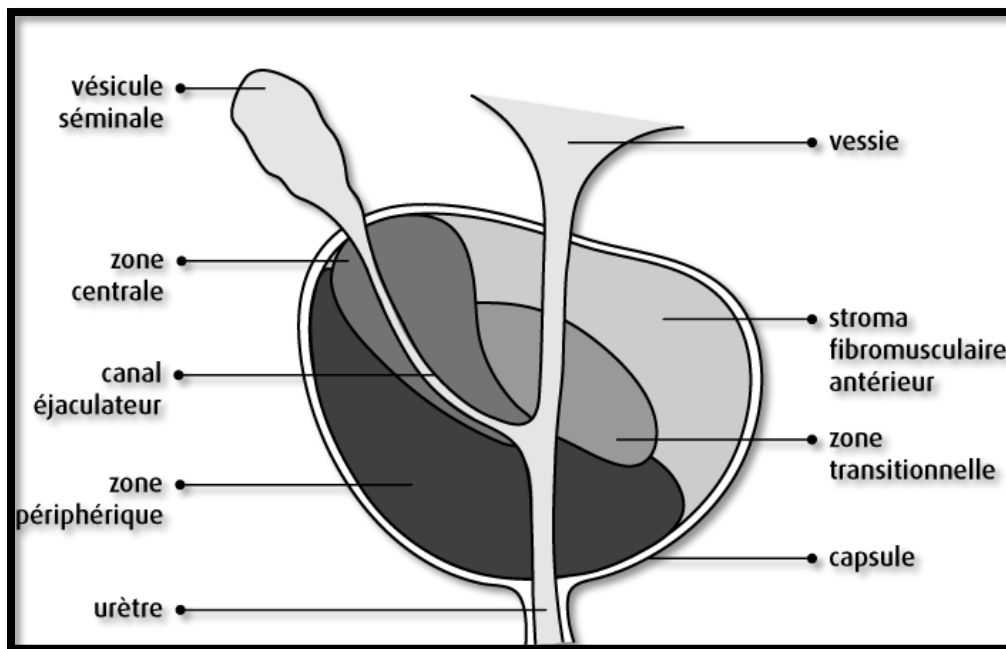
### **I.4. Glande annexes**

Trois glandes sont annexées aux voies excrétrices masculines : les deux vésicules séminales (droite et gauche), la prostate et les deux glandes bulbourétrales ou glandes de Cowper. Ces glandes produisent la majeure partie du sperme.

#### **I.4.1. Vésicules séminales (Figure 1, 6)**

Les vésicules séminales (ou glandes vésiculeuses), sont les deux glandes débouchant dans la prostate située au voisinage de la vessie, produisent plus de la moitié du liquide séminal, mesurant 5 à 10 cm de long, pour un volume de 5 à 10 (Bailleul et al. , 1991).

Les vésicules séminales sécrètent un liquide alcalin de nature visqueuse et de coloration jaunâtre renfermant du fructose ainsi que de l'acide ascorbique. Des protéines jouant un rôle dans la coagulation (spécifiquement la séminogéline et des prostaglandines). Les spermatozoïdes et le liquide séminale se mélangent dans le conduit éjaculateur puis pénètrent dans l'urètre et plus précisément dans sa partie prostatique à l'instant de l'éjaculation (Mauvais. , 1986).



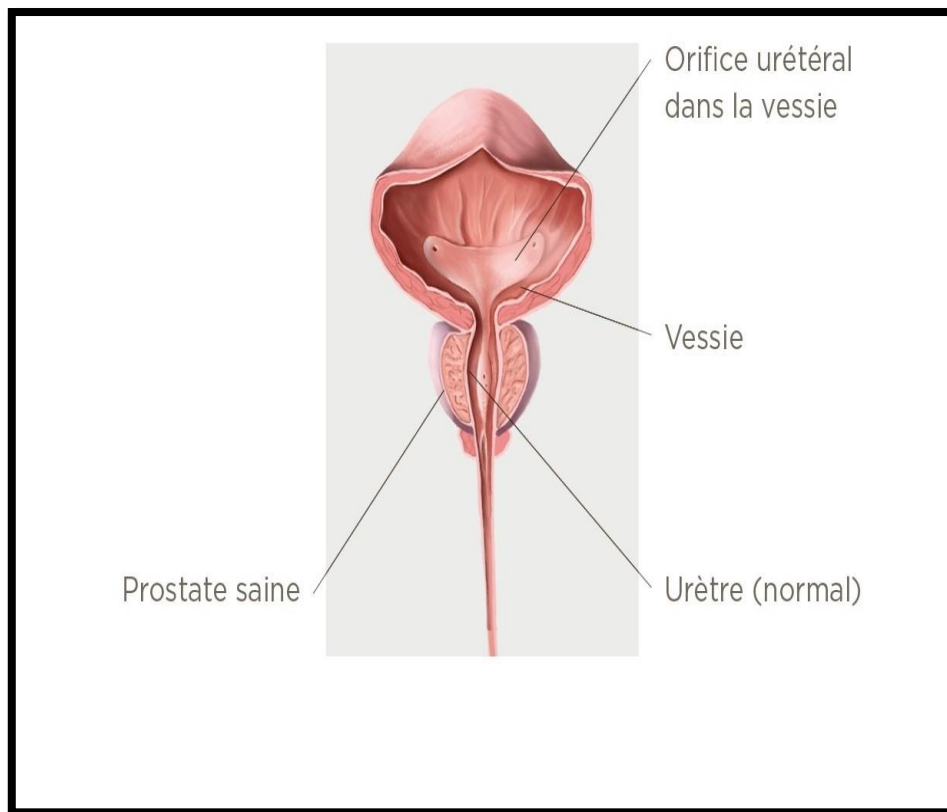
**Figure 06 :** La vésicule séminale. (Société canadienne du cancer, 2017)

#### I.4.2. La Prostate (Figure 7)

La prostate est une glande exocrine de l'appareil génital masculin. Elle est située au croisement des voies génitales et urinaires, ce qui lui confère plusieurs fonctions. Son atteinte compromet la fertilité, l'éjaculation et la miction .

C'est un organe impair et médian, situé sous la vessie, en avant du rectum et entourant la portion initiale de l'urètre. Elle est contenue dans une loge fibreuse ou loge prostatique. Elle a la forme d'une châtaigne d'environ 3 cm de hauteur et 4 cm de large, pour un poids de 15 à 20 g chez l'homme jeune .

C'est un organe impair et médian, situé sous la vessie, en avant du rectum et entourant la portion initiale de l'urètre. Elle est contenue dans une loge fibreuse ou loge prostatique. Elle a la forme d'une châtaigne d'environ 3 cm de hauteur et 4 cm de large, pour un poids de 15 à 20 g chez l'homme jeune( Cartier et al. , 2005) .



**Figure 07** : La prostate\*

[\\*https://blog.hirslanden.ch/fr/2017/10/10/le-depistage-du-cancer-de-la-prostate/](https://blog.hirslanden.ch/fr/2017/10/10/le-depistage-du-cancer-de-la-prostate/)

#### **I.4.3. La glande de Cowper ou glandes bulbo-urétrales**

Au nombre de deux, les glandes bulbo-urétrales ( ou glandes de Cowper ) sont situées derrière la prostate, de part et d'autre de l'urètre membranacé . Ces glandes ont la taille d'un pois. Durant l'excitation sexuelle, Elles sécrètent, dans l'urètre spongieux, un épais mucus translucide qui protège les spermatozoïdes du milieu acide que représente l'urètre de l'homme, en plus de lubrifier sa paroi afin de faciliter le passage du sperme et ainsi réduire le nombre de spermatozoïdes endommagés au cours de l'éjaculation . le muscle lubrifie également l'extrémité du pénis pendant les relations sexuelles (Bujan , 1988 ).

## I.5. Les cellules testiculaires

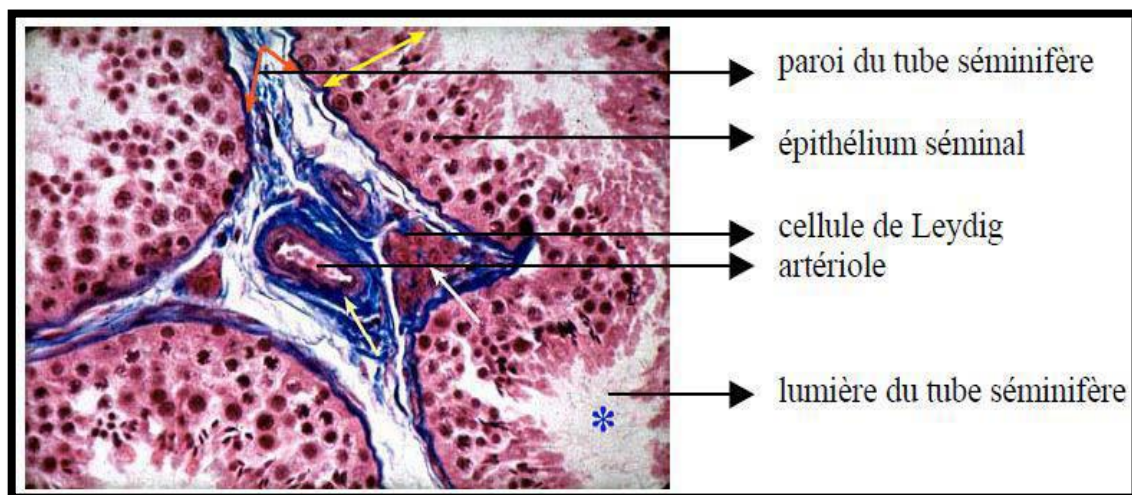
### I.5.1. Tubes séminifères (Figure 8)

Les tubes séminifères contiennent des cellules germinales à différents stades de leur développement ainsi que des cellules somatiques, les cellules de sertoli (Dadoune et Démolin,1991) . Cette association des cellules germinales et de cellules de sertoli forme l'épithélium séminifère (Gérard et al., 1994)

Les cellules germinales sont hautement organisées dans l'épithélium séminifère.

Les cellules moins différenciées sont situées du côté basal du tube séminifère (vers lame basale ) et les cellules les plus matures sont situées du côté apical du tube séminifère ( vers la lumière ) ( Gérard et al., 1994 )

L'épithélium séminifère repose sur la lame basale du tube séminifère. Cette lame basale est constituée de tissus conjonctifs et d'une fine couche de cellules appelées cellules moyide péri-tubulaires. Ces cellules contractiles qui participent à la propulsion et à l'évacuation des spermatozoïdes qui ne sont pas mobiles dans le testicule (Dadoune et Démolinn,1991) .



**Figure 08** : Coupe histologique de tube séminifère. (Blanc et al , 2002)

### I.5.2. Cellules de sertoli

Ce sont des cellules de type épithélial s'étendant depuis la lame basale cernant les tubes séminifères jusqu'à leur lumière. Elles sont unies par des desmosomes, mais ménagent entre elles des interstices dans lesquels sont logées les cellules germinales.

Elles jouent un rôle de soutien et de nutrition vis-à-vis des cellules germinales mais interfèrent aussi avec la fonction endocrine du testicule (Blanc et al, 2002).

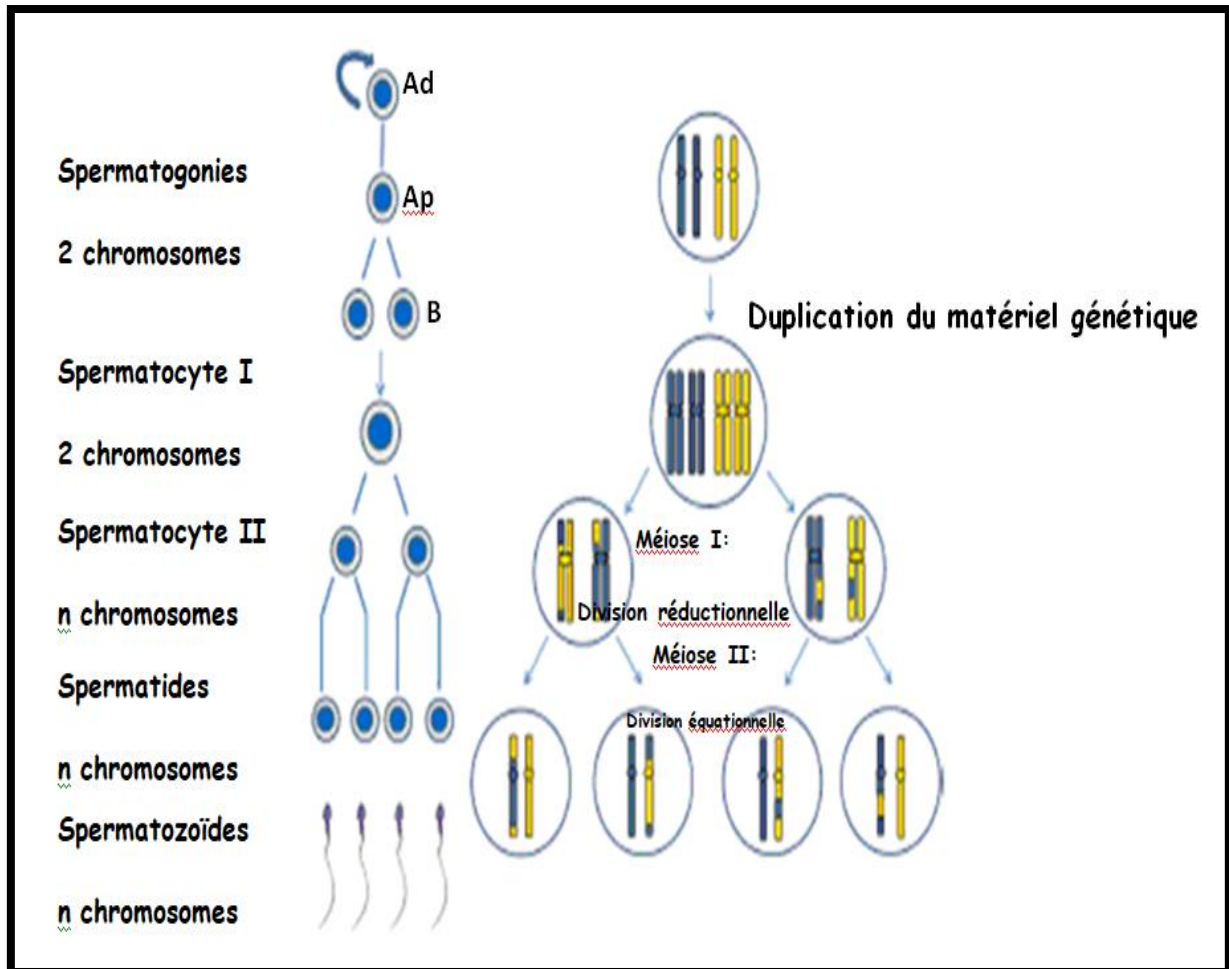
### **I.5.3. Cellules de leydig**

Les cellules de Leydig, situées dans l'espace interstitiel testiculaire, entre les tubules séminifères, assurent la bio synthèse des stéroïdes dont le plus important est la testostérone. Sécrétée dès la sixième semaine de la vie embryonnaire, celle-ci induit directement la différenciation des organes génitaux masculins. Le développement et la fonction des cellules de Leydig sont sous le contrôle de l'hormone gonadotrophine chorionique pendant le début de la vie fœtale puis de la LH (luteinizing hormone) : l'action des deux hormones est relayée par le même récepteur à sept domaines transmembranaires, couplé à l'adénylyl cyclase. Le maintien des récepteurs dépend directement de la LH. La régulation de la synthèse des androgènes par la LH semble modulée par de multiples facteurs, sécrétés au sein du testicule par les cellules de Sertoli et les cellules germinales, variant non seulement au cours de l'ontogénèse mais aussi selon le stade du cycle spermatogénétique dans le tubule voisin (Eric et al.,2013 ) .

## **II. Spermatogénèse**

### **II.1. Origine méiotique des spermatozoïdes**

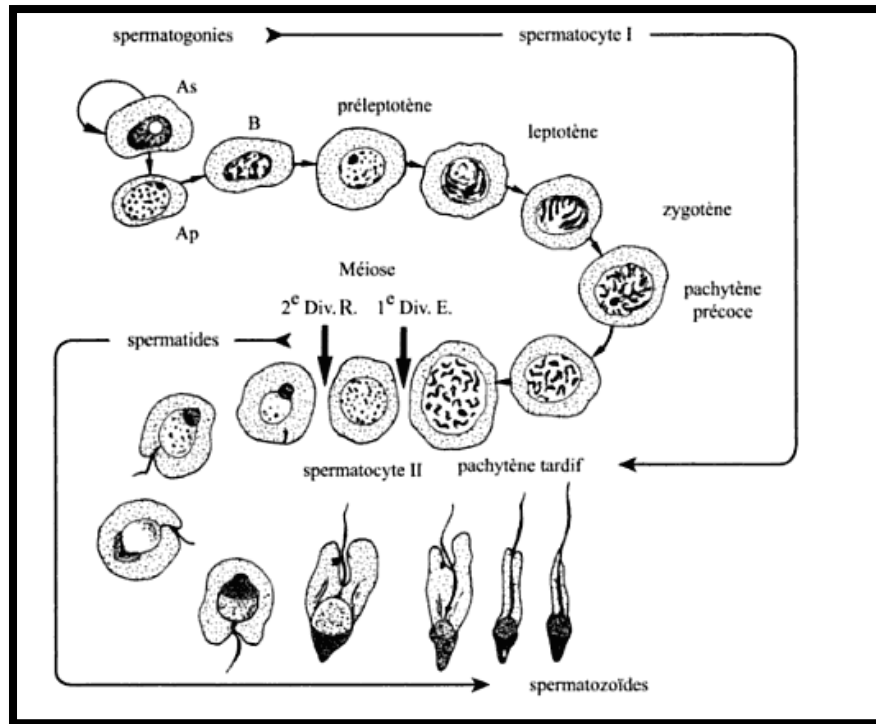
La spermatogénèse (Figure 09) est le processus de différenciation cellulaire qui aboutit à la transformation des cellules germinales en spermatozoïdes. Elle se déroule dans la paroi des tubes séminifères du testicule (Clermont, 1963; Czyba et Montella, 1993; Dadoune et Demoulin, 1991; Hartl et Jones, 2003; Wing-Yee et Yan Cheng, 2008).



**Figure 09** : Schématisation de la spermatogenèse chez l'homme et du contenu chromosomique des cellules au cours des différentes étapes (Perrin A., 2009).

## II.2. Evolution des cellules de la lignée germinale :

Trois types de cellules germinales sont impliqués dans la spermatogenèse : les spermatogonies, les spermatocytes et les spermatides (Figure 10).



**Figure 10** : Les cellules de la lignée germinale (Thibault et Levasseur, 2001).

#### ✚ Les spermatogonies :

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

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

#### ✚ Les spermatocytes :

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

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

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

Ces cellules entrent ensuite dans un processus de division qui n'affecte que les cellules de la lignée germinale, appelé la méiose. Sa finalité est d'assurer le brassage de l'information génétique et la diminution de moitié du contenu en chromosomes de la cellule. Elle consiste en deux divisions successives (méioses I et II), consécutives à une seule phase de réplication d'ADN (Figure 11 et 12). Chacune des deux divisions peut être décomposée, comme la mitose, en 4 étapes distinctes : prophase, métaphase, anaphase, télophase.

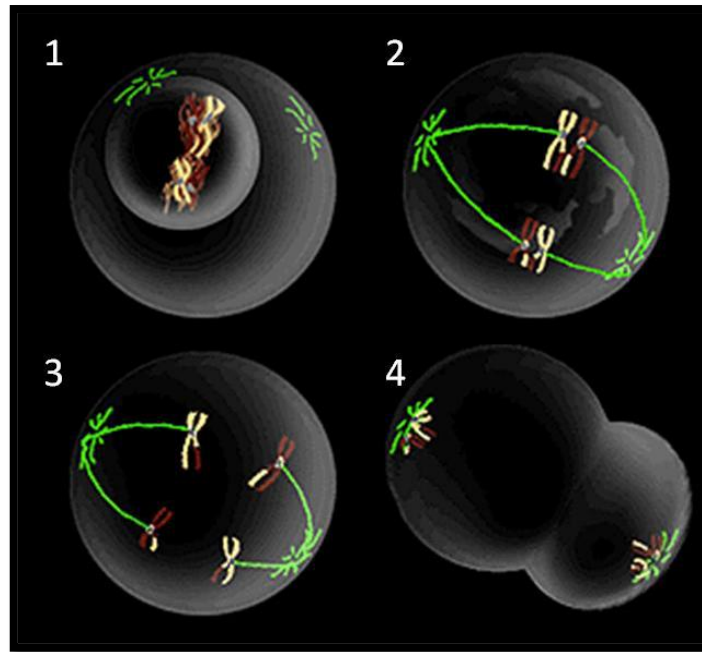
La prophase de méiose I comprend cinq stades successifs : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse. Cette prophase est caractérisée par l'appariement des chromosomes homologues d'origine paternelle et maternelle, avec échange de matériel génétique entre les chromatides homologues au stade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

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

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

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

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



**Figure 11** : Principe de la méiose I avec 4 chromosomes (1/prophase, 2/métaphase, 3/anaphase, 4/téloméphase).

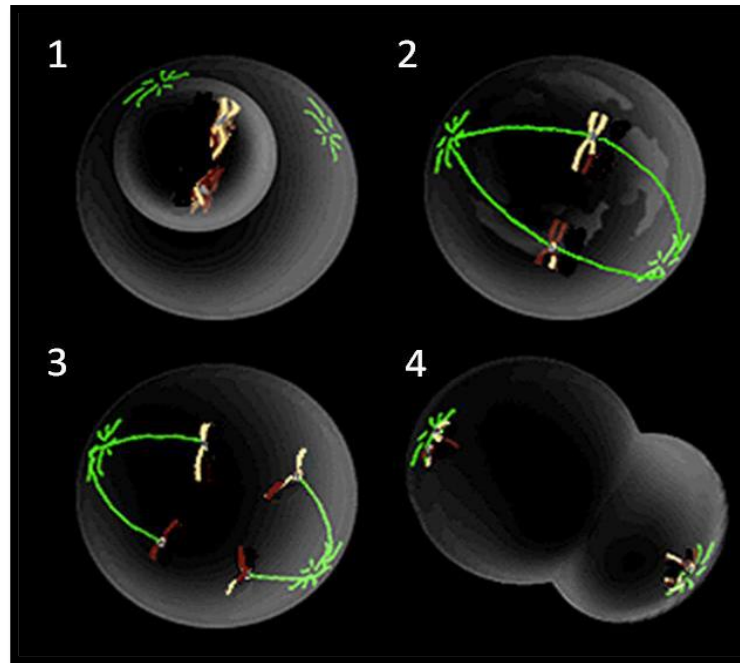
Après une interphase très courte où les chromosomes ne se décondensent que partiellement, les spermatocytes secondaires entrent en deuxième division de méiose, sans réplication d'ADN préalable. La deuxième division est similaire à une mitose somatique normale, à ceci près qu'elle ne porte que sur 23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

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

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

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

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



**Figure 12** : Principe de la méiose II avec 4 chromosomes (1/prophase, 2/métaphase, 3/anaphase, 4/télaphase).

#### ✚ Les spermatides :

La différenciation post-méiotique des spermatides en spermatozoïdes est appelée la spermiogénèse. Chez l'homme, elle dure environ 23 jours, et peut être divisée en 8 étapes (Figure 13).

Les spermatides, localisées près du centre du tube séminifère, sont de petites cellules de 6 à 7  $\mu\text{m}$  de diamètre divisées en trois classes :

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

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

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

La maturation consiste en :

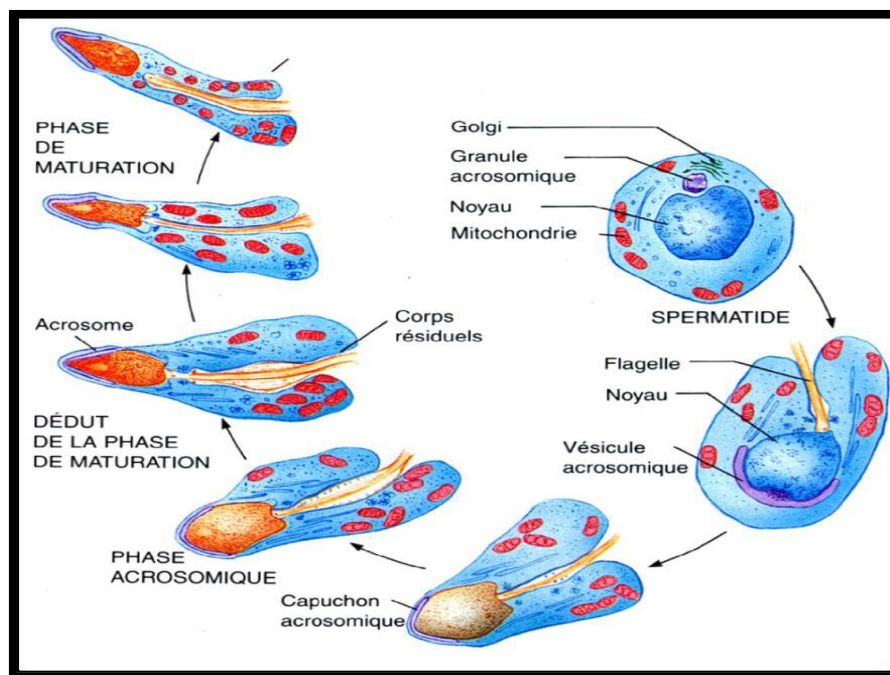
i/ une réorganisation nucléaire, avec élongation et compaction importante du noyau. Cette étape cruciale modifie globalement la structure du génome. Elle sera détaillée plus loin;

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

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

iv/ l'assemblage des structures du flagelle.

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



**Figure 13** : Schéma de la spermiogenèse, adaptée de Marc, 2004.

### II.3. Cinétique de la spermatogenèse :

La production des spermatozoïdes est continue à partir de la puberté grâce au renouvellement des spermatogonies souches Ad et Ap par mitoses. Chez l'homme, les spermatogonies Ap un peu plus différenciées donneraient naissance aux cellules souches de renouvellement ou spermatogonies B, lesquelles entameraient leur différenciation.

La spermatogenèse humaine dure 74 jours. Le cycle spermatogénétique est défini comme la succession chronologique des différents stades de différenciation d'une génération de cellules germinales (depuis la spermatogonie jusqu'au spermatozoïde) (Figure 09). Chacune des étapes du cycle spermatogénétique a une durée constante (Tableau 1).

**Tableau 1** : Durée de vie moyenne des cellules germinales humaines (Faure, 2007).

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

## II.4. Emission des gamètes:

Les spermatozoïdes sont produits et formés dans les testicules, puis suivent leur trajet dans les voies génitales masculines ; ce trajet peut être distingué en deux étapes : intra et extra-testiculaire.

### II.4.1. Transit intra-testiculaire :

Après la production dans l'épithélium séminifère, les spermatozoïdes à l'état immobile sont transportés dans un liquide sécrété par les cellules de Sertoli, le fluide testiculaire (très riche en testostérone), sous l'effet des contractions des tubes séminifères, via les tubes droits, le rete testis (Nguyen M-H, 2015)

### II.4.2. Transit extra-testiculaire

Les spermatozoïdes cheminent des canaux efférents jusqu'au canal épидидymite, où ils peuvent être stockés dans la queue de l'épididyme. A ce niveau-là, les spermatozoïdes subissent encore des modifications pour acquérir leurs fonctions complètes.

En fait, sous l'influence de la carnitine et des facteurs protéiques sécrétés par les cellules épидидymaires, les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité, une propriété essentielle. La mobilité des spermatozoïdes est améliorée successivement dans les trois parties de l'épididyme.

Les spermatozoïdes sont décapités par les modifications de la répartition des protéines, du changement de composition des lipides, de l'intégration de nouvelles protéines d'origine épидидymaire. Toutes ces modifications rendent les spermatozoïdes provisoirement inaptes à la fécondation. Les derniers restes cytoplasmiques sont évacués et libérés dans le liquide épидидymaire, la compaction complète du noyau est achevée, le manchon mitochondrial acquiert sa forme définitive, des modifications des protéines acrosomiales et l'intégration de protéines membranaires intervenant dans la fixation du spermatozoïde à la zone pellucide et à la membrane ovocytaire ont lieu.

Les spermatozoïdes sont stockés dans la queue de l'épididyme et émis hors de l'organisme de manière discontinue, dans le liquide séminal, par éjaculation. Un éjaculat est constitué au moins de 1,5ml de sperme et contient environ 15 millions de spermatozoïdes par ml (selon l'OMS. 2010). Au moment de l'éjaculation, la première partie de l'éjaculat est constituée des sécrétions épидидymaires, des sécrétions prostatiques et des spermatozoïdes ; le premier jet est donc très fécondant. La deuxième partie de l'éjaculat, quant à elle, est constituée des sécrétions des vésicules séminales et est beaucoup plus riche en fructose (Nguyen M-H, 2015).

### **III. Spermatozoïde**

#### **III.1. Morphologie**

Le spermatozoïde est une cellule très allongée (environ 60µm), composée de trois parties : la tête, le col et le flagelle (Figure 14).

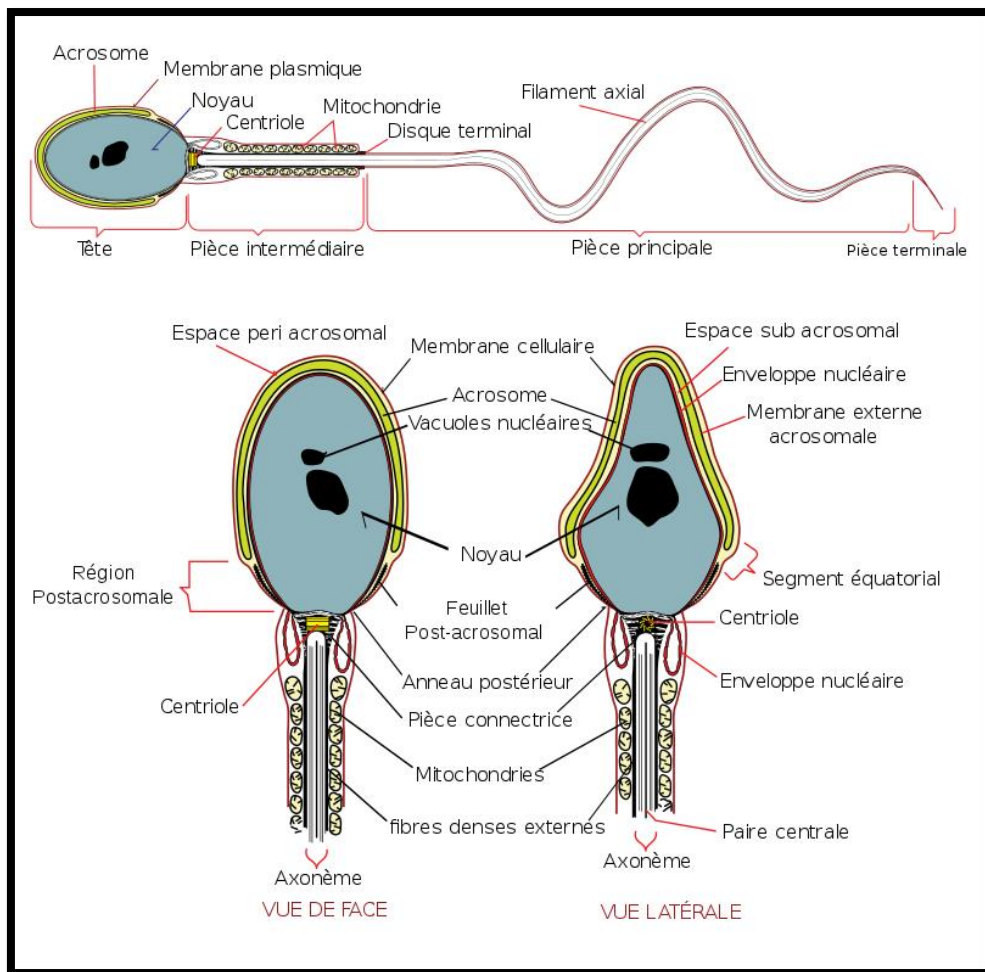
La tête est constituée d'un noyau et d'un acrosome. Le noyau occupe la majorité de la tête, il contient du matériel génétique extrêmement condensé (ADN). L'acrosome est une vésicule aplatie, recouvrant les 2/3 supérieurs du noyau. Il contient de nombreuses enzymes hydrolytiques : glucuronidase, hyaluronidase, phosphatase acide. . . permettant au spermatozoïde de traverser la zone pellucide de l'ovocyte pour le féconder.

Le col est la zone de jonction entre la tête et le flagelle, dans laquelle se trouve un appareil centriolaire et une pièce connective.

Le flagelle se lie avec le col et se divise en trois parties : la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale. Elles ont toutes en commun une structure axiale, l'axonème, tandis que les pièces intermédiaires et principale diffèrent de la pièce terminale par les structures concentriques. Dans la pièce intermédiaire, l'axonème est entouré de mitochondries qui fournissent l'énergie nécessaire à la mobilité du spermatozoïde (Nguyen M-H, 2015).

#### **III.2. Caractéristiques physiologiques**

La mobilité est un caractère essentiel du spermatozoïde. Le mouvement flagellaire est de type ondulatoire, les ondes naissant au niveau du col et se propageant vers l'extrémité selon une fréquence de 10 par seconde. Le déplacement du spermatozoïde est sinusoïdal suivant une direction générale plus ou moins rectiligne. La vitesse du spermatozoïde dépend de l'environnement (liquide s'séminal liquéfié ou non, glaire cervicale, liquide utéro-tubaire). (Nguyen M-H, 2015).



**Figure 14 : Structure de spermatozoïde\***

\*([https://fr.wikipedia.org/wiki/Spermatozo%C3%AFde#/media/Fichier:Complete\\_diagram\\_of\\_a\\_human\\_spermatozoa\\_fr.svg](https://fr.wikipedia.org/wiki/Spermatozo%C3%AFde#/media/Fichier:Complete_diagram_of_a_human_spermatozoa_fr.svg))

La capacité fécondante d'un spermatozoïde dépend de plusieurs facteurs : sa morphologie, sa mobilité, l'équipement enzymatique acrosomial, le degré de condensation de la chromatine, la présence de protéines cytoplasmiques, des caractéristiques membranaires... Dans un sperme, les spermatozoïdes ne sont pas tous féconds.

La vitalité du spermatozoïde est limitée. En fait, dans un sperme maintenu in vitro à 37°C, seulement 20% des spermatozoïdes sont encore vivants au bout de 24h. Dans le tractus génital féminin leur survie est au moins de 48 heures en conservant leur fécondance mais peut être plus longue en perdant progressivement la fécondance (Nguyen M-H, 2015).

Concernant les activités métaboliques, le spermatozoïde est inerte, c'est-à-dire il n'existe pas d'activité transcriptionnelle et traductionnelle à cause d'une chromatine condensée et de l'absence des ARN ribosomiaux. Seule l'activité respiratoire des mitochondries permet au spermatozoïde la mobilité. En regardant l'équipement chromosomique, il y a deux sortes de spermatozoïdes : 23,X et 23,Y. Ils ne peuvent pas être différenciés morphologiquement les uns des autres (Nguyen M-H, 2015).

#### **IV. Régulation hormonale de la fonction de reproduction chez l'homme**

La régulation hormonale (Figure 15) de la production de gamètes et d'hormone sexuelles fait intervenir des interactions entre l'hypothalamus, l'adénohypophyse et les testicules. Ces interactions constituent ce qu'on appelle parfois l'axe hypothalamo-hypophysogonadique.

La séquence d'évènement régulateurs de l'axe hypothalamohypophysogonadique, déroule comme suit :

- 1- L'hypothalamus sécrète la gonadolibérine (GnRH, gonadotropin-releasing hormone), qui est transportée jusqu'à l'adénohypophyse par le sang circulant du système porte hypophysaire. La GnRH régule la libération par l'adénohypophyse de deux gonadotrophines- l'hormone folliculostimulante (FSH, follicule-stimulating hormone) et l'hormone lutéinisante (LH, luteinizing hormone). La FSH et la LH ont été nommées d'après leurs effets sur les gonades femelles.
- 2- La liaison de la GnRH aux cellules hypophysaires entraîne la libération de FSH et de LH dans le sang.
- 3- La FSH stimule indirectement la spermatogénèse en déclenchant la sécrétion d'ABP (androgène-binding protein) par les épithéliocytes de soutien. L'ABP permet le maintien d'une concentration élevée de testostérone près des cellules germinales, qui favorisent la spermatogénèse. La FSH rend donc ces dernières cellules réceptives aux effets stimulateurs de la testostérone.
- 4- La LH se lie aux cellules interstitielles du tissu conjonctif lâche qui entoure les tubules séminifères contournés et les pousse à sécréter la testostérone. Les cellules interstitielles sécrètent aussi un peu d'estrogènes.
- 5- L'augmentation locale des concentrations de testostérone est le facteur qui déclenche finalement la spermatogénèse.

6- La testostérone qui entre dans la circulation sanguine produit plusieurs effets dans d'autres régions de l'organisme. Elle stimule la maturation des organes sexuels, le développement et le maintien des caractères sexuels secondaires et la libido.

7- L'augmentation des concentrations de testostérone déclenche une boucle de rétro inhibition qui inhibe la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus et agit directement sur l'adénohypophyse pour inhiber la libération de FSH et de LH.

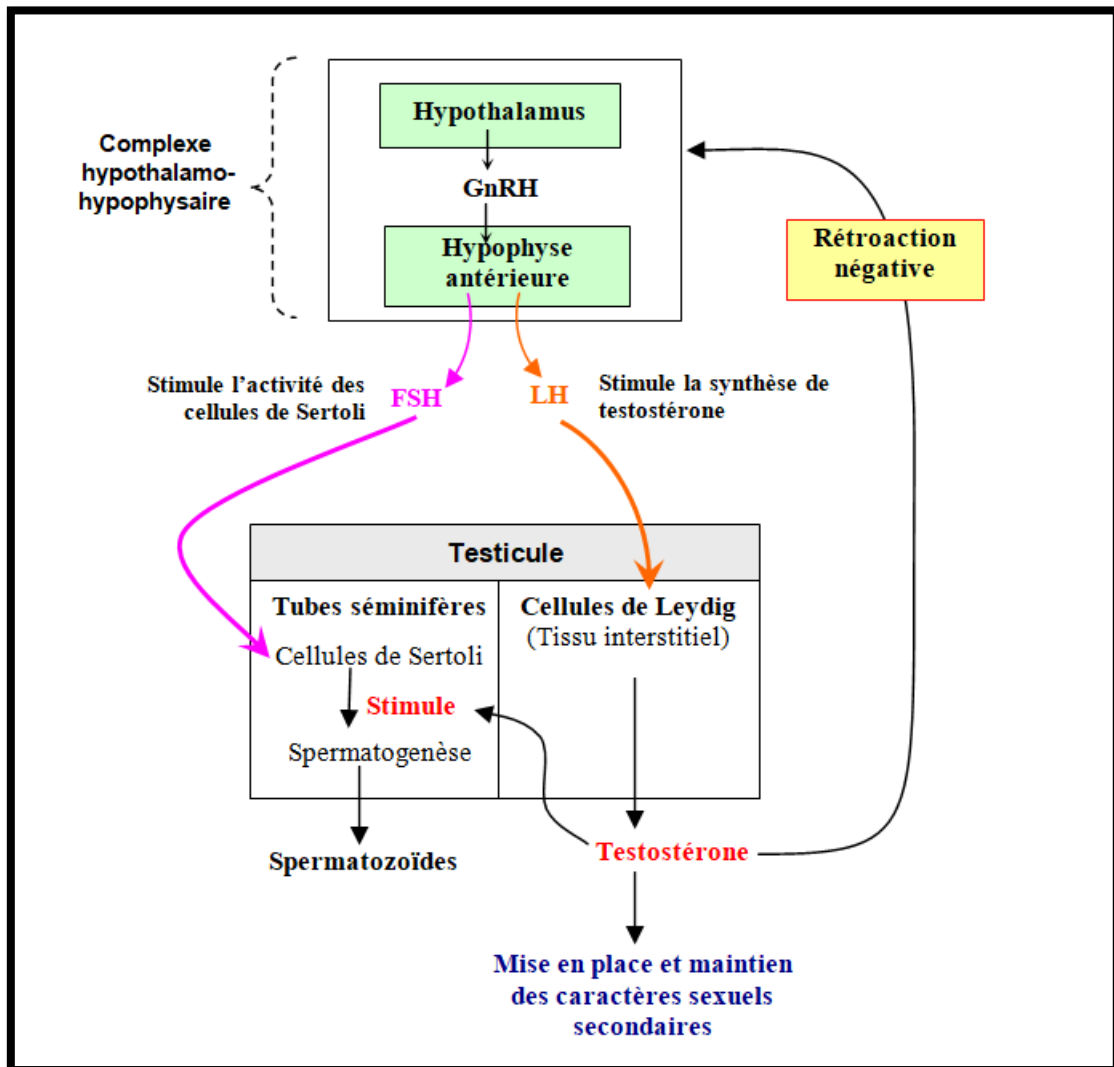
8- L inhibine est une hormone protéique sécrété par les épithéliocytes de soutien.

La concentration de cette hormone constitue un indicateur de l'état de la spermatogénèse. Lorsque la numération des spermatozoïdes est élevée, la sécrétion d'inhibine augmente, ce qui inhibe directement la libération de FSH par l'adénohypophyse et de GnRH par l'hypothalamus. Quand la numération des spermatozoïdes est devenue inférieure à 20 millions par millilitre, la sécrétion d'inhibine baisse fortement et la spermatogénèse reprend

La quantité de testostérone et le nombre de spermatozoïdes produits par les testicules reflètent un équilibre entre les trois groupes d'hormone qui forment l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique: (1) la GnRH, qui stimule indirectement les testicules par l'intermédiaire de son influence sur la libération de FSH et de LH; (2) la FSH et la LH, qui stimulent directement les testicules; (3) les hormones sexuelles (testostérone et inhibine), qui exercent une rétro-inhibition sur l'hypothalamus et l'adénohypophyse. Une fois cet équilibre établi au cours de la puberté (ce processus dure environ trois ans), la quantité de testostérone et de spermatozoïdes produits demeure relativement stable tout au long de la vie. Parce que l'hypothalamus est également influencé par d'autres régions du cerveau, tout l'axe cérébrotesticulaire est régi par le SNV. En l'absence de GnRH, de FSH et de LH, les testicules s'atrophient et la production de spermatozoïdes et de testostérone s'arrête (Eric et al. 2013).

Le développement des organes génitaux de l'homme dépend de la sécrétion prénatale des hommes males. Durant quelques mois après sa naissance, le bébé de sexe masculin présente des concentrations plasmiqes de FSH, de LH et de testostérone presque égales à celles du garçon qui est au milieu de la puberté. Peu après, la concentration sanguine de ces hormones diminue et demeure basse tout au long de l'enfance. A l'approche de la puberté, le seuil d'inhibition de l'hypothalamus augmente, et il faut des concentrations de testostérone beaucoup plus élevées pour réprimer la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus, Plus la sécrétion de GnRH augmente, plus les testicules sécrètent de testostérone, mais le seuil

d'inhibition de l'hypothalamus continue d'augmenter jusqu'à ce que soit atteint le mode d'interaction hormonale de l'adulte, lequel se manifeste par la présence de spermatozoïdes matures dans le sperme (Eric et al. 2013).



**Figure 15 :** Régulation hormonale de la fonction de reproduction chez l'homme (Schlosser et al., 2007)

---

*Chapitre 2: Exploration de l'infertilité  
masculine*

---

## I. Généralité

L'infertilité est définie par l'OMS comme l'incapacité à engendrer une grossesse après un an de rapports sexuels réguliers non protégés. Cette incapacité est rapportée au fait que les facteurs cliniques et biologiques nécessaires pour parvenir à une grossesse ne sont pas réunis chez l'un ou l'autre des partenaires. L'infertilité est, à tort, souvent confondue avec l'infécondité, qui désigne plus un état : celui de ne jamais avoir été impliqué dans l'obtention d'une grossesse ou la naissance d'un enfant. Le terme d'infertilité ne peut donc être employé que s'il existe une preuve de l'existence d'un facteur ou un ensemble de facteurs compromettant l'obtention d'une grossesse. Elle représente un problème de santé publique qui concerne 10 à 15% des couples (Boivin et al., 2007).

## II. Définition de l'infertilité masculine

Est l'incapacité pour un homme d'assurer une procréation du fait d'une défaillance des paramètres spermatiques, ce qui établit de façon significative la différence biologique entre population fertile et infertile (Pontonnier et al., 1993).

✓ On décrit deux types d'infertilité masculine :

**L'infertilité primaire** : c'est l'absence de grossesse après un minimum d'un an de rapports sexuels non protégés chez une femme qui n'a jamais eu de grossesse.

**L'infertilité secondaire** : c'est l'absence de grossesse après un minimum d'un an de rapports sexuels non protégés chez une femme qui a déjà eu une grossesse.

### II-1- Facteurs impliqués dans l'infertilité masculine

En dehors des causes connues de l'infertilité masculine de nombreuses études ont démontré l'implication de différents facteurs liés à l'environnement et aux conditions de vie :

#### a- Age

On sait qu'après 35 ans, la fertilité de la femme décline fortement. Le déclin de la fertilité des hommes avec l'âge est une question encore mal comprise.

Le taux de paternité chez les hommes de plus de 35 ans est en augmentation de 16% selon une étude américaine menée de 1980 à 1995 (Wagner, 2004).

La dégradation de la fertilité chez l'homme n'est pas un processus obligatoire contrairement au phénomène d'arrêt brutal des fonctions gonadiques rencontré chez la femme. Il n'y a pas de limites physiologiques aux fonctions de reproduction chez l'être masculin.

Cependant, cette fertilité qui apparaît constante et continue semble ne pas rester à son maximum tout au long de la vie d'un homme. Un âge paternel supérieur à 40 ans est un facteur de risque clé pour l'infertilité tout comme l'âge maternel élevé (Larochebrochard et al., 2003)

Une méta-analyse regroupant 20 études s'étendant de 1980 à 1999 (Kidd et al., 2001) a mis en évidence une diminution du volume spermatique avec l'âge. On note ainsi la survenue d'une hypospermie qui peut être significative après 50 ans. A cela peut s'ajouter une diminution de la mobilité spermatique. Celle-ci diminuerait de 0,6% par an (12% de 30 à 50 ans). Enfin, le taux de tératospermie peut également augmenter avec l'âge : plus 0,9% par an (18% de 30 à 50 ans) (Auger et al., 1995).

### **b- Exposition**

On sait depuis longtemps que les expositions à certaines substances que ce soit dans la vie quotidienne ou dans la vie professionnelle diminuent la fertilité masculine :

#### **b-1-La chaleur**

Fonction principale du scrotum est réputée être de maintenir les testicules à une température légèrement inférieure à celle du corps. La température scrotale et en reflet, celle du testicule, est inférieure d'environ 3 à 4°C par rapport à la température centrale corporelle eutherme soit 33°C (Sharpe et Irvine , 2004).

Celle-ci est physiologiquement nécessaire pour assurer une bonne spermatogénèse. Plusieurs études ont montré qu'une augmentation de 1,8 à 5,2°C de la température des testicules a des effets négatifs sur la spermatogénèse, qu'elle ralentit voire bloque.

De nombreux métiers (boulangers, chauffeurs, soudeurs) augmentent les risques d'hypofertilité d'une part et d'autre part le port de sous-vêtements serrés en tissu synthétique, l'utilisation d'un ordinateur portable posé sur les cuisses (qui augmente la température des testicules de 4,6 à 5,2°C en une heure) et la prise de bain très chauds (qui a été longtemps utilisée en Inde comme méthode de contraception masculine) sont eux aussi mis en cause. Une étude rétrospective faite en France a relevé que le temps mis par des couples fertiles à concevoir était long, puisque ces hommes conduisaient 3heures par jour (Bujan et al., 2000). Les pyrexies aiguës entraînent des oligoasténospermies transitoires c'est la raison pour laquelle on demande généralement le spermogramme 03 mois après un épisode fébrile.

#### **b-2- Perturbateurs endocriniens**

Le développement de l'industrie chimique exposerait la population à des substances chimiques a des effets oestrogéniques ou anti-androgéniques. On sait depuis longtemps que les expositions de certaines professions aux pesticides (agriculteurs) ou aux éthers de glycol

(peintres) diminuent la fertilité masculine. Cependant, on considère que ces molécules auraient des effets sur la fertilité de la population générale à des doses environnementales (Ravel et al., 2009).

De nombreuses études, résumées par ( Garlantézec et Multigner , 2012) citent les principaux agents incriminés :

**b-2-1- Les métaux lourds** ou l'on retrouve une augmentation du délai nécessaire pour concevoir (DNC) pour les couples dont l'homme est exposé. En termes de qualité de sperme, ont été mises en évidence une diminution de la concentration en spermatozoïdes (oligospermie), une diminution de leur mobilité (asthénospermie) en cas d'exposition au plomb et une augmentation des anomalies morphologiques des gamètes (téatospermie) en cas d'exposition au cadmium. L'ensemble de ces perturbations des paramètres spermatiques a été détecté pour des niveaux sanguins circulants jusque là considérés comme inoffensifs.

**b-2-2- Les pesticides** dans leur ensemble entraînent les mêmes types d'anomalies. L'étude (Sallemen et al., 2003) s'intéresse essentiellement et appui la responsabilité sur les pyréthriinoïdes, les carbamates et les organophosphorés. Les insecticides tel que le Fenvalerate ou encore le carbaryl sont également cités dans d'autres études.

**b-2-3- Les solvants** ont les mêmes conséquences. On pourra citer les éthers de glycols, les solvants pétroliers, le diméthylformamide ou encore le disulfure de carbone.

Il a été remarqué que l'exposition des hommes à ces familles de toxiques entraînait une diminution de production de testostérone (notamment pour l'exposition aux pesticides) et des autres hormones type LH, progestérone et œstradiol. On décrit également des malformations génitales (hypospadias et cryptorchidie) chez les garçons nés d'un parent exposé.

### **c- Au tabac**

La fumée de cigarette contient plus de 4000 composants parmi lesquels on peut citer le monoxyde de carbone, des alcaloïdes comme la nicotine, des hydrocarbures polyaromatiques, des métaux lourds comme le cadmium. La cotinine, 20 métabolite de la nicotine, se retrouve. On en déduit donc un passage actif de ce métabolite à travers la barrière hémato-testiculaire depuis les artères testiculaires vers les tubes séminifères. Ceci peut aisément expliquer les anomalies présentes sur les spermogrammes des patients fumeurs. On note une tendance à l'oligospermie et une diminution relative de la vitalité des spermatozoïdes. La mobilité spermatique semble être altérée comme la morphologie des gamètes qui apparaissent microcéphales (Sepaniak et al., 2004).

Une spécificité supplémentaire du tabac par rapport aux autres toxiques, au-delà de l'altération des paramètres spermatiques, est une atteinte nucléaire des spermatozoïdes sous la

forme d'une fragmentation de leur ADN. Le liquide séminal des fumeurs est appauvri en substances anti-oxydantes comme l'acide ascorbique et le tocophérol ; ce qui réduit les défenses déjà faibles du matériel génétique des gamètes. Il se crée alors un stress oxydatif par l'émergence de radicaux libres. La membrane cytoplasmique et l'ADN sont alors lésés. Ayant une faible capacité de réparation, cet ADN abîmé peut se transmettre au zygote. Une étude (Zenzes et al . , 1995) a même suggéré que la transmission d'altérations nucléaires était plutôt paternelle. Cela avec de graves conséquences pour la descendance chez laquelle une relation entre tabagisme paternel et survenue de cancer (leucémies aiguës, lymphomes, tumeurs cérébrales ) a été mise en évidence par une étude réalisée par( Ji et al . , 1997) sur des enfants de 0 à 5 ans de pères fumeurs uniquement.

Cette dernière observation, associée à toutes les autres pathologies engendrées par l'intoxication tabagique, pousse au sevrage radical chez l'ensemble de la population hypofertile ou non en sachant que les effets sur la spermatogénèse ne sont complètement réversibles qu'après deux ans suivant l'arrêt de la consommation.

#### **d- L'alcool et aux diverses drogues**

La consommation excessive et prolongée de ces types de produits entraîne comme dans le cadre du tabac des perturbations significatives de la fonction de reproduction chez l'homme. L'alcool a des effets néfastes sur la spermatogénèse car il inhibe la synthèse de testostérone. D'autre part, la consommation de plusieurs drogues telles que le cannabis, l'héroïne ou encore la cocaïne peut être à l'origine d'asthénospermie voire de tératospermie (Hamamah et Barthelemy, 1997 ).

#### **e- Les médicaments**

Les médicaments peuvent exercer une action à différents niveaux : l'aspect qualitatif ou quantitatif du sperme, la libido, l'érection et l'éjaculation (Olivennes et al . , 2006) :

- Inhibition hypophysaire : testostérone, analogues GnRH, stéroïdes anabolisants.
- Effets anti-androgéniques : cimétidine, spironolactone.
- Anéjaculation : antidépresseurs, phénothiazines, bétabloquants.
- Dysfonctionnement érectile : bétabloquants, diurétiques thiazidiques, metoclopramine, hypocholestérolémiants, anxiolytiques, antidépresseurs, antiépileptiques.
- Altération qualitative ou quantitative de la spermatogénèse : nitrofuranes, salazopyrine, kétoconazole, médicaments anticancéreux (alkylants)

- Trouble de la libido : antidépresseurs (IMAO, ISRS, tricycliques), neuroleptiques (sulpiride), thymorégulateur (lithium), bêta-bloquants, diurétiques, antiépileptiques et anxiolytiques (Hazard et al., 2000).

### **III. Etiologie de l'infertilité masculine**

Les infertilités masculines ont différentes causes. Elles peuvent être pré-testiculaires (hypogonadisme hypogonadotrope), post-testiculaires (le plus souvent un obstacle empêchant l'évacuation des spermatozoïdes en dehors du testicule), ou être le résultat d'une maladie testiculaire ou d'un trouble érectile ou éjaculatoire. Dans certains cas, aucune cause anatomique n'est retrouvée, on parle alors d'infertilité idiopathique (Young, 2016).

#### **III-1- Les causes pré-testiculaires**

Les causes d'infertilités pré-testiculaires sont majoritairement liées à un Hypogonadisme hypogonadotrope, c'est-à-dire une diminution de la synthèse des hormones sexuelles due à une diminution de la sécrétion des hormones gonadotropes LH et FSH (Roz et al., 2009).

Cette diminution de synthèse des hormones sexuelles entraîne une altération de la production de spermatozoïdes (Roz et al., 2009). Un hypogonadisme hypogonadotrope doit être évoqué devant une azoospermie ou une oligospermie (Roz et al., 2009). Il existe plusieurs étiologies d'hypogonadisme hypogonadotrope comme des mutations de gènes responsables de la stimulation de l'axe gonadique, l'adénome à prolactine, certains médicaments ou produits comme les anabolisants parfois utilisés par les sportifs (Valdezsocin, 2014).

#### **III-2- Les causes testiculaires**

Les causes testiculaires sont les plus fréquentes et associent une atteinte qualitative et quantitative des spermatozoïdes. L'origine des modifications peut être chromosomique, lésionnelle, infectieuse ou endocrinienne (Foresta et al., 2001).

##### **➤ Causes chromosomiques**

Parmi les causes chromosomiques on retrouve le syndrome de Klinefelter, aneuploïdie caractérisée par un chromosome sexuel X supplémentaire. Ce syndrome entraîne une augmentation des taux de gonadotrophines donc un taux de testostérone faible (Plotton et al., 2010). Un développement insuffisant du pénis et du scrotum, une descente incomplète des testicules ainsi qu'une azoospermie ou une oligospermie sévère (Rock et al., 2014). Près de

11% des hommes présentant une azoospermie souffrent d'un syndrome de Klinefelter (Plotton et al. ,2010).

L'infertilité est en partie expliquée par le chromosome X surnuméraire qui entraîne une apoptose et une altération du renouvellement des spermatogonies (young, 2016).

On distingue aussi des lésions génétiques dont les micro-délétions du chromosome Y, seconde cause génétique responsable d'infertilité masculine (Masoudi et al. ,2016). Une micro-délétion au niveau du bras long du chromosome Y, où se situe la région AZF (facteur d'azoospermie), est à l'origine d'une azoospermie ou d'une oligospermie (young, 2016). La région AZF peut être divisée en 3 locus : **AZFa**, **b** et **c**, contenant de nombreux gènes impliqués dans la spermatogénèse. Les délétions les plus fréquentes concernent le locus AZFc, codant pour le gène DAZ (Delete in AZoospermia) (young, 2016). Cependant aucune corrélation claire n'existe entre la localisation de la délétion et le phénotype clinique (Foresta et al. ,2001).

D'après l'étude réalisée par Foresta et al. en 2001 chez 185 patients stériles, les délétions du chromosome Y entraînent fréquemment une azoospermie (84,3%), une oligospermie sévère (14,1%) ou une oligospermie modérée (1,6%). Ces micro-délétions sont à l'origine d'une perte importante des cellules de la lignée germinale (Foresta et al. ,2001).

Le chromosome Y est responsable de la formation des testicules et de la spermatogénèse, grâce au gène SRY (sex-determining region Y ou région déterminant le sexe), qui est un facteur de détermination testiculaire (TDF) (Tachdjian, 2017). En effet on observe un inversement du phénotype et une infertilité chez les femmes dont le caryotype est 46,XY (délétion du gène SRY) ou chez des hommes au caryotype 46,XX (présence d'un fragment Y par duplication du gène SRY sur le chromosome X paternel) (Poulat, 1992).

Des mutations sur d'autres gènes comme le SRD5A2 qui code pour la 5-  $\alpha$  -réductase peuvent entraîner des troubles du développement sexuel et une insensibilité aux androgènes. Le déficit en 5-  $\alpha$  -réductase est un trouble autosomique récessif, empêchant la conversion de la testostérone en DHT. Les hommes atteints de cette pathologie ont des organes externes incomplètement virilisés, des anomalies au niveau des vésicules séminales et de la prostate, entraînant une infertilité (Hsieh, 2010).

➤ **Lésions testiculaires**

Les lésions testiculaires font partie des causes d'infertilité masculine acquise. On recense des lésions congénitales comme la cryptorchidie ou les dysgénésies gonadiques. La cryptorchidie est une malformation due à un défaut de migration du testicule de l'abdomen dans la bourse durant la vie fœtale (Hsieh, 2010). La descente du testicule est régulée par une protéine appelée insulin-like 3 (INSL3), analogue de l'insuline, qui est sécrétée par les cellules de Leydig lors de la vie fœtale (Bay et al. ,2011). Une mutation de cette protéine ou de son récepteur LGR8, récepteur couplé à une protéine G, engendre une cryptorchidie. Cependant les patients atteints de cryptorchidie n'ont pas obligatoirement une mutation d'INSL3. Il semble que de nombreuses étiologies peuvent être retrouvées : des mutations sur des gènes codant des hormones importantes pour la spermatogénèse, des anomalies cytogénétiques et des causes environnementales. Des études étiologiques sont en cours, puisqu'il semble que la cause de cryptorchidie reste inconnue pour de nombreux patients (Ravel et al. ,2007). Les garçons atteints de cette malformation, naissent avec un nombre de cellules germinales réduit, ce qui entraîne un risque d'infertilité ultérieur. D'après l'étude rétrospective de cohorte de Cortes et al. en 2001, les hommes atteints de cryptorchidie unilatérale ont un risque de stérilité de 10%, c'est pourquoi une chirurgie réparatrice est recommandée le plus tôt possible (Cortes et al. ,2001) .

➤ **Infertilités immunologiques ou auto-immunes**

Il existe une infertilité immunologique ou infertilité auto-immune caractérisée par la présence d'anticorps anti-spermatozoïdes (ACAS) (Elloumi et al. ,2013). Dans les circonstances normales les antigènes des spermatozoïdes ne déclenchent pas de réaction immunitaire, puisque ceux-ci sont séparés du système immunitaire par la barrière hémato-testiculaire (Tuech, 2012). La physiopathologie est encore peu connue cependant plusieurs étiologies semblent émerger : une brèche dans la barrière hémato-testiculaire, une intervention chirurgicale, une tumeur testiculaire, la varicocèle (dilatation des veines du cordon spermatique (Kantartzi et al. ,2007)), la cryptorchidie ou l'orchidopexie (traitement chirurgical permettant de fixer le testicule à l'intérieur du scrotum (Orchidopexie, 2017)). Ces ACAS vont entraîner une agglutination des spermatozoïdes, une diminution de leur mobilité, un effet cytotoxique sur les spermatozoïdes conduisant à leur cytololyse et une inhibition du pouvoir fécondant (Elloumi et al. ,2013).

➤ **Lésions acquises**

De nombreuses lésions acquises sont responsables d'infertilité chez l'homme. Il est possible qu'une infertilité puisse apparaître suite à des lésions traumatiques et/ou ischémiques lors d'une torsion du cordon spermatique, d'une chirurgie ou d'un cancer. Le testicule est un organe sensible à l'hyperthermie, les rayonnements ionisants (radiothérapie), les toxiques (chimiothérapie, médicaments) ainsi qu'à des pathologies comme les oreillons ou les orchites Infectieuses (young, 2016).

### **III-3- Les causes post-testiculaires**

Les causes post-testiculaires sont principalement liées à une obstruction au niveau des voies génitales. L'obstruction peut être liée à une anomalie congénitale, une infection, un traumatisme et même un acte chirurgical : la vasectomie, qui consiste à ligaturer volontairement les déférents pour une action contraceptive. Tout le cheminement des spermatozoïdes de la lumière des tubes séminifères aux canaux éjaculateurs peut être le lieu d'un obstacle (young, 2016).

➤ **Causes malformatives**

Les causes malformatives sont rares, mais cependant on peut observer dans de rares cas d'infertilité une absence de canaux déférents ou une agénésie bilatérale congénitale des déférents (ABCD) (Fontaine et Jarfin, 2001). L'ABCD est une maladie génétique autosomique récessive, liée à des mutations du gène CFTR, régulateur de conductivité transmembranaire, responsable aussi de la mucoviscidose (young, 2016). Cette anomalie peut conduire à une azoospermie obstructive non résolutive chirurgicalement, associée à un faible volume de sperme, un pH inférieur à 7,2 et un taux de fructose diminué (Bouyé et al. ,2014). Des anomalies des canaux éjaculateurs sont aussi responsables d'infertilité mais de façon plus sporadique, avec un tableau clinique semblable à l'ABCD mais avec présence des canaux déférents (Rigot et al. ,2013).

➤ **Obstructions acquises**

Des obstructions acquises peuvent aussi être responsables d'infertilité masculine. Elles sont d'origine tumorales, infectieuses ou iatrogènes/chirurgicales (young, 2016). En effet, les interventions chirurgicales au niveau du pelvis ou des bourses sont un facteur de risque d'infertilité masculine (Khodari et al. ,2015). Parmi les causes infectieuses, les urétrites et épидидymites altèrent la fertilité masculine avec des perturbations plus ou moins transitoires

du spermogramme. L'épididymite peut être le résultat d'infections sexuellement transmissibles (gonocoque, mycoplasme, Trichomonas ou Chlamydia) ainsi que de prostatite aiguë bactérienne à Escherichia Coli, Klebsiella, Enterobacter ou Pseudomonas (Legeume, 1992).

### **III-4- Autres causes**

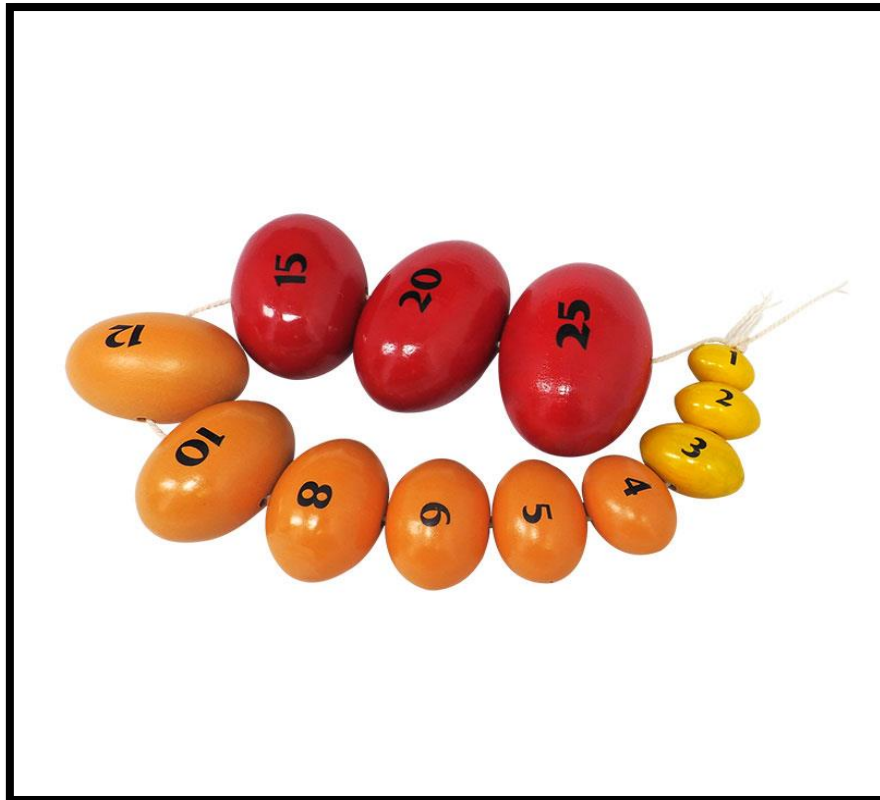
Parallèlement à ces causes pré-testiculaires, testiculaires et post-testiculaires, des troubles érectiles, éjaculatoires et sexuels peuvent entraîner une incapacité à féconder. Les dysfonctions érectiles étant des causes mécaniques réversibles et non un réel problème d'infertilité. Les causes d'infertilité étant variées, il est nécessaire de réaliser un bilan complet pour établir un diagnostic précis et trouver la meilleure prise en charge possible au désir de paternité. Néanmoins pour une part non négligeable de patients infertiles, aucune étiologie n'est retrouvée. On parle alors d'infertilité masculine idiopathique (Phé et Rouprêt, 2010).

## **IV. Exploration de l'infertilité masculine**

### **IV.1. L'examen clinique**

Un examen clinique, physique et approfondi doit être réalisé pour écarter anomalies morphologiques des organes génitaux (young, 2016). Une éventuelle gynécomastie doit être recherchée ainsi qu'une diminution de la pilosité. Une exploration des organes génitaux externes et du volume testiculaire doit également être faite par palpation (estimation du volume et de la consistance des bourses, de la taille de la verge et de la présence éventuelle de cicatrice pouvant évoquer une chirurgie) (Mehrpour et al ., 2014). Une échographie du scrotum et des organes génitaux internes doit être réalisée par un médecin spécialiste, pour rechercher la présence des canaux déférents et de potentielles anomalies (young, 2016).

En fonction des cas, un toucher rectal peut être recommandé pour évaluer l'état de la prostate et des vésicules séminales (Mehrpour et al. , 2014). Des examens complémentaires doivent être systématiquement effectués pour un diagnostic plus précis.



**Figure 16 :** Orchidomètre de Prader permettant d'évaluer le volume testiculaire en consultation\*

\* <https://french.alibaba.com/product-detail/hot-sale-original-wooden-color-orchidometer-60466945724.html>

## IV.2. Analyse du sperme :

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

### IV.2.1. Le spermogramme :

Le spermogramme selon les normes de l'OMS 2010 (Tableau 2) Le spermogramme est l'examen fondamental chez l'homme, il prend en compte l'aspect quantitatif: le volume et qualitatif: la couleur, l'odeur, la viscosité, la mobilité, la numération, la vitalité et la morphologie des spermatozoïdes.

- **Le recueil du sperme**

Doit être fait après un délai d'abstinence de 2 à 5 jours, après ce délai, si la numération des spermatozoïdes augmente, en revanche leur mobilité et leur vitalité sont sensiblement diminuées. Le recueil par coït interrompu est à proscrire ainsi que le recueil dans un

préservatif. Une toilette des mains et de la verge au savon et une miction doivent immédiatement précéder le prélèvement pour éliminer les germes commensaux urétraux. Le recueil du sperme doit se faire par masturbation dans un flacon stérile et le placé dans une étuve à 37 °C, pendant 10 à 20 minutes, le temps nécessaire à la liquéfaction du sperme.

- **Le volume**

Le volume normal de l'éjaculat pour 3 jours d'abstinence sexuelle se situe entre (2 et 6 ml), il est le reflet des capacités sécrétoires des glandes annexes. Environ :

20% du volume de l'éjaculat provient des sécrétions prostatiques

20% provient des épидidymes et les déférents 60% du volume provient des vésicules séminales

Hypospermie, volume total de l'éjaculat inférieur à 2 ml

Hyperspermie, volume total de l'éjaculat supérieur à 6 ml

Aspermie, absence d'éjaculat ou absence totale d'émission de sperme

- **La viscosité**

Le liquide séminal coagule rapidement après l'éjaculation puis il se liquéfie secondairement dans les 20 min à 1 heure de temps grâce aux enzymes prostatiques.

- **Le pH**

Le pH normal se situe entre 7,2 et 8, il est le témoin indirect des sécrétions des glandes annexes (sécrétions prostatiques acides et sécrétions des vésicules séminales basiques). Un pH acide inférieur à 6,5 témoigne un défaut de fonctionnement des vésicules séminales. Un pH > 8 évoque le diagnostic d'une insuffisance prostatique ou une infection.

- **La numération**

La numération normale de spermatozoïdes dans l'éjaculat est supérieure à 15 millions/ml et supérieure à 39 millions pour la totalité de l'éjaculat. La première partie de l'éjaculation qui est constitué des sécrétions prostatiques et épидidymaires contient la grande partie des spermatozoïdes (jusqu'à 80% de la totalité des spermatozoïdes contenus dans l'éjaculat).

- **La mobilité des spermatozoïdes**

La mobilité des spermatozoïdes est classée en quatre catégories (ou grades) :

Catégorie "a" : mobilité fléchante et rapide (vitesse  $>25 \mu\text{m/s}$ ).

Catégorie "b" : mobilité lente (vitesse de  $5-25 \mu\text{m/s}$ ).

Catégorie "c" : mobilité sur place.

Catégorie "d" : immobilité.

Une heure après l'éjaculation, au moins 30% des spermatozoïdes doivent avoir une mobilité normale (catégories a+b).

- **La vitalité**

Le pourcentage des spermatozoïdes vivants dans l'éjaculât doit être supérieur égal ou à (58%) de l'ensemble des spermatozoïdes. Il existe plusieurs techniques au laboratoire pour tester la viabilité des spermatozoïdes dont, une coloration diagnostique à l'éosine nigrosine (Y-éosine).

- **La morphologie**

Selon la classification de " David 2010 " au moins 4 % des spermatozoïdes doivent avoir une morphologie normale.

- **Les agglutinats**

Les agglutinats correspondent un rassemblement (accolement) de plusieurs spermatozoïdes vivants ensemble.

Les agglutinats s'expliquent par la présence de spermatozoïdes vivants et porteurs d'anticorps anti-spermatozoïdes. Ils doivent être différenciés des agrégats de spermatozoïdes, qui sont la réunion et l'accolement de plusieurs spermatozoïdes morts ensemble.

**Tableau 2** : Les valeurs normales du spermogramme selon les normes de l'OMS 2010.

\*<https://www.centre-gynecologique-lavancee.fr/fr/fertilite/medecine-de-la-reproduction>

Paramètre	Norme (OMS 2010)
Volume de sperme	> 1,5 ml
Nombre total de SPZ (par éjaculat)	> 39 millions
Concentration de SPZ (par ml)	> 15 millions/ml
Mobilité totale ( A+B+C%)	> 40 %
Mobilité progressive (A+B %)	> 32 %
Vitalité (SPZ vivants, %)	> 58 %
PH	Entre 7,2 et 8
Les leucocytes	< 1 million/ml
Morphologie des SPZ (formes normales, %)	> 4 %

#### IV.2.2 Les anomalies spermatiques

- **Les anomalies de la quantité du volume spermatique**

- **Aspermie** : l'absence d'éjaculat ou le volume de sperme inférieur à 0,5 ml peut-être à cause des étiologies suivantes :

- Soit une éjaculation rétrograde
- Soit une anéjaculation (absence d'éjaculation), (Comhaire et al ., 1976).

- **Hypospermie** : le volume total de l'éjaculat inférieur à 1,5 ml. L'hypospermie peut être due :

- Soit à un problème technique de recueil du sperme
- Soit à un déficit de sécrétion au niveau des glandes annexes (prostate, vésicules séminales)
- Soit à une éjaculation rétrograde (dans la vessie), (OMS, 2010).

- **Hyperspermie** : volume total de l'éjaculat supérieur à 6 ml ; elle évoque la présence de lésion infectieuse des glandes annexes et en particulier les vésicules séminales. Elle peut être due aussi à une abstinence trop longue, (OMS, 2004)

- **Les anomalies du nombre de spermatozoïdes**

- **Azoospermie**

L'azoospermie se définit comme l'absence de spermatozoïde lors de la réalisation d'au moins trois spermogrammes pratiqués dans des conditions optimales : ce diagnostic ne peut être affirmé que si l'on examine avec attention le culot de centrifugation avant et après coloration pour infirmer la présence de spermatozoïdes. Il faut être très prudent dans le diagnostic définitif de l'azoospermie car un phénomène infectieux sévère peut entraîner une azoospermie réversible, (Hammamah et al ., 1999).

- **Oligospermie**

Elle se définit par une diminution du nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat inférieur à 15 millions par ml, (OMS, 2010).

- **Polyspermie ou Polyzoospermie**

La numération des spermatozoïdes est supérieure à 200 millions par ml. (OMS, 2010).

- **Cryptozoospermie**

Crypto c'est caché, donc il s'agit de l'absence de spermatozoïdes à l'examen d'observation direct d'une goutte de sperme mais à l'opposé de l'azoospermie, une recherche approfondie permet d'en trouver quelques uns (moins de 100000 spermatozoïdes dans la totalité de l'éjaculat), (Clément, 2004).

- **Les anomalies de la qualité du sperme**

- **Asthénospermie ou asthénozoospermie**

Moins de 40% des spermatozoïdes sont mobiles une heure après l'éjaculation, (OMS, 2010).

- **Nécrozoospermie**

S'il n'y a pas de spermatozoïdes vivants à l'éjaculation ; il faut rechercher un problème infectieux ou oxydatif. Les spermatozoïdes humains présentent un fort pourcentage d'anomalies morphologiques.

L'étude morphologique a été codifiée et quantifiée et la plupart des laboratoires utilisent la classification de David qui tient compte de poly malformation des spermatozoïdes, (Cook et al ., 2007).

- **Leucospermie**

La numération des leucocytes est supérieure à 1million /ml ; elle évoque une infection ou un processus inflammatoire (lithiase prostatique ; abstinence trop longue), (OMS, 2010).

### ➤ **Tératozoospermie**

Elle se caractérise par un taux de spermatozoïdes sont normaux morphologiquement inférieur à 15%. Les spermatozoïdes humains présentent un fort pourcentage d'anomalies morphologiques, (Auger et al ., 2000).

### **IV.2.3.Le Spermocytogramme**

Des frottis de spermes fixés et colorés (coloration de Harris Schorr ou de Papanicolaou) vont permettre la lecture ultérieure de la morphologie spermatique lors duspermocytogramme. Le spermocytogramme analyse la morphologie spermatique.

Le spermiologiste doit la définition en microscopie optique, d'un spermatozoïde normal aux équipes de David (1975) puis de Kruger (1986) qui sont les pères des deux classifications utilisées aujourd'hui pour l'évaluation de la tératozoospermie. La classification de David a été modifiée en 2000 (Auger et al. 2001) et demeure aujourd'hui un outil diagnostique clé de l'infertilité masculine puisqu'elle permet de définir la tératozoospermie, c'est-à-dire d'évaluer le pourcentage de spermatozoïdes typiques et atypiques d'un sperme et de décrire le type et le nombre d'anomalies portées par chaque spermatozoïde (index d'anomalies multiples ou IAM).

### **IV.2.4.Méthode de classification de David : Principe, définition et exemples**

#### **a- Principe**

La méthode de David pour le classement des anomalies morphologiques des spermatozoïdes humains a été proposée en 1972 lors d'un colloque sur la fécondité et la stérilité du mâle et publiée en 1975 (David et al ., 1995). La classification initiale comportait 13 types d'anomalies, sept pour la tête et six pour le flagelle. L'originalité de la méthode de classification repose sur la prise en compte de toutes les anomalies observées grâce à un système de classification à entrées multiples : un spermatozoïde porteur de plusieurs anomalies est défini par l'ensemble de ces anomalies c'est-à-dire qu'il figure plusieurs fois dans la grille de classement, à chacune des anomalies concernées.

Compte tenu de l'inhomogénéité du sperme humain et de la faible fréquence de certaines anomalies, 100 spermatozoïdes au minimum doivent être classés pour fournir une évaluation correcte du pourcentage de spermatozoïdes typiques et du profil des différentes atypies. Cette recommandation est cependant parfois impossible à suivre lorsque la concentration de spermatozoïdes est très faible. Dans ces cas, la classification peut être faite à partir de 50 spermatozoïdes, mais le résultat pour les spermatozoïdes normaux et anormaux ne doit pas

être rendu en pourcentage et la conclusion doit tenir compte de la fiabilité diminuée des fréquences des anomalies retrouvées, notamment lorsqu'il s'agit d'anomalies rares.

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

Les anomalies des spermatozoïdes sont classées en trois catégories selon cette classification de David :

**Sept anomalies de la tête :**

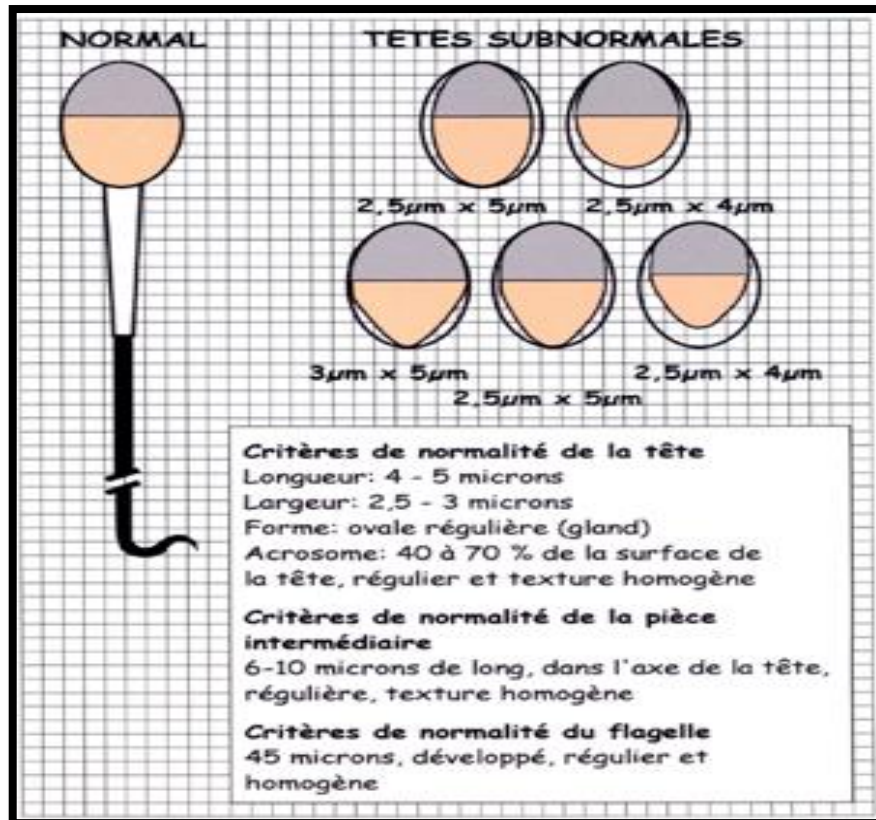
- ❖ Spermatozoïdes micro céphaliques (longueur de la tête inférieure à 3µm)
- ❖ Spermatozoïdes macro céphaliques (longueur de la tête supérieure à 5µm)
- ❖ Spermatozoïde à tête allongée
- ❖ Spermatozoïde à tête multiple
- ❖ Spermatozoïde à tête amincie
- ❖ Spermatozoïde présentant un acrosome anormal ou absent
- ❖ Spermatozoïde présentant une base (région post acrosomique) anormale.

**Trois anomalies de la pièce intermédiaire :**

- ❖ Restes cytoplasmiques (le cytoplasme est attaché à la pièce intermédiaire, mais rarement à la tête)
- ❖ Angulation (la pièce intermédiaire ne se trouve pas dans l'axe longitudinal de la tête mais possède une angulation dépassant les 90°)
- ❖ Pièce intermédiaire grêle

**Cinq anomalies du flagelle**

- ❖ Spermatozoïde à flagelle absent
- ❖ Spermatozoïde à flagelle enroulé
- ❖ Spermatozoïde à flagelle écourté
- ❖ Spermatozoïde à flagelle multiple
- ❖ Spermatozoïde à calibre irrégulier



**Figure 17** : Illustrations du spermatozoïde humain normal ou subnormal, considéré comme normal, et rappel des définitions (Auger et Eustache, 2000).

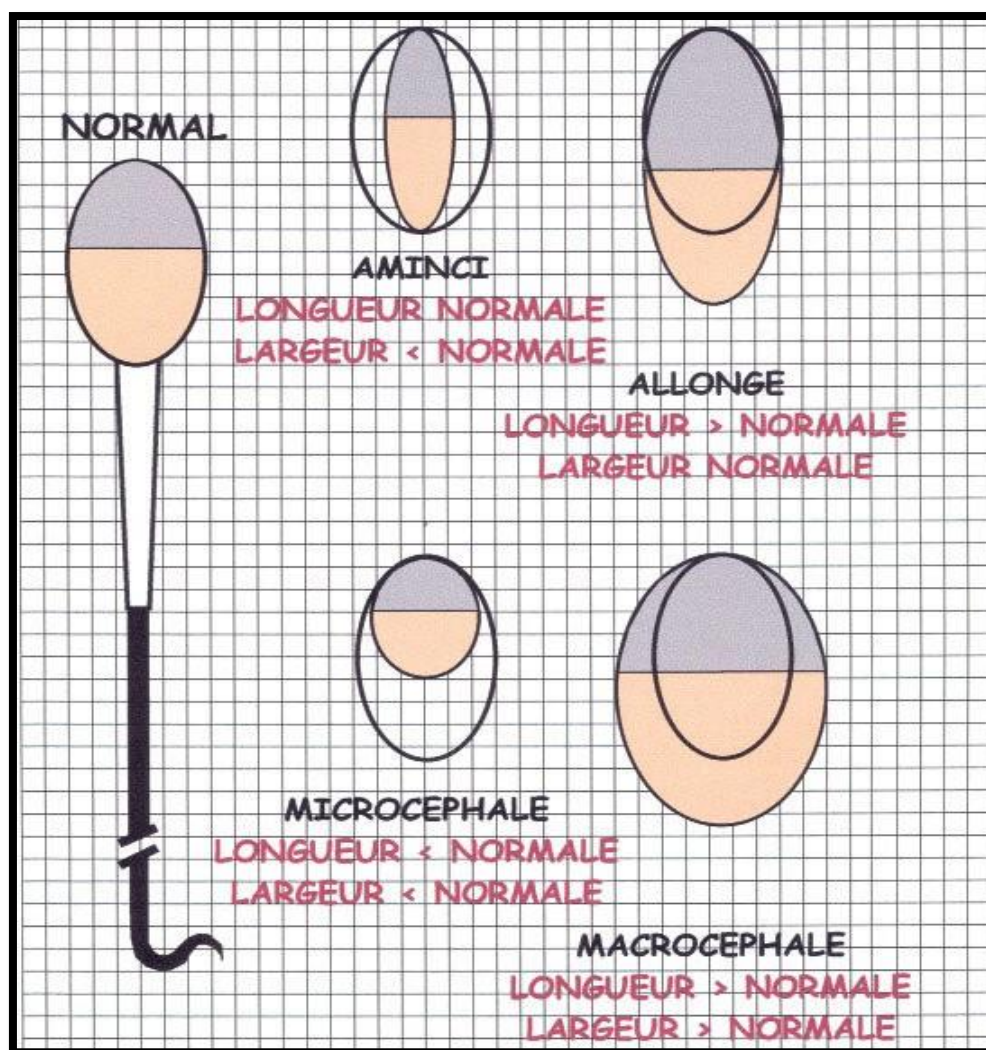
#### ✚ Anomalies de la tête (Figure 18)

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

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

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

**Macrocéphale:** Le grand axe et le petit axe sont plus grands que la normale

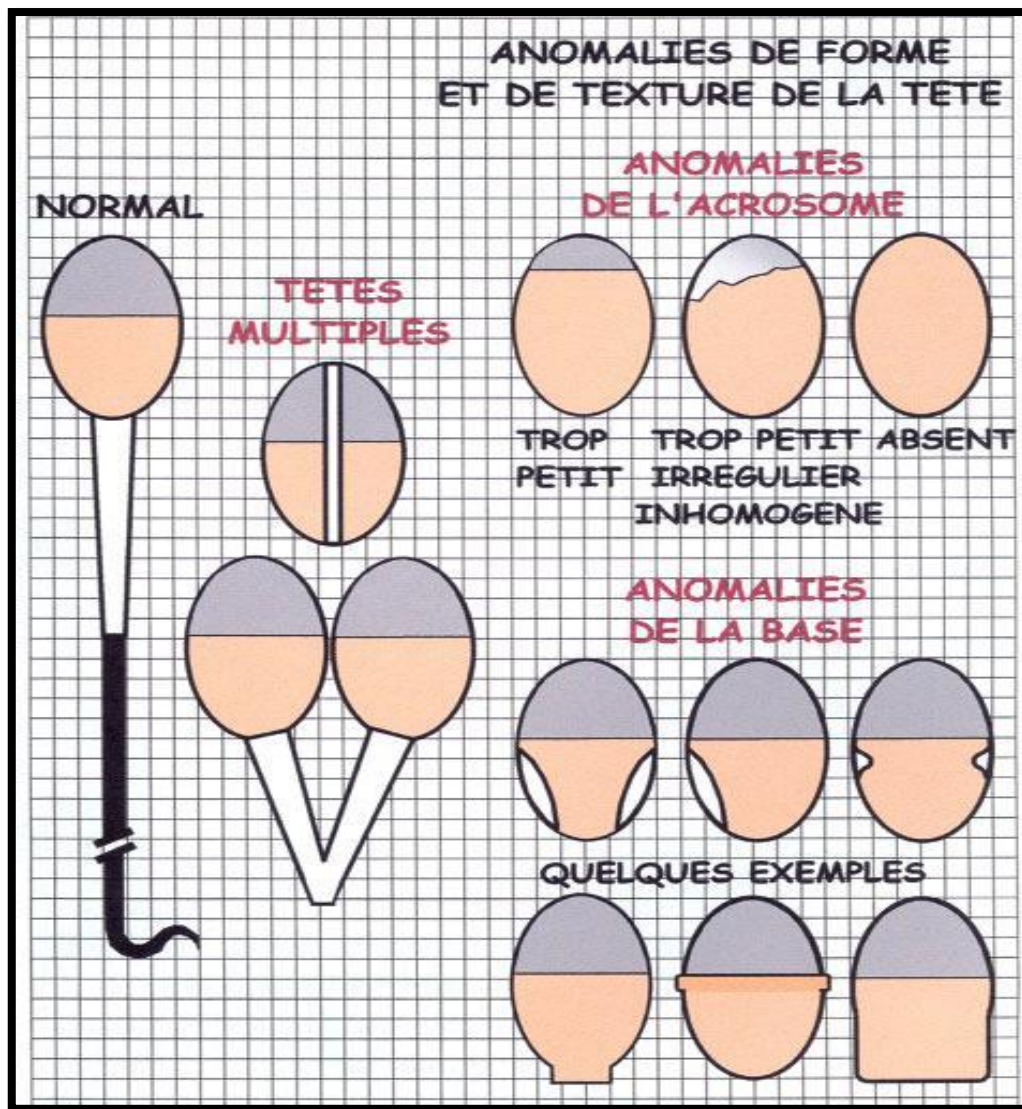


**Figure 18** : Anomalies de taille de la tête des spermatozoïdes humains (Auger et Eustache, 2000).

**Têtes multiples** : Il y a plus d'une tête par spermatozoïde. Elles peuvent être accolées et occuper une surface totale similaire à celle d'une seule tête ou bien être parfaitement dissociées (Figure 19).

**Anomalies de l'acrosome** : On classe dans cette catégorie toute anomalie de taille, de contour ou de texture de la région acrosomique ainsi que l'absence d'acrosome. La surface de l'acrosome est inférieure à 40 % ou supérieure à 70 % de la surface totale de la tête (Figure 19).

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



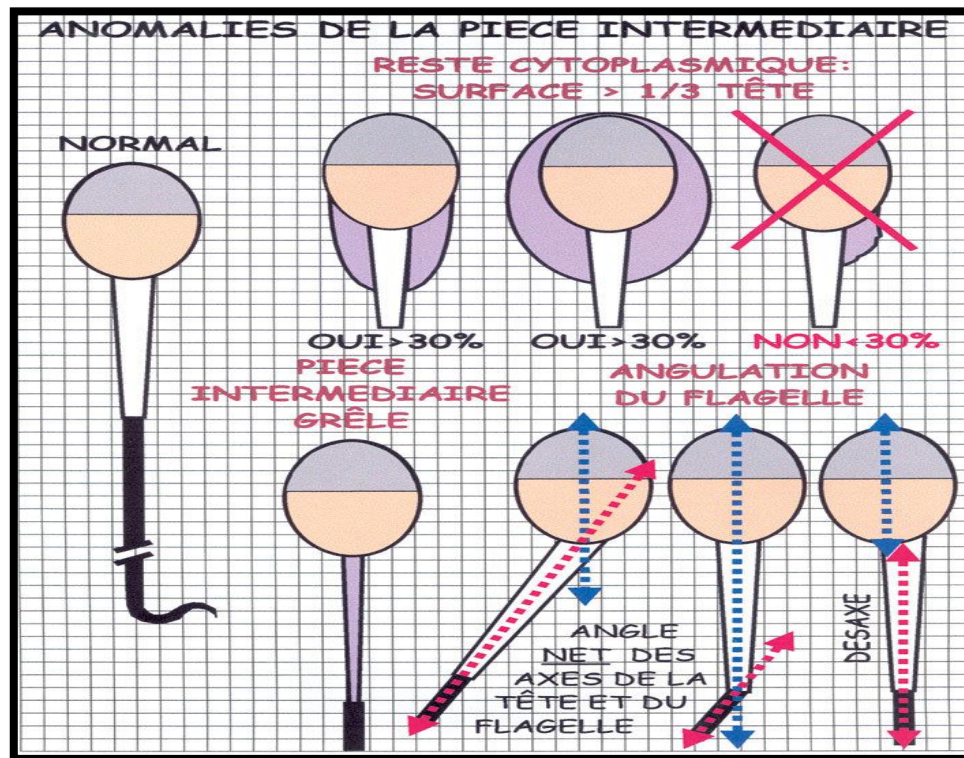
**Figure 19** : Anomalies de forme et de texture de la tête des spermatozoïdes humains (Auger et Eustache, 2000).

#### ✚ Anomalie de la P.I (Figure 20)

**Reste cytoplasmique** : le reste cytoplasmique est considéré comme une anomalie s'il a une surface supérieure au tiers de la surface d'une tête normale. Il se situe le plus souvent à la jonction de la tête et de la pièce intermédiaire et c'est pourquoi il est classé comme anomalie de la pièce intermédiaire mais il peut également entourer l'ensemble de la cellule (souvent dans le cas de spermatozoïdes enroulés) ou englober seulement la tête (Figure 20).

**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 20).

**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 20).



**Figure 20** : Anomalies de la pièce intermédiaire des spermatozoïdes humains (Auger et Eustache, 2000).

#### 🚩 Anomalie du flagelle (Figure 21)

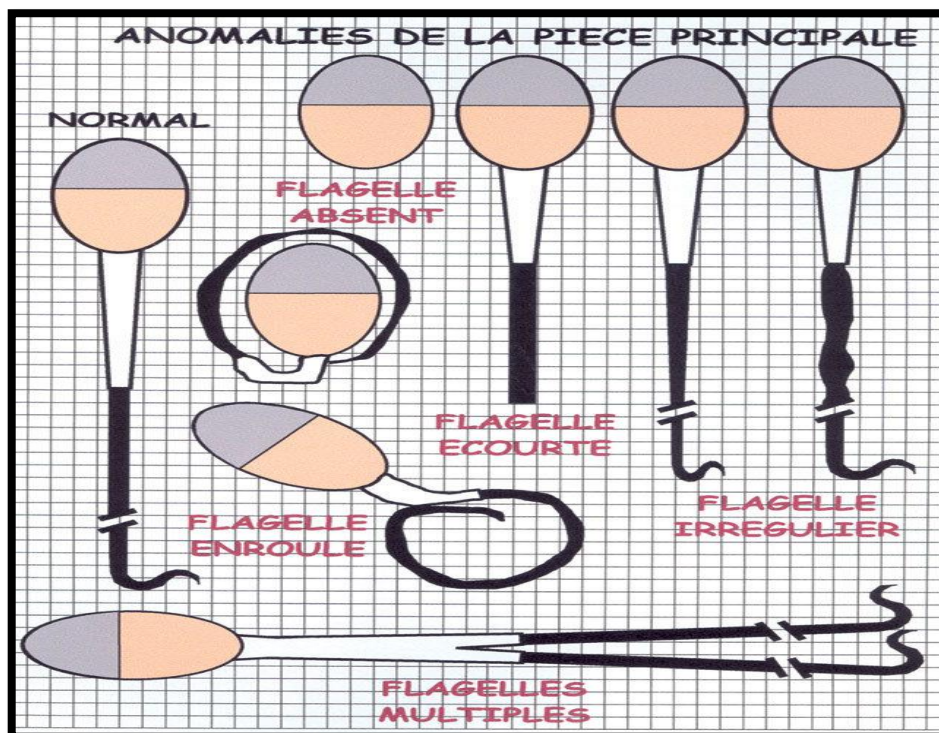
**Flagelle absent** : les têtes isolées sont comptées dans cette catégorie. La pathologie ultrastructurale intéresse les colonnes striées qui sont absentes et/ou la pièce connective qui est rudimentaire (Figure 21).

**Flagelle court** : le flagelle est significativement écourté (<5 fois la longueur de la tête). La microscopie électronique à transmission indique parfois que le flagelle est court du fait d'une brièveté de la pièce intermédiaire mais, le plus souvent, on observe des flagelles courts et épaissis avec une prolifération des éléments composant la gaine fibreuse. Ces flagelles ne sont pas fonctionnels (Figure 21).

**Flagelle irrégulier** : le diamètre de la pièce principale est variable, présentant des rétrécissements ou des élargissements. En microscopie électronique à transmission, cette anomalie correspond à des désorganisations étagées de l'axonème et/ou du périaxonème (Figure 21).

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

**Flagelles multiples** : il y a plus d'un flagelle par spermatozoïde, la pièce intermédiaire étant commune ou multiple. En microscopie électronique à transmission, on observe des têtes spermatiques bien isolées avec deux (et plus) plaques basales et deux (et plus) pièces connectives (Figure 21) (Ounis, 2015).



**Figure 21** : Anomalies de la pièce principale des spermatozoïdes humains (Auger et Eustache, 2000).

### **IV.3. Exploration cytogénétique**

#### **IV.3.1. La cytogénétique**

##### **IV.3.1.1. La cytogénétique conventionnelle – Caryotype:**

Historiquement le caryotype est le premier examen permettant une analyse globale du génome qui a permis d'identifier des anomalies chromosomiques. La réalisation d'un caryotype est basée sur la culture cellulaire avec un blocage du cycle cellulaire au stade métaphase de la mitose. La métaphase mitotique est la phase durant laquelle les chromosomes sont condensés permettant une analyse de leur nombre et de leur structure (Dimassi et al., 2017).

Le caryotype conventionnel est reconnu comme étant le gold standard du diagnostic des anomalies chromosomiques de nombre ou de structure (gain ou perte de chromosome, délétions, duplications, translocations...). Il est utilisé pour analyser les modifications du génome qui impliquent à la fois le gain ou la perte des parties des génomes, ainsi que les réarrangements intra et inter-chromosomiques. L'analyse du caryotype est utilisée pour mettre en évidence le lien de causalité entre des anomalies chromosomiques spécifiques et des syndromes cliniques (Kang j-u, 2018).

##### **IV.3.1.2. La cytogénétique moléculaire:**

Pour surmonter les limites des analyses des bandes chromosomiques, des techniques de cytogénétique moléculaire telles que l'hybridation in situ en fluorescence (FISH), le caryotype spectral (SKY), et l'hybridation génomique comparative (CGH) sont apparues comme des outils diagnostiques efficaces. Ces techniques sont largement utilisées comme complément de la cytogénétique conventionnelle pour identifier les anomalies chromosomiques (Kang j-u et Koo, 2012). Les techniques de cytogénétique moléculaire ont été reconnues comme des atouts précieux, voire même des alternatives aux techniques d'analyse des bandes chromosomiques, puisqu'elles améliorent l'interprétation approfondie des anomalies chromosomiques, en comblant l'écart entre la cytogénétique conventionnelle et la cytogénétique moléculaire (Russo et Degrassi, 2018).

##### **a. L'hybridation in situ en fluorescence FISH :**

La technique de l'hybridation in situ en fluorescence FISH est basée sur l'utilisation des sondes d'ADN spécifiques à une région chromosomique marquées au fluorochrome. Ces sondes sont des fragments clonés d'ADN génomique qui peuvent s'hybrider avec leurs

séquences d'ADN complémentaires et produire un signal fluorescent sur des chromosomes de fond colorés qui peuvent être facilement détectés, rendant ainsi l'analyse par FISH idéale. L'analyse par FISH permet non seulement de détecter les microremaniements chromosomiques de 50 à 100 Kb, mais aussi la visualisation directe des ces altérations sur des cellules non cultivées en interphase (Li et Andersson, 2009).

FISH a été utilisée pour le dépistage des aneuploïdies en prénatal (Exemple : Sd de Turner, Sd de Klinefelter), les microdélétions (Microdélétions AZF du bras long du chromosome Y), les réarrangements des régions subtélomériques, et les translocations cryptiques (Translocation du gène SRY sur le chromosome X) (Lourou et al ., 2008).

Au cours de la dernière décennie, les tests FISH ont fait des progrès rapides dans le domaine de la détection des altérations génomiques, quelle que soit leur complexité, en comblant l'écart entre la cytogénétique conventionnel et la cytogénétique moléculaire (Kang et al ., 2007).

L'hybridation in situ en fluorescence nous a permis de détecter une translocation du gène SRY sur le chromosome X chez un patient mâle XX.

#### **b. L'hybridation comparative génomique CGH :**

L'hybridation comparative génomique (CGH) permet l'analyse de l'ensemble du génome afin de diagnostiquer les anomalies chromosomiques, et représente une variante de la FISH avec un avantage évident de révéler des déséquilibres dans l'ensemble du génome (Simons et al ., 2012). Cependant, en raison de la résolution limitée des chromosomes en métaphase (5-10 Mb), des aberrations tels que le mosaïcisme, les translocations chromosomiques équilibrées, les inversions et les changements de la ploïdie génomique ne peuvent pas être détectées à l'aide de cette technique (Gullotta et al ., 2007).

Dans l'ensemble, la résolution à laquelle les anomalies de nombre peuvent être détectées par les techniques de cytogénétique moléculaire n'est que légèrement supérieure au caryotype conventionnel. De plus, ces techniques exigent beaucoup de main d'œuvre et de temps, surtout quand les anomalies touchent plusieurs régions (Savage et all ., 2011). Pour détecter de telles anomalies, des techniques de haute résolution sont nécessaires.

### **IV.3.2. Fragmentation de l'ADN spermatique**

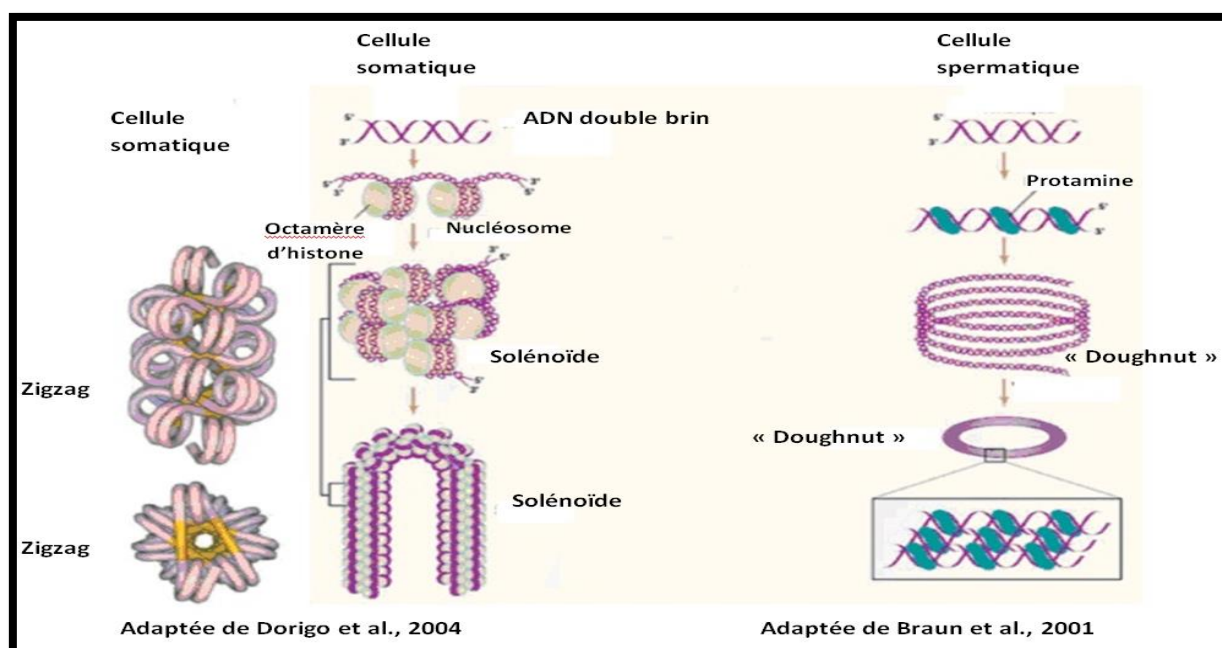
#### **IV.3.2.1. Structure de la chromatine spermatique**

Dans les cellules somatiques, 147 pb d'ADN s'enroulent autour d'un octamère d'histone pour former un nucléosome. Chaque octamère complexe contient deux copies de chaque histone H2A, H2B, H3 et H4. Pendant la spermiogenèse (post-méiotique), l'ADN spermatique subit une sévère métamorphose afin d'être bien protégé dans un petit nucléus. Dans ce processus, l'ubiquitination des histones H2A et H2B promeut l'acétylation d'histone H4. Ces modifications des histones rendent l'ADN plus accessible aux modifications créées par la topoisomérase II et facilitent le remplacement des histones par des protéines de transition PT1 et PT2 (Oliva, 2006 ; Lu et al., 2010 ; Carrell , 2012). L'absence d'une protéine peut être compensée par l'autre pour que la production des spermatozoïdes soit assurée (Yu et al., 2000 ; Zhao et al., 2001). Les protéines de transition sont ensuite complètement remplacées par des protamines P1 et P2. Les protamines sont des protéines riches en arginine (70%) qui contiennent des charges positives par le groupe NH<sub>3</sub><sup>+</sup>. Une fois la protamine liée à l'ADN, la formation des ponts disulfures entre les cystéines des protamines se fait afin de stabiliser le complexe nucléoprotamine (Balhorn, 2007). Par conséquent, grâce à la formation des ponts disulfures, la chromatine spermatique est environ 10 fois plus condensée que celle des cellules somatiques (Miller et al., 2010) ( figure 22) . Quand le spermatozoïde féconde un ovocyte, la chromatine est décondensée par la réduction des ponts disulfures entre les protamines permettant d'enlever des protamines et de réorganiser l'ADN en nucléosome (Oliva, 2006).

Le remodelage de la chromatine spermatique est indispensable. D'abord, la réduction de la taille et la forme du nucléus spermatique rend au spermatozoïde une structure hydrodynamique permettant de se déplacer plus vite, d'être capable de féconder un ovocyte en premier. Ensuite, la compaction de l'ADN par les protamines protège le génome paternel des attaques de nucléases ou d'autres agressions lors des transits dans les tractus génitaux. Ces deux caractéristiques ont été évolutivement optimisées afin de conserver l'intégrité du génome au long du trajet dans l'appareil reproductif féminin jusqu'à la fécondation. Les protamines sont indispensables pour la réussite de la fécondation. En fait, l'altération de la quantité des protamines provoque une condensation de la chromatine spermatique incomplète entraînant la susceptibilité aux dommages de l'ADN qui résulte en un échec du développement embryonnaire lors de l'ICSI (Cho et al., 2003). Les protamines participent également à la mise en place de l'empreinte du génome paternel et peuvent accorder une

marque épigénétique dans le génome spermatique qui affecte la réactivation ou la répression du génome lors de la fécondation (Jodar et Oliva, 2014).

La plupart des histones est remplacée par des protamines pendant la spermiogenèse, une fraction de 3% à 15% du génome paternel échappe à la protamination chez les hommes fertiles (Oliva, 2006 ; Hammoud et al., 2011). Ces régions encodent des transcrits nécessaires pendant la compaction, ou contiennent des gènes indispensables pour le développement de l'embryon, ou assurent la décondensation de la chromatine après la fécondation (Balhorn, 2007 ; Li et al., 2008). La distribution des histones et protamines le long de la chromatine paternelle ne se fait pas au hasard (Wykes et Krawetz, 2003 ; Hammoud et al., 2011 ; Carrell, 2012). En fait, les promoteurs des gènes PRM1, PRM2, TP2 (rôle dans la condensation de la chromatine) et les gènes IGF2 et SOCS1 (qui ont un rôle important pour le développement précoce de l'embryon) sont riches en histones (Wykes et Krawetz, 2003). De plus, plusieurs gènes associés aux facteurs de développement comme EVX1, EVX2, ID1, STAT3, KLF5, FGF9, SOX7 et SOX9 sont marqués par des modifications des histones avec la transcription active lors de la délivrance dans l'ovocyte (Hammoud et al., 2009). En outre, la modification des histones contribue au stade pluripotent des cellules souches embryonnaires (Hammoud et al., 2009 ; Jenkins et Carrell, 2012). Il est donc vraisemblable que la rétention des histones et ses modifications sont très importantes pour non seulement une fonction normale des spermatozoïdes mais également une embryogenèse normale.



**Figure 22** : Modèles de l'organisation de la chromatine dans une cellule somatique (zigzag ou solénoïde) et dans une cellule spermatique (doughnut).

#### IV.3.2.2. Origines de la fragmentation de l'ADN spermatique

Les dommages de l'ADN dans les lignées des cellules germinales peuvent être à l'origine de l'infertilité, des fausses couches et des anomalies congénitales dans la descendance (Aitken et al., 2009). L'ADN cassé est un processus physiologique pendant la maturation des spermatozoïdes (Sakkas et Alvarez, 2010).

La topoisomérase a été considérée comme une candidate idéale permettant l'accès à la structure hyperenroulée de l'ADN (Laberge et Boissonneault, 2005).

Les topoisomérase 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 (DSB) et sa nouvelle ligature ultérieure (Wang, 2002). Chez l'homme, il y a deux isoformes de la topoisomérase : topoisomérase II  $\alpha$  et topoisomérase II  $\beta$ . Il a été montré que l'hyperacétylation des histones H3 et H4 était une condition préalable pour que la topoisomérase II  $\beta$  cause les cassures double brin de l'ADN (Laberge et Boissonneault, 2005). En fait, l'hyperacétylation de ces histones diminue l'affinité des histones à l'ADN permettant de retirer les nucléosomes et ainsi de relâcher l'ADN superenroulé (Leduc et al., 2008 ; Meyer-Ficca et al., 2011).

L'intégrité de l'ADN spermatique peut être affectée tout au long de la différenciation depuis les spermatogonies jusqu'aux spermatozoïde matures. Le spermatozoïde possédant un ADN fragmenté est capable de féconder un ovocyte et de compléter les 2-3 premiers clivages du zygote. Pourtant la formation du blastocyste va être bloquée induisant l'apoptose (Fatehi et al., 2006). L'ADN cassé peut être restauré par des systèmes de réparation de l'ovocyte et dans l'embryon (Wells et al., 2005 ; Gasca et al., 2007). La capacité de réparation de l'ovocyte dépend du cytoplasme et de la qualité génomique de l'ovocyte qui est influencée par l'âge maternel. En plus, l'efficacité de la réparation dépend également de la qualité de l'ADN paternel (Sakkas et al., 2010). Si l'ovocyte fait des erreurs lors de la réparation des cassures de l'ADN paternel après la fécondation, il provoque des mutations de novo dans l'embryon qui peuvent avoir un impact sur la santé de la descendance.

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

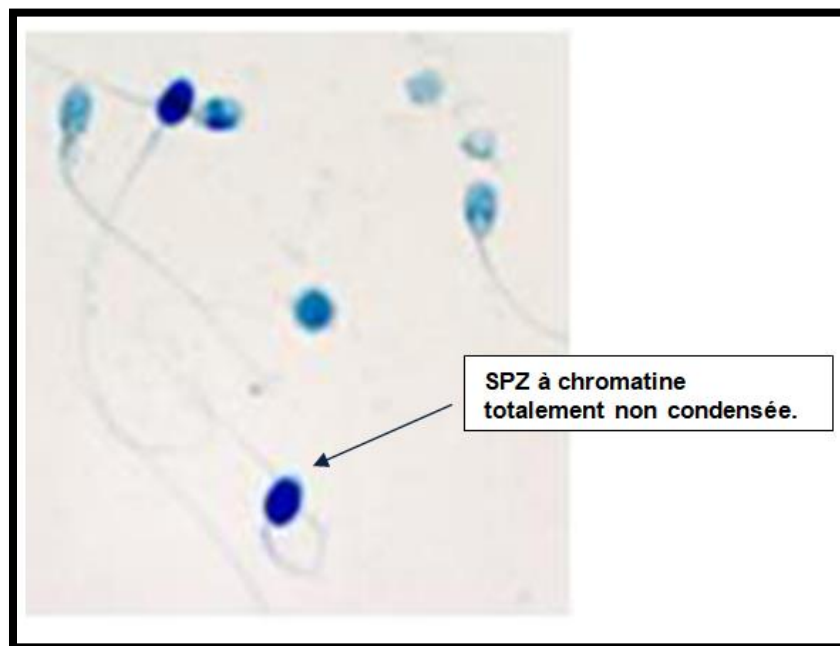
l'ADN spermatique, l'apoptose abortive pendant la spermatogenèse, les substances oxygénées réactives (SOR) et des facteurs environnementaux (pesticides, tabac, toxique. . . ).

#### IV.3.3. Evaluation de la fragmentation de l'ADN dans les gamètes mâles

Différentes techniques ont été développées afin d'évaluer les dommages dans la chromatine spermatique. Ces méthodes sont capables de détecter directement ou indirectement les cassures de l'ADN spermatique.

##### IV.3.3.1. Test au bleu d'aniline

Cette méthode a été décrite par Terquem et Dadoune en 1983 (Terquem et Dadoune, 1983). Elle est basée sur le fait que le bleu d'aniline a une forte affinité pour les résidus lysines des histones nucléaires. La persistance des histones dans le noyau spermatique indique une protamination incomplète de la chromatine spermatique. Les noyaux riches en histones des spermatozoïdes immatures prennent plus le bleu d'aniline tandis que les noyaux riches en protamines des spermatozoïdes matures ne sont pas colorés.



**Figure 23:** des spermatozoïdes immatures colorer au bleu d'aniline

Cette technique a montré son association à des altérations des paramètres spermatiques classiques (Rocca *et al.*, 2016 ; Cariati *et al.*, 2016).

#### **IV.3.3.2. Test 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).

#### **IV.3.3.3. Test de comètes**

Le test de comètes (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.

Cette technique est mise au point en 1984 par Ostling et Johanson sur une lignée cellulaire de lymphome de souris (Ostling et Johanson, 1984). et optimisée sur les lymphocytes humains par Singh et al en 1988 (Singh et al., 1988). L'équipe de Singh a modifié avec succès cette technique pour l'adapter aux spermatozoïdes (Singh et al., 1989). 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).

#### **IV.3.3.4. Test SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay)**

Le test SCSA est basé sur le fait qu'un tampon acide (pH=1,2) ou la chaleur peut dénaturer l'ADN au niveau des sites de cassures simple ou double brin, tandis que l'ADN double brin normal reste intact. Ensuite, la chromatine spermatique est colorée avec de l'acridine orange qui va colorer de manière différentielle l'ADN double et simple brin grâce à ses propriétés métachromatiques. Sous l'excitation de la lumière bleue en cryométrie en flux, l'ADN intact (double brin) émet une fluorescence verte, tandis que l'ADN cassé (simple brin) émet une fluorescence rouge. Le calcul du DFI (DNA Fragmentation Index) se base sur le ratio de la fluorescence rouge sur la fluorescence totale. Il permet d'évaluer le taux de l'ADN dénaturé (Evenson et al., 1980 ; Evenson et al., 1999).

#### **IV.3.3.5. Test à l'acridine orange**

Le test à l'acridine orange est introduit comme un test SCSA simplifié en utilisant un microscope à fluorescence (Tejada et al., 1984). Le nombre des spermatozoïdes émettant une fluorescence rouge indique le taux des spermatozoïdes avec un ADN simple brin, c'est-à-dire l'estimation du nombre de spermatozoïdes avec un ADN fragmenté.

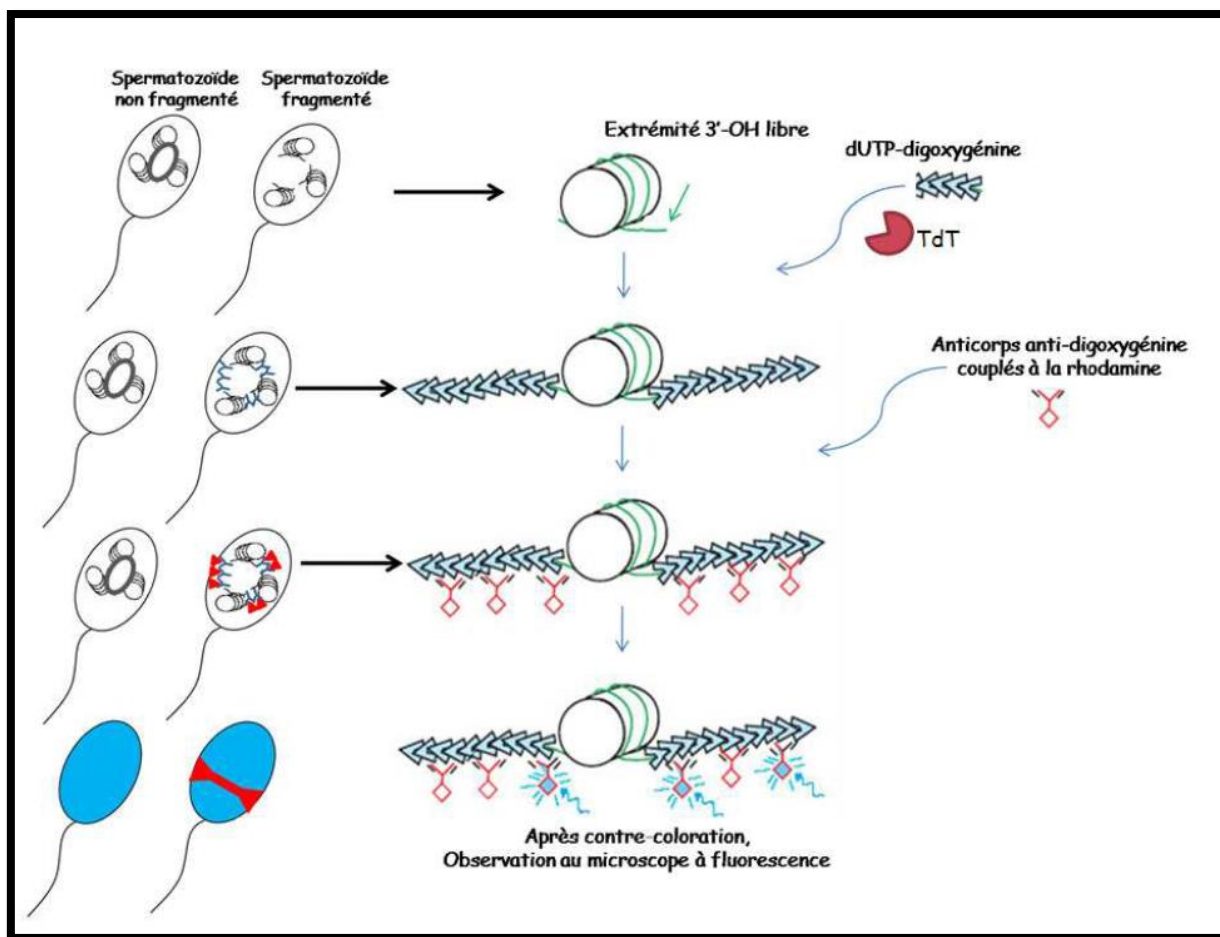
**IV.3.3.6. Test SCD (Sperm Chromatin Dispersion)**

Le test SCD a été utilisé pour la première fois en 2003 par l'équipe de Fernandez (Fernandez et al., 2003). Le SCD est basé sur le test halo pour détecter les dommages de l'ADN (Roti Roti et Wright, 1987). En fait, les spermatozoïdes sont traités par une solution acide puis par un tampon de lyse. Les spermatozoïdes avec un ADN fragmenté ont un petit ou aucun halo, à l'inverse des spermatozoïdes avec un ADN intact.

**IV.3.3.7. Test TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labelling) (Figure 24)**

Cette technique a été développée, pour les cellules somatiques, par Garvieli et al en 1992 et appliquée pour la première fois sur les spermatozoïdes par l'équipe de Gorczyca un an plus tard (Gorczyca et al., 1993). 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 la digoxigénine qui va être capturée par les anticorps anti-digoxigénine. 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 (Mehdi et al., 2009). Un taux élevé de la fragmentation de l'ADN spermatique semble être associé à la diminution des résultats en FIV (Frydman et al., 2008). La fragmentation de l'ADN spermatique évaluée par la technique TUNEL paraît être un bon indicateur de la fertilité masculine (Sergerie et al., 2005).



**Figure 24** : Principes de la technique TUNEL sur les spermatozoïdes\*

\*<https://www.semanticscholar.org/paper/Analyse-de-1%27%C3%A9quipement-chromosomique-et-de-la-de-Perrin/01b0b078dfcbe38a257c4184a9179e94a3bde1/figure/29>

## V. Traitement

Le traitement des troubles de la fertilité masculine dépend de l'exactitude du diagnostic, de l'évaluation des facteurs étiologiques en cause, et du partenaire féminin car le couple infertile doit être traité comme une unité.

### V.1. Le traitement médical

#### V.1.1. Le traitement antibiotique

Les infections aiguës ou chroniques des glandes sexuelles accessoires peuvent entraîner des modifications morphologiques des spermatozoïdes, et peuvent altérer la fonction de la prostate (Lunenfeld, 1986), ou entraîner une obstruction des voies excrétrices du sperme. Dans ce cas, une antibiothérapie adaptée pourrait être bénéfique et améliorerait la fertilité. De même, des

études ont montré une amélioration de la fertilité et une augmentation du taux de grossesse après un traitement antibiotique.

### **V.1.2. Le traitement hormonal**

Le traitement hormonal vise à corriger les déséquilibres hormonaux, liés à un dysfonctionnement hypothalamique, hypophysaire ou testiculaire affectant directement la spermatogenèse. Moins de 5% des hommes infertiles présentent des troubles hormonaux pouvant être traités par thérapie hormonale. Les déséquilibres hormonaux résultant d'un dysfonctionnement du mécanisme d'interaction entre l'hypothalamus, l'hypophyse et les testicules, affectent directement le développement des spermatozoïdes (spermatogenèse). Dans ce type d'infertilité, le traitement à l'aide de gonadotrophines conduit à un taux de succès élevé.

Dans certains cas, les gonadotrophines sont également choisies pour traiter des infertilités masculines inexplicables telles que les oligospermies (nombre de spermatozoïdes anormalement bas) ou les asthénospermies (lorsque moins de 40% des spermatozoïdes sont mobiles). Les troubles de la production des spermatozoïdes dus à une hyperprolactinémie D'autres types de thérapies médicamenteuses consistent à traiter l'infertilité masculine due à des infections par des antibiotiques ou encore un trouble de la production des spermatozoïdes dû à une hyperprolactinémie (augmentation du taux sanguin de prolactine) par administration de bromocriptine.

### **V.2. Le traitement chirurgical**

Le traitement chirurgical de l'infertilité masculine vise à éliminer les obstacles anatomiques empêchant la production et la maturation des spermatozoïdes (dans les testicules et dans l'épididyme) ou l'éjaculation. Les méthodes chirurgicales d'excision des veines variqueuses dans le scrotum (varicocèle) peuvent parfois servir à améliorer la qualité des spermatozoïdes. La vasectomie (ligature ou interruption du canal déférent, par lequel les spermatozoïdes quittent les testicules), employée comme méthode de contraception peut être réversible grâce à des techniques de microchirurgie, même s'il subsiste chez certains patients des problèmes d'infertilité après ces interventions.

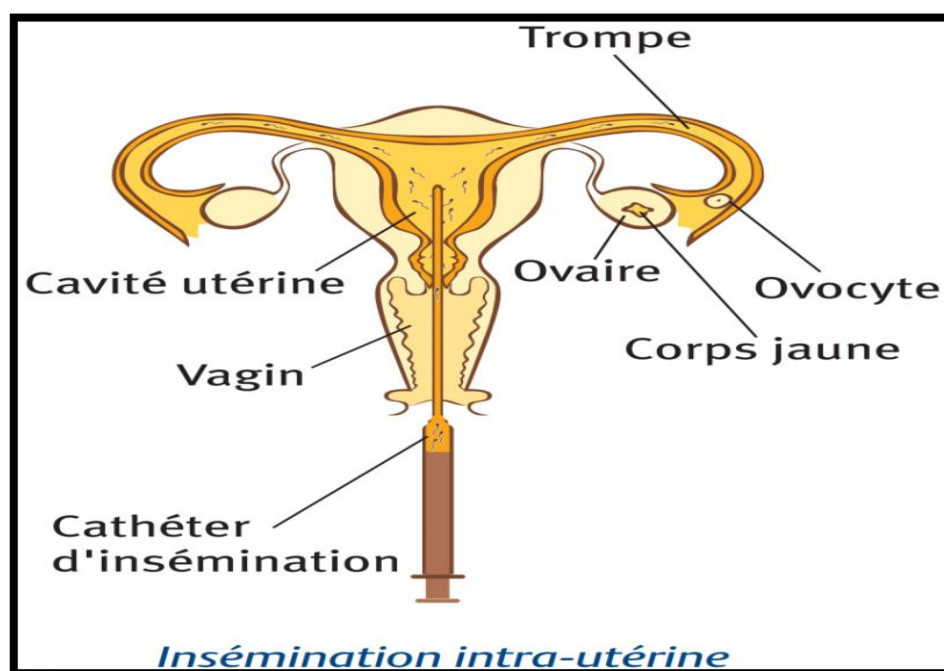
### **V.3. Techniques d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP)**

Les techniques d'aide médicale à la procréation ont révolutionnées le traitement de l'infertilité masculine par azoospermie ou oligospermie sévère et avec asthénospermie et tératospermie. Ces techniques ne peuvent se concevoir qu'au sein d'une équipe pluridisciplinaire complémentaire, entraînée et équipée. Malgré leur succès les techniques d'AMP restent un traitement symptomatique de l'infertilité lorsque la cause n'a pas été identifiée et corrigée (Rollet, 1999).

### V.3.1. L'insémination artificielle avec sperme du conjoint

L'insémination intra-utérine (Figure 25) est une technique qui consiste après stimulation ovarienne à déposer le jour de l'ovulation des quantités relativement importantes de spermatozoïdes sélectionnés soit à l'entrée du col de l'utérus, soit à l'intérieur de l'utérus en passant le col, pour leur permettre d'accéder directement aux trompes de Fallope. Avant l'insémination, les spermatozoïdes subissent une préparation spéciale au sein du laboratoire de biologie de reproduction afin d'optimiser leur pouvoir fécondant, ou les meilleurs seront sélectionnés. L'inséminât doit contenir environ 500 000 spermatozoïdes mobiles.

**Indications** : ces inséminations sont indiquées dans les troubles de l'éjaculation, les oligospermies sévères, certaines infertilités immunologiques et stérilités inexplicées. L'insémination est un geste indolore mais qui doit être réalisé le plus délicatement. Le taux de grossesse par cycle est d'environ 10-20% selon les équipes. Cependant, au cours des dernières années, de nouvelles techniques connues sous le nom de microfécondation ou microinjection ont été utilisées pour traiter des infertilités masculines sévères. Les résultats encourageants de ces techniques donnent des chances aux couples infertiles d'avoir des enfants sans avoir recours au don du sperme.

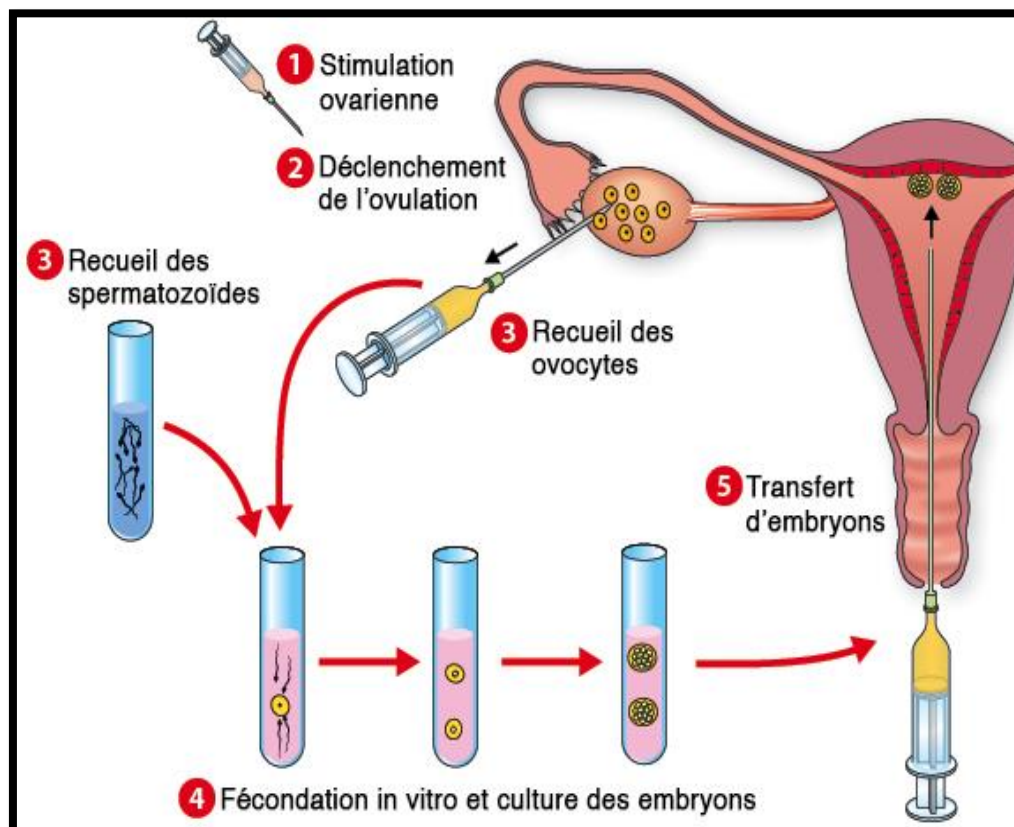


**Figure 25** : Insémination intra utérine\*

\* <https://www.insemination.fr/linsemination-intra-uterine/>

### V.3.2. La Fécondation in vitro

Au cours de cette technique (Figure 26) , les ovocytes sont mis en contact avec une préparation de 50 000 à 200 000 spermatozoïdes /ml, sélectionnés sur gradient de densité. Les spermatozoïdes sont obtenus soit directement à partir d'un éjaculat, soit en cas d'azoospermie, d'une extraction chirurgicale (testiculaire ou épидидymaire en fonction de la cause de l'azoospermie) (Khalouk et al ., 2010). Quatre –deux à 48 heures après l'insémination, deux voire trois embryons sont sélectionnés et transférés dans la cavité utérine, les embryons surnuméraires de bonne qualité pouvant être cryoconservés dans l'azote liquide dans l'attente d'un transfert ultérieur (Schosser et al ., 2007 ). Les de grossesse sont de l'ordre de 27% par embryon transféré. Les indications sont : l'échec de l'insémination artificielle, dans les infertilités immunologiques et inexplicables Cette procédure est plus pénible, car elle impose une hyperstimulation ovarienne contrôlée (traitement injectable quotidien), une surveillance échographique et hormonale très régulière et enfin une ponction ovocytaire écho guidée par voie transvaginale (Marcelli et al ., 2009 ).



**Figure 26** : Les différentes étapes de la fécondation in vitro\*

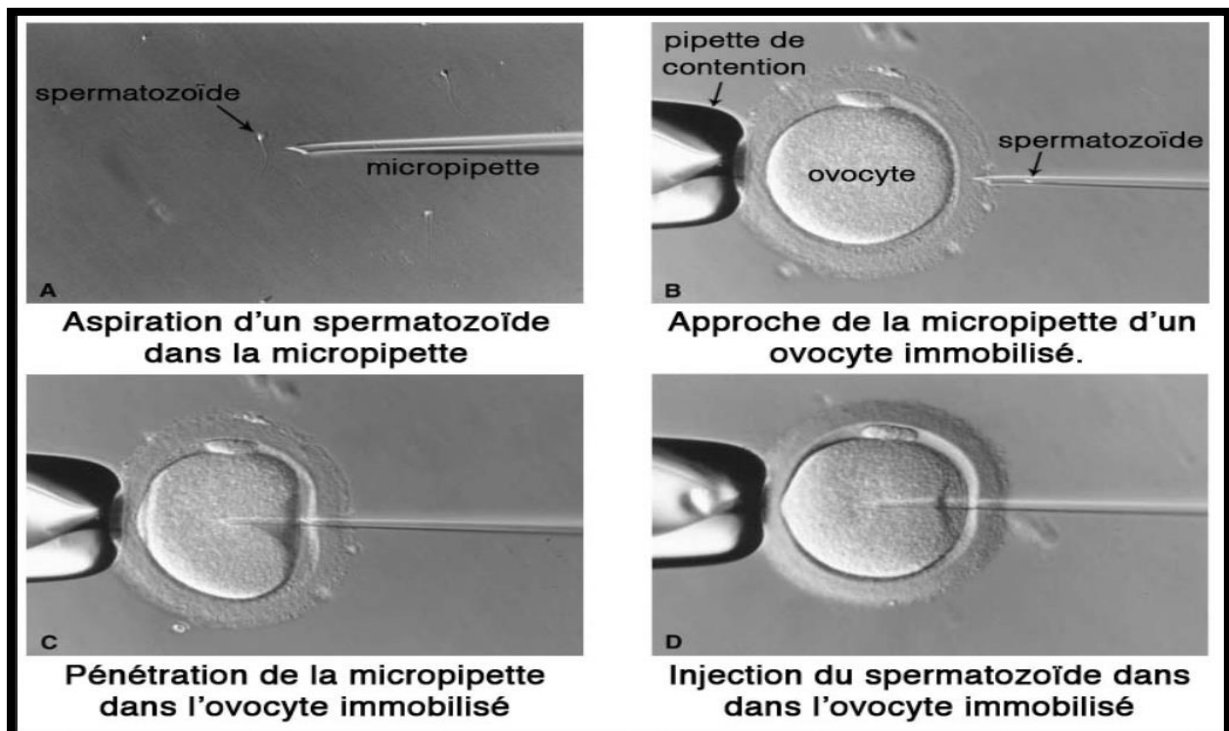
\*<https://sites.google.com/site/fecondationinvitro500/les-differents-etapes-de-la-fecondation-in-vitro>

### V.3.3. Techniques de fécondation avec micromanipulation (Figure 25)

Ces techniques de micromanipulations sont réservées aux infécondités masculines sévères : azoospermies avec prélèvement chirurgical des spermatozoïdes, asthénospermies d'étiologie connue et auto-immunisation anti spermatozoïdes sévères. Elles permettent directement l'interaction ovocyte-spermatozoïde sans traverser la zone pellucide et la membrane ovocytaire (Marcelli et al ., 2009 ).

La technique présentant le taux de succès le plus élevé est actuellement l'injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde ou ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection), qui consiste à sélectionner un seul spermatozoïde et le micro-injecté dans l'ovocyte. Le spermatozoïde sélectionné doit être de morphologie normale et vivant.

En cas de dyskinésies flagellaire, le test hypo-osmotique permet de différencier les spermatozoïdes vivants et morts. L'ICSI avec spermatozoïdes provenant de l'éjaculat (représente 88% en France en 2002) est indiquée dans les infertilités masculines sévères (moins de 500 000spermatozoides/ml) et aux échecs de la FIV classique. L'ICSI peut être réalisée avec spermatozoïdes frais (2,4%) ou congelés (6,8%) prélevés au niveau différentiel, épидидymaire voire testiculaire (Schosser et al ., 2007 ) .



**Figure 27 :** Les différentes étapes d'une injection intra cytoplasmique de spermatozoïdes\*

[\\*http://www.chu-nimes.fr/amp/injection-intra-cytoplasmique-de-spermatozoide-icsi.html](http://www.chu-nimes.fr/amp/injection-intra-cytoplasmique-de-spermatozoide-icsi.html)

**V.3.4. Spermatozoïdes prélevés dans l'épididyme ou dans le tissu testiculaire**

Des techniques de microchirurgie permettent de prélever des spermatozoïdes directement dans l'épididyme ou même dans le tissu testiculaire. Ces techniques sont utilisées en cas de malformations congénitales (ex : Agénésies des canaux déférents) qui empêchent le passage des spermatozoïdes au moment de l'éjaculation.

Les spermatozoïdes peuvent être prélevés dans l'épididyme microchirurgie ou MES ( Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration ) . Les spermatozoïdes peuvent être obtenus à partir de tissu testiculaire par biopsie, en cas d'azoospermie sécrétoire ou obstructive avec obstacle proximal. Cette technique porte le nom de TESE (Testicular Sperm Extraction). Les spermatozoïdes prélevés par MESA ou TESE sont ensuite utilisés pour une tentative de fécondation par ICSI.

---

# *Partie expérimentale*

---

---

# *Matériels et méthodes*

---

## I. Patients et Méthodes :

Le but de notre travail est d'étudier la relation entre la condensation de la chromatine spermatique et les autres paramètres spermatiques (numération, mobilité, vitalité, et morphologique).

### I-1- Patients :

Nous avons réalisé une étude sur une population de 52 hommes, âgés entre 17 et 64 ans, les patients que nous avons inclus dans notre étude sont des hommes venus au niveau de laboratoire d'analyses médicales Dr. BENZEGUIR de la wilaya de S.B.A. consulté pour des problèmes d'infertilité.

#### I-1.1 Lieu d'étude

- Laboratoire Dr. BENZEGUIR de la wilaya de S.B.A.
- Laboratoire Immunologie faculté des sciences de la nature et de la vie S.B.A.

#### I-1.2 Période d'étude

Notre étude s'est étendue sur une période d'un mois allant du 15 mars au 15 avril 2021.

## I.2 Méthodes

### I.2.1 Spermogramme

C'est un examen biologique permettant l'analyse des différents paramètres constituant le sperme, comprenant une analyse macroscopique et microscopique du sperme

**a- Examen macroscopique** permet d'évaluer :

- **Couleur :** L'observation de la couleur est faite à l'œil nu, le liquide séminal est normalement de coloration blanchâtre, parfois très discrètement jaune.
- **Odeur :** On utilise notre propre odorat pour déterminer ce paramètre, De façon générale, l'odeur qui est la plus citée pour qualifier le sperme est une odeur qui rappelle celle de l'eau de Javel.
- **Volume :** Il est estimé à l'aide d'un cylindre gradué de 10ml Le volume normal de l'éjaculat pour 3 jours d'abstinence se situe entre 1,5ml et 6ml.
- **PH :** À l'aide d'un papier-bandelette à usage unique conçu à cet effet. En déposant

une goutte de sperme sur le carré indicateur de la bandelette à l'aide d'une pipette Pasteur en plastique. Un pH normal se situe entre 7,2 et 8,0.

- **Viscosité :** À l'aide d'une pipette Pasteur, bien mélanger le sperme. Aspirer doucement environ 5ml. Évaluer la viscosité du sperme en le laissant s'écouler par simple gravité, Un sperme d'une viscosité normale, s'écoule sous forme de gouttes bien séparées alors qu'un sperme de forte viscosité forme des filaments de plus de 2 cm entre chaque goutte.
  
- b- Examen microscopique :** L'analyse microscopique est réalisée, après préparation des échantillons en fonction du paramètre à apprécier, grâce à une observation sous un microscope photonique, aux grossissements 40x.
- **Mobilité :** Pour évaluer la mobilité, un examen à l'état frais doit être effectué : placer 10 microlitres ( $\mu\text{L}$ ) de sperme entre une lame et une lamelle. Un décompte est réalisé en visualisant au moins 200 Spermatozoïdes (40x) et l'évaluation des grades se fait comme suit :
  - Motilité progressive: les spermatozoïdes se déplacent, en ligne droite, en zigzag ou en formant de grands cercles) peu importe leur vitesse.
  - Motilité non progressive: les spermatozoïdes qui bougent, mais dont les mouvements ne permettent pas le déplacement (petits cercles, faibles battements déplaçant à peine la tête, battements de flagelle seulement).
  - Immobiles : les spermatozoïdes ne font aucun mouvement.

Dans un éjaculat normal la proportion de spermatozoïdes mobiles progressifs une heure (rapides et lents) doit être supérieure à 32%, celle de spermatozoïdes immobiles doit être inférieure à 58%, dans le cas contraire on parle d'asthénospermie.

- **Vitalité :** La méthode d'évaluation de la vitalité des spermatozoïdes est basée sur l'exclusion d'un colorant vital par les spermatozoïdes vivants, à l'opposé le colorant pénètre les spermatozoïdes morts à membrane altérée.

Elle est évaluée par des colorants vitales l'éosine-nigrosine : une goutte de sperme est ajoutée à 2 gouttes d'éosine à 1% et après 30 sec, on ajoute 3 gouttes de nigrosine à 10%. Un frottis est réalisé, La lecture se fait sous un microscope photonique, au grossissement 40x. Ainsi, les spermatozoïdes morts apparaissent colorés en rose, alors que les spermatozoïdes

vivants sont incolores. Un sperme normal contient plus de 75% de formes vivantes. Au-dessous de 58% de cellules vivantes on parle d'une nécospermie.

#### ▪ Numération

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

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

C : concentration millions /ml

N : nombre de spermatozoïdes comptés sur la totalité de la cellule.

Di: dilution = 10 V : volume =10

1000onversion de cm<sup>3</sup> en ml.

#### I.2.2 Spermocytogramme

C'est l'étude morphologique des spermatozoïdes. L'analyse morphologique des spermatozoïdes " spermocytogramme " est effectuée sur un frottis après fixation et coloré par la méthode de May Grünwald-Giemsa (MGG). La technique de coloration au MGG est réalisée en 2 mL de May Grünwald sur le frottis de sperme. Après 4 min, 2 mL d'eau (pH 7,2) sont ajoutés. Le colorant dilué agit 1 min est éliminé. Du Giemsa (dilution au 1/10<sup>ème</sup>) est déposé de façon à recouvrir la lame pendant 20 min. la lame est rincée sous un filet d'eau courante puis séchée. Le montage est réalisé en déposant 1 goûte d'Entellan® (Merck, Darmstadt, Allemagne) et une lamelle. La lecture des lames colorées est faite à l'objectif x 100 à huile d'immersion.

- des spermatozoïdes morphologiquement normaux :

Le spermatozoïde est constitué d'une tête régulière et ovalaire, avec un grand axe de 4 à 5 µm et un petit axe de 2,5 à 3 µm, et d'un flagelle ayant un contour régulier et un aspect homogène, une longueur d'environ 45 µm et un diamètre de l'ordre de 0,4 à 0,5 µm.

- les polymalformations des spermatozoïdes qui comptent :

#### **Anomalies de la tête**

- ✚ Allongée, amincie, microcéphale, macrocéphale, irrégulière, dupliquée, en lyse.

#### **Anomalies de la pièce intermédiaire**

- ✚ Reste cytoplasmique. Pi angulée. Pi grêle.

#### **Anomalies du flagelle**

- ✚ Absent. Court. Enroulé. Double.

### **I.2.3 Coloration au bleu d'aniline ou bleu de méthyl ( $C_{37}H_{27}N_3Na_2O_9S_3$ )**

Cette coloration met en évidence les histones riches en lysine. Les lames à analyser sont fixées à l'éthanol 95% pendant 5 minutes puis immergées pendant 5 minutes dans une solution de bleu d'aniline acétifié à 5%, préparée extemporanément (dissolution de 1 g de bleu d'aniline (®Aniline blue, BIOCHEM Chemopharma) dans 0,8 ml d'acide acétique, ajustement du volume avec de l'eau distillée pour obtenir un volume final de 20 ml et filtration de la solution obtenue). Les lames sont rincées dans l'eau distillée (3x1minute) puis déshydratées par immersion successive dans une solution d'éthanol de densité croissante (Annexe2) (éthanol à 95 % 3 minutes ; éthanol 100% 3 minutes ) et séchées à l'air libre. Au microscope optique (Heidoph instruments D-91126 Schwabach, Germany), au grossissement x1000, les noyaux spermatiques contenant beaucoup d'histones sont colorés en bleu foncé.

. Quand toute la tête du spermatozoïde est bleu foncé, la chromatine est dite totalement mal condensée. Quand 20 -50% de la tête est coloré en bleu foncé, la chromatine est partiellement non condensée. Les noyaux spermatiques contenant moins de 15-20% d'histones sont non colorés et apparaissent bleu pâle.

Il n'existe pas de valeur normale clairement établie mais selon plusieurs publications, un seuil à 70% de spermatozoïdes matures normalement condensés (non colorés) doit être attendu à l'examen (Auger et al., 1990)

## **II- Etude statistique**

Une analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SPSS 22.0. Des tests statistiques comprenant le test de khi2, la corrélation de Pearson ont été utilisés. La signification statistique a été prise en compte pour les valeurs  $p < 0,05$ .

---

# *Résultats et discussion*

---

## II. Résultats

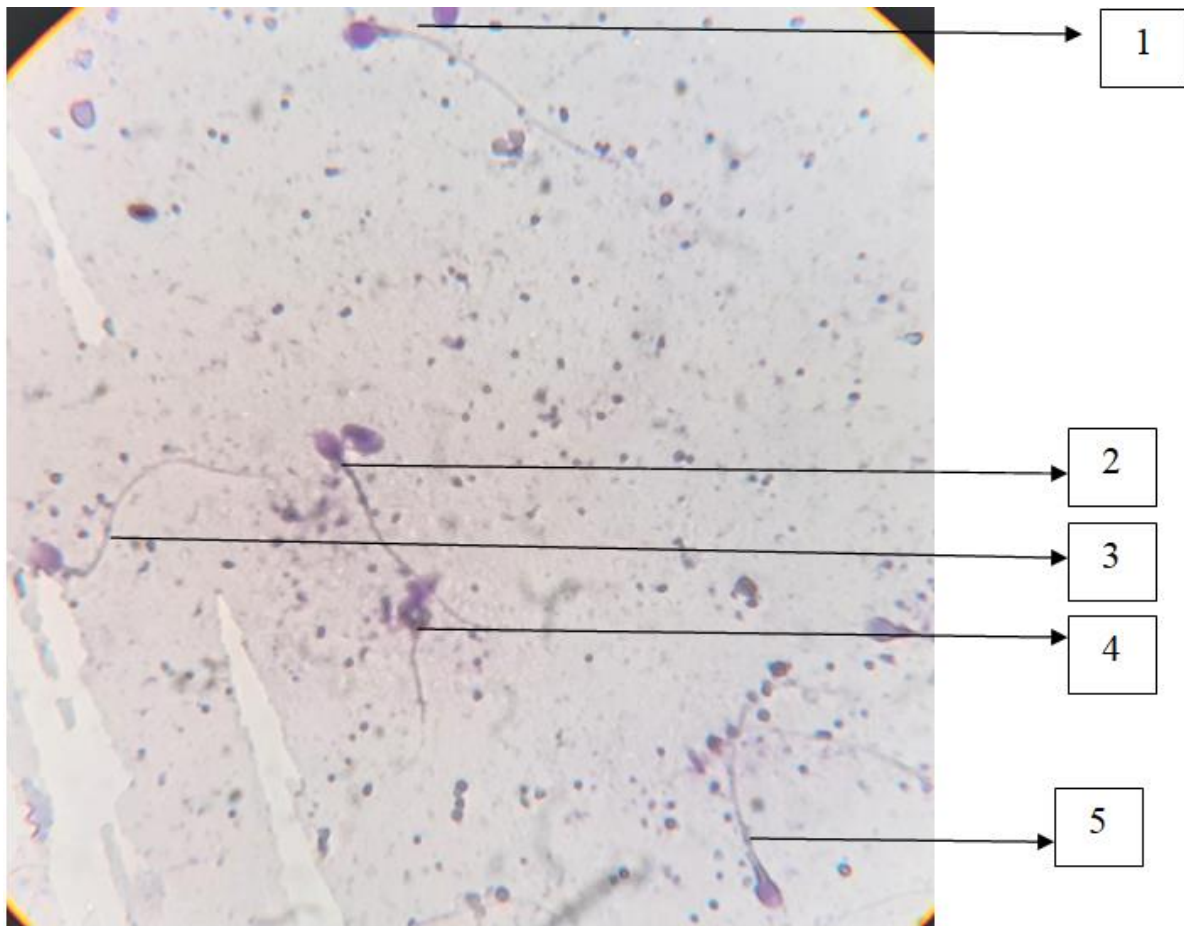
### II.1 Spermogramme et Spermocytogramme

Le spermogramme et le spermocytogramme ont été réalisés sur le prélèvement ayant servi à la coloration de bleu d'aniline (Tableau 3, Figur 28).

Une moyenne de la numération spermatique de  $61,57 \pm 60,09$  millions/ ml, et une moyenne à mobilité progressive  $37,56 \pm 18,79$  % et à morphologie normale  $25,98 \pm 26,28$  % a été observée dans le groupe de patients (Tableau 3).

**Tableau 3 : Résultats spermogramme et spermocytogramme des patients**

Patient	Age (Ans)	Spermogramme			Morphologie
		Numération (millions/mL)	Mobilité (%)	Vitalité (%)	Normale (%)
<b>Moyenne</b>	40,06±9,09	61,59±60,09	37,56±18,79	66,67±26,96	25,98±26,28



**Figure 28 : Anomalies morphologiques des spermatozoïdes des patients.**

**1 : Spermatozoïde acrosome mal formé**

**2 : Spermatozoïde Normal**

**3 : Spermatozoïde avec pièce intermédiaire angulé et flagelle irrégulier**

**4 : Spermatozoïde avec une tête Macrocéphale et un flagelle écourté**

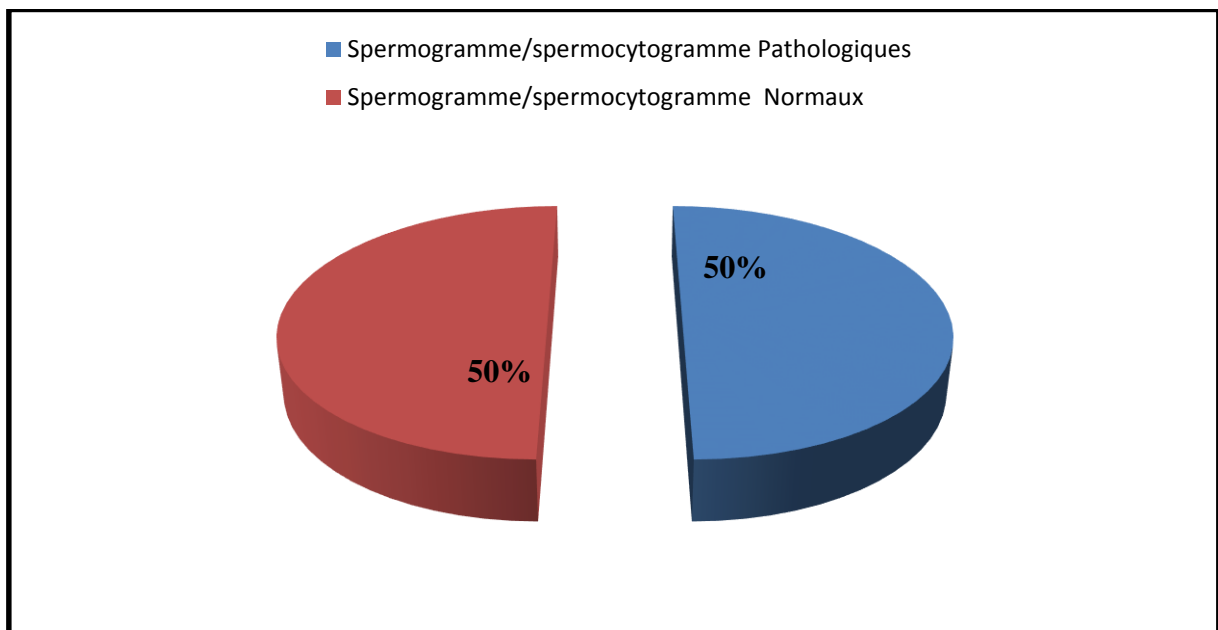
**5 : Spermatozoïde avec reste cytoplasmique**

D'après les résultats du spermogramme et spermocytogramme nous avons réparti les patients en fonction de la normalité ou la pathogénicité (tableau 4, Figure 28).

Nous avons réparti aussi les patients selon la fréquence des cas pathologiques (Tableau 4, Figure 29).

**Tableau 4: Résultats globaux des données des spermogrammes et spermocytogrammes**

Résultat	Effectifs	Pourcentage (%)
Spermogramme/spermocytogramme Pathologiques	26	50
Spermogramme/spermocytogramme Normaux	26	50
Total	52	100

**Figure 29 : Répartition des patients en fonction de la normalité ou la pathogénicité des résultats du spermogramme et du spermocytogramme**

Nous avons réparti les patients ayant un spermogramme et un spermocytogramme pathologique selon la fréquence de la pathologie telle qu'il est indiqué dans le tableau 5, Figure 30.

**Tableau 5: Répartition de la fréquence des cas pathologiques**

Diagnostic	Fréquence	Pourcentage (%)
A	10	38,46
O	6	23,07
T	2	7,69
AT	1	3,84
OA	4	15,38
OAT	3	11,53
Total	26	100

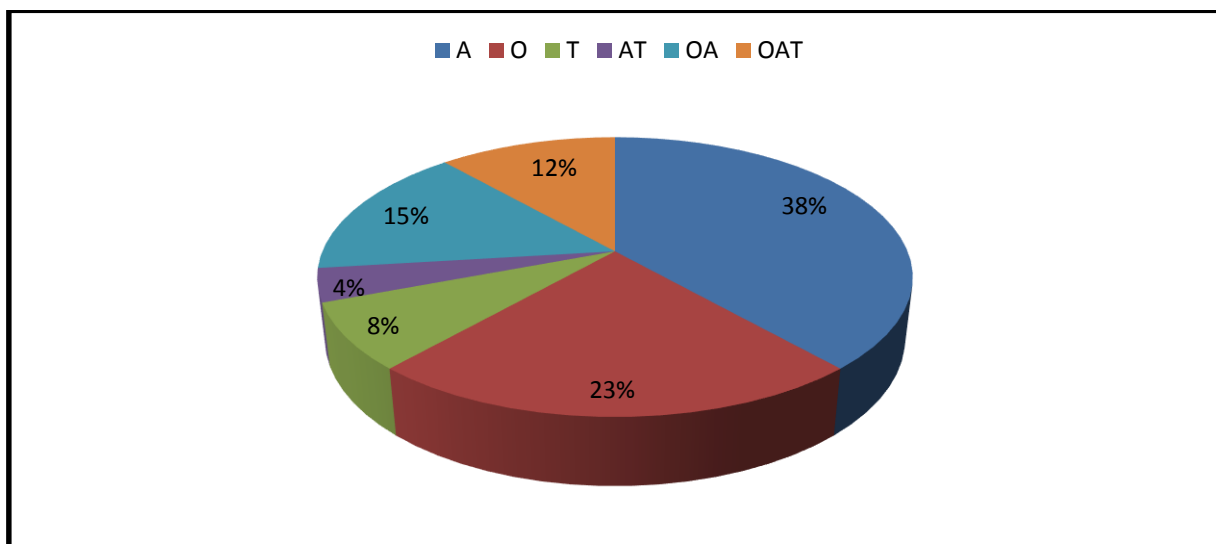
O : oligospermie (< 15 millions/mL)

A : asthénospermie (< 32% progressant)

T : tératospermie (< 4% de formes typiques)

OAT : oligoasthénotératospermie

PN: profile normal



**Figure 30 : Distribution de la fréquence des anomalies spermatiques**

## II.2 Coloration au bleu d'aniline :

Nous avons analysé plus de 5000 spermatozoïdes par la technique de coloration au bleu d'aniline pour tous les patients (Tableau 6, Figure 31,32).

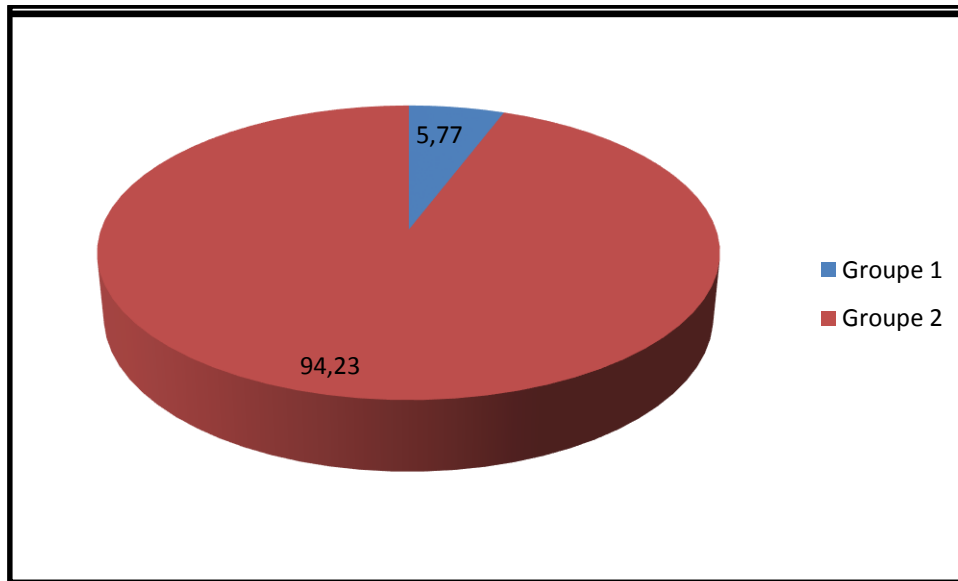
Le taux de la condensation de la chromatine des spermatozoïdes des patients est présenté dans le tableau 6.

Le taux moyen de gamètes à chromatine mal condensé est évalué par la technique de coloration au bleu d'aniline dans le groupe des patients est de 64,20 %. Le taux de spermatozoïdes à chromatine mal condensé le plus élevé est observé chez le P 20 (96%) et le taux plus faible est observé chez le P 36 (13%).

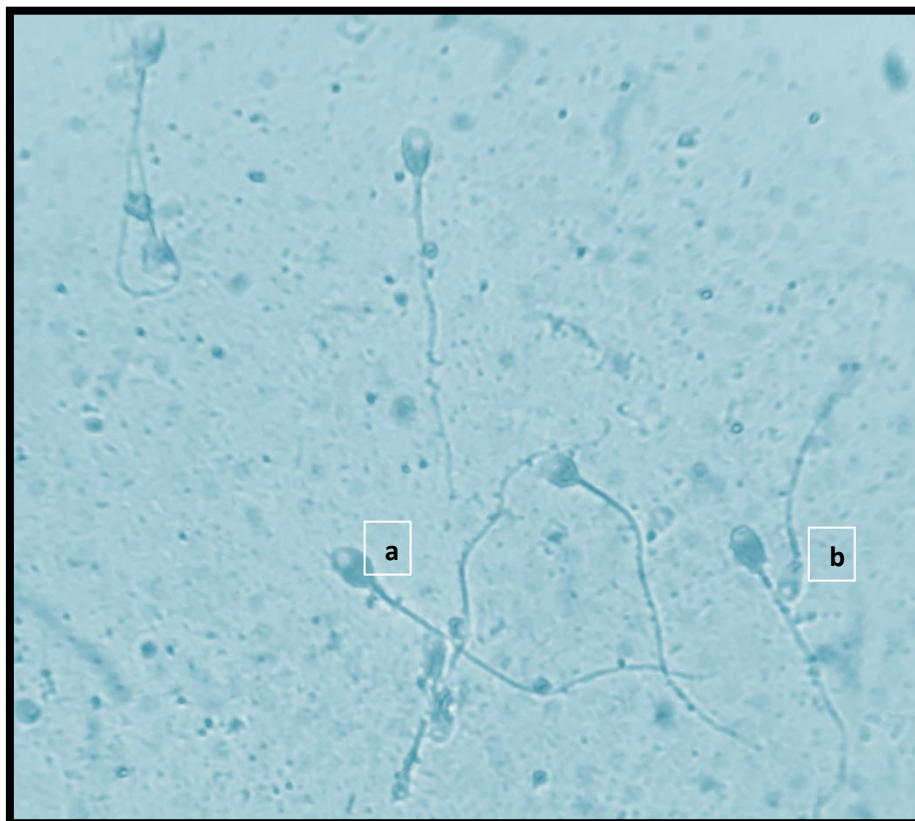
D'après les résultats du taux de la condensation de la chromatine des Spermatozoïdes chez les patients, nous avons répartis nos patients en 2 groupes selon le taux de la condensation de l'ADN spermatique, G1 (n=3) : nombre de patients avec un taux de spermatozoïdes a chromatine bien condensée (5,77%), G2 (n=49) : nombre de patients avec un taux de spermatozoïdes a chromatine mal condensée (94,23%),

**Tableau 6 : Répartition des patients en groupe selon le taux de la condensation de la chromatine des Spermatozoïdes des patients**

Groupe de patients	Nombre de patients	Pourcentage
Groupe 1	3	5,77
Groupe 2	49	94,23
Total	52	100



**Figure 31 : Distribution du pourcentage des deux groupes selon le taux de la condensation de la chromatine des Spermatozoïdes des patients**



**Figure 32 : Observation microscopique des spermatozoïdes colorés au bleu d'aniline GX1000**

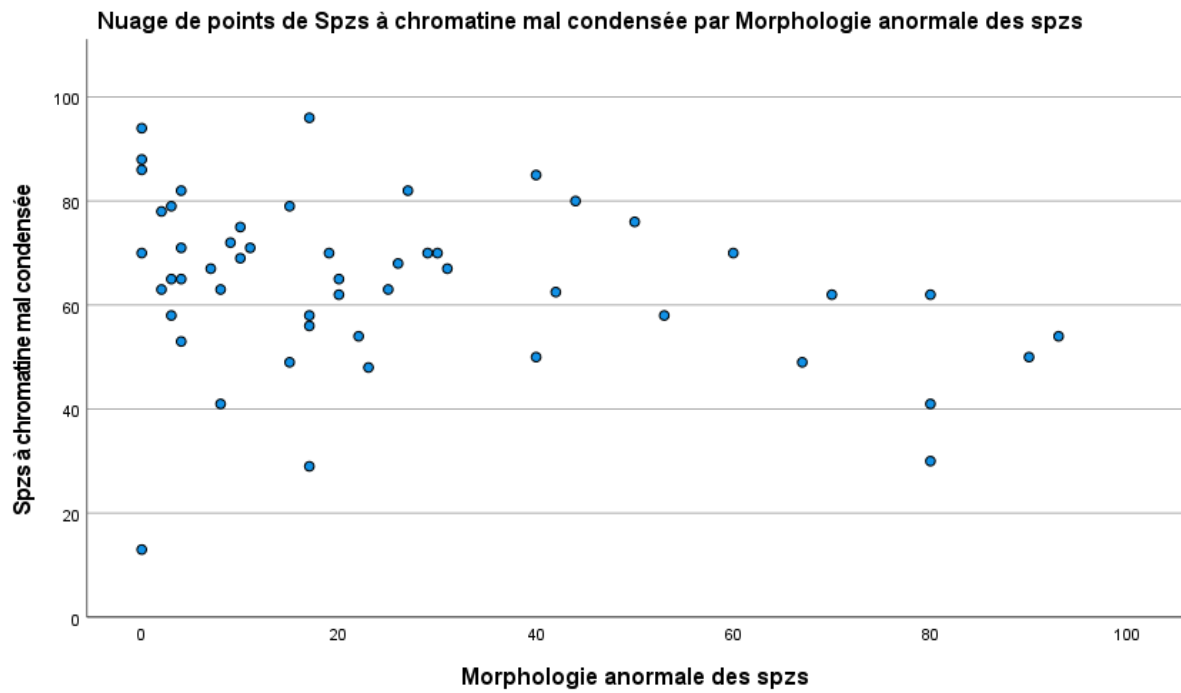
**(a: spermatozoïde immature (bleu foncé), b : spermatozoïde mature (bleu claire))**

Sur le tableau nous présentons les moyennes des paramètres spermatiques de chaque groupe ainsi la valeur  $p$  qui indique s'il y a une relation entre ces paramètres et la condensation de chromatine spermatique. Aucune différence significative n'a été observé  $p$  trouvé est  $> 0,05$ .

Le taux de spermatozoïdes avec des noyaux colorés en bleu foncé était négativement corrélé avec le taux de spermatozoïdes avec une morphologie normale (Figure7,Figure33).

**Tableau 7: comparaison des paramètres de sperme entre les groupes G1 et G2**

Données du spermogramme et spermocytogramme (moyennes $\pm$ ET)	G1 (n=3)	G2 (n=49)	Valeur $p$
Mobilité progressive (%)	48,87 $\pm$ 7,60	35,80 $\pm$ 18,66	0,297
Concentration des spermatozoïdes (millions/mL)	48,41 $\pm$ 66,28	60,24 $\pm$ 60,93	0,979
Vitalité (%)	81,67 $\pm$ 10,41	65,04 $\pm$ 27,80	0,174
Morphologie (%)	32,33 $\pm$ 42,15	24,28 $\pm$ 23,58	0,075



**Figure 33: Corrélation entre la condensation de la chromatine spermatique et la morphologie des spermatozoïdes**

Le graphique ne montre aucune relation entre la condensation de la chromatine spermatique et la morphologie des spermatozoïdes.

### III. Discussion :

Depuis toujours, les hommes ont été confrontés aux problèmes de reproduction, toutefois, la demande des couples et les possibilités thérapeutiques offertes n'ont fait que s'accroître au fil du temps. L'exploration de l'infertilité masculine reste avant tout basée sur l'analyse classique des paramètres du sperme. Néanmoins, d'autres techniques visant à évaluer l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes, et la maturité de la chromatine spermatique viennent aujourd'hui la compléter (Varghese et al. , 2009 ; Fellous et Siffroi, 2003 ; Guérin et Benchaib , 2004 ; Hamadehh et al., 2001 ; Sellami et al., 2003 ; Poumasumi et al., 2019).

Notre étude consiste à utiliser la coloration au bleu d'aniline pour évaluer le degré de condensation de la chromatine des spermatozoïdes chez des hommes normospermiques et à paramètres spermatiques anormaux.

En ce qui concerne l'évaluation de la condensation de la chromatine par la coloration au bleu d'aniline, il a été admis, sans que pour autant les preuves de la spécificité des interactions moléculaires n'aient été établies, que la coloration bleue soit liée à la persistance des résidus lysine présents dans les histones (Terquem en Dadoune , 1983). Les résultats obtenus par cette coloration sont concordants avec ceux obtenus à l'aide d'autres techniques d'évaluation de la condensation de la chromatine telles que l'acridine orange ou la chromomycine A3 (Angelopoulou et al., 2007). Une relation entre le degré de compaction de la chromatine et la fertilité masculine a été identifiée (Filatov et al., 1999), une augmentation du pourcentage de spermatozoïdes à chromatine mal condensée ayant été mise en évidence chez des patients présentant une tératozoospermie par comparaison à des hommes aux paramètres spermatiques normaux (Hofmann et Hilscher 1991). Cependant, aucune relation n'est aujourd'hui clairement établie entre la condensation de la chromatine et la morphologie des spermatozoïdes (Hammadeh et al., 2001).

Les résultats obtenus dans notre étude montrent un taux moyens de chromatine spermatique mal condensée chez les patients de  $60,20 \pm 16,14\%$  qui un taux significativement plus élevé chez le groupe contrôle ( $<30\%$ ). Ainsi, nous avons mis en évidence un taux de gamètes à morphologie normale de  $25,98 \pm 26,28\%$ . Ces taux observés pourraient être une autre voie aidant à expliquer leurs troubles de la reproduction.

L'âge des patients varie entre 17-64 ans, avec une moyenne de  $40,06 \pm 9,09$  ans. Nous avons noté un taux de 50 % de patients avec des spermogrammes et/ou des spermocytogrammes pathologiques.

Il a été rapporté que l'influence du vieillissement sur la qualité nucléaire des spermatozoïdes (Singh et al., 2003 ; Zubkova et al., 2005 ; Wyrobek et al., 2006 ; Caer et al., 2008).

Notre étude ne peut pas confronter ces observations, une étude portant sur une cohorte de patients serait souhaitable.

Dans cette étude nous avons comparé le taux de spermatozoïdes à chromatine mal condensée avec les paramètres spermatiques des patients (Concentration, mobilité progressive, vitalité, et morphologie normale) aucune corrélation n'a été trouvée  $p > 0,05$  (tableau 7).

Ces résultats sont comparables avec ceux de Al-Fahham et al. qui a rapporté un taux de spermatozoïdes à chromatine mal condensée très élevé chez les patients fertiles et infertiles en utilisant la technique de coloration au bleu d'aniline. En outre, aucune association n'a été trouvée entre les taux de spermatozoïdes à chromatine mal condensée et les différents paramètres spermatiques : Concentration, mobilité progressive, vitalité, et morphologie normale (Al-Fahham et al., 2014).

Bien que Hammadeh et al. ont rapporté une signification négative entre les patients et les donneurs fertiles par l'utilisation de la coloration au bleu d'aniline. Ils ont trouvé qu'il n'y a pas de corrélation entre la maturité de la chromatine et la morphologie, la numération et la mobilité des spermatozoïdes (Hammadeh et al., 2001). Cependant, dans une autre étude, une association significative entre la condensation de chromatine et la morphologie des gamètes a été trouvée (Kim et al., 2013).

Sellami et al., ont trouvé une signification positive entre la maturité de la chromatine spermatique et le taux moyen des spermatozoïdes avec anomalies de la tête chez des hommes infertiles en utilisant la coloration au bleu d'aniline (Sellami et al., 2013).

Dans une autre ancienne étude ont trouvé une signification négative entre la maturité de la chromatine spermatique, la morphologie et la mobilité progressive (Kazerooni et al., 2009).

Les résultats de la coloration au bleu d'aniline sont similaires chez les hommes normospermiques que chez les hommes avec paramètres spermatique anormaux (oligospermie, asthénospermie, ou tératospermie...). Ainsi, l'étiologie du défaut de la condensation de la chromatine spermatique doit être recherchée dans d'autres facteurs comme l'aberration de protamine ou l'apoptose plutôt que l'excès d'histone ou la mal condensation de la chromatine chez les hommes infertiles.

Alors qu'une étude de Mohammadi et al., 2020 ont trouvé une faible corrélation défaut de la condensation de la chromatine spermatique et les autres paramètres spermatiques. (Mohammadi et al., 2020).

Dans les cas idiopathiques, les paramètres du sperme ont été corrélés aux taux diminué de condensation de la chromatine spermatique. Selon Talebi et al. qui ont étudié l'implication des paramètres du sperme dans les avortements spontanés, ils ont évalué la qualité du sperme d'un groupe de patients dont les partenaires ont eu au moins trois avortements répétés après une conception naturelle. Les résultats de la coloration au bleu d'aniline ont révélé que la majorité des échantillons chez ces patients présentaient des taux élevé de spermatozoïdes à chromatine immature (Talebi et al., 2012).

La relation entre la condensation de la chromatine spermatique et les paramètres spermatiques reste controversée (Talebi et al, 2011 ; Talebi et al., 2008 ; Talebi et al., 2007, Alharbi et al, 2019). Talebi et al. n'ont montré aucune association entre les résultats de la condensation de la chromatine spermatique et de l'état de l'intégrité de l'ADN en utilisant différentes techniques chez des souris adultes (Rahimipour et Talebi ; 2013).

Il reste important que la découverte de l'évaluation de la condensation de la chromatine spermatique par la coloration au bleu d'aniline a un caractère prédictif dans les résultats des techniques d'aide médicale à la procréation (AMP), bien que ceux-ci ne puissent pas déterminer le potentiel de fécondation et les taux de clivage et de grossesse après ICSI (Irez et al., 2015 ; Simon et al., 2014).

Les résultats de notre étude soutiennent l'importance de la coloration au bleu d'aniline chez les hommes infertiles, qui subit habituellement des techniques de reproduction assistée. Cette technique permet d'évaluer la condensation de la chromatine spermatique et doit être recommandée avant l'application de toute procédure de procréation assistée. Ces investigations permettent d'identifier les patients présentant un risque accru de défaillance de

la reproduction et de faciliter un conseil approprié pour informer les patients sur leurs options de reproduction. Ainsi afin d'approfondir et compléter ce travail, il faudrait étendre l'étude sur un nombre de patients plus conséquent permettant un traitement statistique des données afin de dégager des corrélations entre les paramètres mis en cause et les différentes pathologies suspectées.

---

# *Conclusion*

---

## Conclusion

L'infertilité masculine peut être due à une multitude de facteurs étiologiques, parmi les facteurs les plus répondus, les anomalies chromosomiques de spermatozoïdes comme syndrome de klinefelter, les anomalies morphologique de spermatozoïdes (anomalies de la tête, de flagelle....), aussi la mal condensation de la chromatine de l'ADN spermatique.

Pour mieux comprendre nous avons analysé le taux de la condensation de la chromatine spermatique à l'aide de la technique de coloration au bleu d'aniline chez des hommes normospermiques et des hommes à paramètres spermatiques anormaux, nous avons étudié l'interaction entre cette condensation et la morphologie, la mobilité, le nombre et la vitalité des spermatozoïdes.

Les résultats obtenus ne montrent aucune association entre les deux paramètres, Donc la relation entre la condensation de la chromatine spermatique et la morphologie du sperme humain reste discutable et des investigations plus appropriées et approfondies sont nécessaires pour répondre adéquatement à cette question.

Les dommages à l'ADN spermatique peuvent avoir un effet négatif sur le taux de fécondation in vitro, entraver le développement embryonnaire et également être pro-mutagènes (Kopeika et al., 2015). Ces altérations peuvent conduire à une fausse couche, une mort fœtale in utero, une mort subite du nourrisson, des malformations infantiles, la transmission de maladies génétiques incluant les cancers et la transmission de maladies épigénétiques (Frias et al., 2003 ; Marchetti et al., 2005 ; Siderakis et Tarsounas, 2007 ; Reig-Viader et al., 2014 ; Kopeika et al., 2015). Ainsi, l'intégrité de l'ADN spermatique joue un rôle fondamental dans les chances de paternité.

L'utilisation de techniques plus sophistiquées comme le dosage de la chromomycine A3 (CAM3) (Nasr-Esfahani et al., 2001), et la cytométrie d'image par microscopie électronique à transmission (MET) (Auger et al., 1993) fournit des résultats plus précis et plus spécifiques dans l'évaluation de la maturité du noyau des spermatozoïdes, mais présente de nombreuses contraintes techniques à utiliser dans les investigations de routine. Il faut poursuivre et approfondir l'étude de la qualité de la chromatine du sperme chez les hommes infertiles pour

mieux comprendre sa relation avec la capacité fécondante et mieux évaluer leur impact sur les résultats de *la fécondation in vitro* et du développement embryonnaire.

Jusqu'à présent, ces tests ont été présentés comme étant simples, rapides et précis pour l'analyse de l'intégrité de la chromatine spermatique. De plus, ces méthodes ne nécessitent pas d'instrumentation complexe (Evgeni et al., 2014).

---

# *Références bibliographique*

---

**Référence bibliographiques**

1. Ahmadi A, Ng SC (1999). Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool* 284 : 696-704.
2. Aitken RJ, De Iuliis GN, McLanchlan RI (2009). Biological and clinical significance
3. Alharbi M., MD. 2019, Human sperm DNA damage: Impact of *in vitro* oxidative stress and *in vivo* vitamins on conventional and advanced sperm function parameters Division of Urology, Department of Surgery, McGill University, Montreal, Quebec, Canada.
4. Auger J, Eustache F, Andersen AG, Irvine DS, Jorgensen N, Skakkebaek NE, Suominen J, Toppari J, Vierula M, Jouannet P. Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Hum Reprod* 2001; 16: 2710-2717.
5. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among the fertile men in Paris during the past 20 years. *N. Engl. J. Med.* 1995; 335:281- 288.
6. Auger, J. and Eustache, F. (2000) standardisation of the Morphological Assessment of Human Spermatozoa According to Modified David's Classification. *Andrologie*, 10,358-373.
7. Avendano C, Franchi A, Duran H, Oehninger S (2010). DNA fragmentation of normal
8. Balhorn Rob (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biology* 8(227).
9. Bay K, Main KM, Toppari J, Skakkebaek NE. Testicular descent: INSL3, testosterone, genes and the intrauterine milieu. *Nat Rev Urol.* 2011;8(4):187-96.
10. Blanc B et Porcu G., 2002. Stérilité. Collection stratégie diagnostique et thérapeutique en gynécologie. Editions : Arnette. 19 p-462p.
11. Boivin, J., L. Bunting, J. A. Collins, et K. G. Nygren. 2007. « International Estimates of Infertility Prevalence and Treatment-Seeking: Potential Need and Demand for Infertility Medical Care ». *Human Reproduction* 22 (6): 1506- 12. doi:10.1093/humrep/dem046.
12. Bouyé S, Marcelli F, Ghoneim T, Lemaitre L, Robin G, Mitchell V, et al. Description andrologique d'une population azoosperme avec une agénésie des canaux déférents consultant pour infertilité Progrès en Urologie. 2014;24:132-137
13. Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, Saad A (2011). Study of aneuploidy rate and sperm DNA fragmentation in large-headed, multiple-tailed spermatozoa. *Andrologia* 44 :130-135.
14. Bujan L. Increase in scrotal temperature in car drivers. *Human Reproduction*. 2000; 15 (6) : 1355-1357.
15. Bujan L., Mieusset R., Mansat A., Pontonnier F., 1988 . Conditions de travail:spermatogenèse et fertilité masculine. *Arch. Mal Profès* ; 49-9
16. Cabrol C., Kalhe W., Leonhardt H., Platzer W., 1979 . Anatomie 2 viscères. Edition française, p: 264-281.
17. Carrell DT (2012). Epigenetics of the male gamete. *Fertil and Steril* 97(2) : 267-274.
18. Carrell DT, Liu L, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Erickson L, Campbell B (2013). Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl* 49(1) : 49-55.
19. Carrell DT, Wilcox AL, Lowy L, Peterson CM, Jones KP, Erickson L, Campbell B, Branch DW, Hatasaka HH (2003). Elevated sperm chromosome aneuploidy and

- apoptosis in patients with unexplained pregnancy loss. *Obstet Gynecol* 101(6) : 1229-1235.
20. Carretier J, p.Coloby, p.Pommier et al. pour le FNCLCC – Comprendre le cancer de la prostate. Guide d'information et de dialogue à l'usage des personnes malades et de leurs proches. 2005.
  21. Cho C, Willis WD, Goulding EH et al (2001). Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* 28 : 82-86.
  22. Cho C, Jung-Ha H, Willis WD, Goulding EH, Stein P, Xu Z, Schultz RM, Hecht NB, Eddy EM (2003). Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biol Reprod* 69(1) : 211-217. chromosome in infertile males from South of Iran. *Mol Biol Res Commun*.2016;5:247-55.
  23. Clément P, Cohen-Bacrie P. (2004) Aspects biologiques de l'assurance qualité en AMP. Paris, Masson :132-134.
  24. Clermont Y. (1963). the cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat*, 112: 35-51. Czyba J-C., Montella A. (1993). Testicules et épидидymes. *Biologie de la reproduction humaine*. Sauramps médical, Montpellier, pp 49-83.
  25. Comhair LH, Gagnaire JC, Rollet J, Lansac J. La stérilité masculine, cahier médicaux ; 1976, 1(23) : 1567-1586.
  26. Cook J, Dickens BM, Mahmoud F, Assisted reoroduction developments in the islamic world. *international journal of genecology obstertric*. 2005;74: 187-193.
  27. Cortes D, Thorup J.M. Visfeldt J. Cryptorchidism: Aspects of Fertility and Neoplasms Abstract - *Hormone Research*. 2001;55:21-27
  28. Dadone JP., Demoulin A. (1991). Structure et fonctions du testicule. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Ellipses, Paris, pp221-250.
  29. Dimassi S, Tilla M, Sanlaville D. Anomalies chromosomiques. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*. 2017;30(5- 6):249- 70. DOI: 10.1016/j.jpp.2017.09.007.
  30. DOMBRAY, J. (2013).PRISE EN CHARGE DE L'INFERTILITÉ MASCULINE PAR LE MÉDECIN GENERALISTE.
  31. Elloumi H, Haj Mahmoud D, Kacem K, Khrouf M, Bouzouita A, Zhioua F, et al. Les anticorps antispermatozoïdes chez l'homme : de la physiopathologie à la thérapeutique. *Immuno-Anal Biol Spéc*.2013;28(5):316-21.
  32. Erenpreiss J, Saad E, Giwercman A (2008). Sperm DNA damage in men from infertile couples. *Asian J Androl* 10(5) : 786-790.
  33. Eric P. Widmaier Hershel Raff Kevin T. Strang.08 février 2013. Livre Physiologie humaine les mecanismes du fonctionnement de l'organisme 6 em edition américaine: MALOINE. Page 593-594-595-599.
  34. Evenson D. P. (2016).The sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation for sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Animal Reproduction Science* 169:56-75.
  35. Evenson DP, Darzynkiewicz Z, and Melamed MR (1980). Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity of fertility. *Science* 240 : 1131-1133.
  36. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP (1999). Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 14(4) : 1039-1049.
  37. Fatehi AN, Bevers MM, Schoevers E, Roelen BA, Colenbrander B, Gadella BM (2006). DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *J Androl* 27(2) : 176-88.

38. Faure A. K. (2007). Exploration du génome et de l'épigénome dans les troubles sévères de la spermatogenèse chez l'homme, Université Joseph Fourier-Grenoble I, Chimie et Sciences du Vivant, pp 11-26.
39. Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG (2003). The sperm chromatin dispersion test : a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Andrology* 24(1) : 59-69.
40. Fontaine E, Jarfin A. Anomalies des organes génitaux internes masculins et retentissement sur la fertilité. *Urol Pédiatrique*. 2001;11:729-32.  
for infertility. *Obstet Gynecol*. 2003; 189: 901-905.
41. Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y Chromosome Microdeletions and Alterations of Spermatogenesis. *Endocr Rev*. 2001;22(2):226-39.
42. Frias S, Van Hummelen P, Meistrich ML, Lowe XR, Hagemester FB, Shelby MD, Bishop JB, Wyrobek AJ. NOVP chemotherapy for Hodgkin's disease transiently induces sperm aneuploidies associated with the major clinical aneuploidy syndromes involving chromosomes X, Y, 18, and 21. *Cancer Res*. 2003 ; 63 (1) : 44-51.
43. Frydman N, Prisant N, Hesters L, Frydman R, Tachdjian G, Cohen-Bacrie P, Fanchin R (2008). Adequate ovarian follicular status does not prevent the decrease in Pregnancy rates associated with high sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 89(1) : 92-97.
44. Garlandézec R, Multigner L. Relation entre exposition professionnelle, anomalies de la fertilité et troubles de l'appareil reproducteur: revue de la littérature récente. *BEH* 2012; 7-8-9: 119-23.
45. Gasca S, Pellestor F, Loup V, Anahory T, Dechaud H, De Vos J, Hamamad S (2007). Identifying new human oocyte marker genes : a microarray approach. *Reprod Biomed Online* 14(2) : 175-83.
46. Gerard H., Gerard A., Ennya A., Felden F., Gueant J.L. spermatogenic cell do internalize sertoli androgene-binding protein : transmission electron microscopy autoradiographic study in the rat. *Endocrinology*. (1994)134 : 1515-27.
47. Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z (1993). Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells : analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 207 : 202-205.
48. Gullotta F, Biancolella M, Costa E, Colapietro I, Nardone AM, Molinaro P, et al. Prenatal diagnosis of genomic disorders and chromosome abnormalities using array-based comparative genomic hybridization. *J Prenat Med*. 2007;1(1):16- 22.
49. Hamamah S, Barthelemy C. Spermogramme et tests de fécondance. *Intérêt et limites*. *JTA*. 1997: 1-11.
50. Hammamah S, Saliba E, Benhamed M, Gold F, 1999. *Médecine et biologie de la reproduction*. Ed Masson , 3-5 .
51. Hammoud SS, Nix DA, Hammoud AO et al (2011). Genome-wide analysis identifies changes in histone retention and epigenetic modifications at developmental and imprinted gene loci in the sperm of infertile men. *Hum Reprod* 26(9) : 2558-2569.
52. Hammoud SS, Nix DA, Zhang H et al (2009). Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 460 : 473-478.
53. Hartl DL., Jones EW. (2003). Les bases chromosomique de l'hérédité. *Génétique : les grands principes*. Troisième édition. Dunod, Paris, pp73-119.
54. Hazard J, Perlemuter L, *Endocrinologie*. Masson, 2000.
55. Hsieh MH, Hollander A, Lamb DJ, Turek PJ. The Genetic and Phenotypic Basis of Infertility in Men with Pediatric Urologic Disorders. *Urology*. 2010;76(1):25-31.

56. Iourou IY, Vorsanova SG, Yurov YB. Recent patents on molecular cytogenetics. *Recent Pat DNA Gene Seq.* 2008;2(1):6- 15. DOI: 10.2174/187221508783406585.
57. Irez T, Sahmay S, Ocal P, Goymen A, Senol H, Erol N, et al. Investigation of the association between the outcomes of sperm chromatin condensation tests, and assisted re-production techniques. *Andrologia.* 2015;47(4):438\_47.
58. Jenkins TG and Carrell DT (2012). The sperm epigenome and potential implications for the developing embryo. *Reproduction* 143 : 727-734.
59. Ji BT, Shu XO, Linet MS, Zheng W, Wacholder S, Gao YT. Paternal smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89: 238-43.
60. Jodar M and Oliva R (2014). Protamine alterations in human spermatozoa. *Adv Exp Med Biol* 791 : 83-102.
61. Kang JU, Koo SH, Kwon KC, Park JW, Shin SY, Kim JM, et al. High Frequency of Genetic Alterations in Non-small Cell Lung Cancer Detected by Multi target Fluorescence In Situ Hybridization. *J Korean Med Sci.* 2007;22(Suppl):S47 . DOI: 10.3346/jkms.2007.22.S.S47.
62. Kang JU, Koo SH. Evolving applications of microarray technology in postnatal diagnosis (Review). *International Journal of Molecular Medicine.* Spandidos Publications; 2012;30(2):223- 8. DOI: 10.3892/ijmm.2012.988.
63. Kang J-U. Overview of Cytogenetic Technologies. *Korean J Clin Lab Sci.* 2018;50(4):375- 81. DOI: 10.15324/kjcls.2018.50.4.375.
64. Kantartzi PD, Goulis CD, Goulis GD, Papadimas I. Male infertility and varicocele: myths and reality. *Hippokratia.* 2007;11(3):99-104.
65. Khallouk A, Tazi MF, El Fassi MJ, Farib MH (2010). L'infertilité masculine, Physiopathologie, Bilan et prise en charge. (*Urologie. Espérance médicale, Juillet, Tome 17 n° 170.* 421-429).
66. Khodari M, Ouzzane A, Marcelli F, Yakoubi R, Mitchell V, Zerbib P, Rigot J-M .Azoospermie et antécédent de cure de hernie inguinale chez l'adulte. *ProgUrol.* 2015;25:692-697
67. Kidd SA, Eskenazi B, Wyrobek AJ. Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil.Steril.* 2001; 75: 237-248.
68. Kopeika J, Thornhill A, Khalaf Y. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Hum Reprod Update.* 2015 Mar-Apr ; 21 (2) : 209-27. Review.
69. Kumari A, Yadav SK, Sher A (2012). Organizational and functional status of the Y-linked genes and loci in the infertile patients having normal spermiogram. *PlosOne* 7(7) : e41488 (1-12).
70. Laberge RM and Boissonneault G (2005). On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatid. *Biol Reprod* 73 : 289-296.
71. Langman J., 1984 . *Developpement normal et pathologique.* Edition Masson. Embryologie medicale.
72. Larochebrochard E, Thonneau P. Paternal age > or = 40 years: an important risk factor
73. Leduc F, Maquennehan V, Nkoma GB, Boissonneault G (2008). DNA damage response during chromatin remodeling in elongating spermatid of mice. *Biol Reprod* 72(2) : 324-32.
74. Leduc F, Nkoma GB and Boissonneault G (2008). Spermiogenesis and DNA repair : a possible etiology of human infertility and genetic disorders. *Sys Biol Reprod Med* 54 :3-10

75. Lejeune H. Prevention de l'infertilité d'origine infectieuse chez l'adolescent . *Andrologie*, 1992;2 : 100-103.
76. Lewis SE, Aitken RJ (2005). DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res* 322(1) : 33-41.
77. Li MM, Andersson HC. Clinical Application of Microarray-Based Molecular Cytogenetics: An Emerging New Era of Genomic Medicine. *The Journal of Pediatrics*. Elsevier; 2009;155(3):311- 7. DOI: 10.1016/j.jpeds.2009.04.001.
78. Li Y, Lalancette C, Miller D, Krawetz SA (2008). Characterization of nucleohistone and nucleoprotamine components in the mature human sperm nucleus. *Asian J Androl* 10 : 535-541.
79. Lu LY, Wu J, Ye L et al (2010). RNF8-dependent histone modifications regulate nucleosome removal during spermatogenesis. *Dev Cell* 18(3) : 371-384.
80. Lunenfeld B (1986) m. *Infertilité masculine, médecine et reproduction masculine*, 385-409.
81. Marc J-P. (2004). *Génétique médicale, formelle, chromosome, moléculaire, clinique*, ED Masson, 412 pages.
82. Marcelli F, Robin G, Rigot JM, (2009). *Prise en charge de l'infertilité masculine*, *Progrès en urologie*, 019, 260-264.
83. Marchetti F, Wyrobek AJ. Mechanisms and consequences of paternally transmitted chromosomal abnormalities. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2005 ; 75 (2) : 112-29.
84. Masoudi R, Mazaheri-Asadi L, Khorasani S. Partial and complete microdeletions of Y
85. Mauvais-Javis P., 1986. *Médecine de la reproduction masculine*. 2ème ed. Edition: Flammarion.
86. Mehdi M, Khantouche L, Ajina M, Saad A (2009). Detection of DNA fragmentation in human spermatozoa : correlation with semen parameters. *Andrologia* 41 : 383-386.
87. Mehrpour O, Karrari P, Zamani N, Tsatsakis AM, Abdollahi M. Occupational exposure to pesticides and consequences on male semen and fertility: a review. *Toxicol Lett* 2014 ; 230(2):146-56.
88. Meyer-Ficcaml, Lonchar JD, Ihara M, Meistrchml, Austin CA, Meyer RG (2011). Poly(ADP-ribose) polymerases PARP1 and PARP2 modulate topoisomerase II beta (TOP2B) function during chromatin condensation in mouse spermiogenesis. *Biol Reprod* 84(5) : 900-9.
89. Miller D, Brinkworth M, Iles D (2010). Paternal DNA packaging in spermatozoa : more than the sum of its parts ? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 139 : 287-301.
90. Mohamed AM, El-Bassyouni HT, El-Gerzawy AM, Hammad SA, Helmy NA, Kamel AK, et al. Cytogenomic characterization of 1q43q44 deletion associated with 4q32.1q35.2 duplication and phenotype correlation. *Molecular Cytogenetics*. 2018;11(1):57. DOI: 10.1186/s13039-018-0406-0
91. Mohammadi Z., Tavalae M., Gharagozloo P., Drevet J. R. and Nasr-Esfahani M. H. Could high DNA stainability (HDS) be a valuable indicator of sperm nuclear integrity? *Basic and Clinical Andrology* (2020) 30:12 <https://doi.org/10.1186/s12610-020-00110-8>.
92. Nguyen M-H. 2015. *Infertilité masculine: fragmentation de l'ADN spermatique, ségrégation méiotique et facteurs génétiques*. THÈSE /UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE sous le sceau de l'université européenne de Bretagne. 200.
93. Oberline Christophe, Christian vacher et Jean-Louis Berthelot. 2004. *Livre précis d'anatomie TOME II*. 11 em édition Lavoisier page .357-360-364.  
of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl* 32 :46-56.

94. Oleszczuk K, Augustinsson L, Bayat N, Giwercman A and Bungum M (2012) .Prevalence of high DNA fragmentation index in male partners of unexplained infertile couples. *Andrology* 1 : 357-360.
95. Oliva Rafael (2006). Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 12(4) : 417-435.
96. Olivier-Bonnet M, Benet J, Sun F, Navarro J, Abad C, Liehr T, Starke H, Greene C, Ko E, Martin RH. Meiotic studies in two human reciprocal translocations and their association with spermatogenic failure. *Hum Reprod.* 2005; 20(3):683-688.
97. OMS. Présentation de l'infertilité. Serono 2003-2004 :1-2.
98. OMS.Mannuel de laboratoire. (2010 ) analyse du sperme humain et de l'interaction des spermatozoïdes avec le mucus cervical. Paris , OMS, 22-31.
99. Orchidopexie (fixation du testicule). Urofrance. [cité 10 juill 2017]. Disponible sur: <http://www.urofrance.org/nc/urologie-grandpublic/fiches-patient/resultats-de-larecherche/html/orchidopexie-fixation-du-testicule.html>
100. Ostling O et Johanson KJ (1984). Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123 :291-298.
101. Ounis L. (2015). Les anomalies morphologique responsables des infertilités masculines dans l'Est Algérien :Aspect épidémiologique et génétique, Université Constantine 1, Faculté des sciences de la Nature et de la Vie.
102. Perrin A. (2009). Analyse de l'équipement chromosomique et de la fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes d'hommes infertiles. Université de Bretagne Occidentale, faculté de Médecine et des Sciences de la santé de Brest.
103. Phé V, Rouprêt M. Prostatites et épидидymites. (Elsevier Masson SAS, Paris) AKOS (Traité de Médecine). 2010;1-10. 5-0670  
physiopathologie. *Encycl Med Chir(ElsevierSAS, Paris), urologie, 18-760-A-10,2007:6p*
104. Plotton I, Brosse A, Lejeune H. Faut-il modifier la prise en charge du syndrome de Klinefelter pour améliorer les chances de paternité ? *Annal Endocrinol, 2010;71:494504*
105. Potonnier F. et Bujn L. 1993. Comment reconnaître et classer une infécondité masculine. *Rev . Prat* 8 (43) :941-47.
106. Poulat F, Goze C, Boizet B, Berta P. Gene SRY et anomalies de la détermination génétique du sexe chez l'homme. *Andrologie.*1992;2:50-2.
107. Qiu H, Miao K, Wang R, Qiao C, Zhang J, Zhang S, et al. [The application of fluorescence in situ hybridization in detecting chronic myeloid leukemia]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue*
108. Ravel C, Berthaut I, Siffroi JP. Infertilités masculines. *Endocrinologie-Nutrition.Elsevier Masson.* 2009 .
109. Ravel C, McElreavey K, Mandelbaum J, Siffroi J-P. Polymorphismes génétiques et infertilité masculine. *MT Médecine Reprod.*2007;9(4):219-29.
110. Reig-Viader R, Capilla L, Vila-Cejudo M, Garcia F, Anguita B, Garcia-Caldés M, Ruiz-Herrera A. Telomere homeostasis is compromised in spermatocytes from patients with idiopathic infertility. *Fertil Steril.* 2014 Sep ; 102 (3) : 728-738.e1.
111. Rigot J-M, Marcelli F, Giuliano F. Troubles de l'éjaculation à l'exception de l'éjaculation prématurée, troubles de l'orgasme *Progrès en Urologie.* 2013;23: 657-663
112. Rock A, Marcelli F, Robin G, Mitchell V, Leroy C, Rigot J-M. Clinical and paraclinical features of Klinefelter syndrome consulting for male infertility. *Prog Urol.*2014;24:757-63.

113. Rollet J,(1999).Biochimie du liquide séminal pour le clinicien. *Andrologie*, 9, n°4, 468-471.
114. Roti Roti JL, Wright WD (1987). Visualization of DNA loops in nucleoids from Hela cells : assays for DNA damage and repair. *Cytometry* 8(5) : 461-467.
115. Roze C, Touraine P, Leger J, Roux N de. Hypogonadisme hypogonadotrope congénital.*Annal Endocrinol*, 2009;70:2-13
116. Russo A, Degrassi F. Molecular cytogenetics of the micronucleus: Still surprising. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2018;836:36- 40. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2018.05.011.
117. Sakkas D and Alvarez JG (2010). Sperm DNA fragmentation : mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil and Steril* 93(4) : 1027-36.
118. Saleh R, Agarwal A, Nelson D, Nada E, El-Tonsy MH, Alvarez JG, Thomas AJ, Sharma R (2002). Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men : a prospective study. *Fertil Steril* 78 : 313-318.
119. Sallmén M, Liesivuori J, Taskinen H, Lindbohm ML .Time to pregnancy among the wives of finish greenhouseworkers.*Scand J Environ Health*.2003; 29:85-93.
120. Savage MS, Mourad MJ, Wapner RJ. Evolving applications of microarray analysis in prenatal diagnosis. *Curr Opin Obstet Gynecol*.2011;23(2):103- 8.DOI: 10.1097/GCO.0b013e32834457c7.
121. Savage MS, Mourad MJ, Wapner RJ. Evolving applications of microarray analysis in prenatal diagnosis. *Curr Opin Obstet Gynecol*.2011;23(2):103- 8. DOI:10.1097/GCO.0b013e32834457c7 DAVID G., BISSON J.P., CZYGLIK F. *et al.* : Anomalies morphologiques du spermatozoïde humain. 1 Propositions pour un système de classification. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.*, 1975, (Suppl.1) : 17- 36.
122. Schlosser J, Nakib I, Carré-Pigeon F, Staerman F (2007). Infertilité masculine : Stratégie de la prise en charge. *Annales d'urologie* 41, 6-11.
123. Schlosser J., Nakib F., Carré-Pigeo M., Staerman F., 2006 . EMC Infertilité masculine: définition et physiopathologie. *Urologie*.
124. schlosser, J., nakib, I., carré pigeon, f., & staerman, f. (2007).infertilité masculine : Définition et physiologie. *Annales d'urologie* 41,127-133.
125. Sepaniak S, Forge T, Fontaine B. Impact négatif du tabac sur la fertilité masculine: des spermatozoïdes à la descendance. *J GynecolObstetBiolReprod*. 2004; 33 :384-390.
126. Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G (2005). Sperm DNA fragmentation : threshold value in male infertility. *Hum Reprod* 20(12) : 3446-3451.
127. Shamshi MB, Iman SN, Dada R (2011). Sperm DNA integrity assays : diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *J Assist Reprod Genet* 28 : 1073-1085.
128. Sharma RK, Sabanegh E, Mahfouz R, Gupta S, Thiygarajan A, Agarwal A (2010). TUNEL as a test foe sperm DNA damage in the evaluation of male infertility . *J Urology* 76(6) : 1380-1386
129. Sharpe RM, Irvine DS. How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health?.*BMJ*.2004; 328(7437):447-451.
130. Simons A, Sikkema- Raddatz B, Leeuw N de, Konrad NC, Hastings RJ, Schoumans J. Genomewide arrays in routine diagnostics of hematological malignancies. *Human Mutation*. 2012;33(6):941- 8. DOI: 10.1002/humu.22057.
131. Singh NP, Danner DB, Tice RR, McCoy MT, Collins GD and Schneider EL(1989). "Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm." *Exp Cell Res* 184(2) :461-70.

132. Singh NP, McCoy MT, Tice RR and Schneider EL (1988). "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells." *Exp Cell Res* 175(1) : 184-91.
133. Sivanarayana T, Krishna CR, Prakash GJ, Krishna K, Madan K, Sudhakar G, et al. Sperm DNA fragmentation assay by sperm chromatin dispersion (SCD): correlation between DNA fragmentation and outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Med Biol*. 2014;13(2):87-94. spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril* 94(2) : 549-557.
134. Tachdjian G. Anomalies de la différenciation sexuelle. *Encycl Med Chir (Elsevier, Paris) Gynécologie*, 2017;12:1-10
135. Tejada R, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S (1984). A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril* 42 : 87-91.
136. Terquem T and Dadoune JP (1983). Aniline blue staining of human spermatozoa chromatin. Evaluation of nuclear maturation. In : Andre J, ed. *The sperm cell*. The Hague, The Netherlands : Martinus Nijhoff Publishers : 249-252.
137. Terriou P., Barry., Caparos-Langlois D., 2000 .Anatomie de l'appareil génital masculin *Anatomie du corps humain.*; 9-15.
138. Thibault C., Levasseur M-C. (2001). *La Reproduction chez les mammifères et l'homme*, Ed Ellipses, pp 260-313.
139. Tuech . J . Anticorps antispermatozoïdes : indications, étiologies et applications en 2011, de l'exploration de l'infertilité au concept d'immunocontraception masculine .*Andrologie*.2012 ;. 1:20-28
140. Valdes-Socin H. L'hypogonadisme hypogonadotrope normosmique isolé (HHnI) Mémoire Valdes HH nIReview (REBIC) 2014.
141. Wagner L. Fertilité de l'homme vieillissant. *Progrès en urologie*. 2004; 14: 577-582.
142. Wang JC (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases : a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 :430-440.
143. Wells D, Bermudez MG, Steuerwald N, Thornhill AR, Walker DL, Malter H, Delhanty JD, Cohen J (2005). Expression of genes regulating chromosome segregation, the cell cycle and apoptosis during human preimplantation. *Hum Reprod* 20(5) : 1339-48.
144. Wing-Yee L. and Yan Cheng C. (2008). *Transcription regulation in spermatogenesis*. Series :Special Books.
145. Wykes SM and Krawetz SA (2003). The structural organization of sperm chromatin. *The journal of Biological Chemistry* 278(32) : 29471-29477.
146. Young J. Infertilité masculine : mécanismes, causes et exploration *MCED* .2016;80:29-36.
147. Yu YE, Zhang Y, Unni E et al (2000). Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *PNAS* 97 : 4683-4688.
148. *Za Zhi*. 2009;26(2):207- 10. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2009.02.020
149. Zenzes MT, Puy LA, Reed TE. Detection of benzopyrenediol peroxides-DNA adducts in embryos from smoking couple. Evidence for transmission by spermatozoa. *Hum Reprod*. 1995:125-131.

150. Zhao M, Shirley CR, Yu YE et al (2001). Targeted disruption of transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. *Molecular and Cellular Biology* 21 : 7243-7255.
151. Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT (2001). Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 75(4) : 674-677.
152. Zini A, Meriano J, Kader K, Jarvi K, Laskin CA, Cadesky K (2005). Potential adverse effect of sperm DNA damage on embryo quality after ICSI. *Hum Reprod* 20(12) : 3476-80.

## Annexes

### **Annexe 1 : solutions utilisées pour le spermogramme et spermocytogramme**

Réceptacle à sperme à usage unique.

Étuve 37 °C.

Microscope photonique avec oculaires 40x ; 100x.

Papier Johnson.

Éprouvette graduée de 10ml.

Tubes à hémolyse de 5 ml.

Micro pipette 100 µl.

Pipette graduée 1ml.

Pipettes Pasteur.

Embouts de pipettes en polypropylène jaune 5-100µl

Lames en verre

Lamelles couvre objets en verre (23X32 mm).

Papier PH réactif colorimétrique.

Cellule de Malassez.

Solution de Ringer formolé

Solution d'Eosine 1%.

Solution de Nigrosine à 10%.

Solution de Ringer formolé:

Liquide de Ringer:

CaCl<sub>2</sub> 0,300g

KCl 0,250g

NaCl 6,5g

NaHCO<sub>3</sub> 0,2g

H<sub>2</sub>O distillée 1 L

**Solution de Ringer formolé (solution de travail) :**

Liquide de Ringer 1L

Formol à 40% 10 ml

Solution à Eosine 1%:

Eosine “yellowish” 1g

NaCl 9% 100 ml

Bien mélanger et filtrer.

Solution de Nigrosine à 10%:

Nigrosine 10g

NaCl 9% 100mL

Bien mélanger jusqu'à disparition des cristaux puis filtrer.

**Carnoy:**

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

Réactif de May-Grünwald

May-Grünwald poudre 2,5g

Alcool méthylique pur 1000 ml

**Technique de préparation**

Laisser à l'étuve à 37°C pendant 8 jours en agitant ; filtrer.

Réactif Giemsa RAL

Giemsa en poudre 0,75 g

Alcool méthylique 75 ml

Glycérine 25mL

**Technique de préparation**

Mélanger et laisser à l'étuve 37°C deux à trois jours. filtrer.

**Annexe 2: préparation des alcools (Ethanol) 100, 90,70°**

Table pour la dilution de l'alcool (Table de Gay-Lussac) appelée aussi Table de mouillage de l'alcool

		Concentration initiale													
		100	99	98	97	96	95	90	85	80	75	70	65	60	50
Concentration finale	95	6,5	5,15	3,83	2,53	1,25									
	90	13,25	11,83	10,43	9,07	7,73	6,41								
	85	20,54	19,05	17,58	16,15	14,73	13,33	6,56							
	80	28,59	27,01	25,47	23,95	22,45	20,95	13,79	6,83						
	75	37,58	35,9	34,28	32,67	31,08	29,52	21,89	14,48	7,2					
	70	47,75	45,98	44,25	42,54	40,85	39,18	31,05	23,14	15,35	7,64				
	65	59,37	57,49	55,63	53,81	52	50,22	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15			
	60	72,82	70,80	68,8	65,85	64,92	63	53,65	44,48	35,44	26,47	17,58	8,76		
	55	88,6	86,42	84,28	82,16	80,06	77,99	67,87	57,9	48,07	38,32	28,63	19,02	9,47	
	50	107,44	105,08	102,75	100,44	98,15	95,89	84,71	73,90	63,04	52,43	41,73	31,25	20,47	
	45	130,26	127,67	125,11	122,57	120,06	117,57	105,34	93,30	81,38	69,54	57,78	46,09	34,46	11,41
	40	158,56	155,68	152,84	150,02	147,22	144,46	130,8	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43	25,55
	35	194,63	191,39	188,19	185,01	181,85	178,71	163,28	148,01	132,88	117,82	102,84	87,93	73,08	43,59
	30	242,38	238,67	234,99	231,33	227,70	224,08	206,22	188,57	171,05	153,61	136,04	118,94	101,71	67,45
	25	308,9	304,52	300,18	295,86	291,56	287,28	266,12	245,15	224,3	203,61	182,83	162,21	141,65	100,73
20	408,5	403,13	397,79	392,47	387,17	381,9	355,8	329,84	304,01	278,26	252,58	226,98	201,43	150,55	
15	574,75	567,43	560,53	553,55	546,59	539,66	505,27	471	436,85	402,81	368,83	334,91	301,07	233,64	
10	907,09	896,73	886,4	876,1	865,15	855,15	804,5	753,65	702,89	652,21	601,6	551,06	500,50	399,85	

Les chiffres en noir indiquent la quantité d'eau en mL à ajouter à 100mL d'alcool de concentration initiale x (**en bleu**) pour obtenir la concentration désirée.

Exemple : la table indique qu'il faut ajouter 105,34 ml d'eau à 100 mL d'alcool à 90° pour obtenir de l'alcool à 45°.

Attention : Le volume final est inférieur à la somme des volumes mis en jeu ! C'est le phénomène dit de « contraction de volume », variable en fonction du titre de l'alcool initial.

## Résumé

L'infertilité touche environ 15 % des couples qui cherchent à obtenir une grossesse, L'homme est impliqué dans près de 60% des cas d'infertilité du couple.

L'exploration biologique de l'infertilité masculine est basée sur l'étude du sperme elle permet d'apprécier l'ensemble des événements qui se produisent depuis le démarrage de la spermatogénèse jusqu'à l'éjaculation. Le spermogramme et le spermocytogramme restent des examens de première intention, d'autres techniques évaluées l'intégralité de l'ADN spermatique viennent les compléter.

Notre étude a été effectuée sur des recueils de sperme de 52 hommes infertiles, qui ont été soumis à un examen spermatique, L'objectif de notre recherche est d'évaluer L'état de l'intégralité et la maturité de la chromatine spermatique par la technique de la coloration au bleu d'aniline, et étudier le lien entre le taux de la condensation de la chromatine spermatique et les paramètres du sperme, les données ont été analysées à l'aide du logiciel spss 22.0. Des tests statistiques comprenant le test de khi<sup>2</sup>, la corrélation de Pearson ont été utilisés, la signification statistique a été prise en compte pour les valeurs  $p < 0,05$ .

Les résultats obtenus ne montrent aucune association entre les deux paramètres, Donc la relation entre la condensation de la chromatine spermatique et la morphologie du sperme humain reste discutable et des investigations plus appropriées et approfondies sont nécessaires pour répondre adéquatement à cette question.

### **Mots clés :**

Infertilité, chromatine spermatique, bleu d'aniline.