

N° d'ordre :

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et 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 master

Spécialité : sciences biologique

Option : biologie et pathologie cellulaire

Présenté par : pc

THÈME

La relation entre les anomalies morphologiques des spermatozoïdes et les altérations du noyau chez les hommes infertiles.

Soutenu le : 28/09/2020

Devant le jury composé de :

**Président** : Mme Zemri Khalida

**Encadreur** : Mme Moulessehoul Soraya

**Co-encadreur** : Mme Liamani Ouafia

**Examinatrice** : Mme Bachir Boudjra

**Présente par :**

-Djebbar Ennoaman

-Naimi Mohammed Amine

Année universitaire : 2019 -2020

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

## Remerciements

*Je remercie, tout d'abord le bon dieu ALLEL, le tout puissant nous avoir données la patience, l'espoir, la volonté et le courage de réaliser ce travail, de terminer mon stage et d'achever mes études.*

*Mes remerciement sont adressés au responsable de la spécialité biologie et pathologie cellulaire et mon encadreur Pr MOULLESHOUL, co-encadreur Dr LIAMANI Ouafia, le chef de département de la biologie Mr BEN ABDERRAHMEN, et à tous nos enseignants sans exception qu'ils ont été disponible durant tous notre cursus.*

*Mes remerciements spéciaux au chef de labo cher laboratoire BENZGUIRE qui nous a beaucoup aidés Dr Hamza.*

*Je tiens à remercie infiniment toutes les personnes qui ont contribués au succès de notre stage et qui m'ont aidé lors de la rédaction de ce mémoire.*

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

## Dédicace

*A ce que j'aime surtout*

*Mes chers parents qui m'ont toujours soutenu dans mes choix 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, vous êtes un exemple pour moi, je vous en serai toujours reconnaissante.*

*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 précieuses, et signifient bien plus pour moi que je ne saurai jamais l'exprimer,*

*Atout la promotion de Biologie et pathologie cellulaire de l'année 2019/2020*

*Mes meilleurs amis pour leur soutien sans faille et permanent, Toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin.*

## Résumé

Aujourd'hui, dans les pays industrialisés, environ 15% des couples sont confrontés à des problèmes d'infertilité, dans 1/3 des cas, l'étiologie est masculine. La mal condensation de la chromatine des spermatozoïdes pourraient expliquer, en partie, l'infertilité de ces hommes.

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

Notre travail consiste à étudier, par la technique de coloration au bleu d'aniline la maturité de la chromatine spermatique des gamètes de 21 hommes infertiles qui ont été soumis à un examen spermatique, ainsi qu'évaluer la relation entre le taux de condensation de la chromatine spermatique et les paramètres du sperme. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel SPSS 19.0. 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  $p < 0,05$ .

Les résultats obtenus montrent une corrélation négative existant entre la maturité de la chromatine spermatique et le nombre des spermatozoïdes, leur mobilité progressive et leur morphologie par la coloration au bleu d'aniline, ceux qui est comparable à la littérature.

La corrélation entre la condensation de la chromatine et les différents paramètres du sperme humain reste discutable et des investigations plus appropriées et approfondies sont nécessaires pour répondre adéquatement à cette question.

### Mots clé :

Infertilité, Chromatine spermatique, bleu d'aniline.

## **Abstract**

Today, in industrialized countries, around 15% of couples face problems with infertility, in 1/3 of cases the etiology is male. The poor condensation of sperm chromatin may partly explain the infertility of these men.

The exploration of male infertility remains primarily based on the classical analysis of sperm parameters. However, other techniques to assess the sperm DNA integrity and sperm chromatin maturity are now being supplemented.

Our work consists in studying, by the technique of staining with aniline blue the maturity of the sperm chromatin of the gametes of 21 infertile men who were subjected to a sperm examination, as well as to evaluate the relation between the rate of condensation of the sperm chromatin and sperm parameters. Data were analysed using SPSS 19.0 software. Statistical tests, including chi-square test, Pearson's correlation were used. Statistical significance was taken into account for the  $p < 0.05$  values.

The results obtained show a negative correlation between the maturity of the sperm chromatin and the number of spermatozoa, their progressive mobility and their morphology by staining with aniline blue, which is comparable to the literature.

The correlation between chromatin condensation and the various parameters of human sperm remains questionable and more appropriate and in-depth investigations are needed to adequately answer this question.

### **Key words :**

Infertility, Sperm Chromatin, Aniline Blue.

## مُلخَص

اليوم، في البلدان الصناعية، يواجه حوالي 15 ٪ من الأزواج مشاكل مع العقم، وفي ثلث الحالات يكون السبب هو الذكور. قد يفسر سوء تكثف كروماتين الحيوانات المنوية جزئيًا عقم هؤلاء الرجال.

لا يزال استكشاف عقم الرجال يعتمد بشكل أساسي على التحليل الكلاسيكي لمعايير الحيوانات المنوية. ومع ذلك، يتم الآن استكمال تقنيات أخرى لتقييم سلامة الحمض النووي للحيوانات المنوية ونضج كروماتين الحيوانات المنوية.

يتمثل عملنا في دراسة، بتقنية التلوين بأزرق الأنيلين ، نضج كروماتين الحيوانات المنوية لأمشاج 21 رجلاً عقيمًا خضعوا لفحص الحيوانات المنوية ، وكذلك لتقييم العلاقة بين معدل تكثف كروماتين الحيوانات المنوية ومعلومات الحيوانات المنوية. تم تحليل البيانات باستخدام برنامج SPSS 19.0 تم استخدام الاختبارات الإحصائية بما في ذلك اختبار كي مربع، ارتباط بيرسون. تم أخذ الدلالة الإحصائية في الاعتبار لقيم  $p < 0.05$ .

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها وجود علاقة سلبية بين نضج كروماتين الحيوانات المنوية وعددها وتنقلها التدريجي وتشكلها عن طريق التلوين باللون الأزرق الأنيلين ، تلك التي يمكن مقارنتها بالفرضيات. لا تزال العلاقة بين تكثف الكروماتين والمعايير المختلفة للحيوانات المنوية البشرية موضع تساؤل، وهناك حاجة إلى إجراء تحقيقات أكثر ملأمة ومتعمقة للإجابة على هذا السؤال بشكل مناسب.

**الكلمات المفتاحية:** العقم، كروماتين الحيوانات المنوية، الأنيلين الأزرق

## SOMMAIRE :

**RESUME**

**ABSTRACT**

**ملخص**

**LISTE DES FIGURES**

**LISTE DES TABLEUX**

**INTRODUCTION..... 01**

## **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **Chapitre 1 : Formation des gamètes mâles**

1. Appareil génital masculin.....	4
1/1- Testicule.....	4
1/2 -Voies excrétrices.....	6
1/3- Glandes annexes du tractus génital mâle.....	10
2. Spermatogénèse.....	13
2/1-Origine méiotique des spermatozoïdes.....	13
2/2- Evolution des cellules de la lignée germinale.....	14
2/3- Cinétique de la spermatogenèse.....	20
3. Emission des gamètes.....	20
3/1- Transit intra-testiculaire.....	20
32- Transit extra-testiculaire.....	20
4. Spermatozoïde.....	21
4/1-Morphologie.....	21
4 /2 -Caractéristiques physiologiques.....	22

## **Chapitre 2 : Infertilité masculine du diagnostic au traitement**

1. Définition de l'infertilité.....	25
2. Principales étiologies.....	26
2/1 Causes pré-testiculaires.....	26
2/2 causes testiculaires.....	26
2/3 Causes post-testiculaires.....	28
3. Exploration de l'infertilité masculine.....	28
3/1. Examen clinique.....	28
3/2 Analyse du sperme.....	29
3/3 Exploration cytogénétique.....	39
3/4. Exploration génétique :.....	44
3/5. Analyse de la fragmentation de l'ADN spermatique.....	49
4. Traitement de l'infertilité masculine (Méthodes AMP):.....	57
4/1 Inséminations artificielles :.....	57
4/2 La fécondation in vitro (FIV).....	59
4/3 Intra cytoplasmic sperm injection ou injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI) .....	60

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

### **Chapitre 1 : Patients et méthodes**

1. Les patients et les témoins.....	63
1/1 Les patients.....	63
1/2 Le groupe témoin.....	63
2. Méthodes.....	63
2/1 Spermogramme.....	63
2/2 Spermocytogramme.....	67
2/3 Coloration au bleu d'aniline ou bleu de méthyl (C <sub>37</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>3</sub> ).....	69
2/4 Etude statistique.....	70

## **Chapitre 2 : Résultats et discussion**

1. Spermogramme et Spermocytogramme.....	71
2. Coloration au bleu d'aniline.....	75
3. Discussion.....	80

<b>Conclusion.....</b>	<b>84</b>
------------------------	-----------

**Référence bibliographique**

**Annexes**

## Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

PI : pièce intermédiaire

Bandes G : Giemsa

Bandes R : Reverse

SK : syndrome de Klinefelter

FTHL17 : Ferritin, heavy polypeptide-like 17

USP26 : UbiquitinSpecific Peptidase 26

TKTL : TransKeTolase-Like 1.

TAF7L : TAF7-like RNA polymerase II, TATA box bindingprotein (TBP)-associated factor

NFX2 : Nuclear transcription Factor, X-boxbinding 2

TEX13A/B :TestisEXpressedgene 13

AR : le gène du récepteur aux androgènes

FMR1 : Fragile X Mental Retardation 1

SRY : Sex-determining Region of Y chromosome

FISH : Fluorescence in situ hybridization

CEP : chromosome enumeration probe

LSI : locus specific identifier

PCP : partial chromosome paint

WCP : whole chromosome paint

BAC : bacterial artificial chromosomes

PRINS : Primed In Situ labelling ou synthèse in situ amorcée.

PNA : peptide nucleic acids

PAR : pseudoautosomal region

MSY : male specific Y chromosome

TDF : testis determining factor

### La région AZF:

DAZ : deleted in azoospermia.

RBM1Y : RNA-binding motif Y chromosome.

TSPY : testis-specific protein Y-encoded.

SCO : SertoliCellOnly

AURKc : Aurora Kinase C

TPR : tetratrico peptide repeats.

Aik ou Btak : le gène Aurora A

Aik2 ou STK12 : le gène Aurora B

Aie2 ou stk13 : le gène Aurora C

### Les techniques d'AMP:

TNP : Transition Nuclear Protein

PRM2 : protamines de type 2

DFI : DNA fragmentation index

SCGE dite COMET : Technique Single Cell Gel Electrophoresis

SCD : Sperm Chromatin Dispersion test

DAPI :4'-6-diamidino-2-phenylindol)

NT : in situ Nick Translation assay

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

TdT :la terminal deoxynucleotidyl transferase

ICSI : Intra Cytoplasmic Sperm Injection

IUI : L'insémination intra-utérine

FIV : La fécondation in vitro

MGG : May Grünwald-Giemsa

## Liste des figures

Figure	titre	page
Figure 1	structure de testicule	05
Figure 2	vue antérieure des deux testicules	06
Figure 3	Epididyme	08
Figure 4	canal déférent	09
Figure 5	canal éjaculateur	09
Figure 6	La vésicule séminale	11
Figure 7	prostate	12
Figure 8	Les glandes de COWPER	13
Figure 9	Schématisation de la spermatogenèse chez l'homme et du contenu chromosomique des cellules au cours des différentes étapes	14
Figure 10	Les cellules de la lignée germinale	15
Figure 11	Principe de la méiose I avec 4 chromosomes (1/prophase, 2/métaphase, 3/anaphase, 4/télophase)	17
Figure 12	Principe de la méiose II avec 4 chromosomes (1/prophase, 2/métaphase, 3/anaphase, 4/télophase)	18
Figure 13	Schéma de la spermiogenèse, adaptée de Marc, 2004	19
Figure 14	structure de spermatozoïde	23
Figure 15	: Orchidomètre de Prader permettant d'évaluer le volume testiculaire en consultation	29
Figure 16	Illustrations du spermatozoïde humain normal ou subnormal, considéré comme normal, et rappel des définitions	31
Figure 17	Anomalies de taille de la tête des spermatozoïdes humains	34
Figure 18	Anomalies de forme et de texture de la tête des spermatozoïdes humains	35
Figure 19	Anomalies de la pièce intermédiaire des spermatozoïdes humains	36
Figure 20	Anomalies de la pièce principale des spermatozoïdes humains	37

Figure 21	Classification de David 1975 des anomalies morphologiques des spermatozoïdes	38
Figure 22	Représentation du chromosome Y en fonction du type de régions (X-transposées, dégénérées, ampliconiques, hétérochromatine)	45
Figure 23	: Représentation schématique des gènes et des régions AZF (AZoospermia Factor) du chromosome Y humain (AZFa, AZFbetAZFc)	47
Figure 24	Modèles de l'organisation de la chromatine dans une cellule somatique (zigzag ou solénoïde) et dans une cellule spermatique (doughnut)	50
Figure 25	Principes de la technique TUNEL sur les spermatozoïdes	56
Figure 26	des spermatozoïdes immatures colorer au bleu d'aniline	56
Figure 27	Les différentes étapes schématisées d'une insémination intra-utérine	58
Figure 28	Fécondation In Vitro	60
Figure 29	Les différentes étapes d'une injection intra cytoplasmique de spermatozoïdes	62
Figure 30	Anomalies morphologiques des spermatozoïdes des patients	73
Figure 31	Répartition des patients en fonction De la normalité ou la pathogénicité des résultats du spermogramme et du spermocytogramme	74
Figure 32	Distribution de la fréquence des anomalies spermatiques	75
Figure 33	distribution de la fréquence des taux de la condensation de la chromatine des Spermatozoïdes	77
Figure 34	microscopique des spermatozoïdes colorés au bleu d'aniline GX1000	77
Figure 35	Corrélation entre la condensation de la chromatine spermatique et la morphologie des spermatozoïdes	79

## Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
<b>Tableau 1</b>	Durée de vie moyenne des cellules germinales humaines (Faure, 2007)	<b>20</b>
<b>Tableau 2</b>	Tableau 2 : Valeurs normales des paramètres du spermogramme (OMS, 2010).	<b>30</b>
<b>Tableau 3</b>	Résultats spermogramme et spermocytogramme des patients	<b>74</b>
<b>Tableau 4</b>	Résultats globaux des données des spermogrammes et spermocytogrammes	<b>74</b>
<b>Tableau 5</b>	Répartition de la fréquence des cas pathologiques	<b>75</b>
<b>Tableau 6</b>	Taux de la condensation de la chromatine des Spermatozoïdes des patients	<b>76</b>
<b>Tableau 7</b>	comparaison des paramètres de sperme entre les groupes G1 et G2	<b>78</b>

## Introduction

Depuis toujours, les hommes ont été confrontés aux problèmes de reproduction, toutefois, la demande des couples et les possibilités thérapeutiques offertes n'ont fait que s'accroître au fil du temps. Le pourcentage des couples concernés par des problèmes d'infertilité est estimé à environ 15% et dans 1/3 des cas elle se révèle être d'origine masculine (Martin, 2008). 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).

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).

Les études récentes montrent que le 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).

La variabilité des paramètres classiques du sperm, des anomalies du génome masculin, peuvent perturber la condensation de la chromatine et 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). Des études récentes ont montré que la recherche du taux de maturité de la chromatine est essentiel dans le diagnostic (Emelyanov et fyodorov, 2016), des donneurs à paramètres spermatique normaux et fertiles présentaient des niveaux inférieurs de défaut de chromatine par rapport au hommes infertiles (Virro et al., 2004).

L'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes peut être évalué par des méthodes telles que Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling assay (TUNEL)

directement (Sergerie et al., 2005), ou la technique de Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) et la technique de chromomycine A3 (CMA3) indirectement. Ces méthodes nécessitent un appareillage coûteux et sont souvent inaccessibles à la plupart des laboratoires d'andrologie des centres de FIV (Mehta et Sigman, 2014). Étant donné le taux de mal condensation de la chromatine est élevé chez les hommes infertiles que les hommes fertiles, certaines techniques ont été développées pour évaluer l'état de l'intégrité de la chromatine spermatique et qui sont des tests cytochimiques comme la coloration au bleu d'aniline (Talebi et al., 2012 ; Talebi et al., 2013 ; Sabeti et al., 2017 ; Poumasumi et al., 2019).

Ces méthodes sont basées sur la capacité de certains colorants à évaluer la conformation de la chromatine du sperme, qui à son tour dépend de l'interaction de l'ADN avec les protéines (Evenson, 2016 ; Practice committee of American society for reproductive medicine, 2013).

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). Plusieurs questions se posent évidemment, la coloration au bleu d'aniline peut-elle prédire le pronostic de la fertilité masculine? et peut-elle être un test complémentaire utile pour diriger le traitement de l'infertilité de couple?

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).

Les objectifs de la présente étude étaient d'évaluer 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 et d'évaluer la relation entre le statut de condensation de la chromatine spermatique et les paramètres du sperme dans l'infertilité masculine.

---

# **Revue bibliographique**

---

---

---

## Chapitre I : formation des gamètes males

---

---

## I. Formation des gamètes mâles

### I.1. Appareil génital masculin

#### I.1.1. Testicule:

La gonade male ou testicule (**Figure 1, 2**), est située dans les bourses, à la partie antérieure du périnée, sous la verge. Appendus au cordon spermatique, le testicule gauche en général situé un peu plus bas que le droit, ils sont mobiles sous l'effet des fibres crémaster et de la pesanteur.

Le testicule est une glande paire, ovoïde, lisse et brillante de couleur nacré, Sa consistance est ferme et régulière. Il mesure, en moyenne 4 à 5 cm de longueur, 2 à 3 cm de largeur, 2,5 cm d'épaisseur, et pèse 20 (Bboilleul et al., 1991).

Généralement, chez les sujets qui présentent une azoospermie sécrétoire, le testicule est de taille très diminuée, et la consistance est molle.

On lui décrit :

•**Deux faces :**

Latérale : convexe.

Médiane : à peu près plane.

•**Deux bords :**

Postéro-supérieur : en rapport avec l'épididyme.

Antéro-inférieur : convexe et libre.

•**Deux extrémités :**

Antéro-supérieure : arrondie, surmontée par la tête de l'épididyme.

Postéro-inférieure : donnant attache au ligament scrotal, qui la fixe au fond du scrotum.

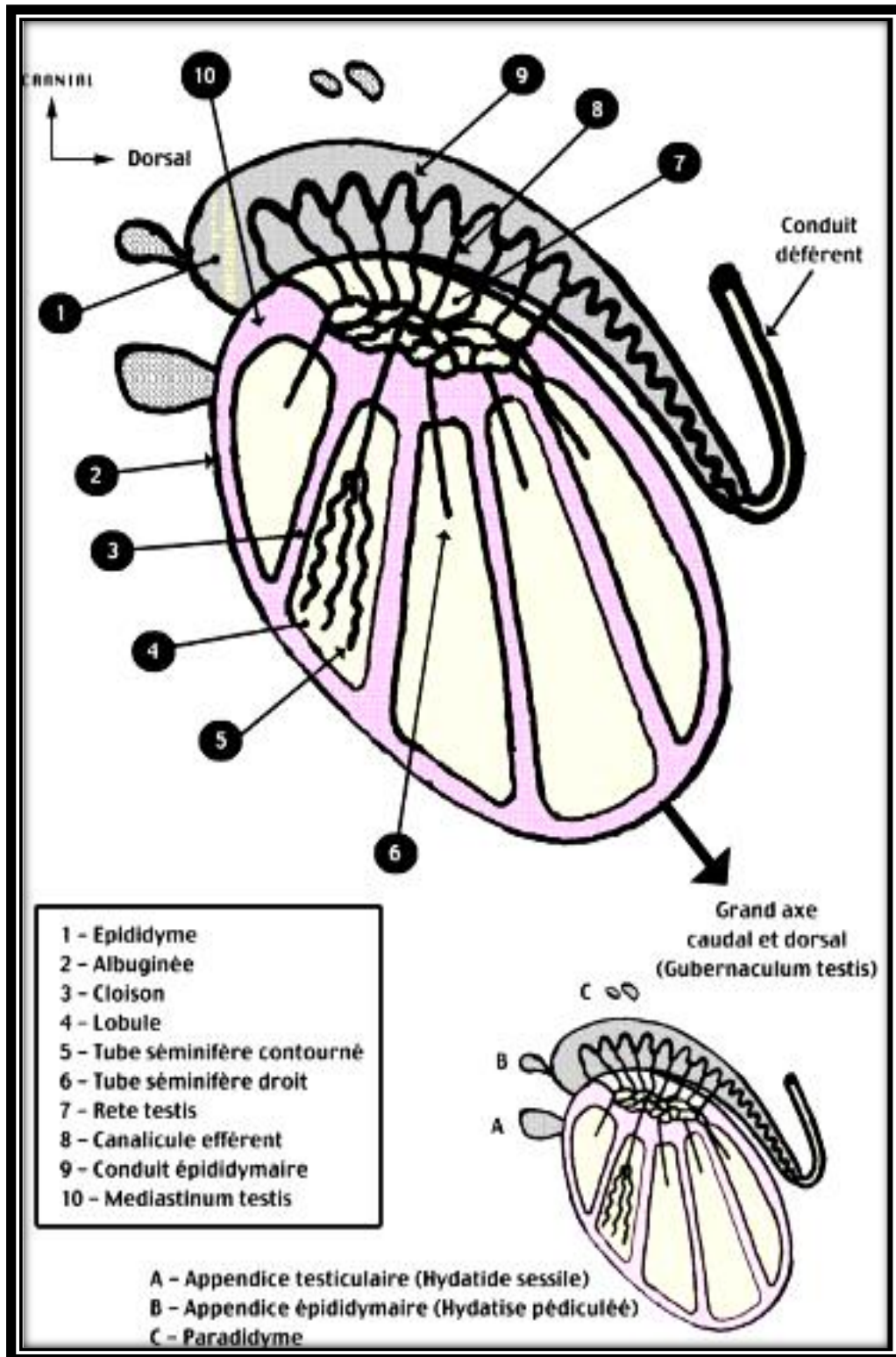
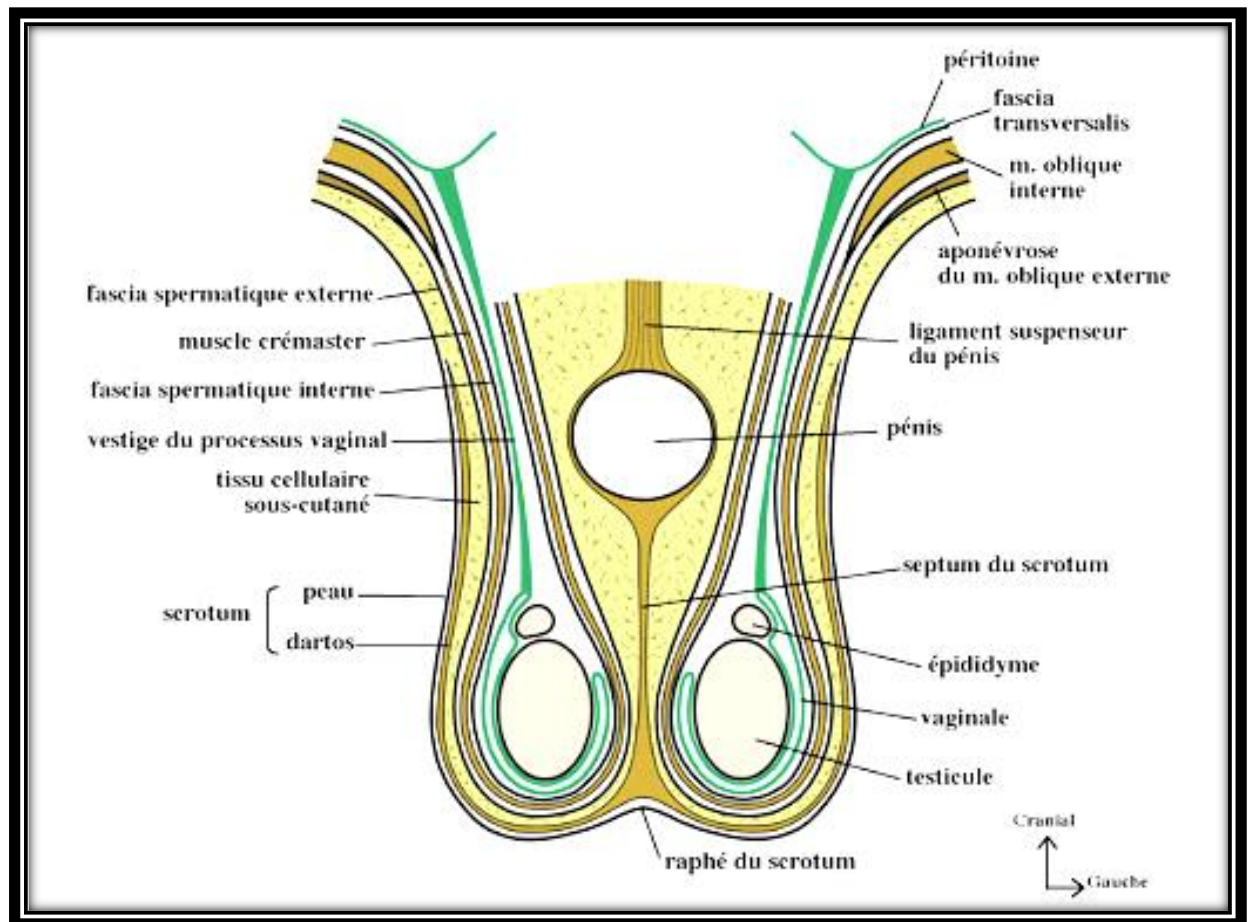


Figure 1 : structure de testicule (Abdomen, 2005)



**Figure 02** : vue antérieure des deux testicules (Abdomen, 2005)

### I.1.2. Voies excrétrices

Les spermatozoïdes élaborés dans les tubes séminifères vont être évacués grâce à un système de canaux constituant les voies excrétoires du sperme. À ces conduits, sont annexés des glandes dont les produits de sécrétion participent à la constitution du sperme.

On distingue 2 catégories de voies spermatiques : les voies spermatiques intra testiculaires et les voies spermatiques extra testiculaires.

#### 1. Les voies spermatiques intra testiculaires :

##### 1- Les tubes séminifères contournés :

Chaque lobule contient environ 40 tubes séminifères contournés qui atteignent dans le testicule mature un diamètre de 140 à 300µm et à l'état déroulé une longueur de 30 à 60 mm. C'est dans ces tubes que se forment les spermatozoïdes qui sont ensuite transportés dans les tubes séminifères droits (Bouchet et al., 1991).

##### 2. Les tubes séminifères droits :

Les tubes séminifères droits à une longueur de 1mm. Ils relient les tubes séminifères à un réseau de canalicules appelé rete testis.

### *3- Le rete testis ou réseau de Haller :*

C'est un réseau de canalicules contenu dans un épaissement de l'albuginée appelé le médiastinum testis. Longtemps considérés comme de simples canaux vecteurs, on leur attribue des fonctions d'échange contribuant à modifier la composition du fluide testiculaire.

Les spermatozoïdes, immatures et immobiles, traversent les voies spermatiques intra testiculaires, poussés par la pression du liquide séminal primitif sécrété de façon continue par les cellules de Sertoli. Ce liquide serait remanié lors de son passage dans les tubes droits et le rete testis. (Bouchet et al., 1991).

## **2. Les voies spermatiques extra-testiculaires :**

### *1. Canalicules efférents :*

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.

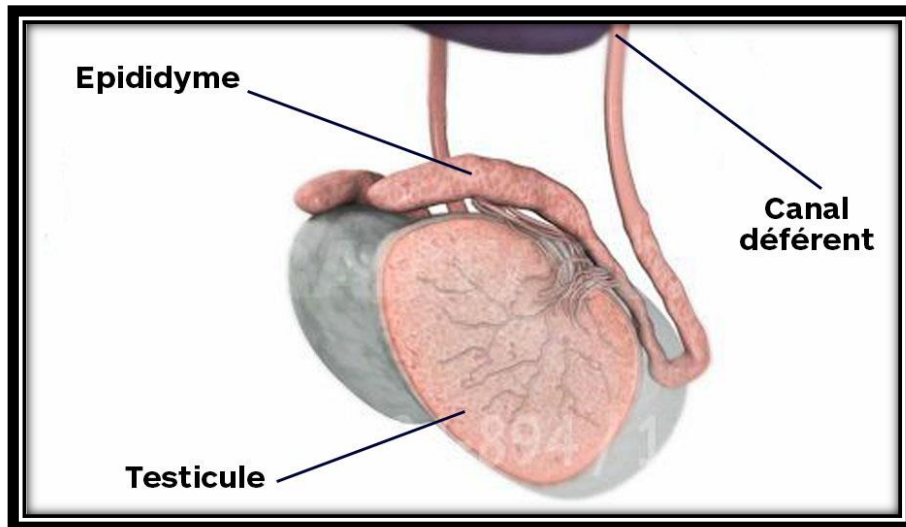
Chaque canalicule efférent a une longueur d'environ 20 cm mais il se tortille en un petit peloton conique de 2 cm dont le sommet commence à la pointe du rete testis et dont la base s'abouche dans le canal épидидymaire.

### *2. Epididyme (figure 3) :*

C'est une formation allongée d'avant en arrière, en forme de virgule, long d'environ 3.8cm. Il coiffe le testicule à la manière du "cimier d'un casque" (Bouchet et al., 1991).

On lui décrit trois parties d'avant en arrière :

- La tête : arrondie, lisse et volumineuse, elle est unie intimement au pôle antérieur du testicule
  - Le corps : prismatique triangulaire, présente trois faces :
    - \* Antérieure : séparée du testicule par un faible espace, le cul de sac interépididymo-testiculaire.
    - \* Interne : croisée par les vaisseaux du cordon spermatique.
    - \* Supéro-externe : tapissée par la vaginale.
  - La queue : aplatie de haut en bas, unie au pôle postérieur du testicule, elle se prolonge, sans ligne nette de démarcation, par le canal déférent.
-



**Figure 3 :** Epididyme (Tout pour les hommes, 2018).

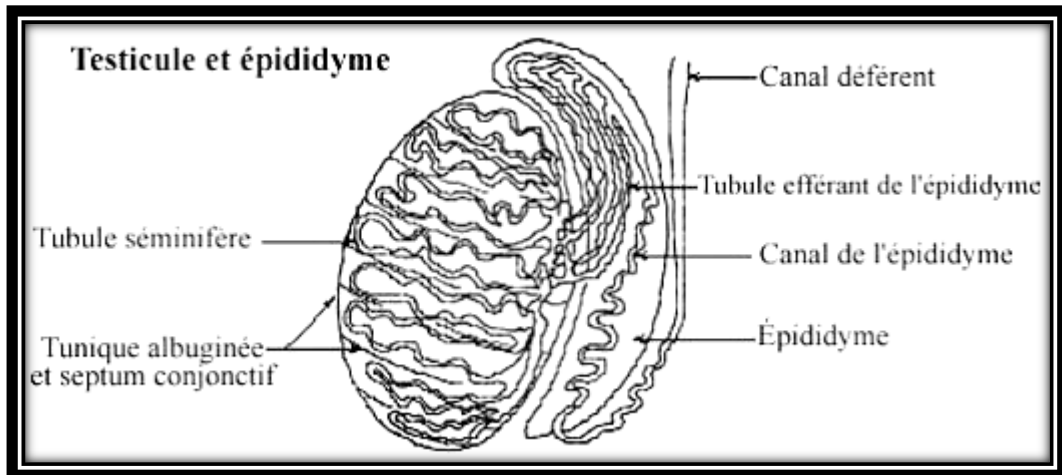
### ***3. Canal déférent :***

Il s'étend depuis la queue de l'épididyme jusqu'à la base de la prostate. Il chemine sur la face médiale du testicule puis traverse successivement la racine des bourses, la région inguinale, la fosse iliaque et la cavité pelvienne (Figure 04).

Sa longueur est de 35 à 45 cm, diamètre externe de 2 à 3 mm, sa paroi très épaisse lui confère une résistance particulière qui permet de le palper facilement car : il se déroule sous les doigts.

Le canal déférent se dilate à son extrémité distale pour constituer l'ampoule du déférent. La structure de cette ampoule est comparable à celle des vésicules séminales. Elle s'ouvre dans sa partie basse et marque le passage du canal déférent au canal éjaculateur. L'ampoule du canal déférent elle apparaît comme un réservoir à l'intérieur duquel s'accumule le sperme dans l'intervalle des éjaculations.

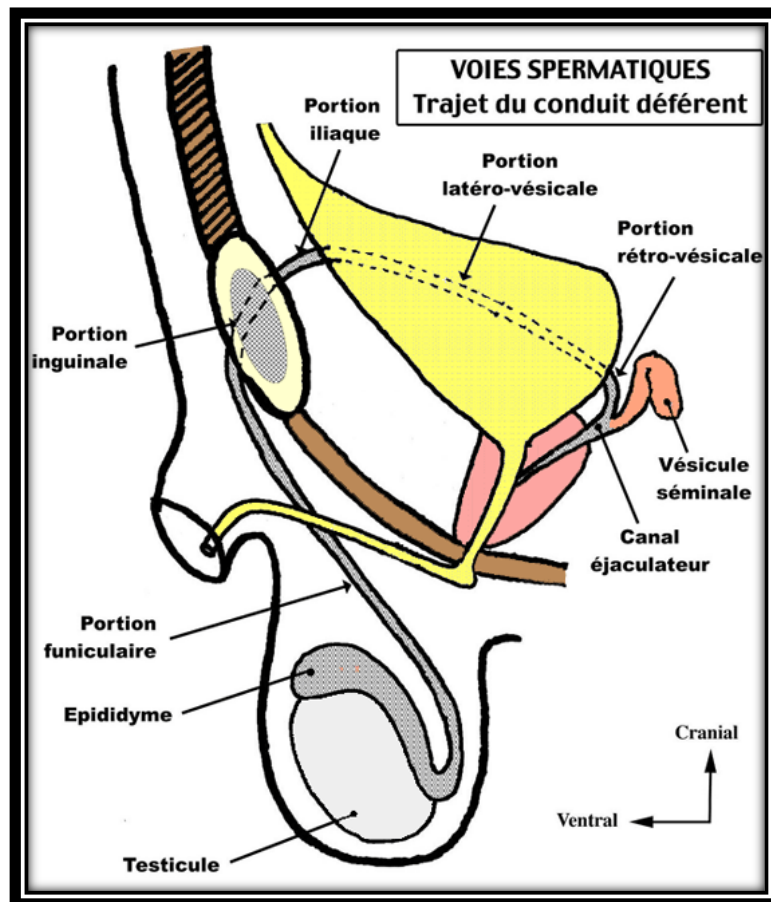
Les anomalies du canal déférent peuvent être à l'origine d'une infertilité masculine de type excrétoire. Pour ces anomalies, il y a celles qui sont congénitales (agénésie) et acquises (post-infectieuse).



**Figure 04** : canal défèrent. (Système reproducteur male, 2018)

#### 4. Canal éjaculateur :

Il est formé par l'union de la vésicule séminale et du conduit défèrent correspondant, est situé dans la quasi-totalité dans l'épaisseur de la prostate. Il s'abouche dans l'urètre au niveau d'une zone bombée : Le colliculus séminal ou veru montanum long de 2 cm sur 1 mm de diamètre, son calibre diminue progressivement de son origine à sa terminaison (Figure 05). Le canal éjaculateur est un simple conduit vecteur.



**Figure 05** : canal éjaculateur. (Abdomen, 2005)

### I.1.3. Glandes annexes du tractus génital mâle

Trois glandes sont annexées aux voies excrétrices masculines : les deux vésicules séminales (Figure 06) (droite et gauche), la prostate (Figure 07) (impaire et médiane) et les deux glandes de Cowper (Figure 08). Ces glandes produisent la majeure partie du sperme.

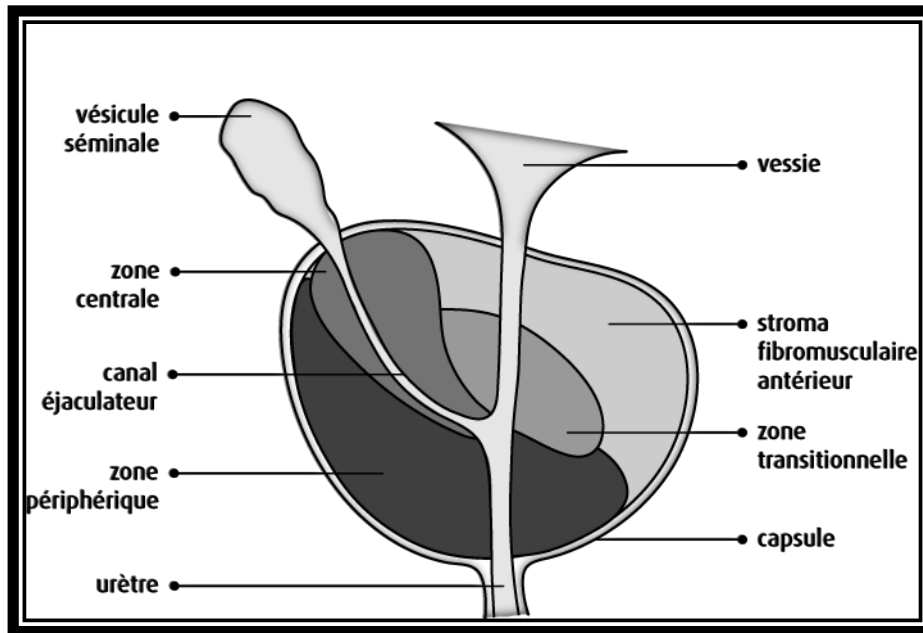
#### 1. Les vésicules séminales :

Ce sont deux réservoirs membraneux dans lesquels s'accumule le sperme dans l'intervalle des éjaculations. Chacune d'elles est branchée sur l'extrémité terminale de l'un des canaux déférents et s'étend en dehors de lui, entre la vessie et le rectum, suivant une direction oblique en dehors, en arrière et un peu en haut. Elles sont longues de 5 à 7 centimètres, de la forme d'un petit doigt. Les vésicules séminales sécrètent un liquide clair, visqueux et alcalin, qui agit sur l'état physiologique des spermatozoïdes en maintenant normale leur mobilité et en leur assurant une vitalité maximale dans le sperme (Valeri et al., 1998).

Extérieurement, les vésicules séminales apparaissent comme des organes allongés aplatis d'avant en arrière et bosselés sur toute leur surface. Leur diamètre augmente depuis leur origine sur le canal déférent, jusqu'à leur extrémité supéroexterne. Le bord interne de chaque vésicule correspond à l'ampoule du déférent. Le bord externe est en rapport avec le plexus veineux important séminal et vésiculoprostatique.

Le col de la vésicule est enfin dans la base de la prostate. Il s'unit avec la terminaison du déférent à angle très aigu de telle sorte qu'il existe là un véritable éperon.

Le fond de la vésicule, externe, arrondi, répond à la terminaison de l'urètre dans la paroi vésicale souvent, ce fond fait saillie sous le péritoine déterminant un petit cul-de-sac vesico-seminal en avant du grand cul de sac sémino-restal, subdivision du cul de sac de Douglas



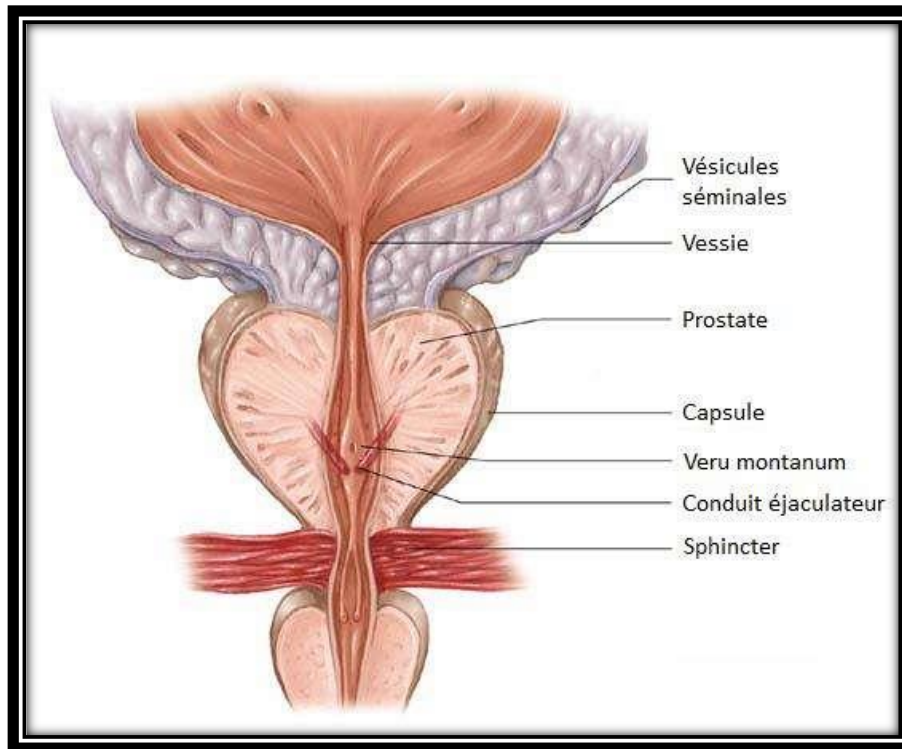
**Figure 06:** La vésicule séminale. (Société canadienne du cancer, 2017)

## 2. La prostate:

Elle apparaît comme un organe musculo-glandulaire impair et médian. Elle est située entre le fond de la vessie et le muscle transverse profond du périnée de 1 à 1,5 cm en arrière de la symphyse et en avant du rectum à partir duquel elle peut être palpée. Elle mesure en moyenne 3 cm de haut, 4 cm de large et 2 cm de profondeur chez un adulte jeune et pèse alors 20 à 25 grammes. La prostate est perforée par l'urètre et par les deux canaux éjaculateurs. Elle possède deux sphincters :

- *Un sphincter interne* formé de fibres musculaires lisses (sphincter lisse) entoure la partie supérieure de l'urètre. La tonicité de ce sphincter empêche l'écoulement l'éjaculation rétrograde.

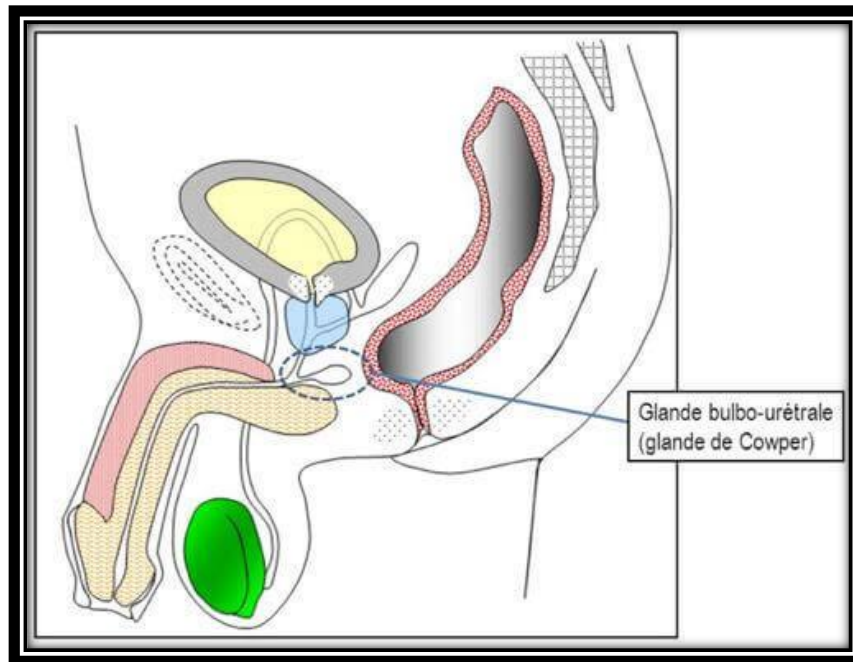
- *Un sphincter externe*, formé de fibres musculaires striées (sphincter strié) comprend un anneau à la partie inférieure de l'urètre prostatique, et une extension en forme de bouclier sur les faces antérieure et antérolatérales de la prostate. Le sphincter externe est responsable de la continence urinaire.



**Figure 07:** prostate (Société canadienne du cancer, 2017)

### 3. Les glandes de COWPER :

Elles sont encore appelées glandes de MERY-COWPER. Elles sont constituées de deux petites masses glandulaires de la taille de petites noisettes situées à la jonction de l'urètre spongieux dans l'épaisseur de l'aponévrose pénienne moyenne. Elles possèdent un canal excréteur relativement long chez l'homme adulte, qui atteint 30 à 40 mm de long et il s'ouvre sur la paroi postérieure de l'urètre pénien au niveau de la partie antérieure du cul-de-sac du bulbe. Elles sécrètent un liquide mucoïde, semblable au liquide prostatique, qu'elles déversent dans la région postérieure de l'urètre membraneux (Langman, 1984).

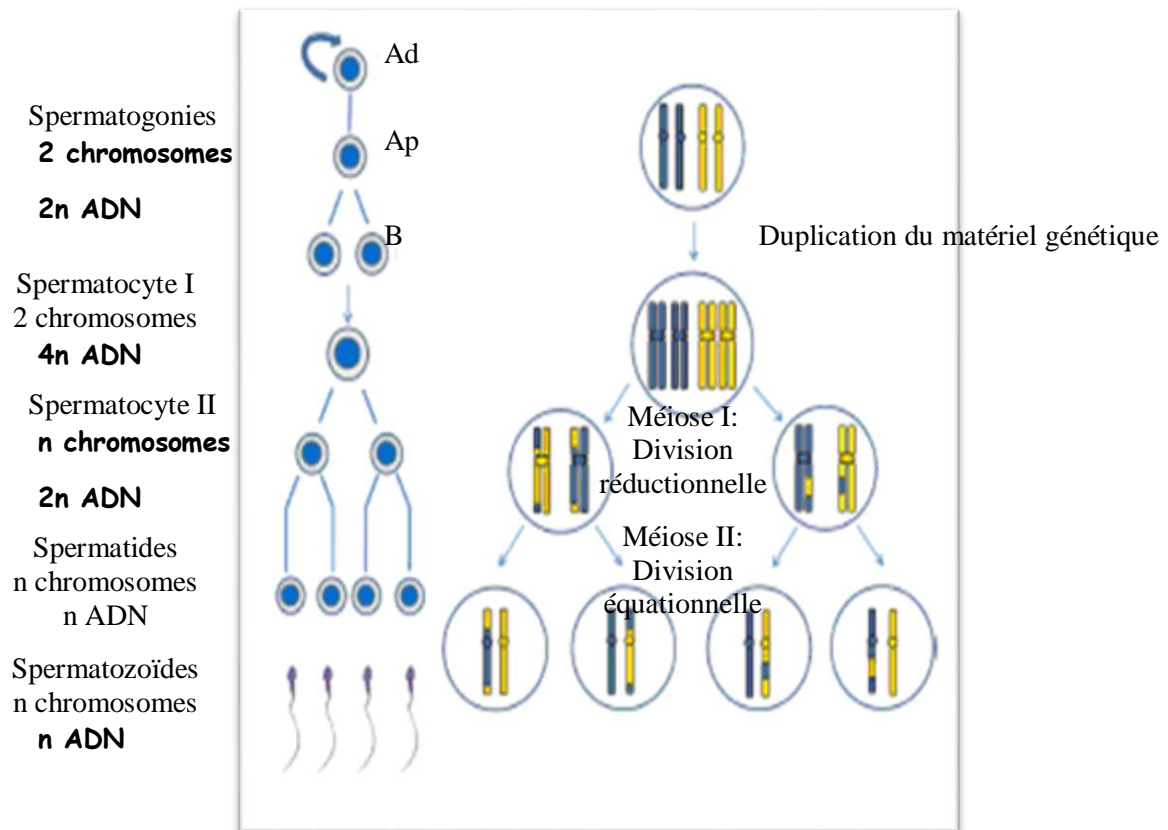


**Figure 08:** Les glandes de COWPER (Sexologue, 2012)

## I.2. Spermatogénèse:

### I.2.1 Origine méiotique des spermatozoïdes :

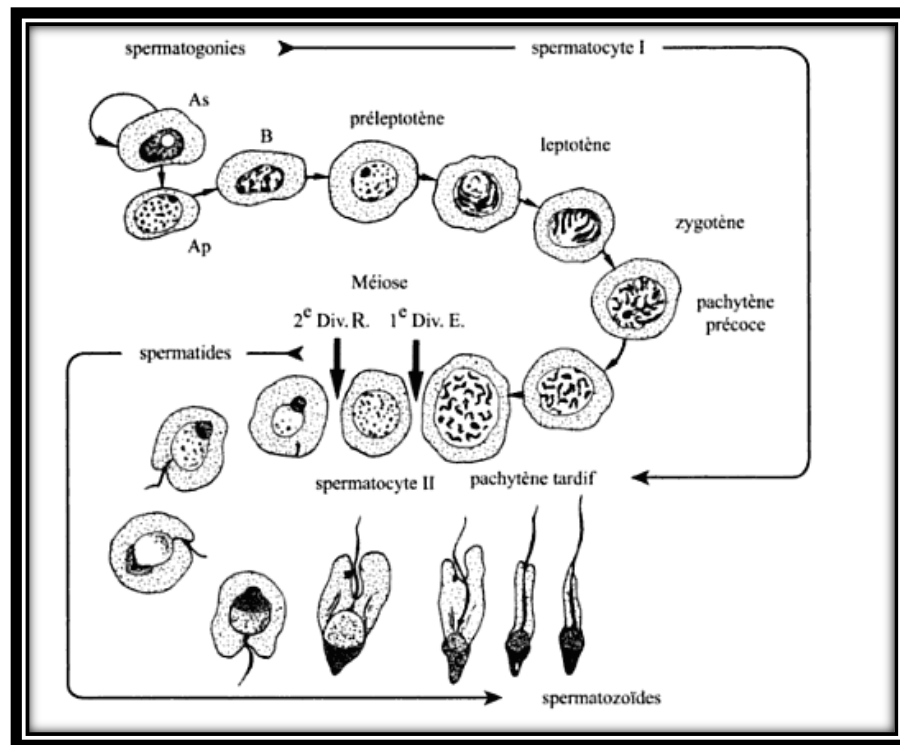
La spermatogénèse (Figure 09) est le processus de différenciation cellulaire qui aboutit à la transformation des cellules germinales en spermatozoïdes. Elle se déroule dans la paroi des tubes séminifères du testicule (Clermont, 1963; Czyba et Montella, 1993; Dadoune et Demoulin, 1991; Hartl et Jones,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

### I.2.2 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.

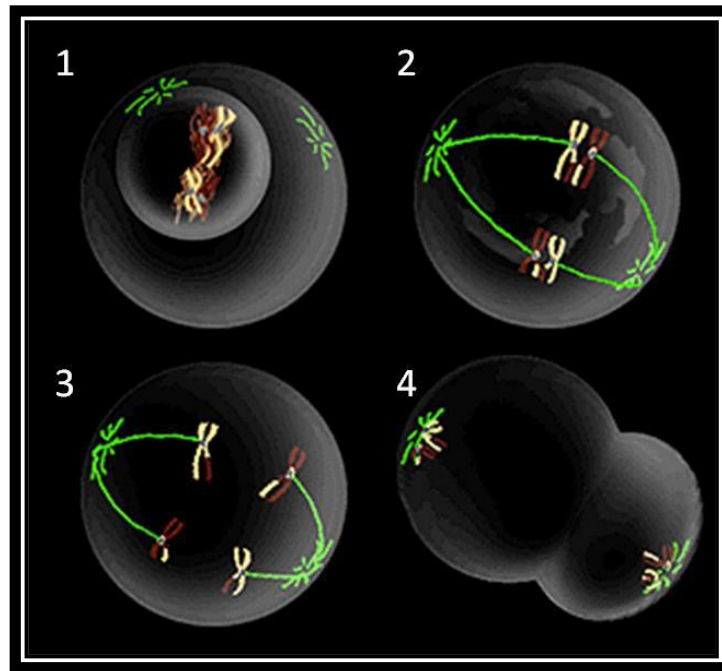
La prophase de méiose I comprend cinq stades successifs : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse. Cette prophase est caractérisée par l'appariement des chromosomes homologues d'origine paternelle et maternelle, avec échange de matériel génétique entre les chromatides homologues au stade 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/télophase).

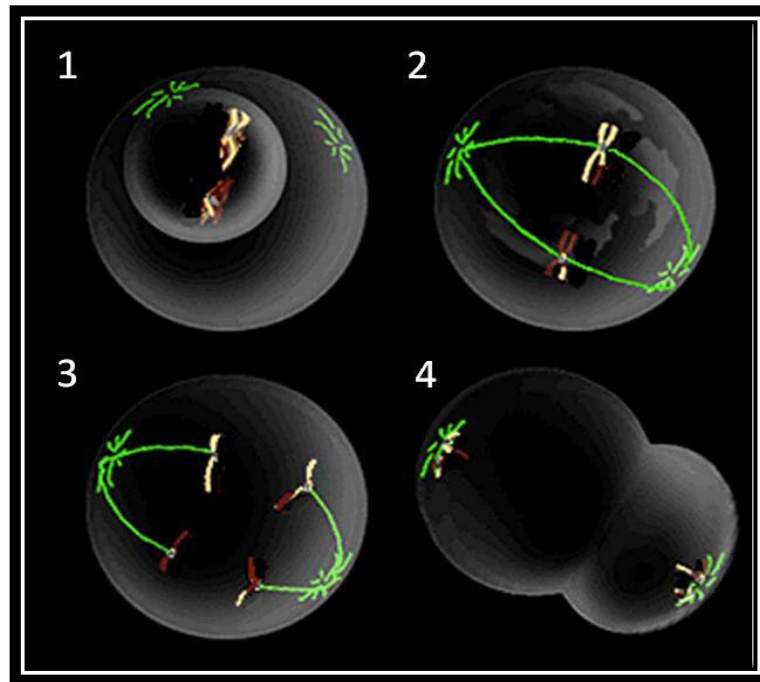
Après une interphase très courte où les chromosomes ne se décondensent que partiellement, les spermatocytes secondaires entrent en deuxième division de méiose, sans réplication d'ADN préalable. La deuxième division est similaire à une mitose somatique normale, à ceci près qu'elle ne porte que sur 23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

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

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

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

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



**Figure 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 spermiogenèse. 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 :

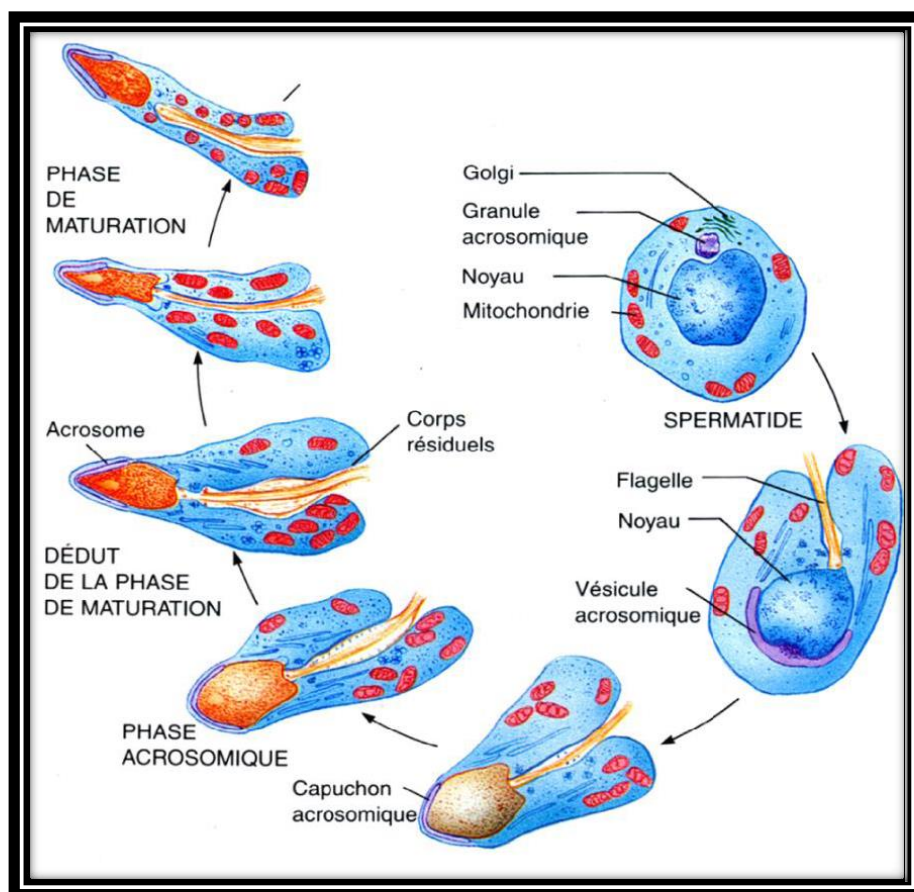
i/ une réorganisation nucléaire, avec élongation et compaction importante du noyau. Cette étape cruciale modifie globalement la structure du génome. Elle sera détaillée plus loin;

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.

### I.2.3 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
Spermatogonie B	16
Spermatocyte primaire	23
dont pachytène	16
Spermatocyte secondaire	1
Spermatides	23

### I.3. 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.

#### I.3.1. Transit intra-testiculaire :

Après la production dans l'épithélium séséminifère, 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 séséminifères, via les tubes droits, le rete testis (Nguyen M-H, 2015)

#### I.3.2. Transit extra-testiculaire

Les spermatozoïdes cheminent des canaux efférents jusqu'au canal épididymite, 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 épididymaires, 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 épididymaire. Toutes ces modifications rendent les spermatozoïdes provisoirement inaptes à la fécondation. Les derniers restes cytoplasmiques sont évacués et libérés dans le liquide épididymaire, 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 épididymaires, 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).

## **I.4. Spermatozoïde**

### **I.4.1. 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.

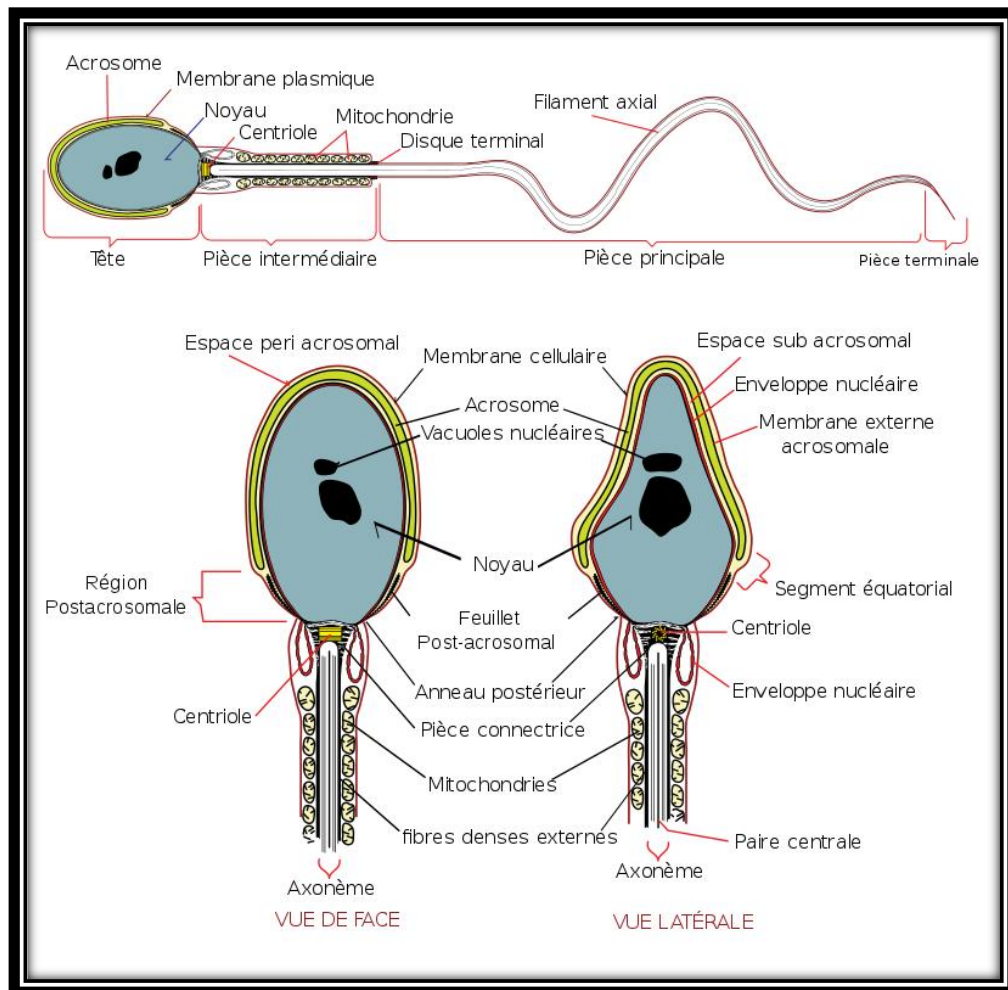
---

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).

#### **I.4.2. 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 séminal liquéfié ou non, glaire cervicale, liquide utéro-tubaire). (Nguyen M-H, 2015)



**Figure 14** : structure de spermatozoïdes (diagram of a human spermatozoa, 2006)

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).

---

---

## Chapitre II : Infertilité masculine du diagnostic au traitement.

---

---

## II. Infertilité masculine du diagnostic au traitement.

### II.1. Définition de l'infertilité:

Pour l'Organisation mondiale de la santé, l'infertilité est définie par l'absence de conception après au moins 12 mois de rapports sexuels non protégés (Rowe P.J. et al, 2000).

L'indicateur le plus fréquemment utilisé pour mesurer l'infertilité est la fécondabilité ou probabilité pour un couple de procréer par cycle féminin. Dans l'espèce humaine elle est d'environ 25%. Lorsque cette probabilité est faible (< 5%), il s'agit d'une hypofertilité et lorsqu'elle est nulle, il s'agit de stérilité (incapacité totale et définitive de procréer).

Cette dernière notion a beaucoup évolué ces dernières années depuis la possibilité des recueils des spermatozoïdes intratesticulaires et intraépididymaires puisque certaines formes d'azoospermie ont été reclassées dans le cadre des infertilités masculines et non plus dans celui de la stérilité.

La prévalence de l'infertilité ou de l'hypofertilité au sein d'un couple est estimée à environ 15% des couples en âge de procréer (Couet, 1999). Pour un tiers de ces couples, la cause d'infertilité peut être attribuée à un facteur masculin et pour un autre tiers un facteur masculin y contribue (Van Steirteghem et al., 1999).

Dans environ 10% des cas, aucune cause n'est retrouvée, l'infertilité reste inexplicée.

Infertilité masculine et anomalies morphologiques des spermatozoïdes sont évoquées en présence d'un pourcentage de formes typiques des gamètes mâles au spermocytogramme inférieure soit à 4 % (critères stricts de Kruger et Coll) soit à 15% (critères de David modifiés) selon les nouvelles valeurs de référence publiées par l'OMS en juin 2010.

Les causes d'infertilité masculine sont variées et souvent multifactorielles, se traduisant dans 61 % des cas par une anomalie quantitative et/ou qualitative du sperme (Thonneau P. et al., 1989), et peut être d'origine congénitale ou acquise (Potonnier et al., 1998).

## II. 2 Principales étiologies :

On pourrait classer les infertilités masculines selon le lieu de l'atteinte : pré- ou post- ou testiculaire (De Kretser DM., 1997). Après exclusion de toutes les causes reconnaissables d'infertilité, les oligozoospermies et azoospermies restant idiopathiques s'élèvent entre 30 et 50 % des hommes infertiles (Bhasin S. et al., 1997). Il persiste, ainsi, un vaste place pour découvrir des étiologies encore non définies d'infertilité masculine (Seifer I. et al., 1999).

### II.2.1 Causes pré-testiculaires :

Le système neuro-endocrinien est indispensable à l'initiation, au maintien et à la restauration de la spermatogenèse. L'action hormonale ne s'exerce pas directement sur les cellules germinales mais plutôt sur les cellules somatiques (Hamamah S. et al., 2004).

Touchant l'hypothalamus, l'hypophyse ou l'action périphérique des androgènes (Hamamah S. et al., 2004 et Vacheret N., 1999).

En absence de gonadotrophine, le défaut de la spermatogenèse est associé à une insuffisance testiculaire endocrine (hypoleydigisme) qui donne une symptomatologie propre : absence de développement pubertaire chez l'enfant et hypogonadisme à l'âge adulte (régression des caractères sexuels secondaires et troubles sexuels) (Vacheret N., 1999).

### II.2.2 causes testiculaires :

Le processus pathologique se situe, dans ces cas, au niveau du testicule lui-même ; avec diminution de la production des spermatozoïdes, les altérations « quantitatives » de la spermatogenèse représentent la majorité des infertilités avec selon l'intensité du trouble, azoospermie ou oligospermie dites sécrétoires. Parallèlement à l'oligospermie, il existe, souvent associées, des anomalies de la mobilité, de la morphologie et du pouvoir fécondant du sperme (Vacheret N., 1999).

La cryptorchidie correspondant à l'absence de descente d'un ou des deux testicules dans le scrotum, c'est une cause majeure d'altération de la spermatogenèse. Les testicules sont normaux ou diminués de volume d'un ou des deux côtés. L'oligoasthénozoospermie est souvent irréductible. La situation intro-abdominale du testicule entraîne une altération de la

spermatogenèse (la physiopathologie exacte n'est pas connue mais implique probablement une modification de l'environnement thermique) (De Tourris et al., 2000).

La varicocèle correspond à un élargissement du réseau veineux du plexus pampiniforme du cordon spermatique observé en général sur la partie gauche. La cause de cette affection est inconnue. Une oligo-asthéo-téatospermie est souvent due à une anomalie de spermatogenèse, elle est corrigée dans les 2/3 des cas après ligature des veines spermatiques (Hamamah S. et al., 2004).

Lésion testiculaire par infection virale : orchite ourlienne ; et la plus fréquente, touchant environ 25% des patients lorsque les orillons surviennent après la puberté. L'atteinte de la spermatogenèse est variable selon les individus, on peut observer un arrêt total irréversible ou une récupération de la spermatogenèse avec la présence de spermatozoïdes dans l'éjaculat (Zorn J-R. et al., 2005, Hamamah S. et al., 2004 ).

Plus rarement infection à d'autres germes : orchites bactériennes ; habituellement secondaires à une infection locale : prostatite, vésiculite, épидидymite. L'atteinte spermatique est moins sévère (Zorn J-R. et al., 2005).

Exposition au gonadotoxines, de nombreuses substances et expositions ont été impliquées dans l'induction des troubles de la spermatogenèse. Les effets de ces gonadotoxines peuvent être réversibles ou irréversibles. Il peut s'agir de :

- médicaments : cimétidine, sulfasalazine, stéroïdes anabolisants, nitrofurantoïne, phénytoïne, clonidine, colchicine, lithium etc....
- chimiothérapie anticancéreuse
- radiations : radiothérapie anticancéreuse, exposition a polluants radioactifs...
- produits chimiques : solvants organiques, pesticide, rejets de l'industrie du plastique...
- métaux lourds : fabrication des batteries, imprimerie...
- exposition à la chaleur : soudeur, boulanger, masseur hammam...
- alcool, cannabis ...

En ce qui concerne les traitements anticancéreux, l'intensité des lésions est proportionnelle aux doses utilisées et à la durée du traitement. La conservation de sperme avant chimiothérapie et radiothérapie devrait permettre de préserver la fécondité ultérieure. Dans la majorité des cas, la cause exacte des altérations de la spermatogenèse reste inconnue, on qualifie alors ces azoospermies ou oligoastheno(térato)spermie d'idiopathiques (Vacheret N., 1999).

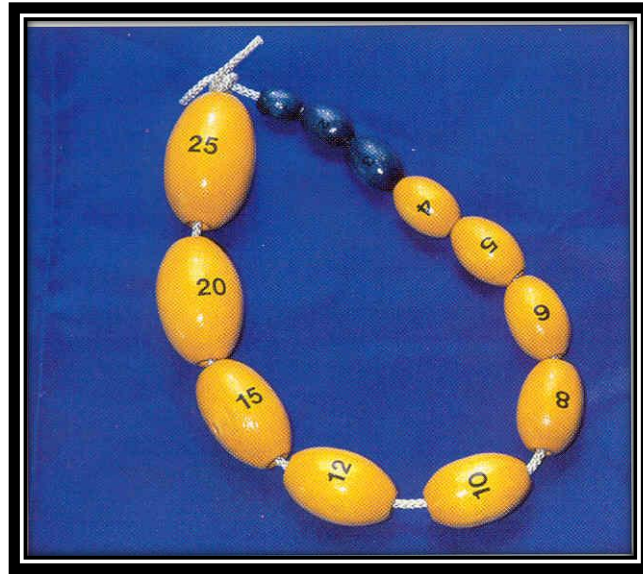
### **II.2.3 Causes post-testiculaires :**

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

## **II.3. Exploration de l'infertilité masculine:**

### **II.3.1. Examen clinique:**

Il vise tout d'abord à vérifier le bon développement pubertaire et à écarter toute maladie, anomalie ou malformation générale. On cherchera des signes cliniques d'hypogonadisme comme une gynécomastie, un aspect gynoïde ou une diminution de la pilosité et des masses musculaires. Un examen orienté et soigneux de la verge, de la région pelvienne et inguinale et du contenu intra scrotal sera réalisé. Il vise essentiellement à évaluer le volume testiculaire qui est un élément clé du diagnostic et peut aussi avoir un impact pronostique. Cette évaluation est facilitée par l'utilisation d'un orchidomètre de Prader (Figure 15). La consistance des testicules est notée. Les testicules doivent être fermes et une diminution de la fermeté témoigne souvent d'une maladie testiculaire. La taille et la morphologie de la verge sont précisées pour écarter toute anomalie, par exemple un micropénis ou un hypospadias. On cherche systématiquement des cicatrices au niveau des organes génitaux et des orifices inguinaux (intervention pour cryptorchidie ou cure chirurgicale d'hernie). Lorsqu'on a l'habitude de l'examen clinique de la sphère génitale masculine on cherche une varicocèle importante, on vérifie la présence et l'intégrité des canaux déférents et l'intégrité du corps de l'épididyme. Les médecins moins expérimentés dans ce domaine peuvent vérifier l'intégrité de ces structures grâce à l'échographie du scrotum et des organes génitaux internes, à condition que cet examen morphologique soit réalisé par des radiologues ou urologues experts.



**Figure 15 :** Orchidomètre de Prader permettant d'évaluer le volume testiculaire en consultation (Belendo, 2011)

### II.3.2 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.

#### *a- Le spermogramme :*

C'est l'étude des caractères macroscopiques, microscopiques et physico chimiques du sperme ; c'est l'examen indispensable de première indication dans la stérilité masculine à condition qu'il soit pratiqué deux à trois reprises dans un intervalle de trois mois par un laboratoire expérimenté.

Les renseignements fournis par le spermogramme :

- **Le volume**

Il renseigne sur le fonctionnement du système glandulaire :

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

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

- **Le pH**

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

- Un pH acide  $<7,2$  traduit une insuffisance ou une absence de sécrétions vésiculaires (exemple : agénésie des vésicules séminales).

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

- **La numération des spermatozoïdes :**

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

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

- Spermatozoïdes  $< 15$  millions par ml ou oligospermie ou oligozoospermie.

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

- **La mobilité :**

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

- **La vitalité :**

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

**Tableau 2 :** Valeurs normales des paramètres du spermogramme (OMS, 2010).

Valeurs normales selon l'OMS-2010		Définitions de l'anomalie	
Volume du sperme : $> 1,5$ ml (1,4 - 1,7) $< 1,5$ ml :		Hypospermie	
Numération des spermatozoïdes (par ml): $> 15$ millions/ml (12 - 16)		0 : Azoospermie	
Numération des spermatozoïdes (par éjaculat): $> 39$ millions (33 - 46)		$< 15$ millions/ml : Oligozoospermie	
Mobilité des spermatozoïdes à la première heure après l'éjaculation. - Grade (a) : mobilité en trajet fléchant rapide ( $>25 \mu\text{m/s}$ ) - Grade (b) : mobilité lente et progressive (5-25 $\mu\text{m/s}$ ).	- Mobilité progressive de type (a+b) des spermatozoïdes : $> 32\%$ (31 à 34) (ou $> 30\%$ )	$<32\%$	Asthénospermie
	- Mobilité de type (a+b+c) des spermatozoïdes : $> 40\%$ (38 - 42)	$< 40\%$	

- Grade (c) : mobilité sur place. - Grade (d) = immobile		
Mobilité à la quatrième heure après l'éjaculation.	Chute de mobilité inférieure à 50 % comparativement aux chiffres de la première heure	Chute de mobilité supérieure à 50%
Morphologie normale des spermatozoïdes : >30 % > 4 % (3,0 - 4,0) (se rapproche de la classification Kruger) Ou : > 15 % (selon la classification de David modifiée par Auger et Eustache).	< 4 % : Tératospermie	
Leucocytes < 1 million/ml	> 1 million/ml : Leucospermie	
Vitalité des spermatozoïdes : > 58 % (55 - 63)	<58 % : Nécrosospermie	
<p>D'autres valeurs normales (consensus) :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o pH : &gt; 7,2</li> <li>o MAR test (anticorps anti spermatozoïdes de type IgA, IgG, IgM fixés sur les spermatozoïdes) : &lt; 50 %.</li> <li>o Immunobead test (motile spermatozoa with bound particules) (ou spermatozoïde mobile avec anticorps antispermatozoïde) : &lt; 50 %</li> <li>o Peroxidase-positive leukocytes : &lt; (1,0) million/ml).</li> <li>o Fructose séminal : &gt; (13) µmol/éjaculât</li> <li>o Phosphatase acide seminale : &gt; 200 U/éjaculât.</li> <li>o Acide citrique séminal : &gt; 52 µmol/éjaculât.</li> <li>o Zinc séminal : &gt; (2,4) µmol/éjaculât</li> <li>o Seminal neutral glucosidase : &gt; (20) mU/éjaculât</li> <li>o L-carnitine séminale : 0.8-2.9 µmol/éjaculât</li> </ul>		

### *b- Le spermocytogramme :*

#### **Définition**

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

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

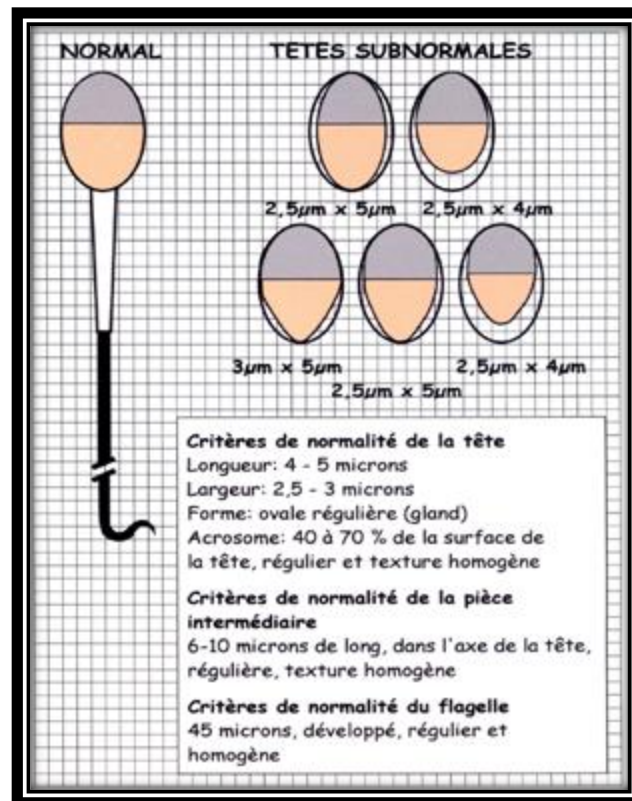
##### **1. Principe**

La méthode de David pour le classement des anomalies morphologiques des spermatozoïdes humains a été proposée en 1972 lors d'un colloque sur la fécondité et la stérilité du male et publiée en 1975 (Fellous et Siffroi, 2003). La classification initiale comportait 13 types d'anomalies, sept pour la tête et six pour le flagelle. La classification de David modifiée recense en dehors des spermatozoïdes morphologiquement normaux (Figure 16 et 21):

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

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

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



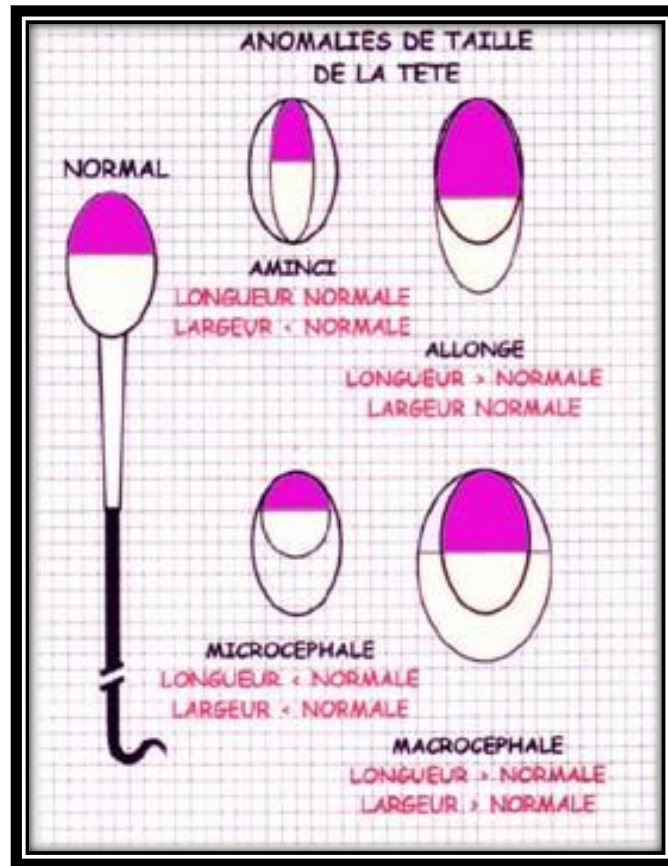
**Figure 16 :** Illustrations du spermatozoïde humain normal ou subnormal, considéré comme normal, et rappel des définitions (Auger et Eustache, 2000).

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

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

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

**Macrocéphale:** Le grand axe et le petit axe sont plus grands que la normale (figure 17).

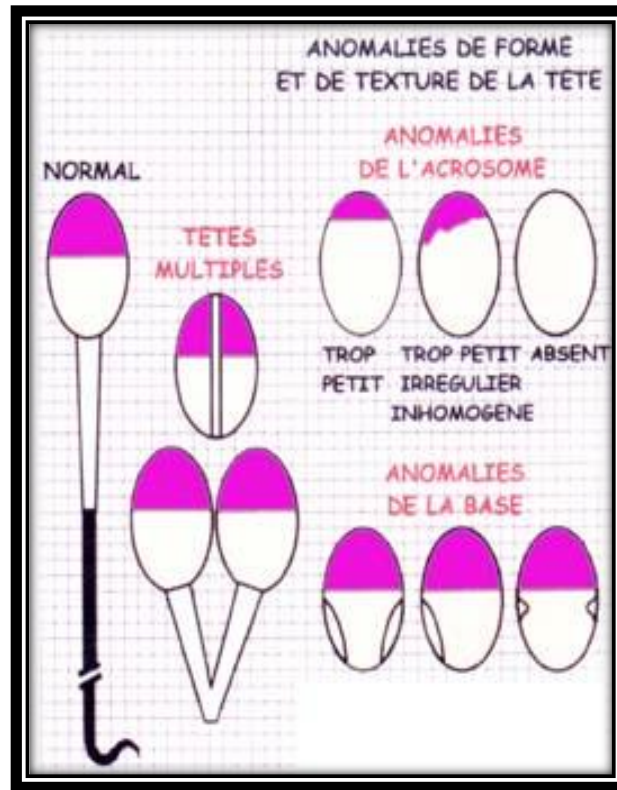


**Figure 17** : Anomalies de taille de la tête des spermatozoïdes humains (Auger et Eustache, 2000).

**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 18).

**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 18).

**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 18).

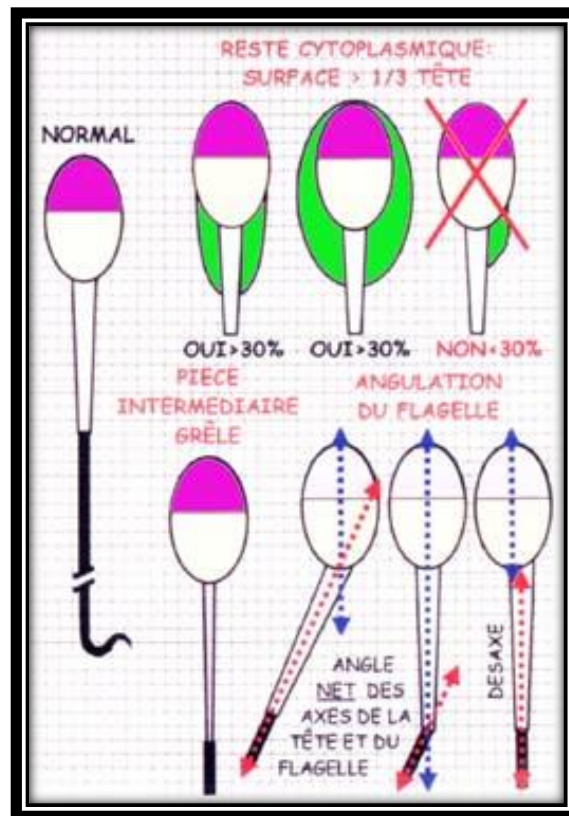


**Figure 18** : Anomalies de forme et de texture de la tête des spermatozoïdes humains (Auger et Eustache, 2000).

**Reste cytoplasmique** : le reste cytoplasmique est considéré comme une anomalie s'il a une surface supérieure au tiers de la surface d'une tête normale. Il se situe le plus souvent à la jonction de la tête et de la pièce intermédiaire et c'est pourquoi il est classé comme anomalie de la pièce intermédiaire mais il peut également entourer l'ensemble de la cellule (souvent dans le cas de spermatozoïdes enroulés) ou englober seulement la tête (Figure 19).

**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 19).

**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 19).



**Figure 19 :** Anomalies de la pièce intermédiaire des spermatozoïdes humains (Auger et Eustache, 2000).

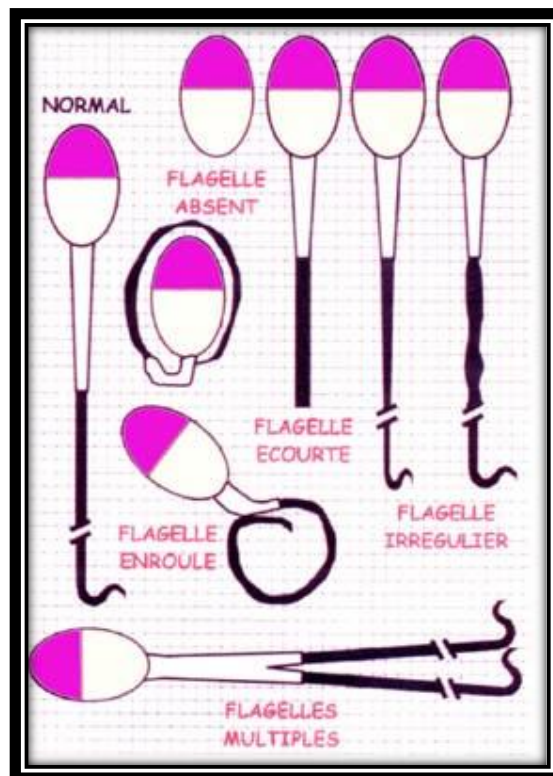
**Flagelle absent :** les têtes isolées sont comptées dans cette catégorie. La pathologie ultrastructurale intéresse les colonnes striées qui sont absentes et/ou la pièce connective qui est rudimentaire (Figure 20).

**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 20).

**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 20).

**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 20) (Ounis, 2015).



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

		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Les anomalies de la tête.</li> </ul>	
FORMES ALLONGEES	Simples		
	Base amincie		
	Battant de cloche		
	Effilés		
FORMES AMINCIES			
MICROCEPHALES			
MACROCEPHALES			
DUPLIQUEES			
FORMES IRREGULIERS	Contour irrégulier		
	Acrosome mal formé		
	Sans acrosome		
FORME EN LYSE			
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Les anomalies de la pièce intermédiaire</li> </ul>			
RESTES CYTOPLASMIQUES			
ANGULATION			
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Les anomalies du flagelle</li> </ul>			
FLAGELLES ABSENTS			
FLAGELLES COURTS			
FLAGELLES ENROULES			
FLAGELLES DOUBLES			
<p>Autres</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Flagelles isolés</li> <li>• Présence cellules de la lignée spermatique</li> <li>• Des éléments à signaler.</li> </ul>			

Figure 21: Classification de David 1975 des anomalies morphologiques des spermatozoïdes (Mansat et Bennet, 1986).

---

### II.3.3 Exploration cytogénétique:

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

#### a- Caryotype:

Les techniques de cytogénétique ont beaucoup évolué depuis la découverte du nombre exact de chromosomes chez l'homme en 1956. Le caryotype standard est utilisé depuis 1959 en cytogénétique classique. Il permet initialement une résolution de 10 à 15 Mb. À partir des années 1970, le marquage en bandes et le caryotype haute résolution ont permis d'améliorer la résolution et la sensibilité de l'analyse cytogénétique (Hugon-Rodin, 2010). Classiquement, un marquage de l'euchromatine en bandes G (Giemsa) et en bandes R (Reverse) est réalisé.

**Les bandes G :** sont obtenues par dénaturation enzymatique, avec la trypsine. Cette dernière digère les protéines et permet l'apparition après coloration au Giemsa d'une succession de bandes permettant de classer et d'analyser les chromosomes. Les bandes G correspondent aux bandes R négatives. Les bandes G marquent des régions d'ADN riches en liaison A-T et représentent des centres de condensation précoces pauvres en gènes actifs et en séquences Alu (Egea, 2010).

**Les bandes R :** sont obtenues par dénaturation thermique des chromosomes. Elles marquent des régions d'ADN riches en liaison G-C correspondant à des régions riches en gènes actifs et en séquences Alu (Egea, 2010). Il existe par ailleurs d'autres techniques de marquage complémentaires qui permettent d'analyser certaines régions particulières du génome :

**Les bandes C :** qui, par coloration au sulfate de Baryum, mettent en évidence l'hétérochromatine constitutive (1, 9, 16, Y). Elles correspondent à des régions non codantes du génome comme les régions centromériques (Arrighi et Hsu, 1971).

**Les bandes Q** : superposables aux bandes G, colorent intensément la partie distale, hétérochromatique, des bras longs de l'Y, certains centromères et certains bras courts des acrocentriques (Caspersson et al, 1970).

**les NOR** qui, par dépôt de nitrate d'argent, mettent en évidence les organisateurs nucléolaires. Ces structures correspondent aux régions du génome contenant les gènes qui codent pour les ARN ribosomiaux (Bloom et Goodpasture, 1976).

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

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

La place des anomalies chromosomiques congénitales dans l'étiologie de l'infertilité masculine n'est pas négligeable. Les anomalies chromosomiques associées à des troubles de la gamétogenèse, et plus particulièrement chez l'homme, peuvent être classées en deux grandes catégories :

- celles affectant le nombre des chromosomes (aneuploïdies) et
- celles touchant leur structure. Ces deux types d'anomalies sont retrouvés dans 14% des azoospermies, avec des mutations touchant préférentiellement les gonosomes (chromosomes sexuels) et dans 5% des oligospermies on retrouve des anomalies touchant préférentiellement les autosomes (Vialard et al, 2009).

**Le syndrome de Klinefelter et la mosaïque XXY Le syndrome de Klinefelter(SK):**

C'est l'aneuploïdie des gonosomes la plus fréquente chez les hommes, survenant chez environ 0,1 à 0,2% des nouveau-nés de sexe masculin. La prévalence de SK chez les hommes infertiles est très élevée, pouvant aller jusqu'à 5% en oligozoospermie sévère et 10% en azoospermie (Vialard et al, 2009). Le SK est une forme de défaillance testiculaire primaire avec hypotrophie testiculaire et une élévation du niveau des gonadotrophines plasmatiques, et il représente la forme la plus commune de l'hypogonadisme masculin. L'infertilité pourrait être due à :

- une anomalie de la méiose, la formation du complexe synaptonémal de l'X et l'Y dans la vésicule sexuelle pourrait être perturbée par la présence d'un chromosome X surnuméraire (Solari, 1999) ;

- la surexpression de gènes sur l'X: sept gènes de spermatogenèse sont en effet portés par l'X : FTHL17 (Ferritin, heavy polypeptide-like 17), USP26 (UbiquitinSpecific Peptidase 26), TKTL1(TransKeTolase-Like 1),TAF7L(TAF7-like RNA polymerase II, TATA box bindingprotein (TBP)-associated factor), NFX2(Nuclear transcription Factor, X-boxbinding 2), TEX13A/B(TestisEXpressedgene 13), ainsi que le gène du récepteur aux androgènes (AR), le gène FMR1 (Fragile X Mental Retardation 1)impliqué dans le syndrome de l'X fragile et le gène de l'hélicaseXH2(Vogt et al, 2008).

Néanmoins, il existe des cas de syndrome de Klinefelter en mosaïque, associant des cellules 47, XXY majoritaires à une faible proportion de cellules 46,XY, où l'on retrouve des spermatozoïdes lors d'une biopsie testiculaire ou, beaucoup plus rarement, dans l'éjaculat. L'incidence de l'aneuploïdie des spermatozoïdes est augmentée dans le SK (Laron et al, 1982).

**Mâle 46, XX L'anomalie chromosomique 46, XX:** est observée essentiellement chez les mâles azoospermiques, avec une fréquence de 0,9% (Mau-Holzmann, 2005). Le phénotype est semblable au syndrome de Klinefelter, mais avec une taille normale et une intelligence intacte. Le gène SRY est présent dans la plupart des cas (SRY+) ; dans ces cas les mâles sont toujours stériles, et l'azoospermie résulte de l'atrophie testiculaire. L'autre catégorie de mâle XX sont les mâles (SRY-), ce qui suppose une mutation dans un gène autosomique ou lié à l'X impliqué dans la cascade du déterminisme sexuel qui devrait remplacer le gène SRY, permettant de déterminer des testicules en l'absence de SRY (Ferlin et al, 2006).

#### **b- Analyse de l'équipement chromosomique des spermatozoïdes :**

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

La difficulté pour l'étude de l'équipement chromosomique des spermatozoïdes résidait principalement dans le fait que ces cellules soient amitotiques (incapables de se diviser par mitoses). Ainsi, l'obtention d'un caryotype ne fut possible que par la réalisation d'une fécondation afin d'obtenir des métaphases haploïdes de spermatozoïdes. En 1976, une équipe

a mis au point une technique de fécondation *in vitro* hétérospécifique entre des ovocytes dépellucidés de hamster doré et des spermatozoïdes humains (Yanagimachi & Yanagimachi, 1976). Cette technique originale a permis de montrer que les hommes porteurs d'anomalies chromosomiques (notamment les translocations) pouvaient avoir une grande variabilité des taux d'anomalies chromosomiques dans leurs spermatozoïdes. Cependant, cette technique est lourde à mettre en œuvre et ne permet l'étude que d'un nombre limité de caryotypes de spermatozoïdes. Ainsi, il aura fallu près de 20 années pour obtenir 10 000 caryotypes de spermatozoïdes humains (Guttenbach et al., 1997).

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

Au début des années 80 des améliorations techniques permirent la mise en évidence de séquence unique : utilisation de sondes clonées, introduction du sulfate de Dextran dans la solution d'hybridation permettant d'augmenter le signal d'hybridation. Cependant, malgré leur réelle efficacité, la lourdeur de ces techniques nécessitant l'utilisation de la radioactivité en limitait l'exploitation : précautions liées à la manipulation de radio-isotopes, durée des temps d'exposition (2 à 3 semaines), longueur de l'analyse, manque de précision dans la localisation des signaux... L'introduction de marqueurs non radioactifs par modification chimique ou physique des acides nucléiques et le développement de systèmes de détection efficace, notamment la fluorescence, a permis aux laboratoires de diagnostics une utilisation en routine devenue indispensable au début des années 90.

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

---

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

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

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

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

Enfin, des analogues d'acides nucléiques, plus précisément, les PNAs (peptide nucleic acids) ont été développés en 1991 (Nielsen et al., 1991). Ces molécules ont été conçues pour des analyses de liaison avec l'ADN et s'utilisent en cytogénétique moléculaire depuis quelques années. La technique PNA-FISH, élaborée en 2001, permet de réaliser un marquage de 3 chromosomes en une seule étape (Taneja et al., 2001). L'équipe de Pellestor et al. a ensuite adapté cette technique au marquage in situ des spermatozoïdes (Pellestor et al., 2003). Cette nouvelle approche peut se révéler intéressante mais elle n'est pas encore utilisée classiquement en routine.

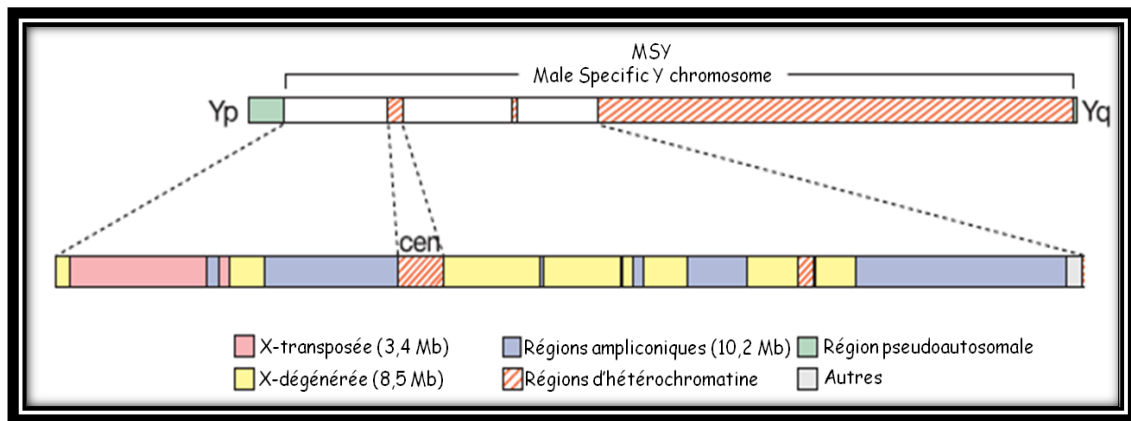
Ceci étant, la grande majorité des laboratoires utilise la FISH qui est la technique de référence pour l'étude du contenu chromosomique des spermatozoïdes.

### **II.3.4. Exploration génétique :**

#### **II.3.4.1. chromosome Y et AZF**

##### **Constitution du chromosome Y et origine des microdélétions**

Le chromosome Y, de 60 Mb, a été décrit par Painter comme un élément petit et non apparié (Painter, 1921). En 1923, Painter conclut en l'existence de 46 autosomes et 2 gonosomes (X et Y) chez l'homme (Painter, 1923). Le chromosome Y est constitué de régions pseudo-autosomiques communes au chromosome X. Ces régions PARs (pseudautosomal region) 1 (2,6 Mb) et 2 (0,32 Mb) permettent une recombinaison interchromosomique avec le chromosome X. Le chromosome Y contient une région qui lui est propre (MSY : male specific Y chromosome). Cette partie ne recombine jamais avec le chromosome X. Elle constitue près de 95% de la longueur du Y. Dans la partie distale de cette région, sur le bras long, il y a une zone d'hétérochromatine (chromatine majoritairement condensée et donc pauvre en gènes) non fonctionnelle plus ou moins étendue selon les hommes. La partie fonctionnelle (donc euchromatique) de la région MSY s'étend sur environ 23 Mb (Ravel et al., 2006) dont 8 Mb sur le bras court et près de 15 Mb sur le bras long (revu par Li et al., 2008). Cette région MSY est constituée de trois régions selon la nature des gènes qui les constituent : une région appelée Xtransposée de 3,4 Mb (99% d'homologie avec la région Xq21.2, gènes transposés de l'X), pauvre en gènes et riche en séquences répétées notamment en séquences LINE 1 (long interspersed nuclear elements 1), des régions contenant des gènes X-dégénérés (8,5 Mb) présentes sur le bras court et le bras long du chromosome Y et enfin des régions dites ampliconiques (10,2 Mb) (gènes en multiples copies) (Figure 22) (Skaletsky et al., 2003; Ravel & Siffroi, 2009)



**Figure 22** : Représentation du chromosome Y en fonction du type de régions (X-transposées, dégénérées, ampliconiques, hétérochromatine) (Adaptée de Skaletsky et al., 2003).

Ces séquences renferment de nombreux pseudogènes et 16 gènes transcrits majoritairement en protéines ubiquitaires. Le chromosome Y est indispensable à la survie de notre espèce puisqu'il est impliqué dans le déterminisme testiculaire et la production de spermatozoïdes. En effet, au sein de cette région MSY se trouve le gène SRY (sex-determining region of Y chromosome) en Yp11.3. Ce gène de différenciation testiculaire n'est, en principe, jamais délété chez un homme de morphotype masculin. Il est cependant rapporté de rares cas d'hommes XX dont le phénotype est masculin, sans ambiguïté sexuelle et pourtant sans SRY (Zenteno et al., 1997).

Pendant la vie embryonnaire, la gonade encore indifférenciée est sous la dépendance d'un facteur de détermination testiculaire (TDF : testis determining factor) codé par le gène SRY. Il intervient dans la cascade d'activation et de répression géniques qui aboutit à la différenciation du testicule, du tractus génital mâle et des organes génitaux externes et à la régression des canaux müllériens.

À l'heure actuelle, 27 gènes ont été identifiés sur le chromosome Y, 9 sur le bras court et 18 sur le bras long. Parmi ces 18, 12 sont exprimés de façon spécifique dans les testicules et sont nécessaires à la production de spermatozoïdes normaux (Cram et al., 2006). D'autre part, en 1976, la première association fut faite entre infertilité masculine et délétion du chromosome Y, plus précisément entre la région AZF et la spermatogenèse (Tiepolo & Zuffardi, 1976). Dix ans après, la biologie moléculaire a permis de subdiviser le chromosome Y en 7 régions (Vergnaud et al., 1986). C'est entre les intervalles 5 et 6 que se situe AZF. Une ou plusieurs microdélétions de tout ou partie de la région AZF en Yq aurait lieu pendant la gamétogenèse ou pendant le développement précoce préimplantatoire et pourrait être la résultante d'une déficience des enzymes responsables de la réparation de l'ADN. Ces

microdélétions résulteraient de recombinaison entre des blocs de séquences répétées (éléments rétroviraux, séquences palindromiques de répétitions en tandem, plusieurs gènes en multiples copies) flanquant les intervalles délétés (Cram et al., 2006). Les familles de gènes DAZ (deleted in azoospermia), RBMY (RNA-binding motif Y chromosome) et TSPY (testis-specific protein Y-encoded) sont présents en un nombre de copies variable chez les hommes et peuvent être le siège de recombinaisons responsables de microdélétions.

### **Les différents types de délétions de la région MSY**

#### **- Les délétions AZFa**

Les délétions AZFa sont la conséquence de recombinaison entre séquences homologues de ature rétrovirale (HERV15). Elles ne représentent que 5% des délétions AZF mais entraînent les atteintes les plus graves de la spermatogenèse puisqu'elles sont classiquement associées à une absence de cellules germinales et à un tableau de syndrome SertoliCellOnly (SCO). Curieusement, cette sévérité du phénotype testiculaire n'est pas corrélée au nombre de gènes perdus puisque seulement deux gènes s'expriment dans cette région, USP9Y et DDX3Y (Ravel et al, 2007).

#### **- Les délétions AZFb**

Les délétions complètes d'AZFb emportent 6,23 Mb et sont la conséquence de recombinaisons entre séquences palindromiques. Elles s'étendent sur 1,5 Mb de la région proximale d'AZFc (McElreavey et al, 2008). Représentant environ 15% des microdélétions de l'Y, elles s'accompagnent classiquement d'une azoospermie par blocage des cellules en méiose. Une dizaine de gènes exprimés dans le testicule sont situés dans la région de délétion AZFb mais le mode d'expression dans l'organisme, ubiquitaire ou testicule-spécifique n'est pas clairement définie. Une délétion AZFb proximale limitée au gène HSFY a été décrite chez un homme azoospermique. En fait, la famille de gènes qui a été la plus étudiée est celle des gènes RBMY qui comprend entre 20 et 50 membres répartis à la fois sur le bras court et le bras long du chromosome, sous la forme de gènes et de pseudo-gènes. L'étude de l'expression de ces gènes a permis, d'une part, de révéler le rôle fondamental joué par les exemplaires situés dans la région AZFb et, d'autre part, de montrer qu'en l'absence de protéine RBMY la spermatogenèse des patients ne vont pas au-delà de la méiose (Ravel et al, 2007).

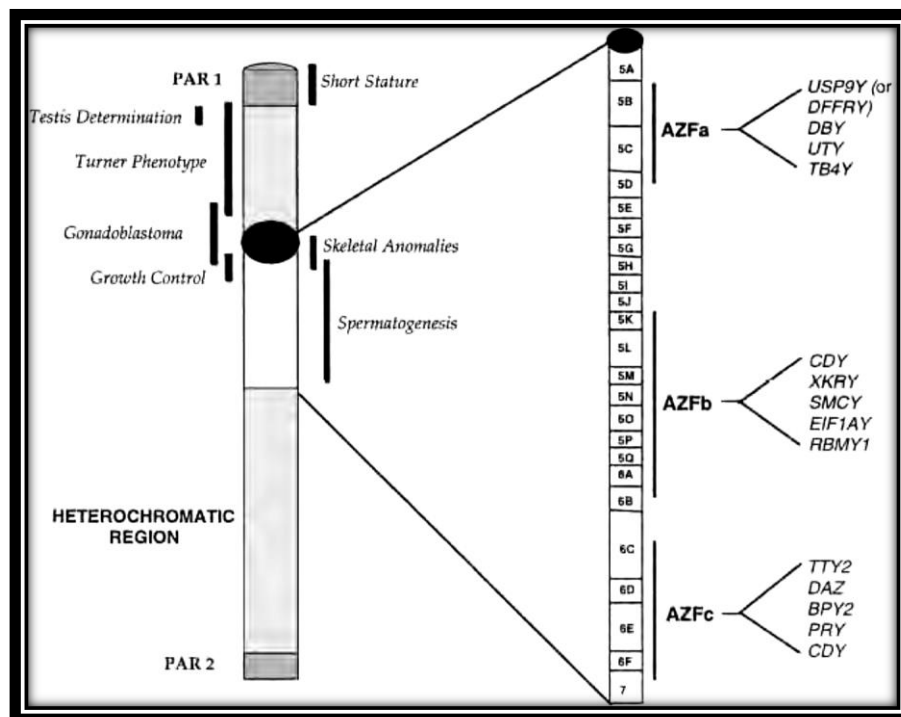
#### **- Les délétions AZFb+AZFc**

sont également la conséquence de recombinaison entre séquences palindromiques, couvrent 7,66 Mb et n'emportent pas la région distale d'AZFc.

#### **- Les délétions AZFc**

Les délétions de la région AZFc sont les plus fréquentes (80% des microdélétions) et touchent un homme sur 4000. Ces hommes présentent une azoospermie ou une oligozoospermie sévère ( $<1 \times 10^6/\text{ml}$ ). Ces microdélétions, dénommées b2/b4 (Kuroda-Kawaguchi *et al*, 2001) sont la conséquence de recombinaisons entre deux éléments répétés de 229kb dans une région chromosomique presque entièrement composée de longues séquences répétées, directes ou inversées dénommées amplicons. C'est dans cette région AZFc que sont localisés plusieurs gènes candidats de la fertilité humaine dont trois copies du gène BPY2, deux copies de CDY1a et CDY1b ainsi que quatre copies du gène DAZ. Chacun de ces trois gènes pourrait contribuer conjointement au phénotype d'infertilité ou bien encore être un gène majeur d'infertilité (McElreavey *et al*, 2008).

Les différents types de microdélétions dans la région AZF sont résumés dans la (figure 23)



**Figure 23** : Représentation schématique des gènes et des régions AZF (AZoospermia Factor) du chromosome Y humain (AZFa, AZFbetAZFc). (Quintana-Murci, 2001)

### II.3.4.2 Le chromosome 3 et SPATA16

Nous venons de développer les microdélétions du chromosome Y découvertes dans les années 1970. Depuis, seulement deux gènes (Dam *et al.*, 2007; Dieterich *et al.*, 2007) ont pu

---

être formellement associés à des troubles de la spermatogenèse chez l'homme. Ces deux gènes sont SPATA16 et Aurora Kinase C (AURKc).

C'est en analysant par puce des cDNA humains à l'aide de sondes de cDNA de testicules adultes et foetaux que Xu et al. (Xu et al., 2003) ont identifié le gène SPATA16 qu'ils ont appelé NYD-SP12. Il a été localisé en 3q26.32. Ce gène est spécifiquement exprimé dans les testicules chez l'homme et au niveau de l'appareil de Golgi. Il a été montré, chez la souris, que la protéine codée par ce gène a un rôle dans la formation de l'acrosome lors de la spermiogenèse. Cette protéine est présente dans des vésicules proacrosomiales transportées jusqu'à l'acrosome dans les spermatozoïdes ronds et allongés (Lu et al., 2006). En 2007, une mutation homozygote dans l'exon 4 (c.848G→A) de ce gène apparaît impliquée chez des patients infertiles présentant une globozoospermie (Dam et al., 2007). Cette tétrazoospermie particulière est rare (incidence de moins de 0,1% chez les hommes infertiles) et se caractérise par des têtes spermatozoïdiques ronds et sans acrosome. La mutation consiste en un changement d'acide aminé (p.Cys229Tyr) au niveau d'un résidu hautement conservé (p.R283Q) situé dans la partie C-terminale d'un domaine TPR (tetratricopeptide repeats). De plus, étant donné que la mutation concerne le dernier nucléotide de l'exon 4, elle peut endommager le site d'épissage situé en 5' de l'intron 4.

#### **II.3.4.3 Le chromosome 19 et AURKc**

Glover et al. rapportent, chez la drosophile *D. melanogaster*, une mutation dans le gène "aurora", qui influe sur le processus mitotique du centrosome (Glover et al., 1995). C'est en 1997 que le gène Aurora A (encore appelé Aik ou Btak) fut identifié chez l'homme à la suite d'une recherche d'homologie avec le gène aur-A de *D. melanogaster* (Kimura et al., 1997; Sen et al., 1997). Puis en 1998, le gène Aurora B (encore appelé Aik2 ou STK12) fut découvert (Kimura et al., 1998; Prigent et al., 1999) ainsi que le gène Aurora C (encore appelé Aie2 ou stk13) (Bernard et al., 1998; Tseng et al., 1998). Étant donné les différents noms attribués, une nomenclature a été proposée sous les noms de Aurora A, B et C en 2001 (Nigg, 2001). Les gènes Aurora codent des kinases qui phosphorylent les résidus sérines et thréonines. Très récemment, le gène AURKc, situé en 19q13.43, a été incriminé chez des patients présentant une infertilité primaire avec des spermatozoïdes macrocéphales et multiflagellés et une tétrazoospermie à près de 100%. C'est une équipe grenobloise qui a mis en évidence une mutation homozygote dans l'exon 3 du gène AURKc (c.144delC) chez 9 patients (Dieterich et al., 2007). Ce gène est exprimé dans les testicules et est impliqué dans la ségrégation méiotique et la division cellulaire lors de la méiose (Kimura et al., 1999; Yan et al., 2005; Tang et al., 2006). La mutation de AURKc entraîne un décalage du cadre de lecture

---

responsable d'une fin prématurée de la traduction et de la production d'une protéine tronquée non fonctionnelle (perte de son domaine kinase) (Harbuz et al., 2009). Une nouvelle étude de la même équipe met en évidence la même mutation chez 34 patients. Parmi eux, deux frères avaient de plus une mutation dans l'exon 6 de AURKc. Tous les patients porteurs de la mutation étaient d'origine nord-africaine. Ils estiment la prévalence de ce syndrome de macrocéphalie et flagelles multiples à 1/10 000 hommes dans la population maghrébine (Dieterich et al., 2009; Harbuz et al., 2009).

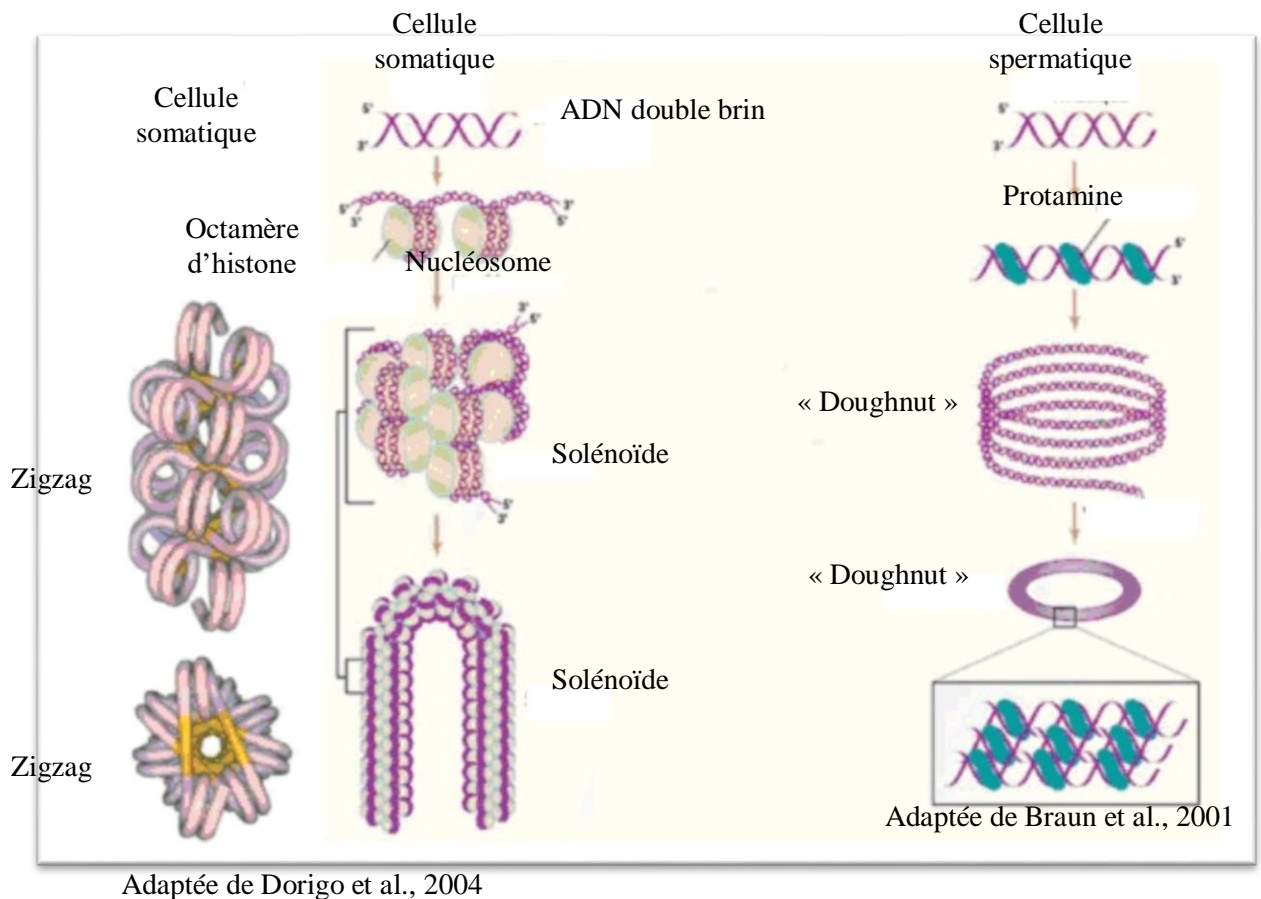
### **II.3.5. Analyse de la fragmentation de l'ADN spermatique:**

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

- **Structure de l'ADN spermatique :**

Dans les cellules somatiques, l'ADN s'organise en nucléosomes. Un nucléosome est constitué d'un octamère d'histones (deux histones H2A, deux H2B, deux H3 et deux H4) autour duquel la molécule d'ADN s'enroule. Deux modèles sont actuellement proposés pour décrire la structure de l'ADN compacté, soit un modèle en zigzag (Dorigo et al., 2004), soit

un modèle en forme de solénoïde (Braun, 2001) (Figure 24). L'ADN du gamète mâle, support de l'information génétique à transmettre, est une longue molécule fragile fortement compactée. La chromatine d'un spermatozoïde s'organise en une superposition de boucles d'ADN que sont les super-enroulements. Celles-ci ont la forme d'un "doughnut" (beignet).



**Figure 24 :** Modèles de l'organisation de la chromatine dans une cellule somatique (zigzag ou solénoïde) et dans une cellule spermatique (doughnut).

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

La chromatine des spermatozoïdes est environ six fois plus condensée que celles des cellules somatiques. Cette compaction très importante correspond à la mise en place d'une protection physique du noyau du gamète aux différentes agressions auxquelles il va être soumis tout au long de son trajet, du tube séminifère jusqu'au cytoplasme ovocytaire. Il est

nécessaire que le patrimoine génétique puisse être acheminé, sans dommage, des voies masculines jusque dans les voies féminines (Manicardi et al., 1998). Au stade de la spermatide ronde, les histones sont remplacées par des protéines de transition 1 et 2 (TNP1 et TNP2 : Transition Nuclear Protein). TNP1 interviendrait dans les processus de réparation de l'ADN, TNP1 et TNP2 dans la mise en place des protamines de type 2 (PRM2). Lors du stade de l'élongation des spermatides, les protéines de transition sont remplacées par des protamines de type 1 (PRM1) et des PRM2 (Aoki et al., 2006). Les protamines sont des protéines basiques riches en arginine et en cystéine. Lors du transit des spermatozoïdes dans l'épididyme, le nombre de ponts disulfures est augmenté au niveau des résidus cystéine des protamines. Environ 95% des groupements thiols (-SH) portés par la cystéine sont oxydés. Cela conduit à la formation de cystine qui consiste en l'union de deux molécules de cystéine par un pont disulfure, ce qui permet une stabilisation supplémentaire de la structure nucléaire. Ce compactage très important est responsable de la perte de la possibilité pour l'ADN spermatique de se répliquer et d'être réparé (Roux et al., 2004).

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

- **Evaluation de l'intégrité de l'ADN spermatique :**

Les techniques permettant d'évaluer la qualité de l'ADN spermatique ont pour objectif l'identification des patients ayant un taux important d'anomalies de l'ADN nucléaire de leurs spermatozoïdes. Le but ultime est d'expliquer l'infertilité des couples et de réussir à déterminer un seuil de fragmentation au-dessus duquel la réussite d'une technique d'aide médicale à la procréation est fortement compromise. L'analyse des gamètes se fait au microscope à épifluorescence ou peut se faire avec un cytomètre de flux (premier appareil développé par Göhde, 1968). L'analyse se fait selon un mode binaire, la chromatine des gamètes est altérée ou intacte.

***Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA):***

Le test de sperm chromatin structure assay (SCSA) est basé sur le fait que la chromatine spermatique anormale est plus susceptible de se dénaturer après un traitement in situ par une solution acide et/ou par la chaleur, qu'une chromatine intacte (Darzynkiewicz et al. , 1975; Evenson et al. , 1980; Evenson et al. , 1985). La technique SCSA utilise les propriétés métachromatiques de l'acridine orange. L'analyse se fait grâce à un cytomètre de

---

flux qui mesure le ratio entre la fluorescence rouge (simple brin d'ADN dénaturé) et la fluorescence verte (ADN double brin). Un coefficient appelé DFI (DNA fragmentation index) est calculé par la relation suivante : Fluorescence rouge / (Fluorescence rouge + verte) (Roux et al. , 2004). Un DFI de 0,1 ou de 0,9 signe, respectivement, un ADN non dénaturé ou très dénaturé. La cytométrie de flux permet d'étudier rapidement un grand nombre de spermatozoïdes, cependant, les prélèvements spermatiques avec une faible numération ne peuvent pas être analysés. Les résultats obtenus à l'aide de la technique SCSA ne sont que faiblement corrélés aux paramètres de l'OMS à savoir la concentration, la mobilité et la morphologie (Evenson et al. , 1991). Ce test paraît donc être un outil diagnostique supplémentaire dans l'exploration de l'infertilité masculine (Larson et al. , 2000). Il a été proposé un seuil de DFI aux environs de 30% à partir duquel le taux de fécondité serait diminué (Evenson et al. , 1999; Boe-Hansen et al. , 2006).

#### ***Test à l'acridine orange (AO) :***

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

#### ***Technique Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) dite COMET :***

La technique SCGE a été décrite la première fois en 1988 pour évaluer les dommages de l'ADN des cellules dus à divers facteurs comme les radiations par ultraviolets, la radiothérapie (Singh et al., 1988). Cette méthode consiste à détecter des cassures dans les brins d'ADN des cellules à étudier. Adaptée à l'analyse des spermatozoïdes (Singh et al., 1989), cette technique consiste à mélanger le sperme avec de l'agarose légèrement chauffé. Le tout est déposé sur une lame. Les cellules sont ensuite lysées. La lyse peut être alcaline

---

---

(pH>10), elle dénature alors l'ADN spermatique. Des cassures simple et double brin sont décelées (Collins, 2004; Speit et al. , 2009). Quelques modifications de la technique faites en 1991 ont permis d'obtenir une détection des cassures double brin uniquement (Olive et al. , 1991). La technique COMET, à pH 7, est plus adaptée à la mise en évidence de dommages de l'ADN liés à une infertilité puisque ces conditions neutres ne dénaturent pas l'ADN contrairement au pH alcalin (Andrabi, 2007). Après l'étape de lyse, les gamètes sont soumis à une électrophorèse. Si un spermatozoïde est soumis à un champ électrique, l'ADN sans cassure reste dans les têtes spermatiques de par son haut poids moléculaire. Au contraire, si l'ADN a des cassures, il migre et sort petit à petit de la tête spermatique et donne ainsi l'aspect d'une comète (d'où le nom de la technique). Après marquage des spermatozoïdes par un colorant fluorescent, l'intensité de la fluorescence et la longueur de la queue de la comète, proportionnelles aux cassures des brins de l'ADN des gamètes, sont analysées. Si la lyse est alcaline, l'augmentation de la longueur de la queue de la comète ne résulte pas seulement des cassures préexistantes dans l'ADN mais elle est également due à la présence de sites sensibles aux attaques alcalines. Les résultats obtenus par la technique COMET ont été utilisés comme facteur prédictif de la qualité des embryons (Tomsu et al. , 2002). Un taux élevé de cassures de l'ADN a été corrélé à la faible capacité d'atteindre le stade blastocyste (Nasr-Esfahani et al. , 2005), à la diminution des divisions embryonnaires après fécondation (Morris et al. , 2002) et à de faibles taux de grossesse (Lewis et al. , 2004). En revanche, aucune corrélation n'a été mise en avant entre les résultats obtenus par COMET et les taux de fécondation (Lewis et al., 2004; Nasr-Esfahani et al. , 2005).

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

### ***Sperm Chromatin Dispersion test (SCD):***

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

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

***In situ Nick Translation assay (NT):***

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

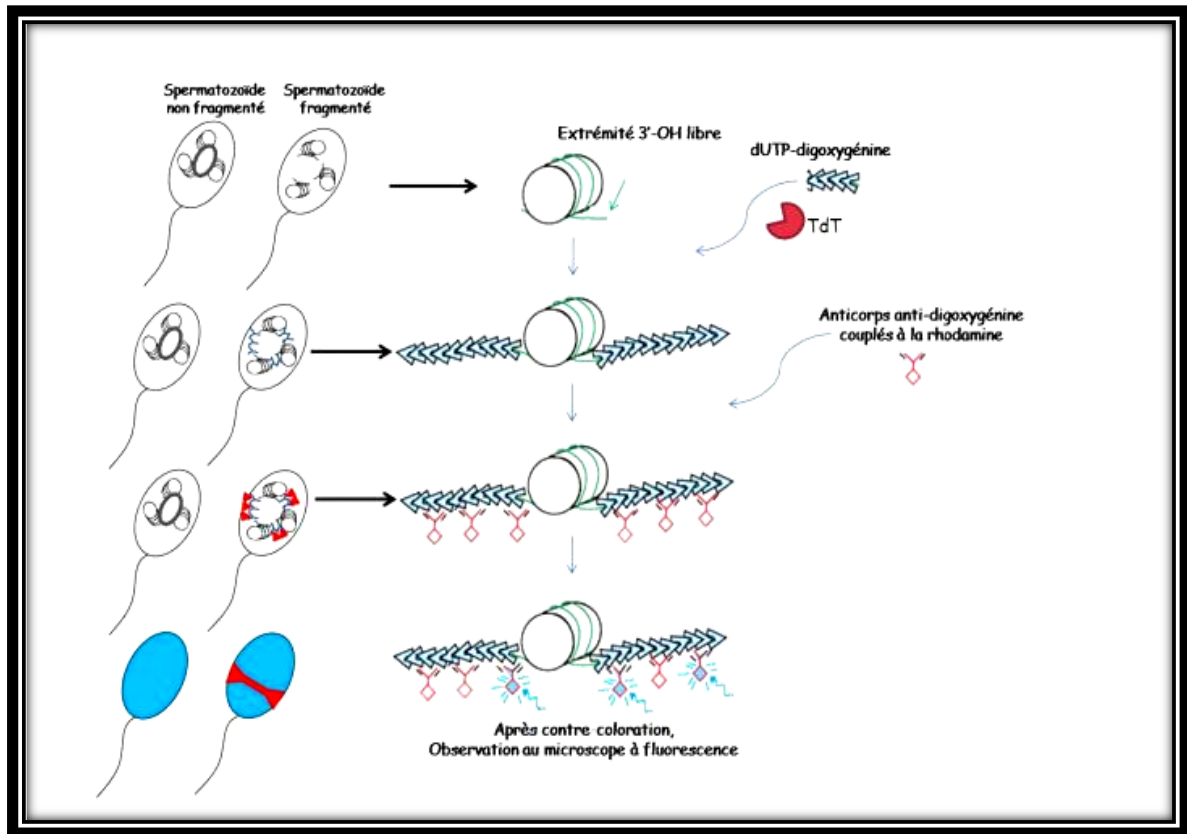
***Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick- End Labeling assay (TUNEL):***

Le TUNEL a été développé en 1992 pour étudier l'apoptose des cellules somatiques (Gavrieli et al., 1992). La technique a ensuite été adaptée pour les spermatozoïdes (Sailer et al., 1995). Dans les cellules somatiques, il se produit des cassures de l'ADN par action d'endonucléases lors du processus apoptotique. Les cassures induisent des libérations d'extrémités 3'-OH (Gorczyca et al., 1993). Cette technique utilise l'activité exonucléasique de la terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) qui catalyse l'incorporation de nucléotides triphosphates aux extrémités 3'-OH libres des doubles ou simples brins. Les nucléotides incorporés forment un oligomère composé de nucléotides couplés à la digoxigénine et de nucléotides non marqués. Des anticorps antidigoxigénine couplés à un fluorochrome sont ajoutés. Le ratio nucléotides marqués/non marqués est optimisé afin d'assurer une bonne liaison des anticorps anti-digoxigénine (figure 25).

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

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

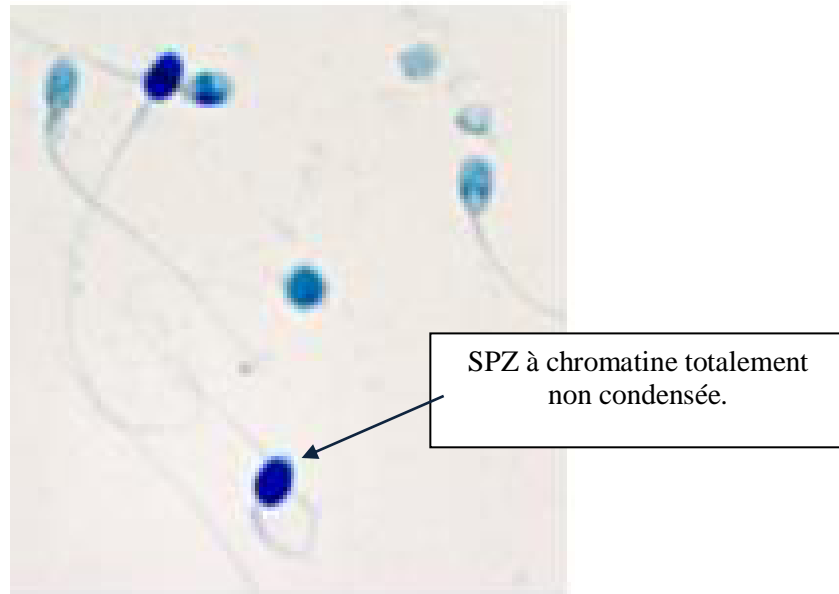
D'autre part, il a plusieurs fois été suggéré que la technique TUNEL mettait en évidence une activité apoptotique. Une équipe (Sakkas et al., 2002) a étudié le taux de gamètes fragmentés par la technique TUNEL ainsi que la présence de marqueurs apoptotiques tels que Fas, p53 et Bcl-x chez des patients avec des paramètres spermatiques normaux et anormaux. Les auteurs trouvent une proportion de gamètes avec un ADN fragmenté et une expression plus forte de Fas et p53 chez les patients avec une faible numération spermatique et une tératozoospermie. Cependant, la fragmentation n'est pas toujours corrélée à l'expression des marqueurs apoptotiques. Les auteurs suggèrent la présence d'au moins deux populations de spermatozoïdes différentes : une population qui aurait échappé à la mort cellulaire initiée dans les testicules et une seconde population ayant eu des perturbations lors du remodelage nucléaire (remplacement des histones par les protamines) au cours de la spermiogenèse. Mais l'hypothèse selon laquelle la technique TUNEL met en évidence une activité apoptotique reste controversée. Elle permet certainement de détecter des fragmentations issues d'autres voies telle la voie nécrotique (Muratori et al., 2000; Aitken et al., 2009).



**Figure 25 :** Principes de la technique TUNEL sur les spermatozoïdes

#### *Test au bleu d'aniline:*

Cette méthode a été décrite par Terquem et Dadoune en 1983 (Terquem et Dadoune, 1983). La coloration au bleu d'aniline permet de définir le degré de condensation de la chromatine du noyau spermatique et par conséquent le niveau de maturité nucléaire spermatique. En effet, l'ADN spermatique contient des histones qui sont progressivement remplacées par des protamines au cours de la maturation spermatique, permettant ainsi la forte compaction de l'ADN. Ce processus est incomplet, 10 à 15% des histones se maintiennent finalement. Les noyaux riches en histones des spermatozoïdes immatures sont riches en lysine et vont donc réagir positivement à la coloration, prenant une couleur bleue, tandis que les noyaux plus riches en protamines des spermatozoïdes matures, qui contiennent beaucoup de cystéine, vont rester incolores ou très pâles. (Figure 26).



**Figure 26:** 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).

#### **II.4. Traitement de l'infertilité masculine (Méthodes AMP):**

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

##### **II.4.1 Inséminations artificielles :**

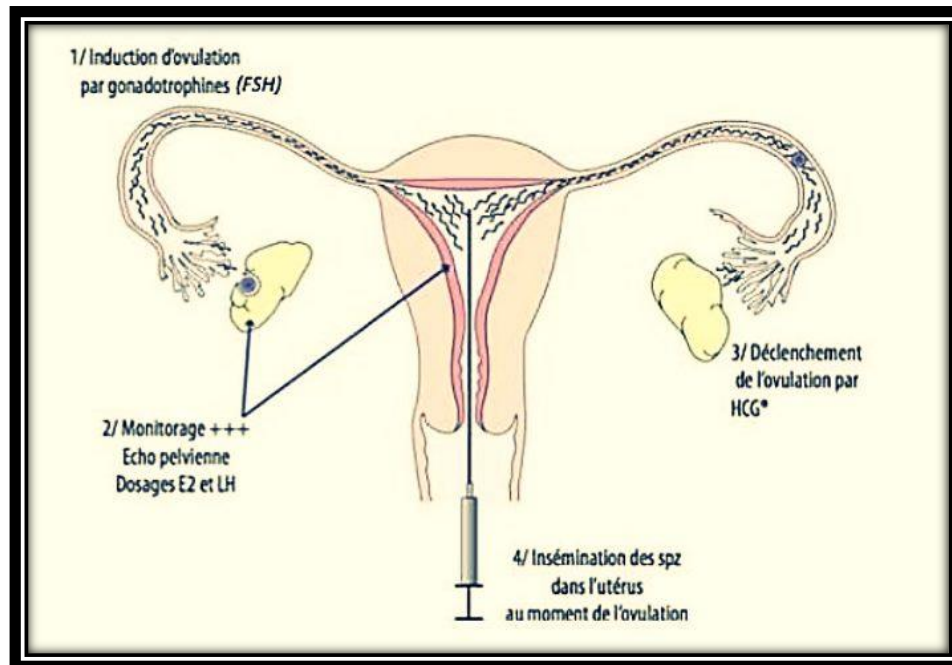
###### **Inséminations intra utérines :**

L'insémination intra-utérine (IIU) est une technique fréquemment proposée dans la prise en charge des couples infertiles, quand les paramètres spermatiques et tubaires le permettent. L'IIU constitue le premier échelon dans les techniques d'AMP. Elle consiste à déposer des spermatozoïdes mobiles à l'intérieur des voies génitales féminines, et donc faciliter la rencontre des gamètes masculins avec les gamètes féminins (B.SELE La micro-injection, 1995). Elle est très fréquemment associée à une stimulation de l'ovulation avec pour objectif une synchronisation précise de l'insémination intra-utérine et de l'ovulation, et une augmentation du recrutement folliculaire afin d'optimiser les chances de conception (figure 27).

Son efficacité a été prouvée dans différentes indications : stérilité cervicale par absence de glaire ou notion de glaire hostile, infertilité masculine en cas d'altération modérée des paramètres spermatiques et en cas d'infertilité inexplicée. L'IUI peut également être proposée en cas d'éjaculation rétrograde.

Les spermatozoïdes sont parfois recueillis dans les urines, d'un éjaculat naturel ou provoqué. L'inséminât doit contenir environ 500 000 à un million de spermatozoïdes mobiles après sélection, concentrés dans un volume de 0,2 à 0,3ml. L'insémination intra-utérine en cycle spontané n'a démontré son efficacité dans deux indications mécaniques : la stérilité cervicale isolée ou l'impossibilité d'avoir des rapports sexuels complets. Dans tous les autres cas, elle ne donne de bons résultats qu'associée à une stimulation de l'ovulation. La stimulation doit être monitoire c'est-à-dire évaluée par échographie pelvienne et/ou dosages hormonaux plasmatiques pour réduire le risque de grossesse multiple (Rossin et al., 2009).

La préparation est introduite au niveau du corps utérin à l'aide d'un fin cathéter qui franchit le col utérin. La stimulation permet aussi de déterminer exactement le moment de l'ovulation et donc de programmer le moment de l'insémination qui est un des facteurs essentiels du succès : 36 heures après l'injection d'HCG provoquant l'ovulation, avec injection lente du sperme préparé suivie d'une dizaine de minutes de repos.



**Figure 27 :** Les différentes étapes schématisées d'une insémination intra-utérine.

**Inséminations intra-cervicales :**

Elle consiste à déposer des spermatozoïdes au niveau du col utérin. Les indications sont essentiellement d'origine masculine notamment en cas de troubles de l'éjaculation et / ou impossibilité de rapports sexuels. Cette prise en charge s'adresse aux couples infertiles dont la femme est âgée de moins de 35 ans, présentant une bonne réserve ovarienne, une glaire correcte, des trompes perméables et des cycles ovulatoires. Elle est le plus souvent réalisée en cycle spontané avec soutien de la phase lutéale.

**II.4.2 La fécondation in vitro (FIV) (Figure 28) :**

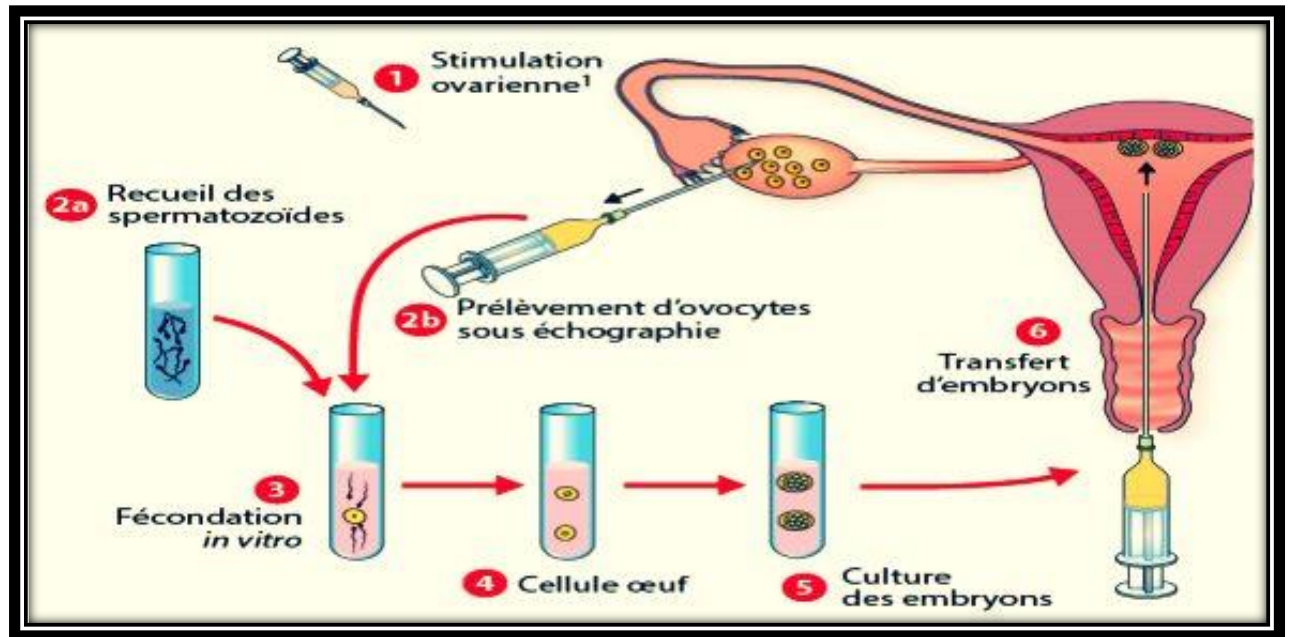
Depuis la naissance de Louise Brown le 25 juillet 1978 après fécondation in vitro (Steptoe & Edwards, 1978), la pratique de cette technique s'est répandue partout dans le monde.

Elle consiste à reproduire au laboratoire ce qui se passe naturellement dans les trompes de Fallope :

la fécondation et les premières étapes du développement embryonnaire. Elle se déroule selon la chronologie suivante :

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

La stimulation des ovaires va permettre le développement de plusieurs follicules. La ponction de ces derniers, faite juste avant l'ovulation, permet le recueil de plusieurs ovocytes. Ces ovocytes sont ensuite mis avec les spermatozoïdes du conjoint, dans un incubateur à CO<sub>2</sub> à 37°C. Au bout de 48 heures, des embryons à 2 ou 4 cellules sont obtenus. Un ou deux seront alors replacés dans l'utérus (transfert) où ils s'implanter et effectuer leur nidation. Cette technique permet de court-circuiter les trompes (stérilités tubaires) et de rapprocher les spermatozoïdes des ovocytes (infertilités masculines peu importantes).



**Figure 28 : Fécondation In Vitro**

#### II.4.3 Intra cytoplasmic sperm injection ou injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI) :

Depuis 1990 se sont développées des techniques plus offensives dites de « fécondation assistée », visant à court-circuiter la zone pellucide et la membrane plasmique, les dernières barrières séparant le gamète mâle du cytoplasme ovocytaire. L'une d'entre elles, appelée familièrement ICSI, a révolutionné le traitement de la stérilité de l'homme. Elle permet de dépasser les échecs de FIV conventionnelle, de proposer des solutions en cas de déficiences spermatiques trop sévères pour réaliser une FIV ou en cas d'azoospermie excrétoire, voire sécrétoire grâce à l'utilisation de spermatozoïdes épидидymaires ou testiculaires. Les ovocytes sont dépouillés des cellules du cumulus et de la corona radiata qui les entourent par action chimique (brève exposition à la hyaluronidase) et mécanique (pipetage répété). Le sperme est préparé classiquement par lavage et centrifugation et les spermatozoïdes mobiles sont ralentis dans leur vitesse de progression par une solution de polyvinylpyrrolidone, ce qui facilite leur capture et leur immobilisation mécanique. Chaque spermatozoïde est alors injecté dans le cytoplasme ovocytaire à l'aide d'une micropipette d'injection. Une fois le spermatozoïde en place, il déclenche l'activation ovocytaire qui s'accompagne, après un temps de latence variable, d'une élévation de calcium intra-ovocytaire, prolongé et oscillatoire comme au cours de la fécondation normale physiologique (Parrington et al., 1996) Et dès lors, la chronologie des événements de la fécondation après ICSI suit le même profil qu'après FIV

---

conventionnelle. Les embryons seront transférés in utero au deuxième ou troisième jour après l'insémination, au stade de deux à huit cellules (figure 29).

Le rapport de l'HAS met en évidence un recours de plus en plus important à cette technique puisqu'elle représente 22,3 % du total des FIV en 1995, 48,5 % en 2000, 53% en 2002 et 57% en 2004. Elle représente environ 25 % des tentatives d'AMP en intraconjugales et 61 % des tentatives FIV/ICSI d'après le rapport de l'Agence de Biomédecine de 2007.

#### II.4.3.1 ICSI et infertilité masculine :

L'ICSI est considérée comme une solution majeure à une infertilité chez l'homme. Les couples candidats à l'ICSI peuvent être classés en plusieurs catégories selon les anomalies spermatiques de l'homme :

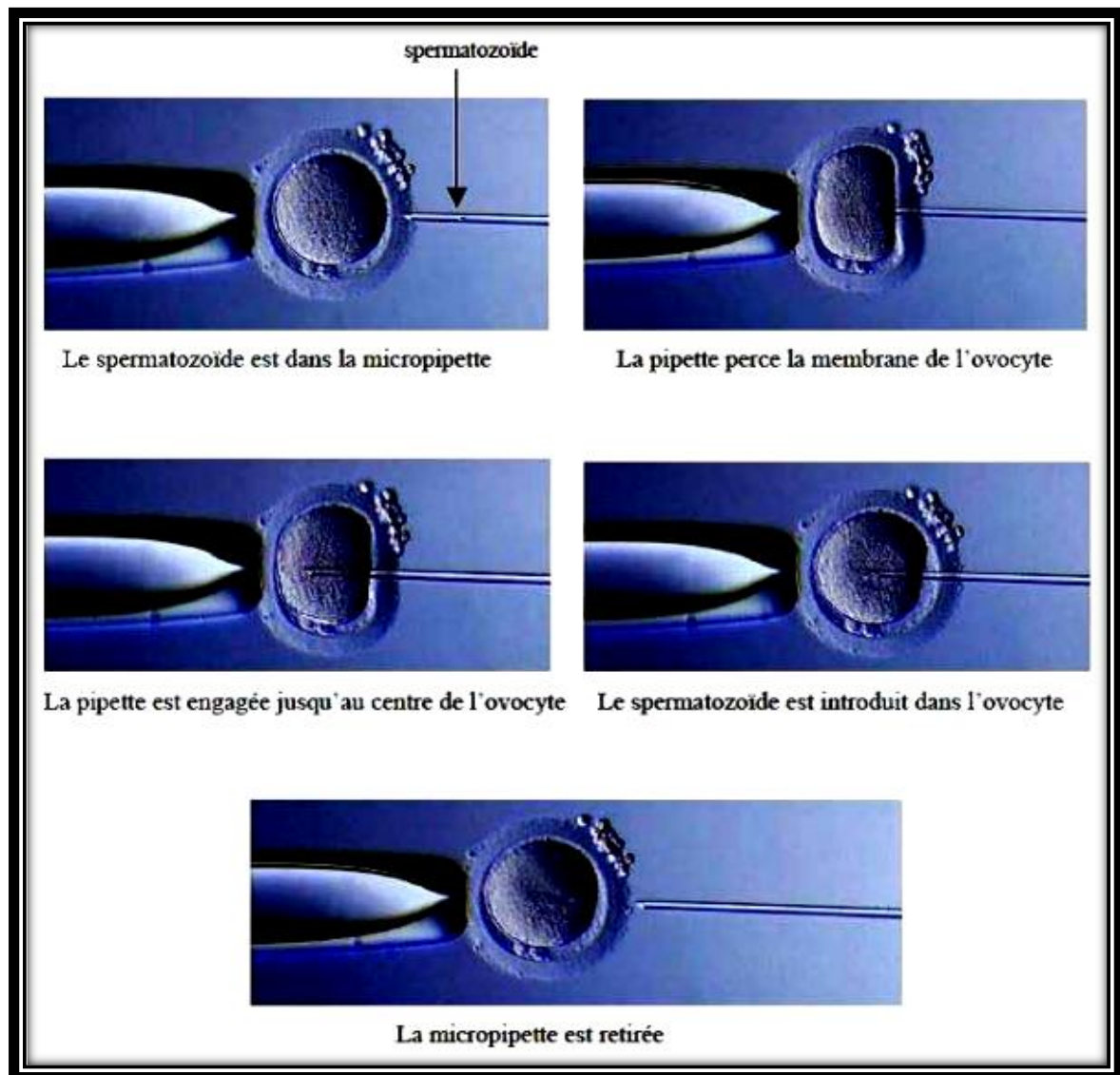
• **Oligo-asthéo-téatospermie** : Lorsqu'après lavage et préparation d'un éjaculat, on ne recueille que 500 000 spermatozoïdes mobiles, les chances d'obtenir une grossesse après insémination intra utérine se réduisent considérablement. Il en va de même si l'on ne dispose que de 100 000 spermatozoïdes mobiles et normaux pour réaliser une FIV conventionnelle. À l'inverse, il suffit d'une dizaine de spermatozoïdes mobiles pour pouvoir réaliser la micro-injection. Aucun des paramètres du spermogramme, ni le nombre, ni la mobilité, ni la morphologie ne sont limitant. Les taux de fécondation et de grossesses sont identiques, que le sperme soit normal ou altéré au niveau d'un, deux ou trois de ses paramètres classiques (Nagy et al., 1995).

Quelle que soit l'étiologie de l'OATS, l'efficacité de la micro-injection est la même : OATS secondaire à une ectopie testiculaire, à une infection, à un facteur toxique exogène, accompagnant une varicocèle, génétique ou idiopathique.

• **Azoospermies excrétoires** : Avec l'avènement de la FIV et le prélèvement de spermatozoïdes épидидymaires, nouvel espoir et nouvelle déception puisque les taux de fécondation des ovocytes en FIV classique, à partir de spermatozoïdes épидидymaires, ne dépassent pas 10 % et les taux de grossesse par cycle 5 %. Grâce à la microinjection, les taux de fécondations sont aussi bons qu'avec des spermatozoïdes éjaculés et l'on peut avec succès utiliser le sperme épидидymaire congelé, ce qui permet de limiter le nombre des interventions (Silber et al., 1994).

• **Autres indications de l'ICSI** : L'ICSI est aussi proposée en cas d'infertilité inexplicée, d'échecs de FIV répétés ou devant un âge maternel avancé (Van der Westerlaken et coll 2005). Si le succès de l'ICSI en thérapeutique de l'infertilité est indéniable, son innocuité est néanmoins mise en cause en raison de son caractère invasif et de l'apparente augmentation des

anomalies chromosomiques, surtout sexuelles, observée chez les enfants conçus par cette technique. L'étude des conséquences sur le patrimoine génétique de ces enfants doit notamment être poursuivie à long terme, car si l'ICSI ne crée pas l'anomalie génétique, elle permet néanmoins sa transmission. Ainsi, tout couple candidat à une ICSI pour une infertilité d'origine masculine devrait bénéficier d'un conseil g potentiels encourus par sa descendance (Johnson, 1998).



**Figure 29 :** Les différentes étapes d'une injection intra cytoplasmique de spermatozoïdes (Aboulghar et al., 2004)

---

# **Partie expérimentale**

---

---

---

## Chapitre III : Patients et Méthodes

---

---

## **I. Patients et méthodes**

### **I.1 les patients et les témoins :**

#### **I.1.1 Les patients :**

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, d'hypofertilité du couple ou de fausses couches spontanées à répétition chez la conjointe. Au total 21 patients ont été recrutés.

#### **I.1.2 Le groupe témoin :**

Notre groupe témoin provient de couples venus consulter au laboratoire d'analyses médicale Dr. BENZEGUIR de la wilaya de S.B.A. pour des problèmes d'infertilité et dont l'origine s'est révélée être strictement féminine.

Un spermogramme et un spermocytogramme ont été réalisés.

### **I.2 Méthodes :**

#### **I.2.1 Spermogramme:**

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

#### **a) Condition de recueil du sperme**

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

- une abstinence sexuelle de 03 jours pour éviter le recueil d'un volume diminué d'éjaculat due a un délai d'abstinence plus court ou un volume contenant un dédoublement de

---

numération avec un pourcentage élevé de spermatozoïdes morts due à une abstinence trop longue.

- le sujet doit être informé sur l'importance de la totalité de l'éjaculat, car une fraction n'est pas représentative de l'ensemble de l'éjaculat.

- le recueil se fait sur place, dans une chambre au laboratoire, destinée au prélèvement afin de limiter les risques de perte d'une partie de l'éjaculat.

- le recueil s'effectue par masturbation dans un réceptacle, à usage unique, stérile avec couvercle.

### **b) Examen macroscopique :**

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

#### **□ Liquéfaction**

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

#### **□ Couleur**

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

#### **□ Odeur**

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

#### **□ viscosité**

Elle est évaluée en plongeant une pipette pasteur dans le sperme, en notant la façon dont le sperme s'écoule. Un sperme d'une viscosité normale, s'écoule sous forme de gouttes

---

bien séparées alors qu'un sperme de forte viscosité forme des filaments de plus de 2 cm entre chaque goutte.

#### □ Volume

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

#### □ pH

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

#### b) Analyse microscopique

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

#### □ Mobilité et qualité du mouvement

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

- Les spermatozoïdes traversant le champ microscopique suivant un trajet régulier, rapide et progressif sont considérés comme forme à mobilité normale.
- Les spermatozoïdes ondulant sur place ou traversant lentement le champ ou présentant un trajet irrégulier sont considérés comme formes à mobilité diminuée.
- Si aucun mouvement n'est observé, les spermatozoïdes sont considérés comme formes immobiles.

Quatre à six champs sont parcourus pour classer 100 spermatozoïdes consécutifs et calculer leur pourcentage respectif dans chacune des formes. Selon les normes plus de 50% de

---

spermatozoïdes doivent présenter une progression rapide rectiligne. Au-dessous de cette valeur on parlera d'une asthénospermie.

#### □ **Appréciation de l'agglutination**

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

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

#### □ **Numération des spermatozoïdes**

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

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

C : concentration millions /ml

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

Di: dilution = 10 V : volume =10

1000 : conversion de cm<sup>3</sup> en ml.

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

Polyzoospermie : >200 millions /ml

Normospermie : 20 à 200 millions /ml.

---

Oligozoospermie modéré : de 5 à 20 millions /ml.

Oligozoospermie sévère : <5 millions /ml.

Azoospermie : absence de spermatozoïdes

#### □ Concentration des cellules rondes

La concentration des cellules rondes est mesurée à l'état frais à l'aide d'un hémodécomètre cellule de Thoma. La concentration en cellules rondes d'un éjaculat normal n'excède pas  $10^6$  cellules/ml (inférieure à 5 % de la concentration totale des spermatozoïdes).

#### □ Test de vitalité

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

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

### I.2.2 Spermocytogramme

Le spermocytogramme est une analyse morphologique des spermatozoïdes. La morphologie de 100 spermatozoïdes est appréciée (objectif à immersion x100) après coloration d'un frottis par la méthode de May Grünwald-Giemsa (MGG). La technique de coloration au MGG est réalisée en 2 mL de May Grünwald sur le frottis de sperme. Après 4 min, 2 mL d'eau (pH 7,2) sont ajoutés. Le colorant dilué agit 1 min est éliminé. Du Giemsa (dilution au  $1/10^{\text{ème}}$ ) est déposé de façon à recouvrir la lame pendant 20 min. la lame est

---

rincée sous un filet d'eau courante puis séchée. Le montage est réalisé en déposant 1 goutte d'Entellan® (Merck, Darmstadt, Allemagne) et une lamelle. Les atypiques sont détaillées selon la classification de David (David, 1975) qui recense :

**- des spermatozoïdes morphologiquement normaux :**

Un spermatozoïde normal présente une tête ovale (vue de face) et légèrement allongée (vue de profil), sa longueur est de 4-5  $\mu\text{m}$  et sa largeur de 2.5 - 3.5  $\mu\text{m}$  avec un acrosome bien délimité. La pièce intermédiaire doit avoir une largeur qui ne dépasse pas la moitié de la largeur de la tête, et doit être implantée dans l'axe longitudinal de la tête et ne peut présenter des angulations aiguës.

- les polymalformations des spermatozoïdes qui comptent :

*Anomalies de la tête :*

- Allongée : longueur  $>6\mu\text{m}$  le rapport longueur/largeur  $>2$   $\mu\text{m}$ , peuvent être simple à base amincie, en battant de cloche, affilées.
- Amincie : largeur nulle et longueur diminuée.
- Microcéphale: tête soit ronde, irrégulière avec anomalies fréquentes de l'acrosome
- Macrocéphale : tête volumineuse.
- Irrégulière : déformation plus ou moins importante de l'ensemble de la tête avec irrégularité de l'acrosome.
- Dupliquée : bicéphale ou binuclées.
- En lyse : hétérogénéité de coloration.

*Anomalies de la pièce intermédiaire :*

- Reste cytoplasmique : sa surface doit être supérieure au moins la moitié de la tête.
- Angulée : l'axe de la pièce intermédiaire et l'axe de la tête forment un angle net ou encore le flagelle n'est pas implanté dans l'axe de la tête.

---

*Anomalies du flagelle:*

- Absent.
- Court : le flagelle est significativement écourté (<5 fois la longueur de la tête) avec généralement un épaississement et un contour plus ou moins régulier.
- Enroulé : le flagelle est enroulé autour de la tête ou en dehors de la tête.
- Double : il y a plus d'un flagelle par spermatozoïde, la pièce intermédiaire étant commune ou multiple.

**I.2.3 Coloration au bleu d'aniline ou bleu de méthyl :**

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)

#### 1.2.4 Etude statistique :

Une analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SPSS 19.0. 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  $p < 0,05$

---

---

## Chapitre IV : Résultats et discussion

---

---

## II. Résultats :

### II.1 Spermogramme et Spermocytogramme :

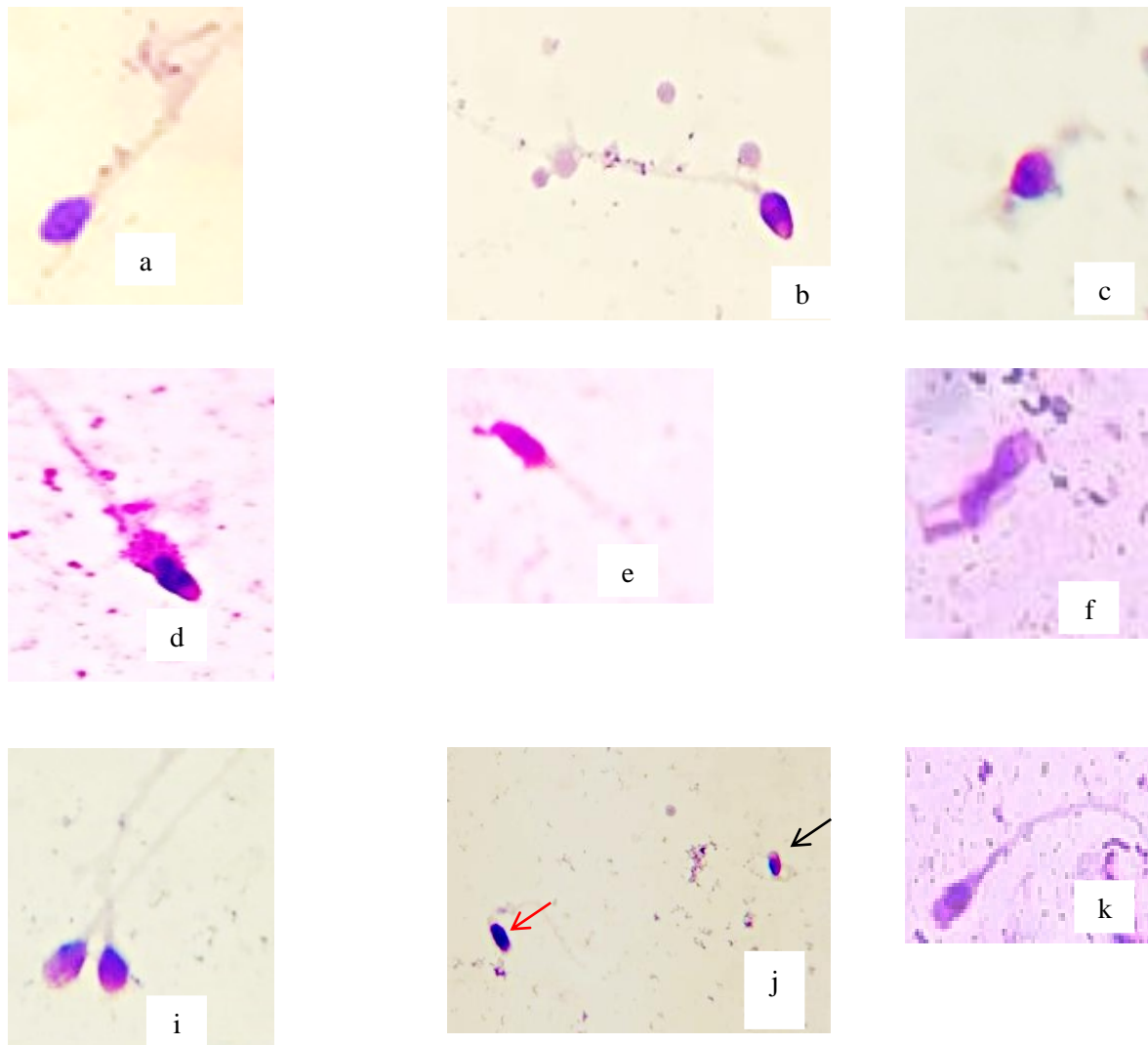
Le spermogramme et le spermocytogramme ont été réalisés sur le prélèvement ayant servi à la coloration de bleu d'aniline (Tableau 3, Figure 30).

Une moyenne de la numération spermatique de  $74,67 \pm 12,49$  millions/ ml, et une moyenne à mobilité progressive  $20,33 \pm 2,72$  % et à morphologie normale  $36 \pm 5,39$  % a été observée dans le groupe de patients (Tableau 3).

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

Patient	Age (Ans)	Spermogramme			Morphologie Normale (%)	Conclusion Spermogramme (normes OMS 2010)
		Numération (millions/mL)	Mobilité (%)	Vitalité (%)		
P1	37	12.43	29.89	58	4	OAT
P2	41	43.29	45.41	78	90	P.N
P3	47	25.76	35.37	58	4	T
P4	36	107.44	31	70	80	A
P5	38	10.51	50.18	85	0	AT sévère
P6	46	151.06	42.74	90	70	PN
P7	33	58.67	27.8	60	80	A
P8	38	132.15	50.47	90	60	PN
P9	34	46	55.06	90	3	T
P10	41	124.94	40.7	90	80	PN
P11	50	34.84	33.6	65	40	PN
P12	43	146	45.2	80	42	PN
P13	52	6.15	30	58	40	OA
P14	43	154.1	50.28	90	50	PN
P15	44	23.9	50.04	80	22	PN
P16	30	32	26.78	60	10	A
P17	35	1.29	0	30	3	OAT
P18	35	12.43	18.33	30	2	OAT
P19	42	9.79	55.74	70	17	O
P20	38	122.73	55.51	90	33	PN
P21	42	10.85	46.11	60	26	O
Moyenne	40,23±5,67	74,67±62,17	20,33±17,62	70,57±18,49	36±30,61	/

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



**Figure 30 : Anomalies morphologiques des spermatozoïdes des patients.**

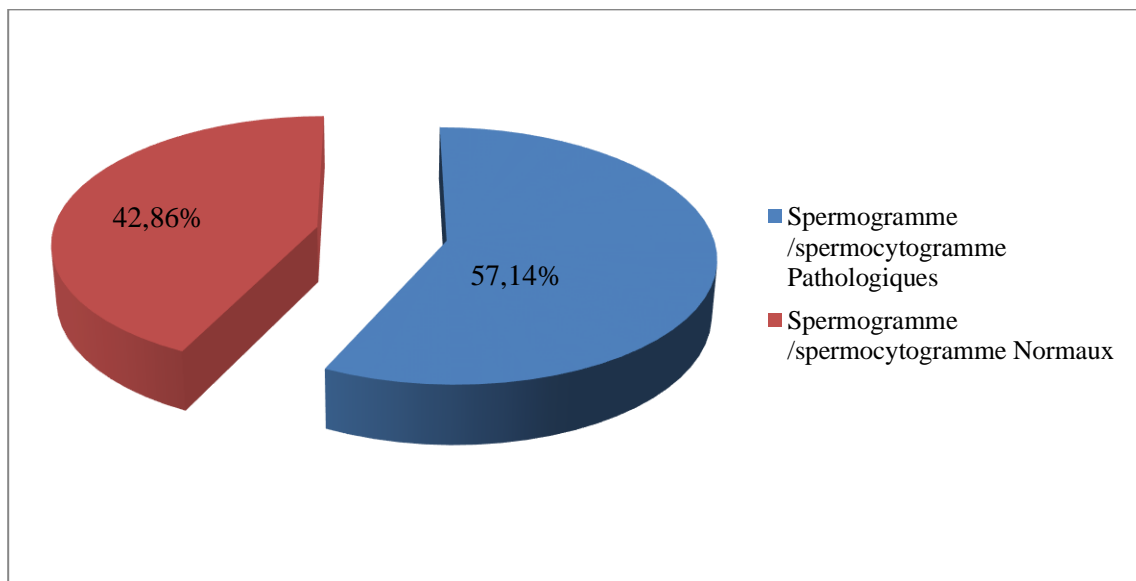
**a** : Absence d'acrosome ; **b** : Tête amincie et une ; **c** : tête macrocéphale ; **d** : tête allongée + reste cytoplasmique ; **e** : anomalie de la région post-acrosomique ; **f** : macrocéphale +reste cytoplasmique+flagelle enroulé ; **i** : acrosome anormale ; **j** : Flagelle court enroulé (flèche noire), Flagelle irrégulier (flèche rouge) ; **K** : anomalie de la région acrosomique (texture hétérogène).

D'après les résultats du spermogramme et spermocytogramme nous avons réparti les patients en fonction de la normalité ou la pathogénicité (tableau 4, Figure 31).

Nous avons réparti aussi les patients selon la fréquence des cas pathologiques (Tableau 4, Figure 31).

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

Résultat	Effectifs	Pourcentage (%)
<b>Spermogramme /spermocytogramme Pathologiques</b>	12	57,14
<b>Spermogramme /spermocytogramme Normaux</b>	9	42,86
<b>Total</b>	21	100

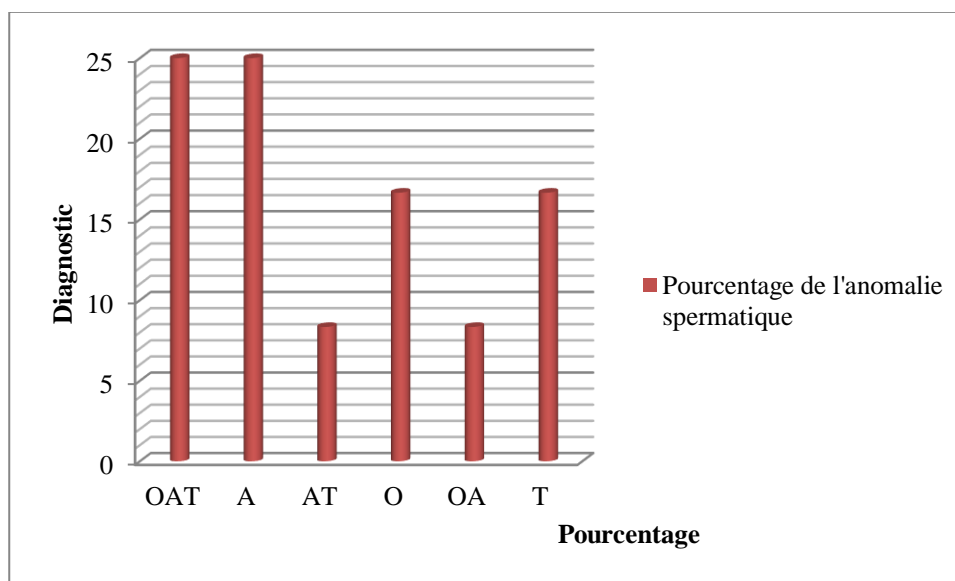


**Figure 31 :** Répartition des patients en fonction De la normalité ou la pathogénicité des résultats du spermogramme et du spermocytogramme

Nous avons répartie 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 32.

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

Diagnostic	Fréquence	Pourcentage (%)
OAT	3	25
A	3	25
AT	1	8.34
O	2	16.66
OA	1	8.34
T	2	16.66
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>100</b>

**Figure 32 :** Distribution de la fréquence des anomalies spermatiques

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

Nous avons analysé plus de 2000 spermatozoïdes par la technique de coloration au bleu d'aniline pour tous les patients (Tableau 6, Figure 34).

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 58 %. Le taux de spermatozoïdes à chromatine mal condensé le plus élevé est observé chez le P 13 (85%) et le taux plus faible est observé chez le P 5 (13%) (Figure 33).

Tableau 6: Taux de la condensation de la chromatine des Spermatozoïdes des patients

Patients	% des Spermatozoïdes à chromatine condensée	% des Spermatozoïdes à chromatine mal condensée
P1	47	53
P2	50	50
P3	29	71
P4	38	62
P5	87	13
P6	38	62
P7	59	41
P8	30	70
P9	35	65
P10	70	30
P11	50	50
P12	37,5	62.5
P13	15	85
P14	24	76
P15	46	54
P16	31	69
P17	21	79
P18	22	78
P19	71	29
P20	42	58
P21	32	68
moyenne	42	58

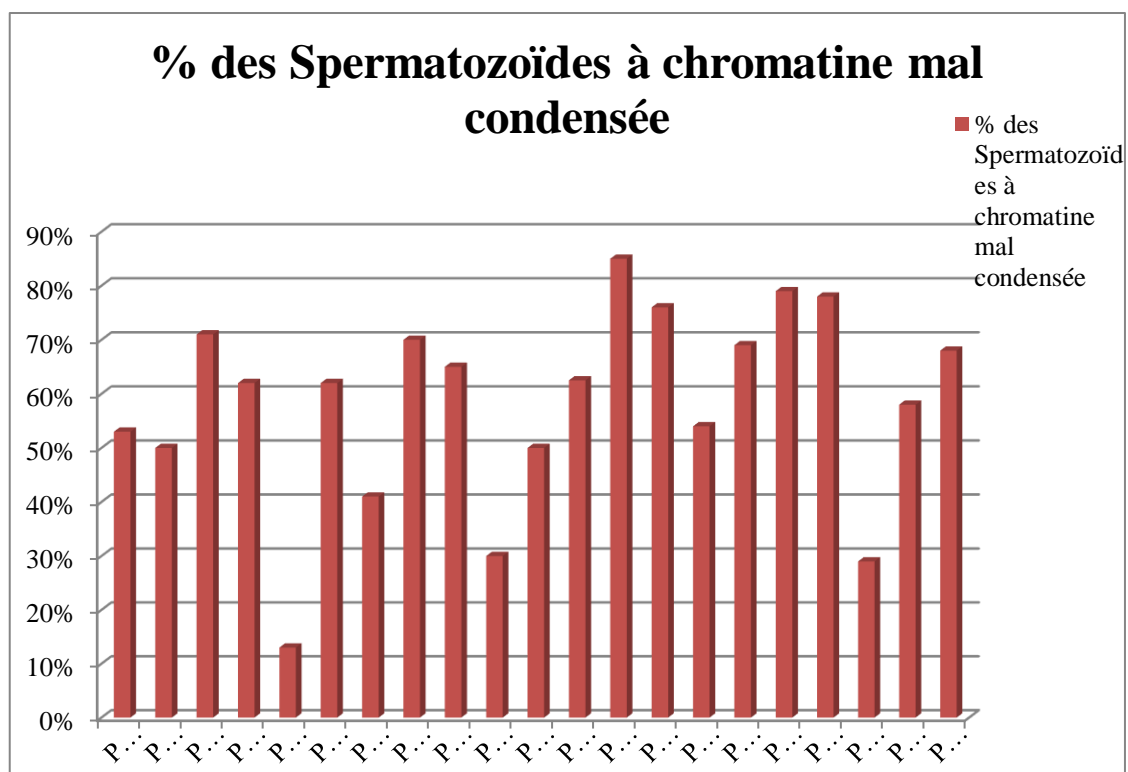


Figure 33 : distribution de la fréquence des taux de la condensation de la chromatine des Spermatozoïdes

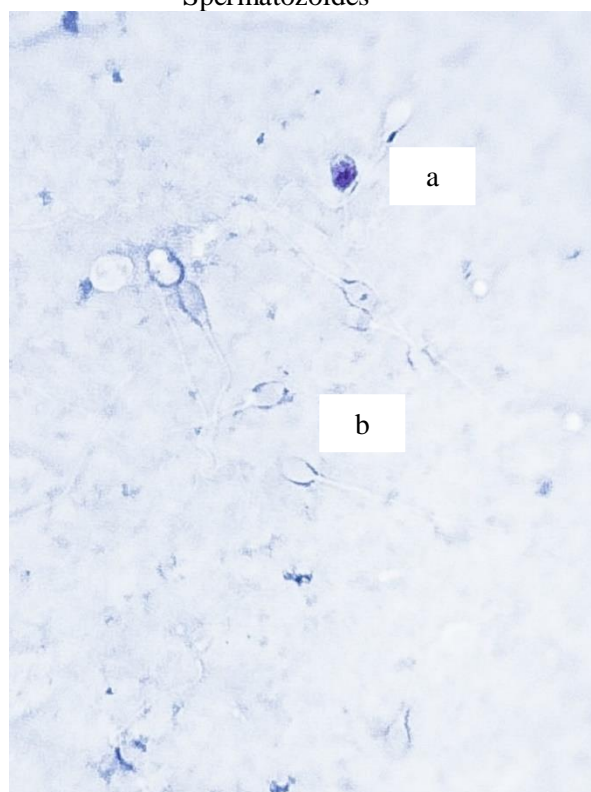


Figure 34 : Observation microscopique des spermatozoïdes colorés au bleu d'aniline GX1000

(a: spermatozoïde immature (bleu foncé), b : spermatozoïde mature (bleu claire))  
 a: spermatozoïde à chromatine normalement condensée, b : spermatozoïde à chromatine totalement non condensée.

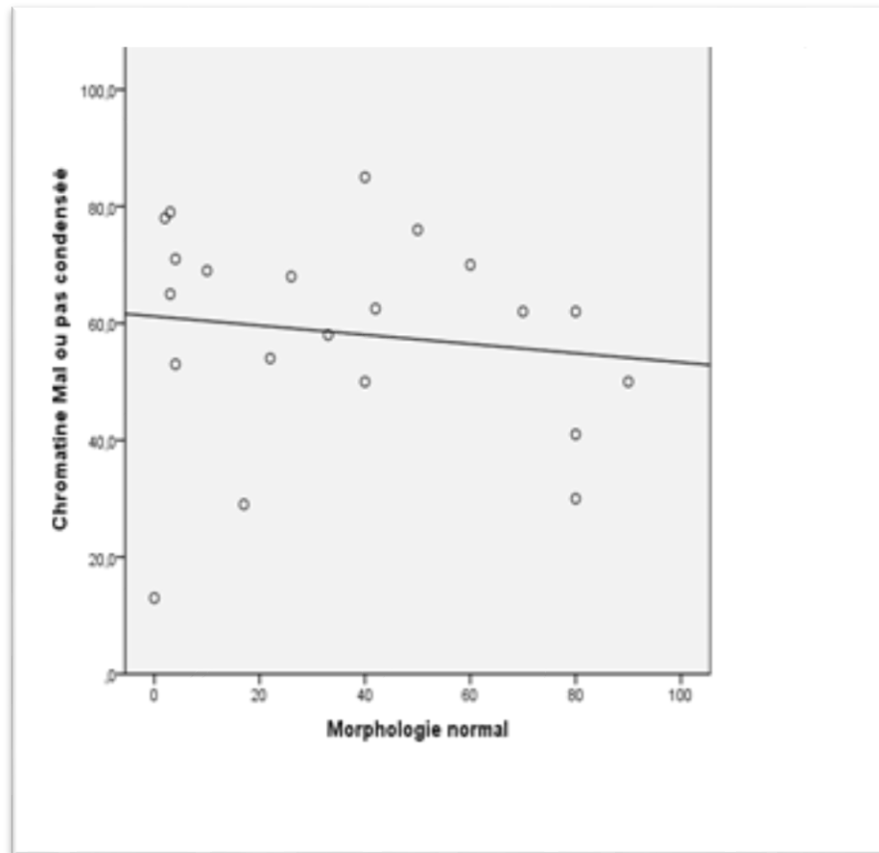
D'après les résultats du taux de la condensation de la chromatine des Spermatozoïdes chez les patients, nous avons divisé nos patients en deux groupes : G1 (n=18) : les patients à Spermatozoïdes à chromatine mal ou pas condensée (85,71%), et G2 (n=3) : les patients à Spermatozoïdes à chromatine condensée (14,29%).

Sur le tableau 7 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 (Figure 35).

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

<b>Données du spermogramme et spermocytogramme (moyennes±ET)</b>	<b>G1 (n=18)</b>	<b>G2 (n=3)</b>	<b>Valeur <math>p</math></b>
<b>Mobilité progressive (%)</b>	20,33±17,62	48,87±7,60	0.247
<b>Concentration des spermatozoïdes (millions/mL)</b>	74,67±62,17	48,41±66,28	0.277
<b>Vitalité (%)</b>	69,53±19,08	81,67±10,41	0.579
<b>Morphologie (%)</b>	37,40±29,83	32,33±42,15	0.251



**Figure 35:** Corrélation entre la condensation de la chromatine spermatique et la morphologie des spermatozoïdes

### Discussion :

L'exploration de l'infertilité masculine reste avant tout basée sur l'analyse classique des paramètres du sperme. 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, que cette coloration serait en relation avec la persistance de nucléoprotéines riches en Lysine (histones et/ou protéines de transition) responsables d'une condensation défectueuse de la chromatine (Terquem et Dadoune, 1983). Les résultats obtenus via cette coloration sont corrélés 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 corrélation 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 corrélation n'est aujourd'hui clairement établie entre la condensation de la chromatine et la morphologie des spermatozoïdes (Hammadeh et al., 2001 ; Sellami et al., 2013 ; Poumasumi et al., 2019).

Les résultats obtenus dans notre étude montrent un taux moyens de chromatine spermatique mal condensée chez les patients de  $58 \pm \%$  qui est un taux significativement plus élevé chez le groupe contrôle ( $<30\%$ ). Ainsi, nous avons mis en évidence un taux de gamètes à morphologie normale de  $36 \pm 30,61\%$ . Ces taux observés pourraient être une autre voie aidant à expliquer leurs troubles de la reproduction.

L'âge des patients varie entre 33-52 ans, avec une moyenne de  $40,23 \pm 5,67$  ans. Nous avons noté un taux de  $57,14 \%$  de patients avec des spermogrammes et/ou des spermocytogrammes pathologiques.

Il a été rapporté que le vieillissement influence 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 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 patient fertile et infertile 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 corrélation 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 corrélation 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.

Dans les cas idiopathiques, les paramètres du sperme ont été corrélés aux taux diminués 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 élevés de spermatozoïdes à chromatine immature (Talebi et al., 2012).

La corrélation 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). 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

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. Ainsi, nous avons évalué la relation entre cette condensation et la concentration, la mobilité progressive et la morphologie des spermatozoïdes.

Les résultats obtenus ne montrent aucune association existante entre la maturité de la chromatine spermatique évaluée par la coloration au bleu d'aniline et le nombre des spermatozoïdes, leur mobilité progressive et leur morphologie.

D'après cette étude, la condensation et la morphologie de la chromatine du sperme devraient être étudiées séparément pour une meilleure évaluation de la fertilité masculine, car aucune corrélation n'a été trouvée entre ces deux paramètres. En outre, l'association entre la condensation de la chromatine et la morphologie du sperme humain reste discutable et des investigations plus appropriées et approfondies sont nécessaires pour répondre adéquatement à cette question.

L'intégrité de la chromatine spermatique est essentielle pour une fécondation réussie, le développement embryonnaire et une grossesse normale. Une diminution de son taux peut agir sur le taux de fécondation et la qualité de l'embryon. 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 bibliographiques

1. Références b A.Agarwal and T. M. Said, "Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility," *Human Reproduction Update*, vol. 9, no. 4, pp. 331–345, 2003.
  2. A. BOUCHET, J. CUIILLERT: Anatomie, volume 4 (abdomen, région rétro-péritonéale, le petit bassin, le périnée), 2ème édition, p2375-2392
  3. Abdomen. Anatomie descriptif du testicule. [Image en ligne] <<http://www.anat-jg.com/PeritoineSous/OGH/VoiesSperm.htm>>. (Consulté le 15 mars 2020).
  4. ABOULGHAR, SEROUR, FAHMY, KAMAL, TAWAB, AMIN. Fertilization and pregnancy rates after ICSI using ejaculate semen and surgically retrieved sperm. 2004
  5. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update*. 2003;9(4):331-45.
  6. Aitken R. J., De Iuliis G. N. and McLachlan R. I. (2003). Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl* 32(1): 46-56.
  7. Al-Fahham AA, Al-Sultani YK, Muhammad-Ali AK. Using Sperm chromatin Staining Techniques as a Predictive Diagnostic Tool for Male Infertility. *Kufa J Nursing Sci*. 2014;4(2):56-64.
  8. Andrabi S. M. (2007). Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. *J Assist Reprod Genet* 24(12): 561-9.
  9. Angelopoulou R, Plastira K, Msaouel P (2007) Spermatozoal sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA. *Reprod Biol Endocrinol* 5:36 15. Terquem A, Dadoune JP (1983) Aniline blue staining of human spermatozoa chromatin. Evaluation of nuclear maturation. In: Andre J (ed) *The sperm cell*. Martinus Nijhoff Publishers London, p 249
  10. Angelopoulou R, Plastira K, Msaouel P (2007) Spermatozoal sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA. *Reprod Biol Endocrinol* 5:36.
  11. Arrighi FE and Hsu TC. Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics*. 1971; 10: 81-86.
  12. Auger, J. and Eustache, F. (2000) Standardization of the Morphological Assessment of Human Spermatozoa According to Modified David's Classification. *Andrologie*, 10, 358-373.
  13. B. SELE La micro-injection de spermatozoïde dans l'ovocyte ou fécondation assistée *Revue française des laboratoires* 1995 N° 278.
-

- 
14. Barlow, P. and Vosa C. G. (1970). "The Y chromosome in human spermatozoa." *Nature* 226(5249): 961-2.
  15. Belendo. La puberté chez les garçons. [Image en ligne] < <https://belendo.be/fr/croissance-et-puberte/la-puberte-chez-les-garcons/>>. (Consulté le 10 juin 2020).
  16. Bernard, M., P. Sanseau, C. Henry, A. Couturier and C. Prigent (1998). "Cloning of STK13, a third human protein kinase related to *Drosophila aurora* and budding yeast Ipl1 that maps on chromosome 19q13.3-ter." *Genomics* 53(3): 406-9.
  17. Bhasin S., Ma K., Sinha I. et al. The genetic basis of male infertility. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 1998, 27:783-805.
  18. Bloom SE and Goodpasture C. An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. *Hum Genet.* 1976; 34: 199-206.
  19. Boe-Hansen G. B., Fedder J., Ersboll A. K. and Christensen P. (2006). The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 21(6): 1576-82.
  20. Braun R. E. (2001). Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Genet* 28(1): 10-2.
  21. C. Foresta, M. Zorzi, M. Rossato, and A. Varotto, "Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men," *International Journal of Andrology*, vol. 15, no. 4, pp. 330–337, 1992.
  22. Caer E., Perrin A., Douet-Guilbert N., Amice V., De Braekeleer M., Morel F. (2008). Differing mechanisms of meiotic segregation in spermatozoa from three carriers of a pericentric inversion of chromosome 8; *Fertil Steril.* ; 89(6):1637-40. Epub 2007 Jul 2.
  23. Caspersson T., Zech L., Johansson C. (1970). Differential banding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res* 60: 315-319.
  24. Caspersson T., Zech L., Johansson C. (1970). Differential banding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res* 60: 315-319.
  25. Chohan K. R., Griffin J. T., Lafromboise M., De Jonge C. J., Carrell D. T. (2006). Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* 27(1): 53-9.
  26. Clermont Y. (1963). The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat*, 112: 35-51.
  27. Collins A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26(3): 249-61.
-

- 
28. Couet M. (1999). Exploration du couple infertile. Dans : Hammamah S., Saliba E., Benhamed
  29. Cram, D. S., E. Osborne and R. I. McLachlan (2006). "Y chromosome microdeletions: implications for assisted conception." *Med J Aust* 185(8): 433-4.
  30. Czyba J-C., Montella A. (1993). Testicules et épидидymes. Biologie de la reproduction humaine. Sauramps médical, Montpellier, pp 49-83.
  31. Dadoune JP., Demoulin A. (1991). Structure et fonctions du testicule. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Ellipses, Paris, pp 221-50.
  32. Dam, A. H., I. Kosciński, J. A. Kremer, C. Moutou, A. S. Jaeger, A. R. Oudakker, H. Tournaye, N. Charlet, C. Lagier-Tourenne, H. van Bokhoven and S. Viville (2007). "Homozygous mutation in SPATA16 is associated with male infertility in human globozoospermia." *Am J Hum Genet* 81(4): 813-20
  33. Darzynkiewicz Z., Traganos F., Sharpless T. and Melamed M. R. (1975). Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry. *Exp Cell Res* 90(2): 411-28.
  34. David G. (1975). Anomalies morphologiques du spermatozoïde humain. Propositions pour un système de classification. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 4(Suppl 1): 7-36.
  35. De Kretser DM, Buzzard JJ, Okuma Y, O'Connor AE, Hayashi T, Lin SY, Morrison JR, Loveland KL, Hedger MP. The role of activin, follistatin and inhibin in testicular physiology. *Mol Cell Endocrinol.* 2004; 225: 57-64.
  36. Dieterich, K., R. Soto Rifo, A. K. Faure, S. Hennebicq, B. Ben Amar, M. Zahi, J. Perrin, D. Martinez, B. Sele, P. S. Jouk, T. Ohlmann, S. Rousseaux, J. Lunardi and P. F. Ray (2007). "Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility." *Nat Genet* 39(5): 661-5.
  37. Dieterich, K., R. Zouari, R. Harbuz, F. Vialard, D. Martinez, H. Bellayou, N. Prisant, A. Zoghmar, M. R. Guichaoua, I. Kosciński, M. Kharouf, M. Noruzinia, S. Nadifi, A. Sefiani, J. Lornage, M. Zahi, S. Viville, B. Sele, P. S. Jouk, M. C. Jacob, D. Escalier, Y. Nikas, S. Hennebicq, J. Lunardi and P. F. Ray (2009). "The Aurora Kinase C c.144delC mutation causes meiosis I arrest in men and is frequent in the North African population." *Hum Mol Genet* 18(7): 1301-9.
  38. Dorigo B., Schalch T., Kulangara A., Duda S., Schroeder R. R and Richmond T. J. (2004).
  39. Dutrillaux B. and Lejeune J. (1971). Une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *CR Acad Sci Paris*, 272 : 2638-2640.
-

- 
40. Dutrillaux B. and Lejeune J. (1973). Nouveau système de marquage chromosomique : les bandes T. *chromosoma*, 41 : 395-402.
  41. Egea G. Caractérisation de 10 marqueurs chromosomiques Surnuméraires (mcs) : Apport de l'hybridation génomique comparative sur Microreseau (cgh-array). Thèse Pharmacie. Grenoble. Université Joseph Fourier. 2010 ; 125 p.
  42. Emelyanov AV, Fyodorov DV. Thioredoxin-de-pendent disulfide bond reduction is required for protamine eviction from sperm chromatin. *Genes Dev.* 2016; 30(24):2651-6.
  43. Evaluation of Sperm Chromatin Integrity Using Aniline Blue and Toluidine Blue Staining in Infertile and Normozoospermic Men Soheila Pourmasumi 1, Arezoo Khoradmehr 2, Tahereh Rahiminia 3, Parvin Sabeti 4, Ali Reza Talebi 2□, Jalal Ghasemzadeh *J Reprod Infertil.* 2019;20(2):95-101
  44. Evenson D. P., Darzynkiewicz Z. and Melamed M. R. (1980). Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210(4474): 1131-3.
  45. Evenson D. P., Higgins P. J., Grueneberg D. and Ballachey B. E. (1985). Flow cytometric analysis of mouse spermatogenic function following exposure to ethylnitrosourea. *Cytometry* 6(3): 238-53.
  46. Evenson D. P., Jost L. K., Baer R. K., Turner T. W. and Schrader S. M. (1991). Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reprod Toxicol* 5(2): 115-25.
  47. Evenson D. P., Jost L. K., Marshall D., Zinaman M. J., Clegg E., Purvis K., De Angelis P. and Claussen O. P. (1999). Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 14(4): 1039-49.
  48. Evenson D.P. (2016). The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Animal Reproduction Science* 169 : 56–75.
  49. Evenson DP. The sperm chromatin structure assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Anim Reprod Sci.* 2016;169: 56-75.
  50. Evgeni E, Charalabopoulos K, Asimakopoulos B. Human sperm DNA fragmentation and its correla-tion with conventional semen parameters. *J Reprod Infertil.* 2014;15(1):2-14.
  51. 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.
-

- 
52. Fellous M., Siffroi J.P. (2003). Génétique de l'infertilité chez l'homme, nouvelles approches.13: 148:57.
  53. Fellous M., Siffroi J.P. (2003). Génétique de l'infertilité chez l'homme, nouvelles approches.13: 148:57.
  54. Ferguson-Smith M. A., Lennox B., Mack W. S. and Stewart J. S. (1957). Klinefelter's syndrome; frequency and testicular morphology in relation to nuclear sex. *Lancet* 273(6987): 167- 169.
  55. Ferlin A, Arredi B, Foresta C. Genetic causes of male infertility. *Reprod Toxicol.* 2006; 22: 133-141.
  56. Ferlin A., Arredi B., Foresta C. (2006). Genetic causes of male infertility. *Reprod Toxicol*; 22:133-141.
  57. Fernandez J. L., Muriel L., Rivero M. T., Goyanes V., Vazquez R.and Alvarez J. G. (2003). The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 24(1): 59-66.
  58. Filatov MV, Semenova EV, Vorob'eva OA, et al (1999) Relationship between abnormal sperm chromatin packing and IVF results. *Mol Hum Reprod* 5:825–30
  59. Gavrieli Y., Sherman Y. and Ben-Sasson S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119(3): 493-501.
  60. Glover, D. M., M. H. Leibowitz, D. A. McLean and H. Parry (1995). "Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles." *Cell* 81(1): 95-105.
  61. Gorczyca W., Gong J. and Darzynkiewicz Z. (1993). Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 53(8): 1945-51.
  62. Guérin JF. and Benchaïb M. (2004). Tests d'exploration de la qualité nucléaire despermatozoïde : relations avec la fertilité et la qualité du conceptus. *Gynecol obstet Fertil*, 32 :799-802.
  63. Guttenbach M. and Schmid M. (1990). "Determination of Y chromosome aneuploidy in human sperm nuclei by nonradioactive in situ hybridization." *Am J Hum Genet* 46(3):553-8.
  64. Guttenbach M., Engel W. and Schmid M. (1997). "Analysis of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of normal men and carriers of constitutional chromosome aberrations." *Hum Genet* 100(1): 1-21.
-

- 
65. H.S.Kim, M. J.Kang, S. A. Kim et al., "The utility of sperm DNA damage assay using toluidine blue and aniline blue staining in routine semen analysis," *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, vol. 40, no. 1, pp. 23–28, 2013.
  66. Hamdi R. (2013). Stérilité et procréation médicalement assistée: le taux de réussite, en Algérie, est proche de celui mondial. *Santé-MAG*;19.
  67. Hammadeh M, Zeginiadjov T, Rosenbaum P, Georg T, Schmidt W, Strehler E. Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. *Arch Androl*. 2001;46(2):99-104.
  68. Hammamah S., Saliba E., Benhamed M., Gold F. 1999. Médecine et biologie de la reproduction. Ed Masson, 3-50.
  69. Harbuz, R., R. Zouari, K. Dieterich, Y. Nikas, J. Lunardi, S. Hennebicq and P. F. Ray (2009). "[Function of aurora kinase C (AURKC) in human reproduction.]" *Gynecol Obstet Fertil* 37(6): 546-551.
  70. Hartl DL., Jones EW. (2003). Les bases chromosomiques de l'hérédité. Génétique : les grands principes. Troisième édition. Dunod, Paris, pp 73-119.
  71. Hofmann N, Hilscher B (1991) Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. *Hum Reprod* 6:979–8214.
  72. Huang C. C., Lin D. P., Tsao H. M., Cheng T. C., Liu C. H. and Lee M. S. (2005). Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril* 84(1): 130-40.
  73. Hugon-Rodin J. (2010). Analyse de 9 patientes avec une insuffisance ovarienne précoce et une translocation x-autosome par puces à ADN pangénomiques de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Thèse Gynécologie Médicale. Paris : Université Paris Descartes (Paris 5); 92 p.
  74. 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 and decondensation tests, and assisted reproduction techniques. *Andrologia*. 2015;47(4):438- 47.
  75. J.P.BBOILLEUL, B.MAUROY: Anatomie des testicules et voies spermatiques et des bourses, éditions techniques EMC (Paris-France), Néphrologie-Urologie, 18600 A10 1991, 14p
  76. Jacobs P. A. and Strong J. A. (1959). A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 183(4657): 302-303.
-

- 
77. Jalbert P. (2004). Exploration génétique du couple infertile. Dans : Hamamah S, Saliba E, Benhamed M, Gold F. Médecine et biologie de la reproduction. Masson, Paris: 55-66.
  78. Janny L. and Menezo Y. J. (1994). Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. *Mol Reprod Dev* 38(1): 36-42.
  79. Johnson MD. Genetic risks of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening. *Fertil Steril* 1998 ; 70 : 39T-411
  80. Jouannet P. (1977) : Le laboratoire face à la clinique : L'examen du sperme. *Le technicien biologiste* (4): 153 – 157
  81. Kazerooni T, Asadi N, Jadid L, Kazerooni M, Ghanadi A, Ghaffaripasand F, et al. Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion. *J Assist Reprod Genet.* 2009;26(11-12):591-6.
  82. Kimura, M., S. Kotani, T. Hattori, N. Sumi, T. Yoshioka, K. Todokoro and Y. Okano (1997). "Cell cycle-dependent expression and spindle pole localization of a novel human protein kinase, Aik, related to Aurora of *Drosophila* and yeast Ipl1." *J Biol Chem* 272(21): 13766-71.
  83. Koch JE., Kolvraa S., Petersen KB., Gregersen N., Bolund L. (1989). Oligonucleotide-priming methods for the chromosome-specific labelling of alpha satellite DNA in situ. *Chromosoma*, 98: 259-265.
  84. Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordum HS, Kusz-Zamelczyk K, Ginter-Matuszewska B, Sajek M, Jaruzelska J. Gene Mutations Associated with Male Infertility, *Male Infertility*, Dr. Anu Bashamboo (Ed.), ISBN: 978-953-51-0562-6, InTech. 2012 ; Available from: <http://www.intechopen.com/books/male-infertility/gene-mutations-associated-with-male-infertility>.
  85. Laboratoire d'anatomie, faculté de médecine et de pharmacie de Fès.
  86. Langman J. 1984. Développement normal et pathologique. Edition Masson. Embryologie.
  87. Laron Z, Dickerman Z, Zamir R, Galatzer A. Paternity in Klinefelter's syndrome: a case report. *Arch Androl.* 1982; 8:149–151.
  88. Larson K. L., DeJonge C. J., Barnes A. M., Jost L. K. and Evenson D. P. (2000). Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 15(8): 1717-22.
-

- 
89. Lewis S, Aitken R. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res*. 2005;322(1):33-41.
  90. Lewis S. E., O'Connell M., Stevenson M., Thompson-Cree L. and McClure N. (2004). An algorithm to predict pregnancy in assisted reproduction. *Hum Reprod* 19(6): 1385-94.
  91. Lewis-Jones DI, Gazvani MR, Mountford R. Cystic fibrosis in infertility: screening before assisted reproduction: opinion. *Hum Reprod* 2000;15:2415— 7.
  92. Li, Z., C. J. Haines and Y. Han (2008). "'Micro-deletions" of the human Y chromosome and their relationship with male infertility." *J Genet Genomics* 35(4): 193-9.
  93. Lu, L., M. Lin, M. Xu, Z. M. Zhou and J. H. Sha (2006). "Gene functional research using polyethylenimine-mediated in vivo gene transfection into mouse spermatogenic cells." *Asian J Androl* 8(1): 53-9.
  94. M. E. Hammadeh, T. Zeginiadov, P. Rosenbaum, T. Georg, W. Schmidt, and E. Strehler, "Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility," *Archives of Andrology*, vol. 46, no. 2, pp. 99–104, 2001.
  95. M., Gold F (sous la direction de Lansac J). *Médecine et biologie de la reproduction*. Masson, Paris, pp17-48.
  96. Manicardi G. C., Tombacco A., Bizzaro D., Bianchi U., Bianchi P. G. and Sakkas D. (1998). DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assays. *Histochem J* 30(1): 33-9.
  97. Mansat A. et Bennet P. (1986). *Techniques d'examen du sperme. Stage de formation*. Toulouse. France.: Laboratoire de biologie de reproduction du CECOS Midi-Pyrénées.
  98. Marc J-P. (2004). *Génétique médicale, formelle, chromosome, moléculaire, clinique*, ED Masson, 412 pages.
  99. Martin R. H. (2008). "Cytogenetic determinants of male fertility." *Hum Reprod Update* 14(4):379-90.
  100. Martin R., Ko E. and Chan K. (1993). "Detection of aneuploidy in human interphase spermatozoa by fluorescence in situ hybridization (FISH)." *Cytogenet Cell Genet* 64: 23-6.
  101. Martins C. F., Dode M. N., Bao S. N. and Rumpf R. (2007). The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA. *Genet Mol Res* 6(1): 94-104.
  102. Mau-Holzmann UA. (2005). Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet Genome Res*; 111: 317-336.
-

- 
103. Mc Elreavey K, Chantot-Bastaraud S, Ravel C, Mandelbaum J, Siffroi J-P. Chromosome Y et infertilité masculine : qu'est-ce qu'un chromosome Y normal ? *Journal de la Société de Biologie*. 2008; 202: 135-141
  104. McElreavey, K., C. Krausz, C. Patrat and M. Fellous (2002). "[Male infertility and microdeletions of the Y chromosome]." *Gynecol Obstet Fertil* 30(5): 405-12.
  105. Mehta A, Sigman M. Identification and preparation of sperm for ART. *Urol Clin North Am*. 2014;41 (1):169-80.
  106. Meseguer M., Santiso R., Garrido N., Gil-Salom M., Remohi J. and Fernandez J. L. (2008). Sperm DNA fragmentation levels in testicular sperm samples from azoospermic males as assessed by the sperm chromatin dispersion (SCD) test. *Fertil Steril*.
  107. Muleris M., Richard F., Apiou F., Dutrillaux B. (1996). *Hybridation in situ en cytogénétique moléculaire (principe et technique)*. Paris, Lavoisier, collection Génie Génétique.
  108. Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S, Cambi M, Olivito B, Azzari C, et al. Investigation on the origin of sperm DNA fragmentation: role of apoptosis, immaturity and oxidative stress. *Mol Med*. 2015;21:109-22.
  109. Muratori M., Piomboni P., Baldi E., Filimberti E., Pecchioli P., Moretti E., Gambera L., Baccetti B., Biagiotti R., Forti G. and Maggi M. (2000). Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl* 21(6): 903-12.
  110. Nagy ZP, Liu J, Joris H, Verheyen G et al. Results of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod* 1995; 10:1123-9.
  111. Nasr-Esfahani M. H., Salehi M., Razavi S., Anjomshoa M., Rozbahani S., Moulavi F. and Mardani M. (2005). Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reprod Biomed Online* 11(2): 198-205.
  112. 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.
  113. Nielsen P. E., Egholm M., Berg R. H. and Buchardt O. (1991). "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide." *Science* 254(5037): 1497-500.
  114. Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science* 306(5701): 1571-3.
  115. Olive P. L., Wlodek D. and Banath J. P. (1991). DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Res* 51(17): 4671-6.
-

- 
116. Ounis L. (2015). Les anomalies morphologiques responsables des infertilités masculines dans l'Est Algérien : Aspect épidémiologique et génétique, Université Constantine 1, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.
  117. Painter, T. S. (1923). "Further Observations on the Sex Chromosomes of Mammals." *Science* 58(1500): 247-248.
  118. Parrington J, Swann K, Shevchenko VI, Sesay AK, Lai FF, Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* 1996; 379:364-8.
  119. Pearson P. L. and Bobrow M. (1970). "Fluorescent staining of the Y chromosome in meiotic stages of the human male." *J Reprod Fertil* 22(1): 177-9.
  120. Pearson P. L., Bobrow M. and Vosa C. G. (1970). "Technique for identifying Y chromosomes in human interphase nuclei." *Nature* 226(5240): 78-80.
  121. Pellestor F. (1998). Ce que le PRINS peut faire pour vous. *Médecine/Sciences*, 14: 935-938.
  122. Pellestor F., Girardet A., Lefort G., Andreo B. and Charlieu J. P. (1995a). "PRINS as a method for rapid chromosomal labeling on human spermatozoa." *Mol Reprod Dev* 40(3): 333-7.
  123. Pellestor F., Girardet A., Lefort G., Andreo B. and Charlieu J. P. (1995b). "Use of the primed in situ labelling (PRINS) technique for a rapid detection of chromosomes 13, 16, 18, 21, X and Y." *Hum Genet* 95(1): 12-7.
  124. 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.
  125. Pontonnier F. et Bujan L. 1993. Comment reconnaître et classer une infécondité masculine?. *Rev. Prat* 8 (43): 941-47.
  126. Pourmasumi S, Ghasemi N, Talebi AR, Mehrabani M, Sabeti P. The effect of vitamin E and selenium on sperm chromatin quality in couples with recurrent miscarriage. *Int J Med Lab*. 2018;5(1):1-10.
  127. Practice committee of the American society for re-productive medicine. The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline. *Fertil Steril*. 2013;99(3):673-7.
  128. Prigent, C., R. Gill, M. Trower and P. Sanseau (1999). "In silico cloning of a new protein kinase, Aik2, related to *Drosophila* Aurora using the new tool: EST Blast." *In Silico Biol* 1(2): 123-8.
-

- 
129. Quenesson I., Girardet A., Coignet L., Andreo B., Lefort G., Charlieu J. P. and Pellestor F.(1995). "[Direct analysis of the frequency of disomy in human sperm using the PRINS technique]." *Ann Genet* 38(2): 85-9.
  130. Quintana-Murci L, Krausz C, Mc Elreavey K. The human Y chromosome: function, evolution and disease. *Forensic Science International*. 2001; 118: 169–181.
  131. Quintana-Murci L, Krausz C, Mc Elreavey K. The human Y chromosome: function, evolution and disease. *Forensic Science International*. 2001; 118: 169–181
  132. Rahimipour M, Talebi AR, Anvari M, Sarchesh-meh AA, Omidi M. Effects of different doses of ethanol on sperm parameters, chromatin structure and apoptosis in adult mice. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013;170(2):423-8.
  133. Ravel C, Mc Elreavey K, Mandelbaum J, Siffroi J-P. Polymorphismes génétiques et infertilité masculine. *mt médecine de la reproduction*. 2007; 9: 219.
  134. Ravel C. et Siffroi J-P. (2009). Anomalies de structure du chromosome Y et syndrome de Turner. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*; 37: 511-518.
  135. Ravel, C. and J. P. Siffroi (2009). "[Y chromosome structural abnormalities and Turner's syndrome.]" *Gynecol Obstet Fertil* 37(6): 511-8.
  136. Ravel, C., S. Chantot-Bastarud, K. McElreavey and J. P. Siffroi (2006). "[Molecular anomalies of the Y chromosome: Consequences on male fertility]." *Gynecol Obstet Fertil* 34(10): 885-93.
  137. Robbins W., Segraves R., Pinkel D.and Wyrobek A. (1993). "Detection of aneuploid human sperm by fluorescence in situ hybridization: evidence for a donor difference in frequency of sperm disomic for chromosomes 1 and Y." *Am J Hum Genet* 52: 799-807
  138. Ron-el R., Nachum H., Herman A., Golan A., Caspi E.and Soffer Y. (1991). Delayed fertilization and poor embryonic development associated with impaired semen quality. *Fertil Steril* 55(2): 338-44.
  139. Rossin B, Pouly JL, Belaisch-Allart J, de Mouzon J. La stimulation de l'ovulation pour fécondation in vitro, en France : choix et résultats en fonction des protocoles et des gonadotrophines. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. 2009 Nov;37(11-12):864-872.
  140. Roux C., Tripogney C., Joanne C. and Bresson J. L. (2004). Nuclear quality of the spermatozoon: exploration tests of the chromatin of human spermatozoa (nuclear proteins). *Gynecol Obstet Fertil* 32(9): 792-8.
  141. Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mahmoud AM. 2000. WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male. *Cambridge university Press*
-

- 
142. Sabeti P, Amidi F, Kalantar SM, Sedighi Gilani MA, Pourmasumi S, Najafi A, et al. Evaluation of intracellular anion superoxide level, heat shock protein A2 and protamine positive spermatozoa percentages in teratoasthenozoospermia. *Int J Re-prod Biomed (Yazd)*. 2017;15(5):279-86.
  143. Sakkas D., Alvarez JG. (2009). Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 93: 1027-1036.
  144. Sakkas D., Mariethoz E., Manicardi G., Bizzaro D., Bianchi P. G. and Bianchi U. (1999). Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 4(1): 31-7.
  145. Sakkas D., Moffatt O., Manicardi G. C., Mariethoz E., Tarozzi N. and Bizzaro D. (2002). Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 66(4): 1061-7.
  146. Seabright M. (1971). Rapid banding techniques for human chromosomes. *Lancet*, 2: 971-972.
  147. Seifer I.; Fellous M; Bignon J. (1999). Causes génétiques de l'infertilité masculines. *Annales de Biologie Clinique*. Volume 57, numéro 3, 301-8, Revues générales.
  148. Sellami A, Chakroun N, Ben Zarrouk S, Sellami H, Kebaili S, Rebai T, et al. Assessment of chromatin maturity in human spermatozoa: useful aniline blue assay for routine diagnosis of male infertility. *Adv Urol*. 2013;2013:578631.
  149. Sen, S., H. Zhou and R. A. White (1997). "A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines." *Oncogene* 14(18): 2195-200.
  150. Sergerie M, Laforest G, Boulanger K, Bissonnette F, Bleau G. Longitudinal study of sperm DNA fragmentation as measured by terminal uridine nick end-labelling assay. *Hum Reprod*. 2005;20(7): 1921-7.
  151. Sergerie M., Bleau G., Teule R., Daudin M. and Bujan L. (2005a). Sperm DNA integrity as diagnosis and prognosis element of male fertility. *Gynecol Obstet Fertil* 33(3): 89-101.
  152. Sergerie M., Laforest G., Bujan L., Bissonnette F. and Bleau G. (2005b). Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 20(12): 3446-51.
  153. Sexoblogue. Anatomie et physiologie de l'appareil sexuel masculin. [Image en ligne] < <https://sexoblogue.fr/cours-de-sexologie/la-sexualite-normale/biologie-de-la-sexualite/l-appareil-sexuel-masculin-anatomie-physiologie>>. (Consultée le 2 mai 2020).
-

- 
154. Silber S J, Nagy ZP, Liu J, Godoy H, Devroey P, Van 2 4 5 Steirteghem AC. Conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Hum Reprad* 1994; 9:1705-9.
155. Simon L, Liu L, Murphy K, Ge S, Hotaling J, Aston K, et al. Comparative analysis of three sperm DNA damage assays and sperm nuclear pro-tein content in couples undergoing assisted repro-duction treatment. *Hum Reprod.* 2014;29(5):904-17.
156. Singh N. P., Danner D. B., Tice R. R., McCoy M. T., Collins G. D. and Schneider E. L. (1989). Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. *Exp Cell Res* 184(2): 461-70.
157. Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R. and Schneider E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175(1): 184-91.
158. Singh NP., Muller CH., Berger RE. (2003). Effect of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril*; 80(6): 1420-1429.
159. Singh NP., Muller CH., Berger RE. (2003). Effect of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril*; 80(6): 1420-1429.
160. Sivanarayana T, Krishna CR, Prakash GJ, Krishna K, Madan K, Sudhakar G, et al. Sperm DNA frag-mentation assay by sperm chromatin dispersion (SCD): correlation between DNA fragmentation and outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Med Biol.* 2014;13(2):87-94.
161. Skaletsky, H., T. Kuroda-Kawaguchi, P. J. Minx, H. S. Cordum, L. Hillier, L. G. Brown, S. Repping, T. Pyntikova, J. Ali, T. Bieri, A. Chinwalla, A. Delehaunty, K. Delehaunty, H. Du, G. Fewell, L. Fulton, R. Fulton, T. Graves, S. F. Hou, P. Latrielle, S. Leonard, E. Mardis, R. Maupin, J. McPherson, T. Miner, W. Nash, C. Nguyen, P. Ozersky, K. Pepin, S. Rock, T. Rohlfing, K. Scott, B. Schultz, C. Strong, A. Tin-Wollam, S. P. Yang, R. H. Waterston, R. K. Wilson, S. Rozen and D. C. Page (2003). "The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes." *Nature* 423(6942): 825-37.
162. Société canadienne du cancer. la prostate. [Image en ligne] < <https://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/prostate/prostate-cancer/the-prostate/?region=qc>>. (Consulté le 30 mars 2020).
163. Société canadienne du cancer. Zone de la prostate. [Image en ligne] < <https://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/prostate/prostate-cancer/the-prostate/?region=qc>>. (Consulté le 30 mars 2020).
-

- 
164. Solari AJ. Synaptonemal complex analysis in human male infertility. *Eur J Histochem.* 1999; 43: 265–276.
  165. Speit G., Vasquez M. and Hartmann A. (2009). The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. *Mutat Res* 681(1): 3-12.
  166. Système reproducteur male. Canal déférent. [Image en ligne] <<http://mapageweb.umontreal.ca/cabanat/bio2412/Chapitre16.html>>. (Consulté le 30 mars 2020).
  167. Talebi AR, Khalili MA, Hossaini A. Assessment of nuclear DNA integrity of epididymal spermatozoa following experimental chronic spinal cord injury in the rat. *Int J Androl.* 2007;30(3):163-9.
  168. Talebi AR, Khalili MA, Vahidi S, Ghasemzadeh J, Tabibnejad N. Sperm chromatin condensation, DNA integrity, and apoptosis in men with spinal cord injury. *J Spinal Cord Med.* 2013;36(2):140-6.
  169. Talebi AR, Moein MR, Tabibnejad N, Ghasem-zadeh J. Effect of varicocele on chromatin con-densation and DNA integrity of ejaculated sperm-atozoa using cytochemical tests. *Andrologia.* 2008; 40(4):245-51.
  170. Talebi AR, Sarcheshmeh AA, Khalili MA, Tabib-nejad N. Effects of ethanol consumption on chro matin condensation and DNA integrity of epididym-al spermatozoa in rat. *Alcohol.* 2011;45(4):403-9.
  171. Talebi AR, Vahidi S, Aflatoonian A, Ghasemi N, Ghasemzadeh J, Firoozabadi RD, et al. Cytoche-mical evaluation of sperm chromatin and DNA in-tegrity in couples with unexplained recurrent spon-taneous abortions. *Andrologia.* 2012;44 Suppl 1: 462-70.
  172. Taneja K. L., Chavez E. A., Coull J. and Lansdorp P. M. (2001). "Multicolor fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for enumeration of specific chromosomes in human cells." *Genes Chromosomes Cancer* 30(1): 57-63.
  173. Tang, C. J., C. Y. Lin and T. K. Tang (2006). "Dynamic localization and functional implications of Aurora-C kinase during male mouse meiosis." *Dev Biol* 290(2): 398-410
  174. Tejada R. I., Mitchell J. C., Norman A., Marik J. J. and Friedman S. (1984). A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril* 42(1):87-91.
  175. Terquem A, Dadoune JP. Aniline blue staining of human spermatozoon chromatin. Evaluation of nuclear maturation. In: André editor,. Martinus Nighoff; 1983. p. 249–52.
-

- 
176. Tesarik J., Greco E. and Mendoza C. (2004). Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod* 19(3): 611-5.
177. Thibault C., Levasseur M-C. (2001). *La Reproduction chez les mammifères et l'homme*, Ed Ellipses, pp 260-313.
178. Thonneau, P., J. Patureau, C. Moyse, S. Marchand, A. Tallec, M. L. Ferial, J. Lansac, P. Lopes, J. M. Tabaste and B. Ducot (1992). "[Infertility in France: results of a multicenter survey in three French departments (1988-1989)]." *Contracept Fertil Sex (Paris)* 20(1): 27-32.
179. Tiepolo, L. and O. Zuffardi (1976). "Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm." *Hum Genet* 34(2): 119-24.
180. Tomsu M., Sharma V. and Miller D. (2002). Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. *Hum Reprod* 17(7): 1856-62.
181. Tout pour les hommes. Qu'est-ce que l'épididymite?. [Image en ligne] <<https://tout-pour-les-hommes.fr/fr/epididymite/>>. (Consulté le 25 mars 2020).
182. Vacheret N. 2005. *Histologie fonctionnelle des organes*. Consulté le septembre 8.
183. Valeri A, Joulin V, Fournier G. 1998. Prostatites. *Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris)*.
184. Van Steirteghem A., Liebaers I. and Camus M. (1999). Infertilités masculines d'origine génétique. *La revue du praticien* 49(12): 1309-13.
185. Varghese A, Bragais F, Mukhopadhyay D, Kundu S, Pal M, Bhattacharyya A, et al. Human sperm DNA integrity in normal and abnormal semen samples and its correlation with sperm characteristics. *Andrologia*. 2009;41(4):207-15.
186. Velez de la Calle J. F., Muller A., Walschaerts M., Clavere J. L., Jimenez C., Wittemer C. and Thonneau P. (2008). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study. *Fertil Steril* 90(5): 1792-9.
187. Vergnaud, G., D. C. Page, M. C. Simmler, L. Brown, F. Rouyer, B. Noel, D. Botstein, A. de la Chapelle and J. Weissenbach (1986). "A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization." *Am J Hum Genet* 38(2): 109-24.
188. Vialard F., Mandon-Pépin B., Pellestor F., Ziyat A., Albert M., Molina-Gomes D., Selva J., Fellous M. (2009). Anomalies génétiques et infertilité masculine. *Androl.*; 19: 2-16.
-

- 
189. Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA®) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and in-tracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril.* 2004;81(5):1289-95.
190. Vogt, P. H., A. Edelmann, S. Kirsch, O. Henegariu, P. Hirschmann, F. Kiesewetter, F. M. Kohn, W. B. Schill, S. Farah, C. Ramos, M. Hartmann, W. Hartschuh, D. Meschede, H. M. Behre, A. Castel, E. Nieschlag, W. Weidner, H. J. Grone, A. Jung, W. Engel and G. Haidl (1996). "Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11." *Hum Mol Genet* 5(7): 933-43.
191. Wikipedia. Diagram of human spermatozoa. [Image en ligne] <[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)>. (Consultée le 10 juin 2020).
192. Wing-Yee L. and Yan Cheng C. (2008). *Transcription regulation in spermatogenesis.* Series:Special Books.
193. Wyrobek AJ., Eskenazi B., Young S., Arnheim N., Tiemann-Boege I., Jabs EW., Glaser RL., Pearson FS., Evenson D. (2006). Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proc Natl Acad Sci*; 103 (25):9601-9606.
194. Yanagimachi, R., H. Yanagimachi and B.J. Rogers (1976). "The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa." *Biol Reprod* 15(4):471-6.
195. Yunis J.J. and Sanchez O. (1975). The G-banded prophase chromosomes of man. *Humangenetik*, 27: 167-172.
196. Zenteno, J. C., M. Lopez, C. Vera, J. P. Mendez and S. Kofman-Alfaro (1997). "Two SRY-negative XX male brothers without genital ambiguity." *Hum Genet* 100(5-6): 606-10.
197. Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic re-view and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2008;23(12): 2663-8.
198. Zorn JR; Savale. (2005). *Stérilité du couple.* 2eme edition Masson.
199. Zubkova EV., Wade M., Robaire B. (2005). Changes in spermatozoa chromatin packaging and susceptibility to oxidative challenge during aging. *Fertil steril*; 84 (Suppl 2): 1191-1198.
-

---

## Annexes

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

Réceptacle à sperme à usage unique.

Etuve 37°C.

Microscope photonique avec oculaires 40x ; 100x.

Papier Johnson.

Eprouvette graduée de 10 ml.

Tubes à hémolyse de 5 mL.

Micropipette 100 µl.

Pipette graduée 1mL.

Pipettes Pasteur.

Embouts de pipettes en polypropylène jaune 5-100µl

Lames en verre

Lamelles couvre objets en verre (22X32 mm).

Papier pH réactif colorimétrique.

Cellule de Malassez.

Solution de Ringer formolé

Solution d'Eosine 1%.

Solution de Nigrosine à 10%.

Solution de Ringer formolé :

Liquide de Ringer :

CaCl<sub>2</sub> 0.300 g

KCl 0.250 g

NaCl 6.5 g

NaHCO<sub>3</sub> 0.2 g

H<sub>2</sub>O distillée 1L

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

Liquide de Ringer 1 L

Formol à 40% 10 mL

Solution à Eosine 1%:

Eosine "yellowish" 1g

---

NaCl 9 ‰ 100 mL

Bien mélanger et filtrer.

Solution de Nigrosine à 10% :

Nigrosine 10g

NaCl 9 ‰ 100 mL

Bien mélanger jusqu'à disparition des cristaux puis filtrer.

Carnoy :

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

Réactif de May-Grünwald

May-Grünwald poudre 2,5g

Alcool méthylique pur 1000ml

*Technique de préparation*

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

Réactif Giemsa RAL

Giemsa en poudre 0,75g

Alcool méthylique 75ml

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.

