

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



N° Ordre :71/D3C/2019

N° Série :02/Bio/2019

Université Frères Mentouri Constantine1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire  
Option : Biologie et Santé

Thèse en vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat 3<sup>ème</sup> Cycle (LMD)

**THÈME**

**Infertilité liée à la qualité du génome spermatique et impact en Procréation Médicalement Assistée**

Présentée par : **HACHEMI MAROUA**

Soutenue le : **01/07/2019**

**Jury d'évaluation**

|                      |                          |                                          |
|----------------------|--------------------------|------------------------------------------|
| Président :          | Pr. Leila ROUABAH        | Université Frères MENTOURI Constantine 1 |
| Directeur de thèse : | Pr. Abdelkader ROUABAH   | Université Frères MENTOURI Constantine 1 |
| Examineurs :         | Pr. Nadja BOUCEKKINE     | C.H.U Laraine DEBAGHINE Alger            |
|                      | Pr. <u>Dallila</u> SATTA | Université Frères MENTOURI Constantine 1 |
| Invité :             | Dr. Abdelali ZOGHMAR     | Clinique IBN ROCHD Constantine           |

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2018-2019

## ***Remercîment :***

Au Professeur **Rouabah Leila** :

J'exprime ma gratitude à Mme. **Rouabah Leila**, Professeur à l'université des frères Mentouri – Constantine 1, qui a contribué à ma formation universitaire et doctorale et qui m'a fait l'honneur d'être présidente du jury de cette thèse. Les mots ne saurons suffisans pour vous exprimer ce que j'aurais aimé vous dire, lors de ce long parcours. Vous avez marqué mes débuts étudiantins et des années plus tard vous marquez la fin de ce cycle, vous m'avez toujours su me guider et me donner des conseils, vous avez fait preuve de gentillesse et d'humanité en vers ma personne .Veuillez trouver ici, madame, l'expression de ma profonde gratitude et l'estime que je porte pour vous. J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi.

Au Professeur **Rouabah Abdelkader** :

Au terme de ce travail, je voudrai d'abord exprimer une éternelle reconnaissance à monsieur **Rouabah Abdelkader**, Professeur à l'université des frères Mentouri – Constantine 1. Qui en dépit de ses multiples charges m'a fait l'honneur d'accepter d'être mon directeur de thèse. Je tiens à vous remercier pour votre soutien et votre aide tout au long de ces années d'étude, et tout particulièrement durant les derniers moments de la thèse. Je suis ravie d'avoir travaillé sous votre direction car outre votre appui scientifique, vous avez toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse. Vous m'avez fait profiter de votre riche connaissance, je vous remercie également pour les conseils précieux que vous m'avez prodigués, qui je l'espère, resteront bien ancrés dans ma mémoire, vous avez guidé mes pas jusqu'à l'achèvement de cette étude.

Je tiens particulièrement à remercier tous les membres du jury et examinateurs qui m'ont honoré de leur présence en ce jour si particulier, et qui vont sans doute contribuer à la richesse de la discussion lors de ma soutenance de thèse de doctorat :

Au professeur **Boucekkine Nadia** :

J'adresse mes vifs remerciements au Professeur Nadia Boucekine ; C.H.U Lamine Debaghine Alger ; médecin chef du service de la Biologie de Reproduction de la Clinique Tiziri- Alger d'avoir accepté

d'examiner et de disséquer avec un œil d'expert mon manuscrit. Croyez Professeur en l'expression de ma considération respectueuse.

Au professeur **Satta Dalila** :

Je tiens à remercier Madame Satta Dalila, Professeur à l'université des frères Mentouri – Constantine 1 d'avoir accepté la lourde charge qui incombe aux rapporteurs, surtout en cette fin d'année si chargée. Un grand merci pour votre regard critique et pertinent sur l'ensemble de mes travaux. Croyez-en en mon indéfectible reconnaissance.

Au Professeur **Benbouhedja Sebti** :

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements au Professeur **Benbouhedja Sebti**, directeur de la Clinique de Chirurgie et Sciences de la Reproduction IBN-Rochd Constantine et médecin chef du service de la Biologie de la Reproduction et Assistance Médicale à la Procréation pour m'avoir donné la possibilité de travailler dans son établissement et d'avoir mis à ma disposition tous les moyens pour y réussir. Je vous témoigne ma gratitude pour m'avoir permis de travailler et de mener à bien mon projet scientifique avec tout le confort nécessaire. Je vous remercie de l'attention bienveillante que vous avez pu marquer à mon encontre. Merci également pour votre œil de clinicien qui a éclairé plus d'une fois ma lumière de scientifique.

Au Docteur **Zoghmar Abdelali** :

Je voudrais exprimer mes plus profonds remerciements au Docteur Zoghmar médecin Biologiste du service de la Biologie de la Reproduction et de l'Assistance Médicale à la procréation de la Clinique de Chirurgie et Sciences de la Reproduction Ibn Rochd Constantine pour m'avoir proposé cette étude, en effet ce travail est une concrétisation et le fruit d'une collaboration fructueuse entre le Laboratoire de biologie Moléculaire et Cellulaire l'université des frères Mentouri – Constantine 1 ; la Clinique de Chirurgie et Sciences de la Reproduction Ibn Rochd Constantine. Je vous adresse Docteur un immense remerciement pour m'avoir proposé une place au sein de votre équipe, également pour avoir fait preuve de patience à mon égard. Je vous remercie beaucoup pour votre aide, vos conseils, votre implication et votre disponibilité. Je n'oublie pas le soutien et la confiance que vous m'avez témoignée et d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Au Docteur **Bensaada Mustapha** :

Un immense remerciement est adressé au Docteur Bensaada Mustapha Enseignant - Chercheur à l'Université Abbas Laghour Khenchela. Je vous suis infiniment reconnaissante de m'avoir accepté et suivi durant mes années de thésarde au sein du laboratoire de cytogénétique de la Clinique de Chirurgie et Sciences de la Reproduction Ibn Rochd Constantine. Je me souviendrai longtemps de votre soutien inconditionnel au cours des séances de tutorat. Quel enrichissement ! Je vous adresse mon entière gratitude pour votre disponibilité, pour votre savoir, votre rigueur, votre passion pour la recherche et votre professionnalisme, pour vos encouragements, vos conseils et vos orientations constructives. Ainsi, au terme de ce cheminement de ces années de recherche, qu'il me soit permis de témoigner mes vifs remerciements pour votre aide si précieuse, sans vous, cette thèse aurait difficilement aboutie.

Au Professeur **Benchaib Mehdi** :

A Monsieur Le Professeur Benchaib Mehdi, Praticien Hospitalier à Hôpital Femme Mère Enfant, Hospice Civil de Lyon et Enseignant-Chercheur à la Faculté de Médecine de l'Université de Claude Bernard, Lyon .Je vous adresse Professeur mes vifs remerciements pour avoir bien voulu participer à l'encadrement de ce projet de recherche, également pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail et pour votre implication dans ce dernier et dans la recherche scientifique en sa globalité. Vous avez fait preuve de générosité envers moi. Je vous remercie sincèrement pour votre gentillesse et pour votre disponibilité, pour vos conseils, vos encouragements et pour votre aide qui ont permis l'aboutissement de ce projet de thèse et je vous remercie également pour votre soutien inconditionnel. Veuillez recevoir monsieur le Professeur l'expression de mon profond respect.

Je remercie tous les cadres de santé et personnel soignant de l'Hôpital Femme Mère Enfant, Hospice Civil de Lyon pour m'avoir accueillie et guidée dans mon stage de recherche au sein de leur institution. J'adresse également mes remerciements à l'équipe de recherche de la Faculté de Médecine de l'Université de Claude Bernard, Lyon en particulier Cyrielle Fournier, pour sa gentillesse et son dévouement tout au long de mon stage je n'oublierai jamais les moments de complicité que nous avons eu ensemble ce fut un plaisir et un cadeau de travailler avec elle.

De peur d'oublier des noms, je remercie tous ceux qui m'ont aidé de loin ou de près pour la réalisation de ce travail

***Je dédie ce travail :***

*A ma merveilleuse mère et à mon très cher père qui m'ont procuré soutien et confiance tout au long de mes études. Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon amour infini.*

*A ma chère sœur et à mon cher frère : je ne peux exprimer à travers ces lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous. Que l'amour et la fraternité nous unissent à jamais.*

*Je me dois d'avouer pleinement ma reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont soutenu durant mon parcours, qui ont su me hisser vers le haut pour atteindre mon objectif. C'est avec amour, respect et gratitude que je vous dédie cette thèse.*

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| <b>INTRODUCTION :</b> ..... | 01 |
|-----------------------------|----|

## **Synthèse Bibliophilique**

|                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| I. Les causes de l'infertilité masculine :.....                             | 04 |
| II. Organisation du génome dans les cellules somatiques :.....              | 05 |
| II, 1. Les histones :.....                                                  | 05 |
| II. 2. Les différents niveaux d'organisation de la chromatine :.....        | 06 |
| II.3. Compartimentation fonctionnelle de la chromatine :.....               | 07 |
| II.4. L'hétérogénéité de la chromatine :.....                               | 09 |
| II.4.1. Les modifications post traductionnelle des histones :.....          | 09 |
| II .4 .2. La méthylation de l'ADN :.....                                    | 12 |
| III. Remodelage de la chromatine au cours de la spermatogénèse :.....       | 13 |
| III.1. la spermatogénèse :.....                                             | 13 |
| III. 2. Le déroulement de la spermatogénèse :.....                          | 14 |
| III. 3. La restructuration de la chromatine au cours de la spermatogénèse : | 17 |
| III.3.1. Dynamique de la méthylation de l'ADN :.....                        | 17 |
| III.3.2. Dynamique des modifications post-traductionnelles des histones :   | 18 |
| IV. L'Architecture finale du noyau spermatique :.....                       | 24 |
| IV. 1. La maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme :.....             | 27 |
| IV. 2. Le rôle du spermatozoïde dans la fécondation :.....                  | 27 |
| V. Les altérations de la qualité du noyau spermatique :.....                | 28 |
| V.1. Anomalies de la réorganisation de la chromatine spermatique :....      | 28 |
| V .2. Défaut de remodelage de la chromatine spermatique :.....              | 29 |
| V .3. Apoptose abortive et fragmentation de l'ADN spermatique :.....        | 29 |
| V .4. 1. Les EOR durant le transit épидидymaire :.....                      | 32 |
| V .4. 2. Les EOR au niveau du tractus génital féminin :.....                | 32 |
| V .4. 3 .Les dommages du stress oxydant sur le spermatozoïde :.....         | 32 |

|                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| V .5. Le Tabagisme : .....                                                                                   | 33 |
| V .6. La cryptorchidie : .....                                                                               | 34 |
| V .7. La varicocèle : .....                                                                                  | 34 |
| V .8. Hyperthermie testiculaire : .....                                                                      | 34 |
| V .9. Inflammation du tractus génital : .....                                                                | 35 |
| V.10. Fragmentation de l'ADN induite par Chimiothérapie<br>et radiothérapie : .....                          | 35 |
| VI. Evaluation de l'intégrité du génome spermatique : .....                                                  | 36 |
| VI. 1. Les principales techniques d'évaluation du taux de<br>la fragmentation de l'ADN spermatique : .....   | 36 |
| VI. 2. Les principales techniques d'évaluation du taux de<br>compaction de la chromatine spermatique : ..... | 37 |
| VII. Perspective thérapeutique : .....                                                                       | 39 |
| VII. 1. L'insémination artificielle : .....                                                                  | 39 |
| VII. 2. La Fécondation In Vitro (FIV) : .....                                                                | 39 |
| VII. 3. La fécondation in vitro avec micro-injection de spermatozoïde (ICSI) :                               | 40 |

## **Matériels et Méthodes**

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| I. Présentation de la population cible : .....                          | 41 |
| II. Evaluation des paramètres spermatiques : .....                      | 42 |
| II. 1. Le spermogramme : .....                                          | 43 |
| II. 2. Spermocytogramme : .....                                         | 44 |
| III. Analyses des cellules rondes : .....                               | 45 |
| IV. Etude de la qualité du génome spermatique : .....                   | 45 |
| IV .1. Evaluation du taux de fragmentation de l'ADN spermatique : ..... | 45 |
| IV.2. Evaluation du taux de condensation de la chromatine spermatique : | 47 |
| V. Technique d'Assistance Médicale à la Procréation : .....             | 48 |

|                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| V.1. Le principe de la technique d'injection intracytoplasmique de spermatozoïde :..... | 48 |
| V .2.Méthodologie:.....                                                                 | 49 |
| V .2.1. Collecte des ovocytes :.....                                                    | 49 |
| V .2.2. Collecte des spermatozoïdes :.....                                              | 51 |
| V .2.3. La fécondation in vitro :.....                                                  | 52 |
| V .2.4. Culture embryonnaire :.....                                                     | 53 |
| V .2.5. Transfert embryonnaire :.....                                                   | 53 |
| VI. Etude statistique :.....                                                            | 54 |

## **Résultats**

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| I. Caractéristique de la population d'étude : .....                            | 55 |
| I.1. Distribution des couples selon le type d'infertilité :.....               | 55 |
| 1.2. Caractéristiques des patients :.....                                      | 55 |
| 1.2. 1. Distribution des patients selon la tranche d'âge :.....                | 55 |
| I.2.2. Répartition des patients selon les paramètres spermatiques : .....      | 56 |
| I. 2.3. Répartition selon le taux de concentration spermatique après TMS :     | 56 |
| 1.2.4. Répartition selon la mobilité spermatique après TMS :.....              | 56 |
| I. 2. 5. Répartition des patients selon le mode de vie :.....                  | 57 |
| I. 3. Caractéristiques des patientes :.....                                    | 57 |
| I.3. 2. Distribution des patientes selon le nombre d'ovocytes recueillis :.... | 58 |
| I.3.3. Distribution selon le nombre d'ovocytes matures en métaphase II :....   | 58 |
| I.4. Caractéristique du couple :.....                                          | 59 |
| I.4.1. Répartition des couples selon le nombre de zygotes obtenus :.....       | 59 |
| I. 4.2. Répartition des couples selon le nombre d'embryons obtenus :.....      | 59 |
| I.4. 3. Distribution des embryons selon le grade :.....                        | 60 |

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I.4.5. Répartition selon le grade des embryons transférés et<br>le taux d'implantation : .....   | 60 |
| I.4.6. Technique de micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïde :                        | 61 |
| II. Etude de la qualité du génome spermatique :.....                                             | 61 |
| II .1. Etude de la qualité de l'ADN spermatique :.....                                           | 61 |
| II .1.1.Distribution des patients selon les classes de DFI :.....                                | 61 |
| II .2 .Etude la qualité de la chromatine spermatique :.....                                      | 62 |
| II. 2 .1. Distribution des patients selon le SDI :.....                                          | 62 |
| II .3. Etude de la relation qualité de l'ADN et structure de<br>la chromatine spermatique :..... | 63 |
| II .3.1. Taux de condensation de la chromatine spermatique<br>selon le DFI du patient : .....    | 63 |
| II .3. 2. Corrélation entre SDI et DFI :.....                                                    | 64 |
| III. Etude de la relation qualité du génome spermatique et âge du patient :                      | 64 |
| III. 1. Distribution des patients selon l'âge et les classes de DFI :.....                       | 64 |
| III .2. Corrélation entre l'âge des patients et le DFI :.....                                    | 65 |
| III. 3. Distribution des patients selon l'âge des patients et le SDI :.....                      | 66 |
| III. 4. Corrélation entre l'âge des patients et le SDI :.....                                    | 66 |
| IV. Etude de la relation qualité du génome spermatique et durée de stérilité :                   | 67 |
| IV.1. Distribution selon les classes de DFI et la durée de stérilité des patients :              | 67 |
| IV. 2. Corrélation entre le DFI et la durée de stérilité des patients :.....                     | 68 |
| IV.3. Distribution selon le SDI la durée de stérilité des patients :.....                        | 68 |
| IV.4. Corrélation entre le SDI et la durée de stérilité des patients :.....                      | 69 |
| V. Etude de la relation qualité du génome spermatique<br>et paramètres spermatiques :.....       | 69 |
| V.1. Distribution des patients selon le DFI et concentration spermatique :..                     | 69 |

|                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| V. 2. Corrélation entre le DFI et concentration spermatique :.....                                           | 70 |
| V. 3. Distribution des patients selon le SDI et la concentration spermatique :                               | 71 |
| V.4. Corrélation entre le SDI et la concentration spermatique :.....                                         | 71 |
| V.5. Distribution des patients selon le DFI et la mobilité spermatique :.....                                | 72 |
| V.6. Corrélation entre le DFI et la mobilité spermatique :.....                                              | 73 |
| V.7. Distribution des patients selon le SDI et la mobilité spermatique :.....                                | 73 |
| V.8 .Corrélation entre le SDI et la mobilité spermatique :.....                                              | 74 |
| V.9. Corrélation entre le DFI et les anomalies céphaliques du spermatozoïde :                                | 74 |
| V.10. Corrélation entre le SDI et les anomalies céphaliques du spermatozoïde :                               | 75 |
| VI. Etude relation mode de vie des patients et qualité du génome spermatique :                               | 75 |
| VI .1. Etude de la relation qualité de l'ADN spermatique et mode de vie : ....                               | 75 |
| VI .2. Etude de la relation qualité de la chromatine spermatique<br>et mode de vie : .....                   | 76 |
| VII. Etude de la relation qualité du génome spermatique taux de fécondance :                                 | 77 |
| VII.1. Distribution des patients selon les classes de DFI<br>et le taux de fécondance :.....                 | 77 |
| VII. 2 .Corrélation entre le DFI et le taux de fécondance :.....                                             | 78 |
| VII. 3. Distribution des patients selon le SDI et le taux de fécondance :.....                               | 79 |
| VII. 8. Corrélation entre le SDI le taux de fécondance :.....                                                | 79 |
| VIII. Etude de la relation qualité du génome spermatique<br>et nombre d'embryons obtenus :.....              | 80 |
| VIII. 1. Répartition des patients selon les classes de DFI<br>et le taux de segmentation embryonnaire :..... | 80 |
| VIII. 2. Corrélation entre le DFI et le taux de segmentation embryonnaire :                                  | 81 |
| VIII. 3. Répartition des patients selon le SDI et le taux<br>de segmentation embryonnaire :.....             | 81 |

|                                                                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| VIII. 4. Corrélation entre le SDI et le taux de segmentation embryonnaire :                                                                   | 81  |
| IX. Etude de la relation qualité du génome spermatique<br>et la qualité embryonnaire :.....                                                   | 82  |
| IX. 1. Répartition selon les classes de DFI et la qualité embryonnaire :.....                                                                 | 82  |
| IX. 2. Corrélation entre le DFI et la qualité embryonnaire :.....                                                                             | 83  |
| IX. 3. Répartition selon le SDI et la qualité embryonnaire :.....                                                                             | 85  |
| IX. 4. Corrélation selon le SDI et la qualité embryonnaire :.....                                                                             | 85  |
| X. Etude de la relation qualité du génome spermatique et résultats<br>de la micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïde :.....        | 87  |
| X.1 Etude de la relation qualité l'ADN spermatique<br>et résultats de la micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïde :...             | 87  |
| X .2. Etude de la relation qualité de la chromatine spermatique<br>et résultats de la micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïde :.. | 88  |
| XI. Relation entre qualité du génome spermatique et résultat des naissances :                                                                 | 89  |
| XII. Croisement entre le taux de condensation de la chromatine et le taux de<br>fragmentation de l'ADN spermatique :.....                     | 89  |
| <b>Discussion Générale et Conclusion</b>                                                                                                      |     |
| DISCUSSION GENERALE :.....                                                                                                                    | 93  |
| CONCLUSION :.....                                                                                                                             | 105 |
| <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :</b> .....                                                                                                    | 109 |
| <b>ANNEXES :</b> .....                                                                                                                        | 135 |

## Liste des abréviations

|          |                                                          |
|----------|----------------------------------------------------------|
| 8-OHdG:  | 8 désoxyguanosine                                        |
| AB :     | Aniline Blue                                             |
| ADN:     | Acide désoxyribonucléique                                |
| ADP:     | Adénosine diphosphate                                    |
| AMP :    | Assistance médicale à la procréation                     |
| ART :    | Artificial reproductive technology                       |
| BT :     | Blue de toluidine                                        |
| CAMKIV : | Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-dependent Protein Kinase IV |
| CMA3:    | Chromomycin A3                                           |
| CpG :    | Cytosine-Guanine Dinucleotide                            |
| DFI :    | DNA Fragmentation Index                                  |
| DNMT 1:  | DNA methyl-transférases                                  |
| DNMT 2:  | DNA methyl-transférases                                  |
| DNMT 3:  | DNA methyl-transférases                                  |
| DNMT a:  | DNA methyl-transférases                                  |
| DNMT b:  | DNA methyl-transférases                                  |
| DNMTL:   | DNA methyl-transférases Like                             |
| EOR :    | Espèces oxygénées réactives                              |
| FIV :    | Fécondation in vitro                                     |
| FIVc:    | Fécondation in vitro classique                           |
| FSH:     | Hormone folliculo-stimulante                             |
| GnRH:    | Gonadotropin-Releasing Hormone                           |
| H1:      | Histone 1                                                |
| H3t :    | Histone 3 transition                                     |
| HATs     | Histones acétyltransférases                              |
| HcG :    | Hormone Gonadotrophine Chorionique                       |
| HCS :    | Holocarboxylase Synthétase                               |
| HDACs :  | Histones désacétylases                                   |

HMTs : Histones méthyltransférases  
HP1 : Heterochromatin Protein 1  
ICSI : Intra -cytoplasmique sperm injection  
IIC : Insémination intra-cervicale  
IIU: Insémination intra-utérine  
IMSI : Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection).  
LH: Hormone lutéinisante  
MPGF: Male Pronucleus Growth Factors  
P1 : Protamine 1  
P2 : Protamines 2  
PARP: Poly ADP-ribose polymérase  
PMA: Procreation médicament assistée  
ROS: Reactive Oxygen Species  
SCD : Sperm chromatin dispersion  
SCSA: Sperm chromatin structure assay  
SDI: Sperm decondensation index  
SGCE: Single cell gel electrophoresis  
Spermatogonie A d: Spermatogonie A dark  
Spermatogonie A p: Spermatogonie A pale  
SUMO: Small Ubiquitin-like Modifier  
TdT: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase  
TMS: Test de migration et de survit  
TPs : Transition protein  
TP1: Transition protein 1  
TP2 : Transition protein 2  
TUNEL : Terminal Uridine Nick-End labeling

## Liste des Figures

|             |                                                                                                                      |    |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1 :  | Représentation de différents niveaux d'organisation du génome humain                                                 | 09 |
| Figure 2 :  | Représentation des différentes modifications post traductionnelle des histones                                       | 12 |
| Figure 3 :  | Schémas représentatif des divisions cellulaires lors de la spermatogénèse                                            | 16 |
| Figure 4 :  | Représentation du profil de la méthylation chez l'homme                                                              | 18 |
| Figure 5 :  | Représentation schématique de la synthèse des protamines                                                             | 22 |
| Figure 6 :  | Représentation de la restructuration de la chromatine au cours la spermatogénèse                                     | 23 |
| Figure 7 :  | Représentation de la liaison de l'ADN et des protamines                                                              | 24 |
| Figure 8 :  | Organisation moléculaire du noyau spermatique                                                                        | 25 |
| Figure 9 :  | Comparaison entre le processus de compaction du génome somatique et le processus de compaction du génome spermatique | 25 |
| Figure 10 : | Représentation de la répartition Protamines/histones dans le noyau spermatique                                       | 26 |
| Figure 11 : | Apoptose abortive au cours de la spermatogénèse                                                                      | 31 |
| Figure 12 : | Les différentes sources des espèces oxygénées réactives et leur impact sur l'intégrité de l'ADN spermatique          | 33 |
| Figure 13 : | Représentation Schématique des différentes causes de la fragmentation de l'ADN spermatique                           | 35 |
| Figure 14 : | Les différentes techniques d'évaluation de l'intégrité du génome spermatique                                         | 38 |
| Figure 15 : | Distribution des patients selon le type d'infertilité                                                                | 55 |
| Figure 16 : | Distribution des patients selon la tranche d'âge                                                                     | 55 |
| Figure 17 : | Distribution des patientes selon la tranche d'âge                                                                    | 58 |
| Figure 18 : | Distribution des patientes selon le nombre d'ovocytes recueillis                                                     | 58 |
| Figure 20 : | Distribution des embryons selon le grade                                                                             | 60 |
| Figure 21 : | Distribution des patients selon les deux classes de DFI                                                              | 62 |
| Figure 22 : | Distribution des patients selon les trois classes de DFI                                                             | 62 |

|             |                                                                                |    |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 23 : | Répartition des patients selon le SDI                                          | 63 |
| Figure 24 : | Corrélation entre SDI et DF                                                    | 64 |
| Figure 25 : | Distribution des patients selon l'âge et les deux classes de DFI               | 65 |
| Figure 26 : | Distribution des patients selon l'âge et les trois classes de DFI              | 65 |
| Figure 27 : | Corrélation entre l'âge des patients et le DFI                                 | 65 |
| Figure 28 : | Distribution selon l'âge des patients et le SDI                                | 66 |
| Figure 29 : | Corrélation entre l'âge des patients et le SDI                                 | 66 |
| Figure 30 : | Distribution selon les deux classes de DFI<br>et la durée de stérilité         | 67 |
| Figure 31 : | Distribution selon les trois classes de DFI<br>et la durée de stérilité        | 67 |
| Figure 32 : | Corrélation entre le DFI et la durée de stérilité                              | 68 |
| Figure 33 : | Distribution selon le SDI et la durée de stérilité                             | 68 |
| Figure 34 : | Corrélation entre le DFI et stérilité des patients                             | 69 |
| Figure 35 : | Distribution selon les deux classes de DFI<br>et la concentration spermatique  | 70 |
| Figure 36 : | Distribution selon les trois classes de DFI<br>et la concentration spermatique | 70 |
| Figure 37 : | Corrélation entre DFI et la concentration spermatique.                         | 71 |
| Figure 38 : | Distribution des patients selon le SDI et<br>la concentration spermatique      | 71 |
| Figure 39 : | Corrélation entre le SDI et la concentration spermatique                       | 72 |
| Figure 40 : | Distribution selon les deux classes de DFI et la mobilité<br>spermatique       | 72 |
| Figure 41 : | Distribution selon les trois de DFI et mobilité spermatique                    | 73 |
| Figure 43 : | Distribution des patients selon le SDI et<br>la mobilité spermatique           | 74 |
| Figure 44 : | Corrélation entre le SDI et la mobilité spermatique                            | 74 |
| Figure 45 : | Corrélation entre le DFI et les anomalies céphaliques<br>du spermatozoïde      | 75 |
| Figure 46 : | Corrélation entre le SDI et les anomalies céphaliques<br>du spermatozoïde      | 75 |

|             |                                                                              |    |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 47 : | Distribution selon les deux classes de DFI et le taux de fécondance          | 77 |
| Figure 48 : | Distribution selon les trois classes de DFI et le taux de fécondance         | 78 |
| Figure 49 : | Comparaison du taux de fécondance pour<br>les DFI $\leq 30\%$ - DFI $> 60\%$ | 78 |
| Figure 50 : | Corrélation entre le DFI et le taux de fécondance                            | 78 |
| Figure 51 : | Distribution selon le SDI le taux de fécondance                              | 79 |
| Figure 51 : | Distribution selon le SDI le taux de fécondance                              | 79 |
| Figure 52 : | Corrélation entre le SDI et le taux de fécondance                            | 79 |
| Figure 53 : | Corrélation entre le DFI et le taux de segmentation embryonnaire             | 80 |
| Figure 54 : | Corrélation entre le SDI et le taux de segmentation embryonnaire             | 82 |
| Figure 55 : | Corrélation entre le DFI et la qualité embryonnaire                          | 84 |
| Figure 56 : | Corrélation entre le SDI et la qualité embryonnaire                          | 86 |

## Liste des Tableaux

|               |                                                                                    |    |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau 1 :   | Répartition des patients selon leurs paramètres spermatiques                       | 56 |
| Tableau 2 :   | Répartition selon le taux de concentration spermatique après TMS                   | 56 |
| Tableau 3 :   | Répartition selon la mobilité spermatique après TMS                                | 57 |
| Tableau 4 :   | Répartition des patients selon leur mode de vie                                    | 57 |
| Tableau 5 :   | Répartition des couples selon le nombre de zygotes                                 | 59 |
| Tableau 6 :   | Répartition des couples selon le nombre d'embryons obtenus                         | 60 |
| Tableau 7 :   | Répartition selon le grade des embryons transférés et le taux d'implantation       | 61 |
| Tableau 8 :   | Technique de micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïde                   | 61 |
| Tableau 9 :   | Taux de décondensation de la chromatine selon les deux classes de DFI              | 63 |
| Tableau 10 :  | Taux de décondensation de la chromatine selon les trois classes de DFI             | 64 |
| Tableau 11 :  | DFI des patients selon leur mode de vie                                            | 76 |
| Tableau 12 :  | SDI des patients selon leur mode de vie                                            | 77 |
| Tableau 13 :  | Répartition selon les deux classes de DFI et le taux de segmentation embryonnaire  | 80 |
| Tableau 14 :  | Répartition selon les trois classes de DFI et le taux de segmentation embryonnaire | 80 |
| Tableau 15 :  | Répartition selon le SDI et le taux de segmentation embryonnaire                   | 81 |
| Tableau 16 :  | Répartition selon les deux classes de DFI et la qualité embryonnaire               | 83 |
| Tableau 18 :  | Répartition selon le SDI et la qualité embryonnaire                                | 85 |
| Tableaux 19 : | Eude de la relation qualité l'ADN spermatique et résultats                         |    |

|                    |                                                                                                               |     |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|                    | de la micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïde                                                     | 88  |
| Tableaux 20 :      | Eude de la relation qualité de la chromatine spermatique<br>et résultats de la fécondation in vitro           | 88  |
| Tableaux 21 :      | Relation entre qualité du génome spermatique<br>et résultat des naissances                                    | 89  |
| Tableaux 22 a :    | Croisement entre le taux de condensation de la chromatine<br>et le taux de fragmentation de l'ADN spermatique | 90  |
| Tableaux 22 b<br>: | Croisement entre le taux de condensation de la chromatine<br>et le taux de fragmentation de l'ADN spermatique | 91  |
| Tableau 22 c :     | Croisement entre le taux de condensation de la chromatine<br>et le taux de fragmentation de l'ADN spermatique | 92  |
| Tableau 23 a :     | Répartition selon les deux seuils de DFI                                                                      | 101 |
| Tableau 23 b :     | Répartition selon les trois seuils de DFI                                                                     | 101 |
| Tableau 24 :       | Répartition des patientes selon le SDI du conjoint                                                            | 102 |

## ملخص

العقم عند الرجال هو مرض شائع نسبيا له عدة اسباب منها اسباب وراثية. بوجود تقنية التلقيح الاصطناعي وبتوفر عملية المساعدة على الانجاب اصبح لهؤلاء الرجال القدرة على ذلك ولكن عدة أسئلة تطرح حول المعلومات الوراثية والجينية المرسله إلى النسل، وطرائق انتقالها. لقد قمنا بدراسة وراثية، التي أجريت على 101 شخص مرشحين مع زوجاتهم لعملية المساعدة على :على الإنجاب، وقد أجريت هذه الدراسة الجينية باستخدام أدوات علم الوراثة الخلوية فتحصلنا النتائج التالية

نوعية المعلومة الوراثية والجينية تأثر على نوعية وكمية الحيوانات المنوية ( $p > 0.05$ ). فيما يتعلق بالعوامل السلوكية والسمية والبيئية، مثل التوافد على ينابيع ساخنة و التدخين . لقد أظهرت دراستنا أن هذه العوامل لم تؤثر على جودة الجينوم المنوي. ومع ذلك ، يبدو أن التدخين يغير بنية الكروماتين لفئة معينة من المرضى ( $p = 0.03$ ) وفيما يتعلق بنتائج عملية التلقيح الاصطناعي اظهرت النتائج التي توصلنا اليها ان نوعية الجينوم لا يبدو أنها تؤثر في عملية الإخصاب أو على كمية و جودة الأجنة المتحصل عليها من طرف الأزواج ( $p > 0.05$ ) تشير نتائجنا أيضًا إلى أن جودة الجينوم المنوي لا تبدو مرتبطة بالحمل. ومع ذلك، يبدو أنها تأثر على عمليات الإجهاض وعلى معدل المواليد ( $p = 0.064$ ) علاوة على ذلك، فإن خلية نطفية حاملة لحمض نووي سليم ذو نوعية جيدة مدعوم ب كروماتين ضعيفة البنية قد يعطي اعلى نسبة ل المواليد.

**المفردات الاستدلالية :** العقم عند الرجال / نوعية الجينوم المنوي / تجزئة الحمض النووي للحيوانات المنوية / تفكيك بنية كروماتين الحيوانات المنوية

## **RESUME :**

L'infertilité masculine est une pathologie relativement fréquente, pour les hommes présumés stériles l'étiologie génétique peut être une cause de cette anomalie. Grâce aux nouvelles techniques de Procréation Médicalement Assistée, des hommes infertiles peuvent aujourd'hui devenir des pères biologiques. Mais des interrogations se posent sur l'information génétique et épigénétique transmis à la descendance, et les modalités de cette transmission.

Une étude génétique est réalisée sur 101 patients masculins infertiles candidats à la procréation médicalement assistée, les patients sont inscrits avec leurs conjointes dans un programme de micro injection intra-cytoplasmique du spermatozoïde.

L'étude a été menée dans un cadre prospective par l'utilisation des outils de la cytogénétique. Aussi, deux approches ont été tenté afin d'apprécier la qualité du génome spermatique. Nous avons d'une part analysé la qualité de l'ADN spermatique, en mesurant le taux de dégradation et de fragmentation de ce dernier. D' autre part, nous avons exploré la qualité de la chromatine spermatique en mesurant son taux de décondensation.

L'étude de l'association entre la qualité du génome spermatique et les différents facteurs spermiologiques classiques, a montré que l'altération de la spermatogénèse est liée à une détérioration du génome spermatique. Concernant les facteurs comportementaux, toxiques et environnementaux l'étude a montré que ces derniers ne semblent pas agir sur la qualité du génome spermatique des patients. Néanmoins, l'intoxication tabagique semble altérer la structure de la chromatine de certains de patients ( $p = 0.03$ )

L'évaluation des différents paramètres lié au statut de la Procréation Médicalement Assistée, notamment ceux de la micro-injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde, indique que les altérations de la qualité du génome spermatique ne semblent pas influencer le processus de fécondation et le développement embryonnaire préimplantatoire ( $p > 0.05$ ).

Par ailleurs les résultats indiquent que la qualité du génome spermatique ne semble pas être liée aux grossesses, néanmoins, cette dernière semble agir sur les avortements.

Concernant les naissances, l'intégrité du noyau spermatique semble influencer le taux de naissance ( $p = 0.064$ ) cependant une cellule spermatique différencié possédant un ADN non altéré peut donner une naissance même si sa chromatine est mal structuré voire décondensé.

**Mot clés :** Infertilité masculine / Qualité du génome spermatique / Fragmentation de l'ADN spermatique / Décondensation de la chromatine spermatique.

## **Abstract:**

Male infertility is a relatively common pathology; the genetic etiology may be a cause of this abnormality for these males presumed sterile. Thanks to new techniques of Medically Assisted Procreation that infertile men could become biological fathers. However, some questions about the genetic and epigenetic information transmitted to the offspring as well as the modalities of this transmission are raised.

A genetic study was carried out over 101 infertile male patients candidates for the Medically Assisted Procreation, these subjects are registered with their spouses in a schedule of intra-cytoplasmic microinjection of the spermatozoon. This study was performed in a prospective setting using cytogenetic tools. Two approaches have been tried in order to assess the quality of the sperm genome. One by analyzing the quality of sperm DNA by measuring the rate of degradation and fragmentation of the latter, another by exploring the quality of spermatid chromatin by measuring its decondensation rate.

The study of the association between the quality of the spermatid genome and the various classical spermiological factors shows that the alteration of spermatogenesis is related to a deterioration of the spermatid genome. Regarding the behavioral, toxic and environmental factors, our study showed that these factors did not act on the quality of the spermatid genome. Nevertheless, smoking intoxication seems to alter the chromatin structure of a specific category of patients ( $p = 0.03$ ). The evaluation of the various parameters was related to the status of Medically Assisted Reproduction especially those of microinjection into cytoplasmic sperm. Our results showed that alterations in the quality of the spermatid genome do not influence either the fertilization process or preimplantation embryonic development ( $p > 0.05$ ). Our findings indicate also that the quality of the spermatid genome is not related to pregnancy. Nonetheless, it may have an impact on abortions. Regarding births, the integrity of the spermatid nucleus may influence the birth rate ( $p = 0.064$ ). Moreover, a differentiated sperm cell with an unaltered DNA can give birth even if its chromatin is poorly structured or even decondensed.

**Keywords:** Male infertility / Spermatid genome quality / Sperm DNA fragmentation / Sperm chromatin decondensation.

### **INTRODUCTION :**

L'infertilité d'un couple est décrite par l'organisation mondiale de la santé comme étant, l'incapacité d'une femme en âge de procréer de concevoir ou d'obtenir une grossesse au-delà d'un délai de 12 mois de vie commune. Elle représente un réel problème de santé publique et elle est considérée comme une pathologie à part entière.

De nos jours, 10 à 15 % des couples ont des difficultés à procréer et le facteur causal masculin tient une part importante, environ 60% des cas, seul ou associé à un facteur féminin (Agarwal *et al.*, 2015).

En effet, pour pallier aux apparentes difficultés liées à l'infertilité et pour permettre aux couples présumés stériles de pouvoir procréer, un ensemble de pratiques cliniques et biologiques est mise en place. Il est regroupé sous le nom de Procréation Médicalement Assistée (PMA).

Ces disciplines médicales tentent de remédier à l'infécondité des couples, en particulier la technique de micro-injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde qui a révolutionné la prise en charge des couples dont le conjoint souffre d'une infertilité. Cette dernière consiste en l'injection directe d'une cellule mâle ou spermatozoïde dans le cytoplasme de l'ovocyte ou la cellule femelle, permettant ainsi une activation cellulaire du processus de fécondation (Palermo *et al.*, 1992).

Le diagnostic de l'infertilité masculine est un élément primordial qui repose essentiellement sur des bilans andrologiques tel que, le spermogramme ou le spermocytogramme. Ces examens biologiques nous renseignent sur des éléments spermiologiques conventionnels comme, la numération, la mobilité, la vitalité et la morphologie du spermatozoïde, sans donner une information sur la qualité et l'intégrité du génome de celui-ci.

Depuis des années, il est admis que les anomalies génétiques peuvent affecter le potentiel de fertilité des hommes. Ces dernières peuvent être ordonnancées en deux classes ; les anomalies d'ordre chromosomique, comprenant les anomalies de nombre ou de structure

et les anomalies d'ordre moléculaire, elles sont géniques affectant un ou plusieurs gènes spécifiques (Tiepolo *et al.*, 1976).

L'essor de la biologie moléculaire et de la génétique médicale a permis d'explorer de nouvelles pistes et par la même, la découverte de nouvelles étiologies géniques dans le cadre de l'infertilité masculine (Sakkas *et al.*, 1999).

En effet, lors de ces dernières décennies, les investigations de l'infertilité masculine passent par l'exploration de l'intégrité du génome spermatique. Cette dernière, consiste à l'étude de l'altération de l'ADN spermatique, par la présence de cassures simples et/ou doubles brins, traduisant une fragmentation de ce dernier. Ou encore, l'analyse de la structure de la chromatine du noyau spermatique, à travers l'évaluation du taux de condensation ou de compaction de cette dernière.

Aussi, la structure du noyau spermatique, qui est le support de l'information génétique, subit une réorganisation intégrale. Une condensation globale est alors mise en place et elle est liée à un remplacement de la plus grande partie des histones somatiques classiques par d'autres protéines nucléaires caractéristiques du noyau spermatique. Donnant ainsi, une évolution particulière dans la condensation et dans la mise en place de la structure tertiaire du noyau spermatique. Cette compaction spécifique de la chromatine spermatique interagit avec l'ADN et joue un rôle dans la mise en place de l'information génétique et épigénétique, apportée par le gamète mâle. D'où l'importance de savoir si la cellule spermatique utilisée, pour une technique de fécondation artificielle, communique une information génique appropriée à la progéniture (Faure *et al.*, 2004).

La qualité du noyau spermatique peut être considérée comme étant un réel facteur pronostique des résultats de la procréation médicalement assistée, notamment dans le cadre de la technique de micro-injection intra cytoplasmique de spermatozoïde (Benchaib *et al.*, 2007).

L'objectif de notre travail est une contribution à porter des réponses aux cliniciens à propos d'une problématique rassemblant un certain nombre d'interrogations à savoir :

- L'avilissement du génome masculin chez l'homme infertile est-il souvent accompagné de la formation d'une spermatogénèse altérée.
- Dans le cadre de l'assistance médicale à la procréation, quelle fonction joue le génome paternel dans l'échec ou la réussite du processus de la fécondance.
- La qualité du génome paternel influence-t-elle le déroulement des premiers stades de division cellulaire lors du processus préimplantatoire. Qu'elle est son impact sur la qualité des embryons obtenus.
- Quel rôle joue le génome paternel lors du déroulement d'une gestation et qu'elle est son impact dans la genèse des avortements.
- L'intégrité du noyau spermatique agit-t-elle sur le taux de naissances lors des fécondations in vitro avec micro-injection intra cytoplasmique du spermatozoïde.
- Comment évaluer la qualité nucléaire du génome masculin chez des patients souffrant de stérilité masculine. Cette dernière question a pour rôle la mise en place d'une thérapeutique médicale de l'infertilité.

Aussi, notre étude consiste d'une part, en une investigation de la qualité du noyau spermatique des hommes présumés infertiles. Nous avons abordé en premier lieu, l'exploration des lésions de l'ADN spermatique à travers l'analyse du taux de fragmentation et dans un second lieu, l'exploration de la structure de la chromatine spermatique pour l'appréciation du taux de décondensation de cette dernière.

D'autre part, nous avons tenté de comprendre le rôle du noyau spermatique sur l'évènement de la fécondance ; le taux de clivage, le développement embryonnaire précoce, le processus de la gestation et l'impact du génome masculin sur les fausses couches prématurées et sur le taux des accouchements.

### **I. Les causes de l'infertilité masculine :**

Les causes de l'infertilité masculine sont variées et souvent multifactorielles, se traduisant dans la plus part des cas par une anomalie quantitative et/ou qualitative du sperme (Agarwal *et al.*, 2015).

Parmi les causes rapportées dans la littérature nous trouvons : les troubles érectiles et éjaculatoires, les causes endocriniennes, les causes testiculaires, les causes obstructives et les causes génétiques. Plusieurs facteurs d'infertilité peuvent coexister chez un même patient (Schlosser *et al.*, 2007).

#### **I.1 - Les causes pré testiculaire :**

L'axe hypothalamo-hypophysaire induit et entretient la spermatogenèse dès l'âge de la puberté par l'intermédiaire des gonadotrophines : (la FSH et la LH). L'atteinte congénitale génétique, anatomique tumorale, traumatique, ischémique ou toxique de cet axe est responsable d'un hypogonadisme hypogonadotrophique, ou autres pathologies qui empêchent et interrompent l'activation testiculaire nécessaire à la production de spermatozoïdes (Schlosser *et al.*, 2007).

#### **I.2 -Les causes testiculaires :**

Les testicules peuvent être soumis à des lésions congénitales ou acquises qui affectent leurs activités exocrines et altèrent le déroulement de la spermatogenèse à savoir : la cryptorchidie, la varicocèle ou encore les infections testiculaires (Young, 2016).

#### **I.3 - Les causes post testiculaires :**

Des maladies telles que les infections ou les lésions accidentelles lors d'une chirurgie au niveau du tractus génital, peuvent atteindre les voies génitales et causer des obstructions. Ces affections empêchent l'évacuation des spermatozoïdes en dehors du testicule (Young, 2016).

#### **I.4 -Les causes idiopathiques :**

A côté de ces principaux mécanismes, il reste des infertilités masculines dites « idiopathiques » inexpliquées où l'étiologie est difficile à identifier avec les outils

diagnostiques actuels mais qui relèvent certainement d'un mécanisme non identifié (Young, 2016).

### **II. Organisation du génome dans les cellules somatiques :**

Dans les cellules eucaryotes, l'ADN est associé à des protéines constitutionnelles pour former une structure nucléoprotéique complexe appelée la chromatine (Figure 1). Cette chromatine est localisée dans un compartiment spécialisé : le noyau. Il y a environ deux mètres d'ADN confiné dans un noyau de quelques micromètres de diamètre, il est réparti en 46 chromosomes. Malgré ce degré de compaction, l'ADN doit être accessible à toute la machinerie qui contrôle sa réplication, sa transcription et sa réparation. Les découvertes majeures sur la structure de la chromatine ont été faites avec les avancées de la microscopie électronique au cours des années 1970. Les observations de microscopie électronique montrent un chapelet de particules reliés les uns aux autres par un filament d'ADN (Olins et Olins, 1974). Cette particule élémentaire a été nommée "nucléosome" (Olins et Olins, 1974 ; Oudet *et al.*, 1975). Le nucléosome cette unité de base de la chromatine est formé d'un cœur de protéines appelées les histones qui sont au nombre de huit (2H2A, 2H2B, 2H3 et 2H4), sur lesquels s'enroulent 146 paires de bases d'ADN.

#### **II. 1. Les histones :**

Les histones sont de petites protéines très basiques, très conservées au cours de l'évolution riches en résidus lysine et arginine, cette composition particulière leur confère une charge globale positive qui va leur permettre d'interagir avec l'ADN chargé négativement (Luger *et al.*, 1997; Richmond et Davey., 2003). L'association des histones avec l'ADN neutralise une grande partie de ses charges négatives et permet ainsi son repliement sur lui-même et donc sa compaction.

##### **II, 1. 1. Les histones de cœur :**

Les histones dites de cœur ont un poids moléculaire de : 14 kDA pour le H2A et le H2B, 15 kDA pour le H3 et 11 kDA pour le H4. Elles sont composées d'un domaine central globulaire structuré appelé « *histone fold* » très conservé au cours de l'évolution et d'une extrémité amino et carboxy-terminales, appelées « *queues des histones* » qui sont plus variables et non structurées. Ces extrémités sont le site des modifications post-traductionnelles.

L'histone fold, est composée de trois hélices reliées entre elles par des boucles flexibles qui constituent un motif de dimérisation et permet aux histones d'interagir entre elles via des interactions de nature hydrophobe. Ces interactions sont appelées "poignée de mains" ("handshake"). Elles permettent aux histones de s'assembler en un octamère, en forme disque de 11 nm de diamètre et de 5,6 nm de hauteur, autour duquel s'enroule l'ADN, sans qu'il y ait de contact entre les bases. La position de l'ADN nucléosomale est déterminée par la structure du cœur protéique. L'ADN et les histones interagissent en 14 positions, toutes les dix paires de bases environ. Au niveau des douze positions les plus centrales, la chaîne latérale d'arginine interagit avec le petit sillon d'ADN par des liaisons hydrogènes, hydrophobes, électrostatiques et des interactions de Van der Waals. (Arents *et al.*, 1991).

### **II. 1. 2. Les histones de liaison ou Histone H1 :**

L'histone H1 appelée l'histone de liaison est une protéine basique qui présente une structure tripartite constituée d'un domaine globulaire riche en lysine et une longue extrémité N et C terminale (Kasinsky *et al.*, 2001). Son domaine globulaire à un diamètre de 2,9 nm présentant une structure protéique avec trois hélices  $\alpha$  (Ramakrishnan, 1997). Son extrémité C-terminal est fortement chargée, elle lui confère cette capacité unique de se lier à l'ADN internucléosomale par des interactions électrostatiques non spécifiques ce qui conduit à une compaction considérable de la chromatine (Allan *et al.*, 1980 ; Allan *et al.* 1986 ; Subirana, 1990 ; Misteli *et al.*, 2000). Cela va faciliter le changement de sa structure vers des formes d'ordre supérieur plus condensées (Van *et al.*, 1989). Les histones H1 sont très importantes à la fois pour le maintien de la structure de la chromatine et pour la régulation de l'expression des gènes et ils sont sujet à de nombreuses modifications post-traductionnelles (Dootz *et al.*, 2011).

### **II. 2. Les différents niveaux d'organisation de la chromatine :**

La chromatine est organisée en plusieurs niveaux de compaction cette compaction est mis en place afin de permettre à l'ADN de 2 mètres de se positionner dans un espace très réduit de l'ordre du micromètre.

#### **II. 2.1. La fibre de chromatine de 11 nm :**

La fibre de chromatine de 11 nm est le premier niveau d'organisation où 146 paires de bases d'ADN s'enroulent autour de l'octamère d'histone formant ainsi le nucléosome.

Les nucléosomes sont liés entre eux par l'ADN inter-nucléosomale d'ordre de 20 à 80 paires de bases, ce qui permet de produire un nucléo filament qui ressemble à un collier de perles avec une taille de 11 nm de diamètre. Ce premier niveau d'organisation assure un raccourcissement de l'ADN au  $1/6^{\text{ème}}$  de sa taille de départ (Olins et Olins, 2003 ; Martins *et al.*, 2012 ).

### **II.2.2. La fibre de chromatine de 30 nm :**

Le deuxième niveau d'organisation répond à la compaction du nucléo-filament. Des interactions spécifiques vont se faire entre les nucléosomes de la fibre de chromatine de 11 nm pour parachever à la formation de la fibre de chromatine de 30 nm. Ce second niveau d'organisation aboutirait à un raccourcissement de la fibre de chromatine de 11 nm de 6 fois sa taille. La stabilité de cette fibre semble dépendre de la présence de l'histone H1 (Thomas et Oudet., 1979), pour sa structure une école de pensée favorise l'arrangement en spirale ou en solénoïde, « *start helix* », (Finch et Klung , 1976 ; Robinson *et al.*, 2006). Une autre école propose plutôt une structure en zigzag « *two-start helix* » (Woodcock *et al.*, 1984 ; Dorigo *et al.*, 2004). Il a également été proposé que la fibre de 30 nm puisse adopter alternativement la configuration solénoïde ou la configuration zigzag (Grigoryev , 2009).

### **II.2.3. La fibre de chromatine de 300 nm :**

La fibre de 30 nm est capable de se replier et de former des structures plus complexes. Ces repliements d'ordre supérieur permettent d'ordonner une organisation en boucles géantes de chromatine, qui se fixe sur la matrice nucléaire grâce à des régions spécifiques de la molécule d'ADN « *scaffold* » « *matrix attachment regions* ». (Hart et Laemmli , 1998) à ce stade la fibre nucléaire possède un diamètre de 300 nm.

### **II.2.4. Le chromosome métaphasique :**

Le niveau d'organisation le plus compact de la chromatine est observé lors de la métaphase, durant la division cellulaire. Le chromosome métaphasique est obtenu par l'enroulement des fibres chromatiniennes de 300 nm sur elles-mêmes. La molécule d'ADN linéaire est alors compactée environ 10 000 fois (Belmont, 2002).

### **II.3. Compartimentation fonctionnelle de la chromatine :**

Au niveau du noyau cellulaire, la chromatine n'est pas distribuée de façon aléatoire et cet agencement spatial à une grande importance pour le fonctionnement du génome. Schématiquement, il est possible de distinguer deux types de régions dans le noyau qui occupent des domaines distincts, l'euchromatine et l'hétérochromatine.

#### **II. 3. 1. L'euchromatine :**

L'euchromatine constitue une forme relâchée et contient des régions riches en gènes, donc elle est associée à une transcription active des gènes. Les histones de l'euchromatine subissent des modifications poste-traductionnelles qui vont influencer la structure et l'activité transcriptionnelle de cette dernière.

#### **II. 3. 2. Hétérochromatine :**

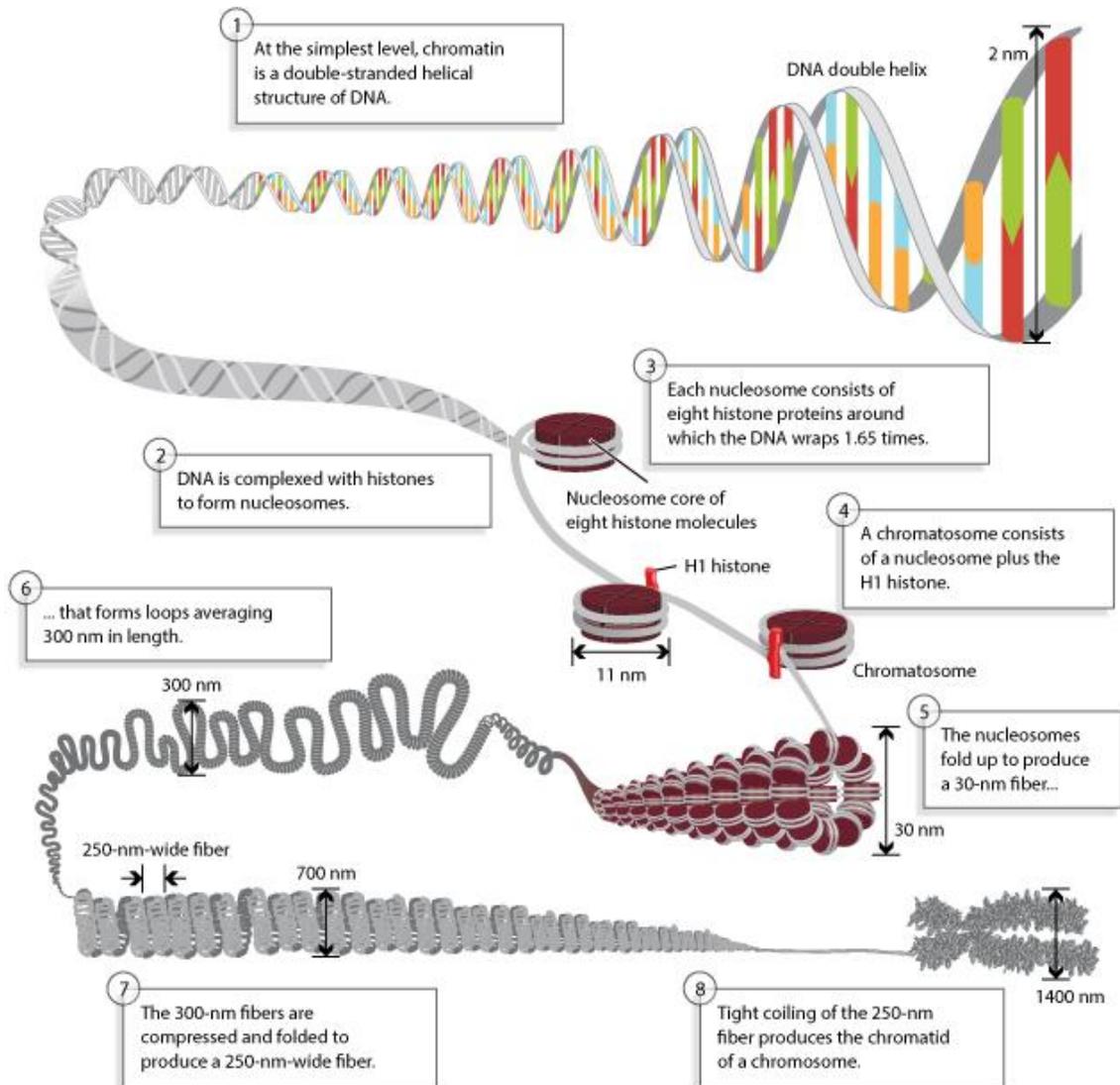
L'hétérochromatine est une structure beaucoup plus compactée que l'euchromatine, pauvre en gènes mais riche en régions répétées. On distingue deux types de séquences : l'hétérochromatine constitutive et l'hétérochromatine facultative.

##### **II.3.2.1. L'hétérochromatine constitutive :**

L'hétérochromatine constitutive se localise spécialement au niveau des centromères et des télomères des chromosomes, elle joue un rôle dans la prestance de l'intégrité du génome condensé qui reste silencieux tout au long de la vie cellulaire. Elle est généralement pauvre en gènes, riche en séquences hautement et moyennement répétées, telles que les séquences satellites (Grewal and Elgin, 2007).

##### **II.3.2.2. L'hétérochromatine facultative :**

L'hétérochromatine facultative est une zone condensée inactive, mais qui peut se décondenser et devenir transcriptionnellement active dans différents contextes, comme l'hétérochromatine facultative du chromosome X des cellules mammifères femelles, ou celle présente au niveau des régions régulatrices de gènes soumis à l'empreinte parentale (Trojer et Reinberg , 2007).



**Figure 1 :** Représentation de différents niveau d’organisation du génome humain d’après Annunziato (2008)

## II.4. L’hétérogénéité de la chromatine :

Il existe une grande hétérogénéité dans l’organisation de la chromatine, Elle joue un rôle majeur dans le contrôle de mécanismes tel que la transcription et représente le support de l’information épigénétique.

### II.4.1. Les modifications post traductionnelle des histones :

Les histones sont souvent la cible de modifications post traductionnelles, cela est lié au rôle majeur qu’elles jouent dans la régulation de la structure et de la fonction du génome.

Il existe quatre types majeurs de modifications post traductionnelles des histones (Figure 2) : l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitination (Strahl et Allis , 2000 ; Jenuwein et Allis , 2001; Shelley et Berger , 2002 ; Turner, 2002). D'autres modifications ont également été décrites telles que l'ADP-ribosylation, la sumoylation, la glycosylation ou la biotinylation. (Henikoff *et al.*, 2004).

### **II.4 .1.1. L'acétylation des histones :**

L'acétylation est le transfert d'un groupement acétyle sur le groupement amino-terminal de certains résidus lysines. La neutralisation de la charge positive du groupement  $\text{NH}_3^+$  de la lysine peut mener à la diminution du contact avec l'ADN nucléosomique qui possède une charge négative, donc cette acétylation altère les interactions électrostatiques liant l'ADN aux histones produisant une chromatine plus flexible et la rendant beaucoup plus accessible au facteur de transcription. (Allegra *et al.*, 1987; Cheung *et al.*, 2000). Deux familles d'enzymes influencent les niveaux d'acétylation des histones : les histones acétyltransférases (HATs) qui ont comme rôle d'ajouter des groupements acétyles aux lysines des histones et les histones désacétylases (HDACs) qui ont un rôle contraire aux HATs, c'est à- dire qu'elles enlèvent les groupements acétyles des histones. Ce phénomène donne lieu à une hypoacétylation qui mène à la répression de la transcription des gènes (Grabher *et al.*, 1994 ; Kuo et Allis, 1998 ; Humphrey *et al.*, 2001).

### **II .4.1.2. La méthylation des histones :**

La méthylation se fait sur des lysines ou des arginines situées sur les extrémités amino-terminales des histones H3 et H4. Cette méthylation est assurée par les histones méthyltransférases (HMTs). Ces modifications biochimiques jouent souvent un rôle dans la formation du caractère mature de la chromatine. (Van Holde , 1989 ; Zhang et Reinberg, 2001). En effet il a été montré que la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 crée un site d'interaction de haute affinité pour la protéine HP1 (Heterochromatin Protein 1), qui est impliquée dans la formation de l'hétérochromatine (Eissenberg et Elgin., 2000). De son côté, la méthylation des arginines semble avoir un effet positif sur la transcription (Zhang et Reinberg, 2001). Le rôle de la méthylation des histones dans la transcription est bien plus complexe que celui de l'acétylation. En effet, pour une même histone, selon le résidu modifié et le nombre de méthylations réalisées, la transcription pourra être activée ou réprimée (Martin et Zhang , 2005).

### **II .4 .1.3. La phosphorylation :**

La phosphorylation est le remplacement d'un groupement hydroxyle par un groupement phosphate des résidus sérine, thréonine et tyrosine des histones H3 et H4. Elle est réalisée grâce à l'action des kinases, par contre la réaction inverse est catalysée les phosphatases. La phosphorylation joue un rôle dans l'activation transcriptionnelle de la chromatine, dans la condensation des chromosomes mitotiques et dans la réparation de l'ADN (Celeste *et al.*, 2003 ; Nowak et Corces , 2004).

### **II .4 .1.4.l'ubiquitination :**

L'ubiquitination autant que phénomène biochimique est généralement liée à la dégradation d'une protéine par un protéasome. Dans le cas des histones, il s'agit d'une monoubiquitination non dégradative d'une lysine dans le domaine carboxy-terminal des histones H2A ou H2B. Cette modification exerce aussi une fonction dans la formation de l'hétérochromatine et dans la régulation de la transcription. Les enzymes responsables sont les ubiquitines ligases (Jason *et al.*, 2002). Il a été rapporté qu'un défaut d'ubiquitination de H2B, dans les souris mâles entraîne chez eux une stérilité (Roest *et al.*, 1996).

### **II .4 .1.5 .l'ADP ribosylation :**

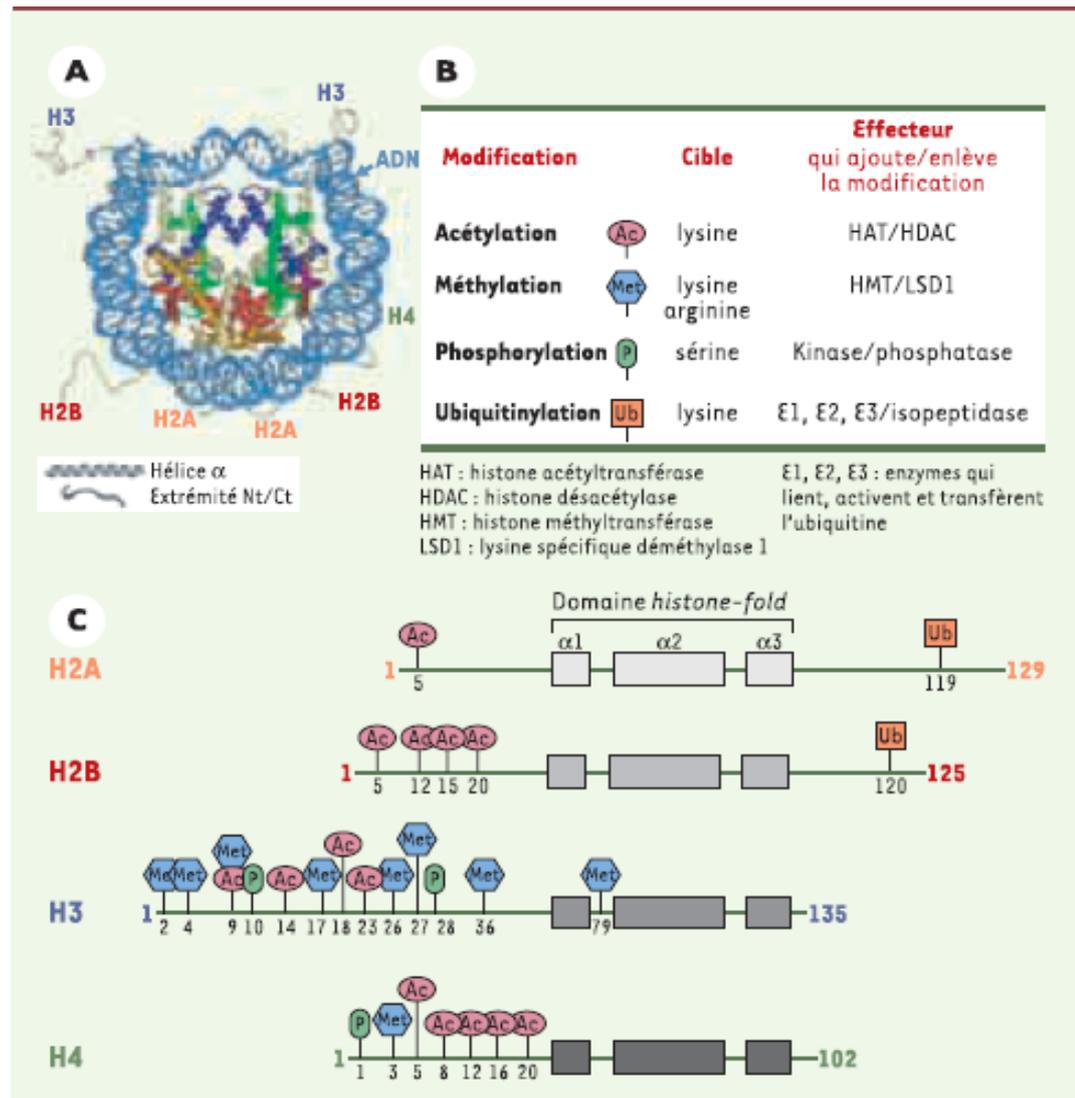
l'ADP ribosylation intervient dans de nombreux processus des cellules vivantes, notamment la signalisation cellulaire, la réparation de l'ADN, la régulation de l'expression génétique et l'apoptose (Corda et Girolamo, 2003). L'ADP-ribosylation est considérée comme étant un élément important du réseau de surveillance du génome des eucaryotes et elle est assurée par la poly ADP-ribose polymérase (PARP), qui détecte et signale les cassures dans l'ADN (de Murcia et de Murcia, 1994).

### **II .4 .1.6. La Sumoylation :**

La Sumoylation est un phénomène assuré par les protéines (SUMO) Small Ubiquitin-like Modifier, qui vont se fixer sur les lysines des H4 entraînant une répression transcriptionnelle de la chromatine (Shiio et Eisenman., 2003).

### **II .4 .1.7. La biotinylation :**

La biotinylation permet de fixer un résidu biotine sur les lysines des histones H3 et H4 par l'intermédiaire de biotinidase ou de holocarboxylase synthétase (HCS) (Camporeale *et al.*, 2004).



**Figure 2 :** Représentation des différentes modifications post traductionnelles des histones d'après Ray (2005)

#### II .4 .2. La méthylation de l'ADN :

Pendant longtemps, le seul support moléculaire connu de l'épigénome était la méthylation de l'ADN. Il s'agit d'une modification biochimique qui aboutit à l'addition d'un groupement méthyl sur le carbone numéro 5 du cycle pyrimidine d'un résidu cytosine de l'ADN. Cette méthylation se produit essentiellement au niveau des enchaînements 5'CG3', appelés îlots CpG et elle est catalysée par les DNA méthyltransférases (DNMT). (Yoder *et al.*, 1997). Dans le génome humain environ 80 % de des CpG sont méthylés (Cheung *et al.*, 2005). Les enzymes qui catalysent cette réaction (DNMT) sont regroupées en trois familles dont chaque une d'elle possède des fonctions bien précises.

-**DNMT1** : c'est une enzyme impliquée dans le maintien de l'information épigénétique et également intervient lors de la réplication cellulaire (Leonhardt *et al.*, 1992 ; Liu *et al.*, 1998 ; Jurkowska *et al.*, 2011).

-**DNMT2** : cette enzyme a toujours montré une activité méthyltransférase faible, elle est usuellement impliquée dans la méthylation de l'ARNt (Herman *et al.*, 2004; Goll *et al.*, 2006 ).

La famille **DNMT 3** comprend deux membres enzymatiquement actifs : la **DNMT3a** et la **DNMT3b** et un facteur régulateur : **DNMT3-Like (DNMT3L)**. La DNMT3a et la DNMT3b sont généralement toutes les deux impliquées dans l'établissement de la mise en place du profil de méthylation des cellules germinales et lors de l'embryogénèse précoce (Okano *et al.*, 1999 ; Goll et Bestor, 2005). Par contre la DNMT3L est une enzyme dont sa principale fonction est d'interagir avec la DNMT3a et la DNMT3b afin de potentialiser leur activité de méthylation de novo in vitro (Chen *et al.*, 2005).

La méthylation de l'ADN est une manifestation impliquée dans la régulation de nombreux processus fondamentaux, comme le contrôle de la régulation de l'expression des gènes, le développement embryonnaire, l'empreinte génomique, ou l'inactivation du chromosome X (Bird, 2002).

### III. Remodelage de la chromatine au cours de la spermatogénèse :

#### III.1. la spermatogénèse :

La spermatogénèse est l'ensemble des processus cellulaires de divisions et de différenciation conduisant à la production des cellules sexuelles mâles matures appelées les spermatozoïdes. Ces processus ont lieu dans les tubes séminifères des testicules de l'homme pubère et ce phénomène se poursuit physiologiquement de façon continue chez l'homme adulte. (Clermont, 1963 ; Dadoune et Demoulin., 1991).

Le testicule est divisé en deux compartiments : un compartiment interstitiel, qui contient plusieurs éléments cellulaires dont les cellules de Leydig responsable de la production et de la sécrétion de la testostérone et un compartiment tubulaire les tubes séminifères qui constituent le siège de la fonction exocrine et qui présentent deux types cellulaires :

### \*. **Les cellules de Sertoli ;**

Cellules nourricières jouant un rôle dans la division et dans la différenciation des cellules de la lignée germinale et constituant la barrière hémato- testiculaire.

### \*. **Les cellules germinales :**

Par leurs divisions et leurs transformations successives, elles assurent la formation des spermatozoïdes.

-Nous avons plusieurs types de cellules germinales :

#### \* **Les spermatogonies :**

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 en (1963) : les spermatogonies Ad, à chromatine dense, d'aspect sombre, les spermatogonies Ap, à chromatine pale poussiéreuse, d'aspect clair et les spermatogonies B, à chromatine mottée et irrégulière.

#### \* **Les spermatocytes primaires :**

Les spermatocytes primaires sont de grandes cellules au noyau arrondi contenant plusieurs nucléoles.

#### \* **Les spermatocytes secondaires :**

Les spermatocytes secondaires sont des cellules au noyau arrondi avec une chromatine homogène.

#### \* **Les spermatides :**

Les spermatides sont des cellules ovoïdes de petite taille avec 6 à 7  $\mu\text{m}$  de diamètre à noyau rond et clair et un appareil de Golgi juxta nucléaire.

#### \* **Les spermatozoïdes :**

Les spermatozoïdes sont des cellules finales issus de la différenciation du spermatide.

### **III. 2. Le déroulement de la spermatogénèse :**

Le déroulement de la spermatogénèse à lieu en trois phases : la phase de multiplication, la phase de maturation nucléaire ou la méiose et en dernier vient la phase de différenciation ou la spermiogénèse.

#### **III. 2.1. La phase de multiplication :**

La phase de division met en jeu les spermatogonies ; cellules diploïdes à 2n chromosomes, qui sont le siège des divisions classiques, les spermatogonies de type Ad peuvent être considérées comme des cellules-souches de la spermatogénèse. Elles se divisent par une série de mitoses en deux spermatogonies filles, l'une d'entre-elles

contribuera à renouveler le stock des cellules souches et l'autre se divisera en deux spermatogonies Ap. Les spermatogonies Ap vont se diviser à leur tour pour donner via mitose cellulaire deux spermatogonies B. Ces dernières donneront par mitoses des spermatocytes primaires (spermatocyte I).

### **III. 2.2. La phase de maturation nucléaire ou la méiose :**

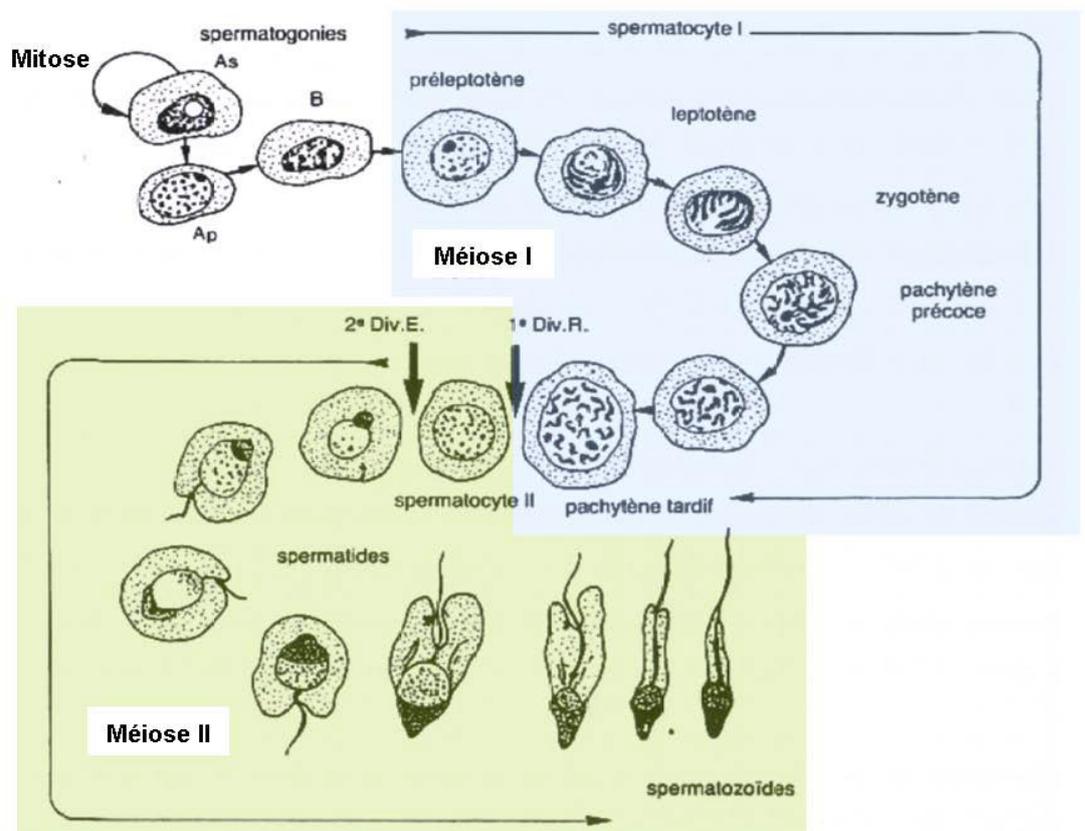
Au cours de cette phase le spermatocyte primaire entre en méiose cellulaire qui comprend deux divisions ; la méiose I dite réductionnelle et la méiose II dite équationnelle.

La méiose I débute par une prophase très longue qui conçoit cinq phases ; leptotène, zygotène, pachytène, diplotène, diacinèse. Pendant la phase préleptotène (la phase S de l'interphase) le spermatocyte I synthétise l'ADN nécessaire à la réplication des chromosomes. Durant le stade leptotène les chromosomes se condensent. Au niveau du stade zygotène on observe un appariement des chromosomes homologues grâce à l'assemblage des complexes synaptonémaux. Vers le stade pachytène il y aura l'échange de matériel génétique entre ces chromosomes homologues par le phénomène du crossing-over qui garantit le brassage de l'information génétique. Dans cette étape le taux de transcription augmente par une décondensation de la chromatine. Les complexes synaptonémaux formés au stade zygotène se rompent au stade diplotène, entraînant la séparation des chromosomes homologues. La diacinèse se démarque par la disparition de l'enveloppe nucléaire. Vient ensuite la métaphase dans laquelle les chromosomes s'alignent sur la plaque équatoriale, après vient l'anaphase où chaque paire de chromosomes migre de façon aléatoire vers un pôle cellulaire différent. Dernièrement arrive la cytodivision qui se caractérise par la reformation de l'enveloppe nucléaire. Les deux cellules résultant de cette première division méiotique se nomment les spermatocytes secondaires (Spermatocytes II). Ces spermatocytes secondaires entrent en méiose II phase équationnelle qui se constitue d'une interphase courte et sans synthèse d'ADN préalable, puis la prophase puis la métaphase II, où les chromosomes comme en métaphase I, s'alignent sur la plaque équatoriale et durant l'anaphase II, les chromatides sœurs se séparent aléatoirement vers chacun des pôles de la cellule. La cytodivision dernière phase conduit à la formation de deux spermatides cellules haploïdes à n chromosomes. (Figure 3).

## III .2.3. La phase de différenciation ou la spermiogénèse :

La phase de différenciation ou la spermiogénèse ne comporte pas de division cellulaire mais une différenciation du spermatide en spermatozoïde et elle comporte cinq stades (Dadoune et Demoulin, 1991) (figure 4) à savoir :

- Formation de l'acrosome à partir de l'appareil de golgi
- Formation du flagelle à partir du centre cellulaire
- Formation du manchon mitochondrial
- Isolement du reste cytoplasmique
- Condensation du noyau



**Figure 3 :** Schémas représentatif des divisions cellulaires lors de la spermatogénèse d'après Dadoune et Demoulin (2001)

### **III. 3. La restructuration de la chromatine au cours de la spermatogénèse :**

Au cours de la spermatogénèse, le noyau de la cellule germinale subit une série d'évènements spécifiques au niveau de la chromatine, ces événements commencent au cours des premières divisions cellulaires mitotiques où l'ADN subit une méthylation afin de mettre en place l'empreinte paternelle. Par la suite au cours des deuxièmes divisions cellulaires de types méiotiques, aura lieu l'échange de segments entre chromosomes homologues afin d'assurer un brassage génétique. Enfin après les divisions cellulaires, on assistera à une réorganisation totale de la chromatine ainsi qu'une condensation globale, associée à l'enlèvement de la plus grande partie des histones de cœur et leur remplacement par des protéines nucléaires spécifiques du noyau spermatique. Ces changements de la chromatine sont également accompagnés par de nombreuses modifications post-traductionnelles des histones ainsi que l'incorporation de nombreux variants.

#### **III.3.1. Dynamique de la méthylation de l'ADN :**

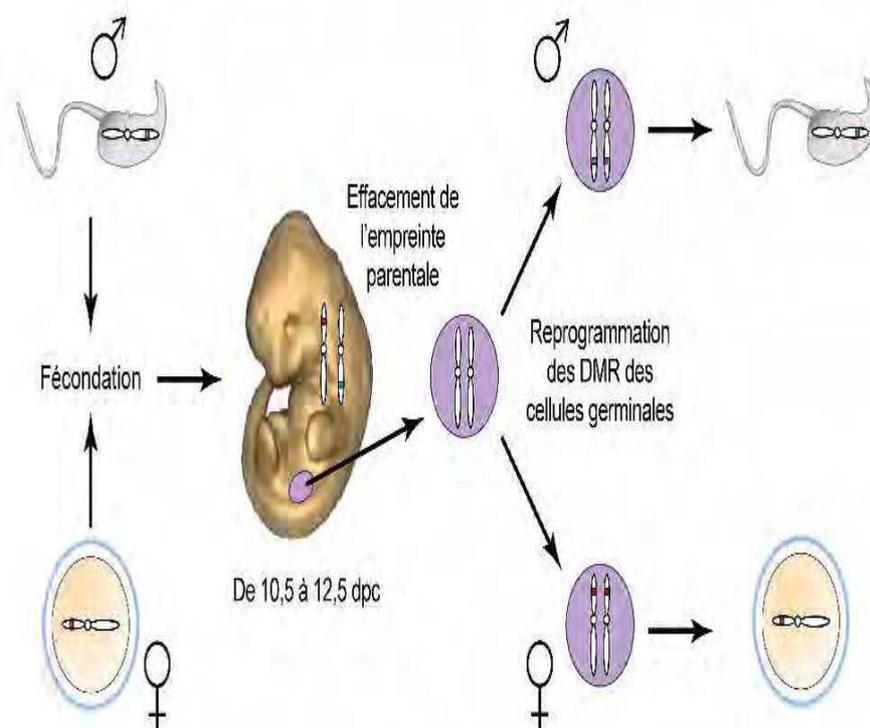
Dans le tissu somatique de l'adulte, les profils de méthylation de l'ADN sont en majorité stables cependant, on observe un remaniement draconien de ces profils lors de la gamétogénèse et dans la période du développement embryonnaire. Ainsi, au cours de ces périodes, les profils globaux de méthylation sont complètement réprimés. Cela débute par une vague de déméthylation massive suivi par une vague de re-méthylation de novo ou de maintien tout aussi massif ensuite une dernière déméthylation qui peut être active ou passive (Figure 4), permettant ainsi une reprogrammation du génome des cellules germinales primordiales leur assurant leur caractère totipotent, lequel est indispensable au développement d'un nouvel individu (Grandjean et Rousseaux., 2006).

Au cœur de la spermatogénèse et plus précisément au niveau des spermatogonies, ainsi que dans les spermatocytes en début de méiose, la reprogrammation du génome spermatique et le bouleversement dans son processus de méthylation joue un rôle important dans :

La différenciation des cellules germinales au cours de la gamétogénèse en facilitant le recrutement de certains variants d'histones nécessaires à la stabilité de la chromatine spermatique. Des travaux ont montré que la méthylation de l'ADN est indispensable pour

la différenciation des cellules germinales (Kelly *et al.*, 2003) et qu'un défaut de méthylation pouvait être à l'origine d'anomalies spermatiques et une infertilité chez l'homme. (Benchaib *et al.*, 2006 ; Kobayashi *et al.*, 2007).

La mise en place de L'empreinte parentale qui est un mécanisme de régulation génique qui se manifeste par une expression monoallélique de certains gènes. Cette méthylation spécifique se déroule dans des régions appelées « DMRs » (differentially methylated regions) ou « ICR » (imprinting control regions) (Mann, 2001 ; Li, 2002).



**Figure 4 :** Représentation du profil de la méthylation chez l'homme d'après Noblanc (2013)

### **III.3.2. Dynamique des modifications post-traductionnelles des histones :**

Dans les cellules germinales les modifications post- traductionnelles des histones, telles que l'acétylation, la phosphorylation, la méthylation et l'ubiquitination sont cruciales pour la régulation structurale et fonctionnelle de la chromatine. Ces modifications seraient impliquées dans le remplacement des histones par les

protamines, donc ils participent à la régulation du degré de condensation de la chromatine spermatique (Figure 6) (Rousseaux *et al.*, 2004 ; Grandjean et Rousseaux, 2006)

### **III.3.2.1. Le profil d'acétylation des histones :**

La modification post-traductionnelle des histones de cœur, de type acétylation est une action très importante. Elle est observée dès les premiers stades de la division cellulaire au niveau des spermatogonies et des spermatocytes primaires. Cette acétylation des histones a pour rôle de soutenir et faciliter l'action de la machinerie de la réplication et d'augmenter l'activité de la transcription lors des mitoses. Une diminution des vagues d'acétylation est observée au cours la méiose. Ensuite une autre série d'acétylation des histones se met en place lors de la spermiogénèse au niveau des spermatides (Meistrich *et al.*, 1992 ; Hazzouri *et al.*, 2000 ; Sonnack *et al.*, 2002 ; Faure *et al.*, 2003) plusieurs études affirment que cette acétylation servirait de signal pour le recrutement de facteurs et de complexes permettant la condensation et la réorganisation totale de la chromatine. (Pivot-Pajot *et al.*, 2003 ; Rousseaux *et al.*, 2004 ; Grandjean et Rousseaux, 2006 ).

### **III.3.2.2. Le profil de la phosphorylation des histones :**

La phosphorylation des histones a été mise en évidence pendant les divisions cellulaires de la gamétogénèse. Ce mécanisme est nécessaire pour la condensation des chromosomes au cours des mitoses et méioses cellulaires (Hendzel *et al.*, 1997 ; Wei *et al.*, 1998). Il serait aussi important pour le clivage lors des recombinaisons méiotiques (Mahadevaiah, 2001). La phosphorylation transitoire de certains histones est primordiale pour leur remplacement lors de la spermatogénèse, elle affecte et détermine le taux d'acétylation lui-même nécessaire pour ces replacements (Rousseaux *et al.*, 2004 ; Krishnamoorthy *et al.*, 2006). La phosphorylation joue aussi un rôle crucial dans la réparation des cassures doubles brins de l'ADN liées à la recombinaison des chromosomes homologues (Celeste *et al.*, 2002).

### **III.3.2.3. Le profil de la méthylation des histones :**

Les histones subissent une méthylation lors de la méiose cellulaire en particulier au niveau des régions péri-centromériques, pour éviter la formation d'un appariement non homologues entre deux chromosomes. (Sasaki et Matsui, 2008). Une autre méthylation survient au cours des évènements cellulaires post-méiotique, elle joue un rôle lors du

déplacement des histones conventionnelles et elle est impliquée dans l'établissement et/ou la maintenance de l'empreinte génomique au cours de la spermatogenèse (Hayashi *et al.*, 2005 ; Godmann *et al.*, 2009 ; Dottermusch-Heidel *et al.* 2014b ; Hammoud *et al.*, 2014 ; Samson *et al.*, 2014 ; Zhang *et al.*, 2014).

### **III.3.2.4. Le profil de l'ubiquitination des histones :**

L'ubiquitination des histones au cours de la spermatogénèse est un phénomène important retrouvé dans plusieurs espèces (Jason *et al.*, 2002). L'ubiquitination comme les autres phénomènes facilite le remplacement des histones par leurs variants (Roest *et al.*, 1996).

### **III.3.2.5. Incorporation des variants d'histones :**

Au cours de la spermatogenèse, plusieurs variants d'histone tel que la H3t remplacent les histones somatiques conventionnelles, nombre d'entre eux sont incorporés au cours de la méiose et jouerait un rôle important dans cette phase de la spermatogenèse (Malik *et al.*, 2003 ; Govin *et al.*, 2004 ; Rousseaux *et al.*, 2005) .

Bien que les fonctions de ces variant ne soient pas encore clairement établies, il est clair que certaines d'entre eux sont probablement impliquées dans des événements méiotiques, tels que les recombinaisons entre chromosomes homologues et lors la ségrégation des chromosomes (Smith *et al.*, 2002). Les variants des histones comme les histones du cœur nucléosomique subissent des modifications post-traductionnelles. (Roussaux *et al.*, 2004).

Vers la fin vient le remplacement des histones somatiques ainsi que leurs variants par des protéines de transition ensuite nous aurons l'addition finale des protamines, menant à une chromatine fortement compactée.

### **III.3.2.6. Incorporation des protéines de transition :**

Au cours de la différenciation des spermatides, la chromatine subit des transitions structurales majeures où le génome haploïde est globalement réorganisé. La plupart des histones sont enlevées et remplacées par des protéines de transition (TPs), elles-mêmes remplacées par d'autres protéines nucléaires à savoir les protamines. Chez l'homme, il y

a deux types de protéines de transition (TP1, TP2). La TP1 apparaît dans le noyau des spermatides au niveau des stades 3 et 4 de la spermiogénèse alors que TP2 est présente dans le noyau des spermatides depuis le stade 1 jusqu'au stade 5 de ce processus (Steger *et al.*, 1998).

Les protéines de transition représentent 90 % des protéines basiques de la chromatine à ce stade de la spermatogénèse (Meistrich *et al.*, 2003). Des souris TP1 nulles produisent des spermatozoïdes subnormaux, et leur fertilité est réduite, malgré l'expression augmentée de TP2. Des souris TP2 nulles ont une spermatogénèse pratiquement normale, avec des testicules de taille normale et des spermatozoïde normaux, mais ils sont hypofertiles (Drabent *et al.*, 2000 ; Lin *et al.*, 2000).

D'après une étude plus approfondie sur la structure des noyaux de spermatozoïdes provenant des souris, la protéine TP2 serait un facteur important pour la maturation des dernières protéines nucléaires ; les protamines, et donc elle est nécessaire pour la finalisation de la condensation de la chromatine (Drabent *et al.*, 2000).

### **III.2.2.7. Incorporation et mis en place des protamines :**

Dans les derniers stades de la spermiogénèse, au stade de l'élongation, l'ADN du noyau spermatique est majoritairement associé à des protéines spécifiques appelées les protamines. Ces dernières vont radicalement modifier la conformation et l'organisation spatiale de la chromatine spermatique. Les protamines sont les protéines les plus abondantes du noyau spermatique, elles ont un faible poids moléculaire, elles sont très basiques riches en arginines et en cystéines (Oliva et Dixon 1991a ; Wouters-Tyrou *et al.*.,1998 ; Lewis *et al.*, 2004).

Dans l'espèce humaine, il existe deux types de protamines : Protamine 1 (P1), Protamines 2 (P2). Elles sont présentes en quantité équivalente dans le noyau spermatique, le rapport P1/P2 est proche de 1. Leur poids moléculaire représente la moitié de celui des histones (Balhorn *et al.*, 1988 ; Barone *et al.*.,1994 ; Fuentes- Mascorro\_2000 ; Steger *et al.*, 2000 ; Corzett *et al* 2002 : Aoki *et al.*.,2006).

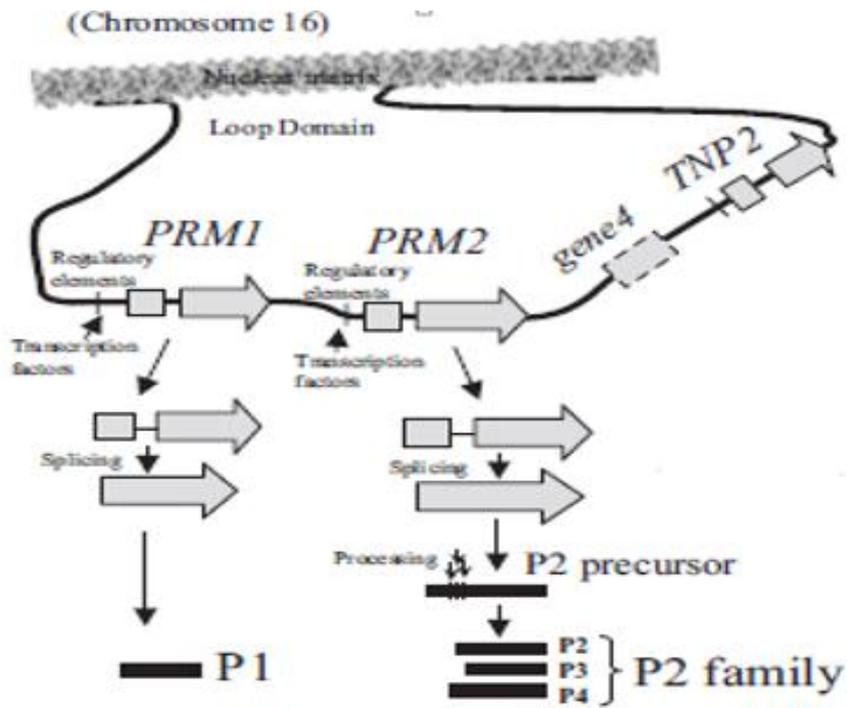
Ces protéines sont issues de deux gènes différents situés sur le bras court du chromosome 16 (Queralt et Oliva., 1993 ; Schlüter *et al.*, 1996 ; Balhorn *et al.*, 2007). La protamine P1 est formée de 50 acides aminés synthétisés d'emblée de façon mature par contre la P2

contient 57 acides aminés synthétisés sous la forme d'un précurseur de 103 acides aminés (Figure 5) (Chauvière *et al.*, 1992 ; Green *et al.*, 1994; Queralt *et al.*, 1995 ; Wouters-Tyrou *et al.*, 1998 ; Aoki et Carrell 2003).

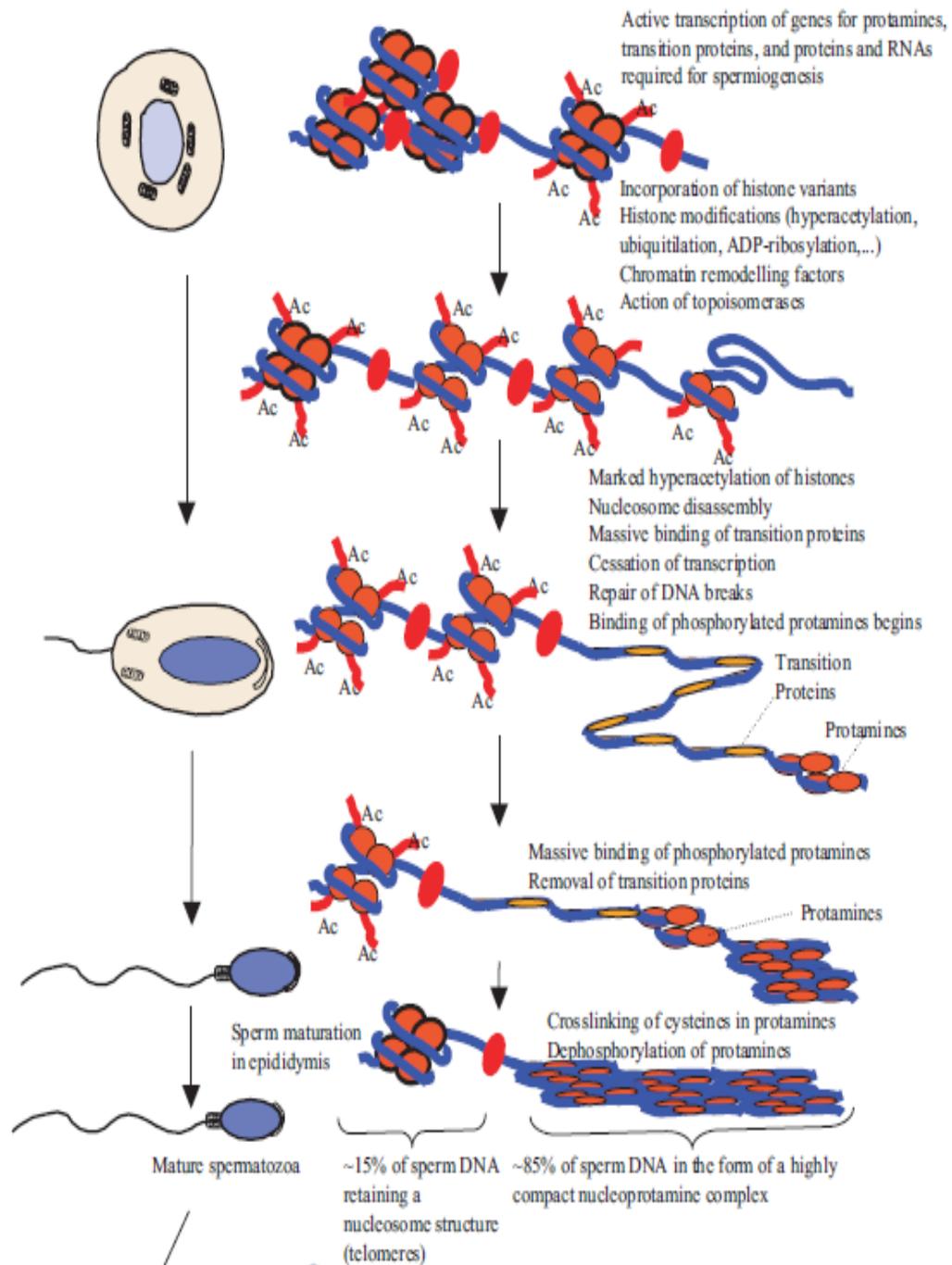
Les protamines P1 et P2 présentent 50% d'homologie, elles sont toutes les deux riches en arginines qui représentent 50% de leurs acides aminés totaux, ces molécules d'arginines les rendent plus basiques et leur confèrent une charge positive qui va neutraliser la charge négative de l'ADN permettant d'avantage un rapprochement entre la chaîne phosphodiesteres de l'ADN et ces protéines nucléaires (Brewer, 1999). D'autres acides aminés sont présents au niveau des protamines tel que les histidines avec leur groupe imidazole et les cystéines avec leur fonction thiol qui permettent la réalisation de ponts disulfures intra et inter protamine renforçant ainsi la condensation de la chromatine. (Balhorn., 1982).

Les protamines P1 et P2 sont toutes les deux phosphorylées ; la phosphorylation de la P1 est catalysée par l'enzyme Serine/Arginine protein specific Kinase I et celle de P2 par l'enzyme Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent-Protein-KinaseIV (CAMKIV).

La phosphorylation permet leur insertion au sein de l'ADN, mais une fois liées à ce dernier, elles sont à nouveau déphosphorylées . Leur insertion au sein de la molécule d'ADN est réalisée grâce à la topoisomérase II, qui déroule la molécule d'ADN et crée des cassures double brin afin de faciliter la mise en place des protamines (Olivia *et al.*, 2006 ; Carrell *et al.*, 2007 ; Angelopoulo *et al.*, 2007 ; Schulte *et al.*, 2010)



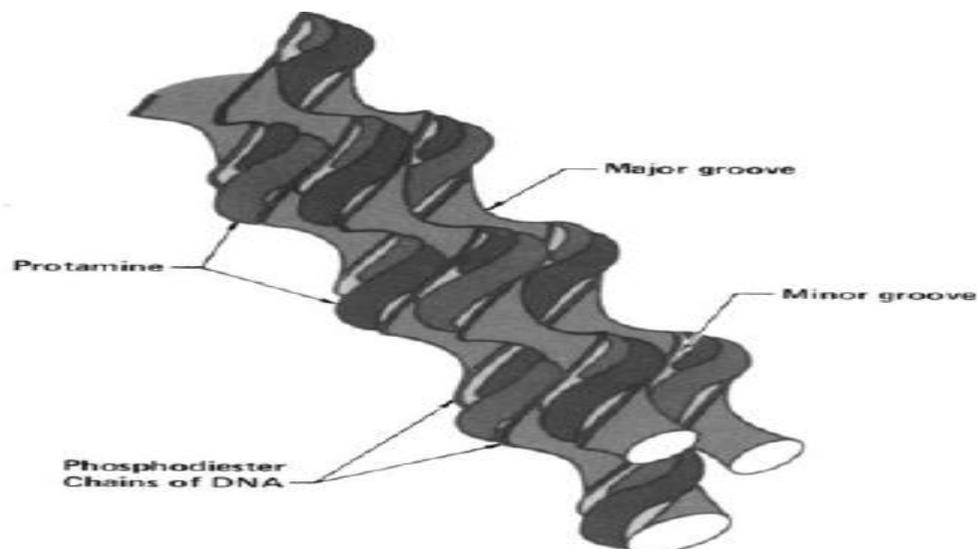
**Figure 5 :** Représentation schématique de la synthèse des protamines d'après Oliva *et al* (2006)



**Figure 6 :** Représentation de la restructuration de la chromatine au cours de la spermatogénèse d'après Oliva *et al* (2006)

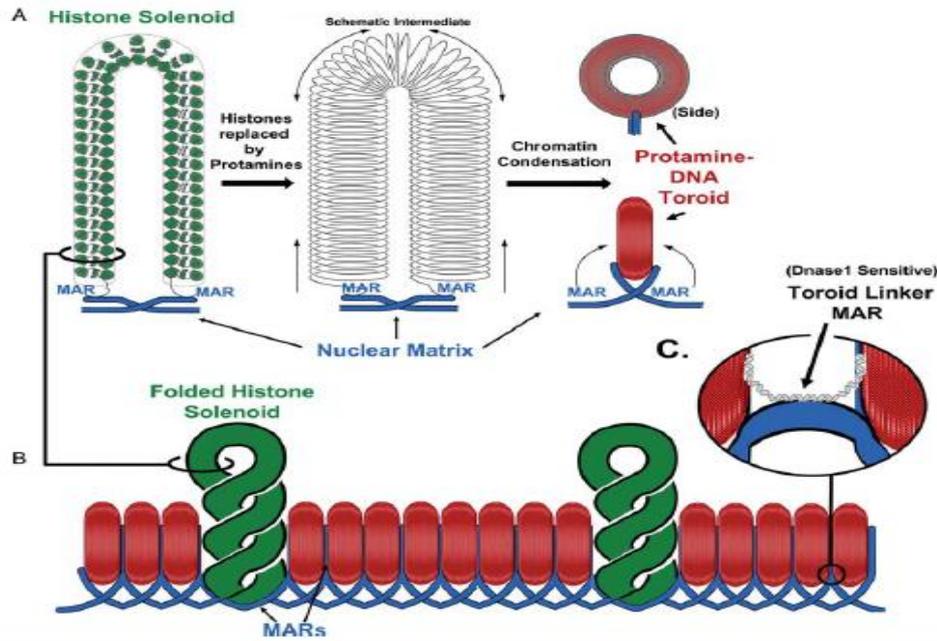
### IV. L'Architecture finale du noyau spermatique :

L'ADN du gamète mâle, est une longue molécule fragile mais fortement compactée. En 1982 Balhorn a présenté un modèle de liaison entre l'ADN et les Protamines (Figure 7) ; les Protamines qui se lient à l'ADN se trouvent en longueur à et l'intérieur du sillon, le complexe Protamine-ADN d'un brin s'insère dans le sillon majeur d'un autre brin d'ADN voisin, de sorte que les brins d'ADN du noyau spermatique soient compactés côte à côte dans une rangé linéaire. Les brins d'ADN sont ensuite étroitement enroulés autour des molécules de protamines pour former une structure toroïdale, celles-ci à une forme d'un beignet (Figure 8) (Hud *et al.*, 1995 ; Braun., 2001 ; Hud et Vilfan, 2005). Chaque boucle contient 60 000 paires de bases et mesure 900 Å de diamètre externe, 150 Å de diamètre interne, 200 Å d'épaisseur, un total de 50 000 boucles est présent dans le noyau du spermatozoïde (Fuentes-Mascorro, 2000). Les ponts disulfures inter et intra-protamines se forment entre les protamines riches en cystéines cette étape est responsable de la compaction et de la stabilisation du complexe ADN –Protamines ainsi la stabilité de tout le noyau spermatique (Rizk *et al.*, 2008). Cette structure hautement organisée permet d'obtenir un noyau 6 à 20 fois plus compacté que celui des cellules somatiques (Figure 9) (Aoki et Carrell, 2003). On assiste à une répression totale de la transcription avec une extinction globale des gènes (Rousseaux *et al.*, 2004).

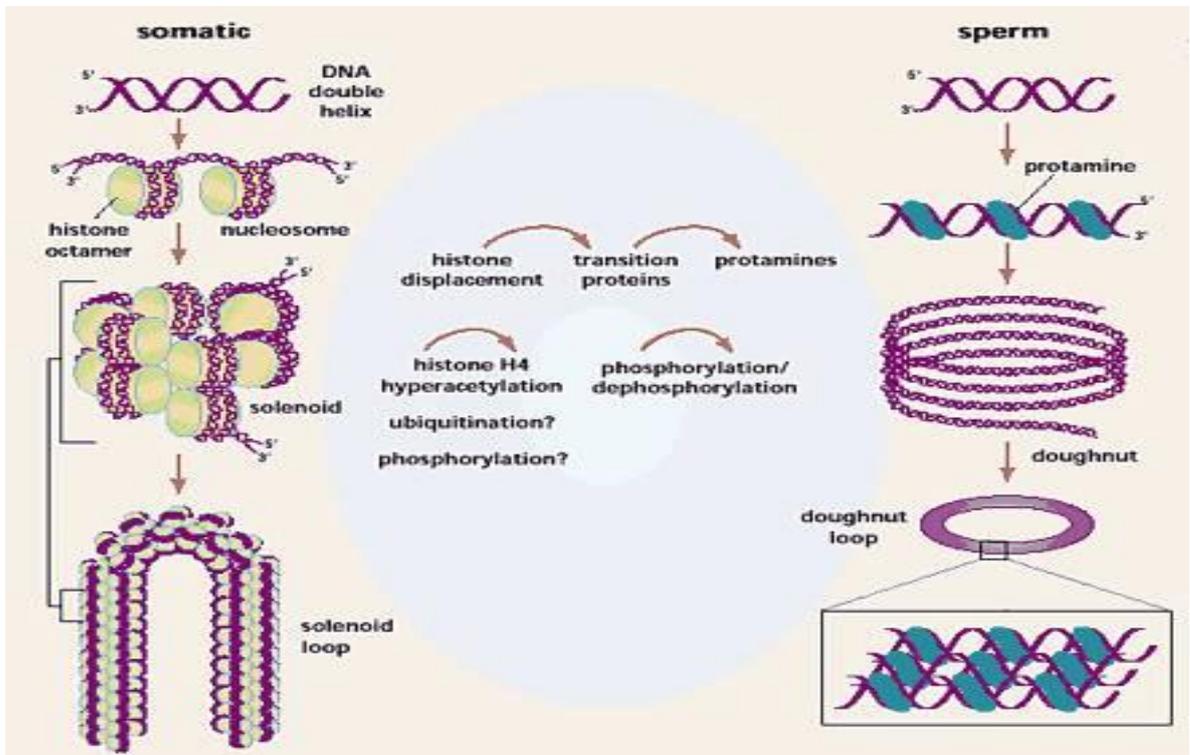


**Figure 7 :** Représentation de la liaison de l'ADN et des protamines

d'après Balhorn *et al* (1982)

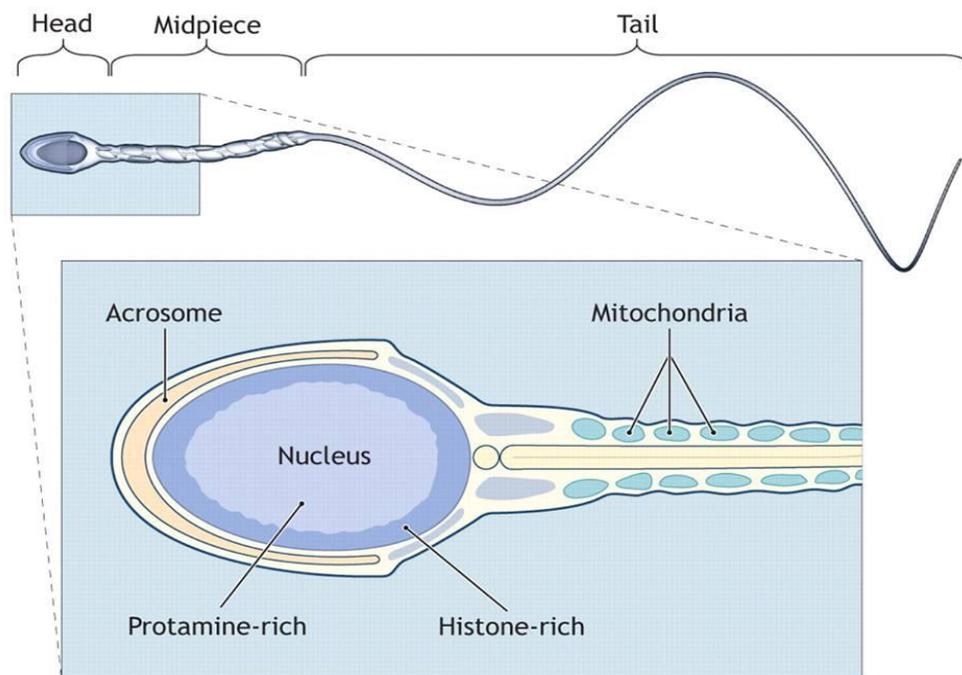


**Figure 8 :** Organisation moléculaire du noyau spermatique d'après Ward *et al* (2010)



**Figure 9 :** Comparaison entre le processus de compaction du génome somatique et le processus de compaction du génome spermatique d'après Braun *et al*, (2010)

Au final 85% de la chromatine spermatique est étroitement ancrée à des protamines et que 15% du reste de l'ADN reste liés à des histones qui représentent les nucléosomes somatiques persistants, situés à la périphérie nucléaire et au niveau des télomères (Figure 10) (Gusse *et al.*, 1986 ; Gatewood *et al.*, 1987 ; Braun., 2001 ; Sergerie *et al.*, 2005a ; Zini et libman., 2006 ; Oliva et de Mateo ., 2010). Des études suggèrent que les zones de l'ADN attachées aux histones persistant correspondent à des familles de gènes qui sont importantes pour la différenciation cellulaire et la structuration précoce de l'embryon (Gineitis *et al.*., 2000 ; Hammoud *et al.*, 2009 ; Ward *et al.*, 2010).



**Figure 10 :** Représentation de la répartition Protamines/histones dans le noyau spermatique d'après Zini et libman (2006)

La relation entre la fonction et l'organisation structurale du noyau spermatique a été bien établie. La condensation du noyau spermatique permet une amélioration hydrodynamique du spermatozoïde afin d'optimiser la fécondation et permet un transfert de l'information génétique et épigénétique d'une manière appropriée à la descendance. Cette hypercompaction instaure le silence du génome et la reprogrammation de l'empreinte paternelle dans l'ovocyte. Par ailleurs du fait de l'inaccessibilité du génome spermatique par cette condensation spécifique le patrimoine génétique paternel est protégé contre les

différentes agressions auxquelles il va être conforté tout au long de son trajet, du tube séminifère jusqu'au cytoplasme ovocytaire (Oliva *et al.*, 2006 ; Ward *et al.*, 2010).

### **IV. 1. La maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme :**

Durant le transit épидидymaire les spermatozoïdes sont soumis à des modifications morphologiques, métaboliques et biochimiques qui leur permettent d'acquérir leur mobilité et leur pouvoir fécondant (Toshimori, 2003). Leur chromatine aussi continue son évolution elle devient plus compactée, la condensation accrue de la chromatine des spermatozoïdes durant le transit épидидymaire pourrait être due à une activité de jonction des molécules de disulfures (-SH) des résidus de cystéines des protamines spermatiques. Ce qui va connecter les différentes fibres d'ADN entre elles et cheviller leur conformation spatiale afin de les rendre plus résistantes et moins accessibles à de potentiels dangers. Les molécules de cystéines interagissent également avec le zinc présent au niveau de épидидyme afin d'améliorer la stabilité de cette chromatine spermatique (Oliva *et al.*, 2006 ; Ward *et al.*, 2010 ; Barratt , 2010).

### **IV. 2. Le rôle du spermatozoïde dans la fécondation :**

La fécondation humaine implique une succession d'étapes palières aboutissant à l'activation de l'ovocyte. Le spermatozoïde autant que cellule n'est pas qu'un simple vecteur d'ADN au cours de la fécondation (Amann *et al.*, 1993), il transmet une information génétique et épигénétique à la descendance (Rousseaux *et al.*, 2004) et il est responsable de l'activation de nombreuses structures et molécules, qui interviennent non seulement dans la fécondation mais aussi durant le développement embryonnaire précoce. Ainsi, le spermatozoïde initie l'activation métabolique de l'ovocyte et transmet le centriole nécessaire à la mise en place du fuseau mitotique permettant les divisions cellulaires (Storey *et al.*, 1995) . Durant un premier temps le spermatozoïde subit une décondensation de sa chromatine par rupture des ponts disulfures des protamines liées à l'ADN nucléaire, qui seront par la suite remplacées par des histones ovocytaires. Une fois ce processus terminé une enveloppe nucléaire apparait, il y a la formation du pronucléus mâle .Ces mécanismes sont sous la dépendance de facteurs cytoplasmiques ovocytaires tel que le glutathion et le Male Pronucleus Growth Factors (MPGF). Les 23 chromatides restées dans l'ovocyte, après l'expulsion du deuxième globule polaire s'éloignent du cortex, se décondensent et s'entourent d'une membrane nucléaire. Le pronucléus femelle ainsi formé et il est en général plus petit que le pronucléus mâle. Les membranes

spermatiques et ovocytaires fusionneront et le contenu du spermatozoïde s'intégrera alors au cytoplasme ovocytaire. La fécondation est achevée, le développement embryonnaire commence. Ainsi, le spermatozoïde élu aura franchi de nombreux obstacles pour apporter la moitié du patrimoine génétique du futur zygote (Van der Heijden *et al.*, 2006 ; Ajduk *et al.*, 2006).

### **V. Les altérations de la qualité du noyau spermatique :**

L'état de la chromatine du gamète mâle est l'un des paramètres les plus importants pour l'évaluation de la fertilité masculine (Lewis *et al.*, 2013) Au cours de la spermatogenèse la chromatine des gamètes mâles est susceptible d'être altérée. Une fragmentation de l'ADN spermatique se produit alors et son origine n'est pas totalement élucidée. La fragmentation de l'ADN spermatique est un terme employé pour désigner l'état dégradé de l'ADN ; cassures double ou simple brin. Ce phénomène existe physiologiquement chez les cellules germinales et plus spécifiquement au niveau des spermatozoïdes au moment du processus de la protamination (McPherson et Longo, 1993).

De plus de ces phénomènes physiologiques, les altérations de la qualité génome spermatique peuvent être dues à différents facteurs. Tel qu'apoptose désordonnée au cours de la gamétogenèse, défaut de remodelage de la chromatine au cours de sa maturation. Aussi, une présence d'une protamination défectueuse, fragmentation de l'ADN liée à l'existence espèces oxygénés réactives, action des différents facteurs environnementaux, altération de l'ADN spermatique suite à des radiothérapies ou chimiothérapies, altération de l'ADN spermatique dû aux toxines et au tabagisme, pathologies de l'appareil génital masculin comme la varicocèle, la cryptorchidie, une infection testiculaire, ou présence d'une hyperthermie (Figure 13) (Sakkas et Alvarez, 2010).

#### **V.1. Anomalies de la réorganisation de la chromatine spermatique :**

La structure du génome spermatique est globalement remaniée puisque les histones, protéines nucléaires associées à l'ADN dans la cellule somatique, sont pour la plupart d'entre elles, enlevées et remplacées par les protamines, protéines basiques spécifiques du noyau spermatique, donnant une structure hétérogène au noyau spermatique. Cette réorganisation du génome sert de support pour l'information génétique et épigénétique

cruciale dans l'induction de la fécondation et dans le développement de l'embryon (Rousseaux *et al.*, 2005).

Plusieurs études rapportent qu'un déficit quantitatif ou qualitatif des protamines est retrouvé chez des hommes infertiles et porteurs d'anomalies spermatiques (Chen *et al.*, 2005 ; Tavalae *et al.* 2010 ; Travers *et al.*, 2010).

Ce déficit de protamines engendre un défaut de compaction rendant le génome spermatique plus vulnérable aux attaques d'agents génotoxiques endogènes ou exogènes tel que les nucléases, les agents mutagènes ou encore les radicaux libres (Irvine *et al.*, 2000 ; Alvarez *et al.*, 2002 ; Szczygiel *et al.*, 2002 ; Sotolongo *et al.*, 2003).

Une réduction du taux de protamines et un accroissement du taux des histones persistants a été souvent corrélée à une augmentation du taux d'altération et de la fragmentation de l'ADN spermatique (Nasr el safani *et al.*, 2005 ; Aoki *et al.*, 2005b ; Angelopoulou *et al.*, 2007 ; Simon *et al.*, 2011).

Les protéines de transition jouent aussi un rôle important dans la réparation de l'ADN spermatique contre les différentes atteintes génotoxiques et ont un rôle actif dans le maintien de l'intégrité de la chromatine spermatique, une défaillance des protéines de transition peut s'accompagner d'une augmentation accrue de la fragmentation de l'ADN spermatique (Boissonneault *et al.*, 2002; Zaho *et al.*, 2004 ; Venkatesh *et al.*, 2010) .

### **V.2. Défaut de remodelage de la chromatine spermatique :**

Le remodelage de la structure chromatinienne survient au cours de la spermiogénèse, il est considéré comme un processus essentiel pour l'intégrité du génome spermatique et il implique l'apparition, dans l'ensemble de la population des spermatides en élongation, une fragmentation de leur ADN. La formation de ces cassures est réalisée par la Topoisomérase II, cette enzyme produit un changement dans la topologie de la chromatine et permet d'éliminer les super-hélices de l'ADN libre, constituées lors du déplacement des histones somatiques par les protéines de transition qui seront elles-mêmes remplacées par les protamines (Huynh *et al.*, 2002). Ces cassures transitoires seraient réparées en fin de spermiogénèse, ainsi qu'au cours de l'éjaculation (Carrel *et al.*, 2007).

Ces modifications de l'équipement nucléoprotéines par cette Topoisomérase doivent se dérouler convenablement pour éviter la persistance de l'ADN fragmenté dans les spermatozoïdes matures. La fragmentation de l'ADN spermatique peut être due à une

activité inappropriée de la Topoisomérase II, le dysfonctionnement de cette endonucléase peut entraîner un taux excessif de fragments d'ADN spermatique non réparés (McPherson et Longo, 1993 ; Macron *et al.* , 2004) .

### **V .3. Apoptose abortive et fragmentation de l'ADN spermatique :**

Divers processus essentiels interviennent dans le déroulement de la spermatogenèse. Le nombre de cellules germinales au sein du tube séminifère est déterminé grâce à un équilibre dynamique qui se crée entre leur prolifération et leur mort par processus d'apoptose. (Print *et al.*, 2000) .

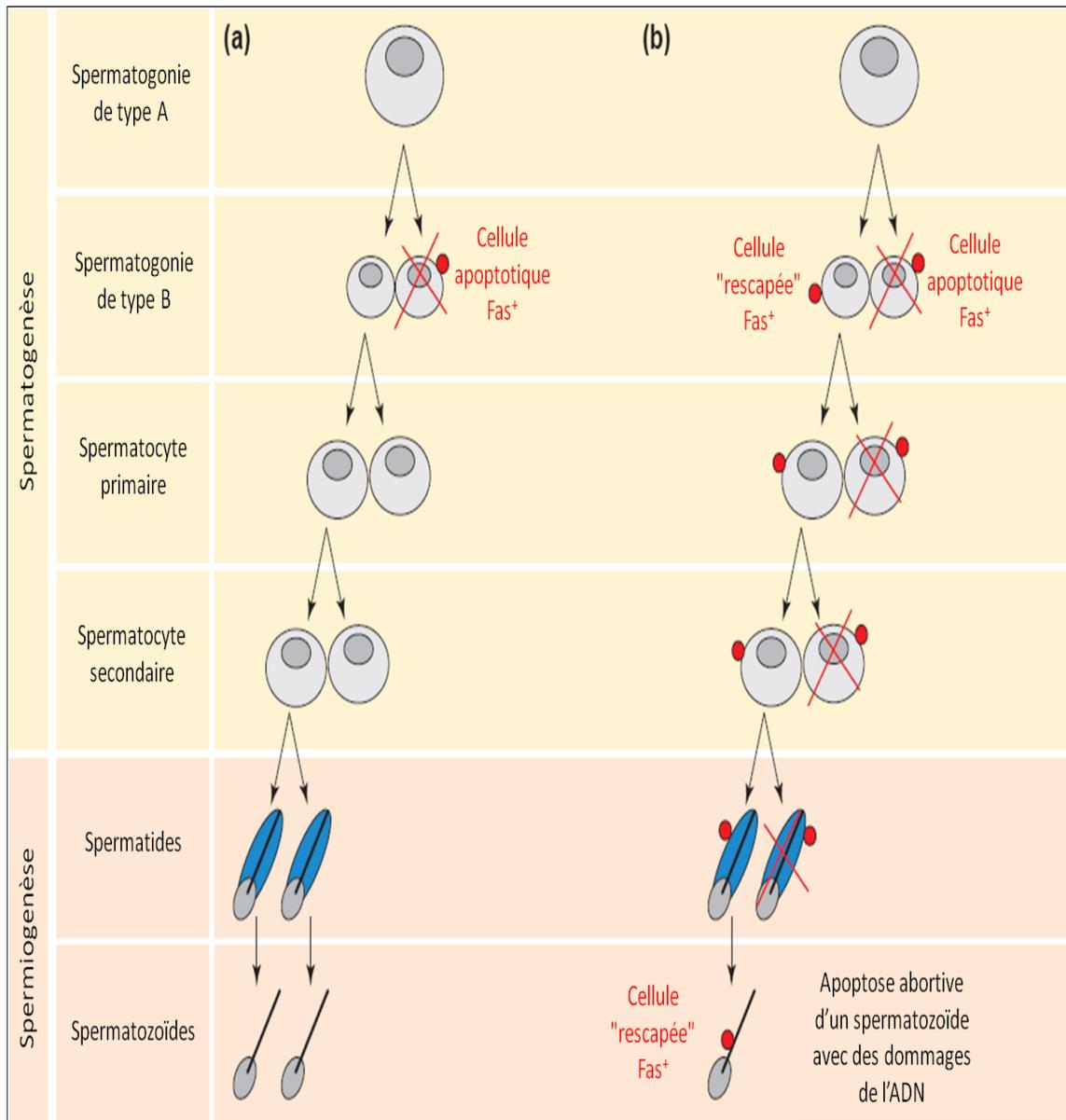
Lors du déclenchement de la spermatogenèse une première vague apoptotique survient d'une manière physiologique sur ces cellules elle a pour effet d'assurer le maintien d'un rapport numérique optimal entre cellules germinales et cellules de Sertoli elle peut concerner 50 à 60% des cellules germinales (Sakkas et Alvarez, 2010).

L'apoptose est déclenchée par différents stimuli et se traduit au niveau cellulaire par une activation d'une cascade enzymatique, la voie des caspases, endonucléases qui génèrent des fragments d'ADN double brin de 200 paires de bases, présentant ainsi des extrémités 3'-OH libres (Gorczyca *et al.*, 1993) . Toutes les cellules de la lignée germinale masculine sont concernées par l'apoptose sauf les spermatozoïdes. Une expression importante de marqueurs de l'apoptose tel que la présence du récepteur membranaire Fas a été détecté dans les cellules testiculaires germinales des hommes (Lee *et al.*, 1997 ; Pentikainen *et al.*, 1999 ; Richburg *et al.*, 2000) . En plus de la mise en évidence de la présence ce marqueur apoptotique des modifications cellulaires et biochimiques ont eu lieu comme la perméabilisation de la membrane cellulaire et mitochondriale et perte de leurs intégrités, activation des caspases et induction d'une fragmentation inter-nucléosomique de l'ADN spermatique, production de radicaux libres et augmentation du taux de calcium intramembranaire (Vermees *et al.*, 1999; Marchetti et Marchetti, 2009).

Ces événements expliquent vraiment la présence de corps apoptotiques au niveau des spermatozoïdes en plus la structure hautement différenciée de cette cellule : le volume résiduel du cytoplasme et éloignement des mitochondries du noyau ne permettent pas de rendre ce genre de mécanisme opérationnel au sein du spermatozoïde (Sakkas *et al.* , 2003 ; Carrel *et al.*, 2007 ; Barra., 2010). La présence d'une fragmentation et de cassures de l'ADN au niveau de ces derniers est donc dus à une apoptose abortive ou avortée, ce

phénomène a été décrit par Sakkas en 1999. Lors de la spermiogénèse le génome masculin devient silencieux, il ne peut plus subir de mécanisme de mort programmée. Les lésions de son ADN seraient donc la conséquence d'une apoptose initiée au cours de la spermatogénèse et non terminée au moment de la formation du spermatozoïde, Ce mécanisme de mort cellulaire est cité comme étant potentiellement à l'origine de la fragmentation de l'ADN spermatique (Sakkas *et al.*, 2003). L'apoptose au niveau la lignée germinale mâle est donc considérée comme étant une cascade d'évènements complexes où des cellules germinales anormales sont marquées et finalement éliminées avant la fin de la spermatogénèse, mais certaines cellules échappent à ce processus ce qui va engendrer une population cellulaire, qui produira vers la fin des spermatozoïdes avec un ADN endommagé (Figure 11) (Zini *et al.*, 2002).

La présence de cassures de l'ADN dans les spermatozoïdes éjaculés serait donc le reflet d'une spermatogénèse anormale. Une augmentation de spermatozoïdes avec ADN fragmenté est observée dans des populations d'hommes infertiles (Zini *et al.*, 2001 ; Sharma *et al.*, 2010).



**Figure 11** : Apoptose abortive au cours de la spermatogénèse d'après Sakkas *et al* (1999a)

**V.4. Le Stress Oxydatif :**

Les espèces oxygénées réactives EOR ou ROS (Reactive Oxygen Species) sont des molécules physiologiques issues du métabolisme cellulaire. Il peut s'agir par exemple de l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), de l'oxygène singulier ( $O_2^*$ ), ou encore du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Ces particules sont considérées comme étant des molécules réactives et instables. On peut les trouver sous forme de molécules neutres, d'ions ou de

radicaux libres, elles sont pour la plupart très réactives avec les différents composants cellulaires. Elles jouent un rôle physiologique indispensable pour la communication intercellulaire, pour la défense immunitaire et pour le contrôle de l'apoptose cellulaire (Halliwell, 1989). Concernant les cellules spermatiques les espèces oxygénées réactives sont indispensables au cours des différentes étapes de la maturation du spermatozoïde (Pons –Rejari *et al.*, 2009).

### **V .4. 1. Les EOR durant le transit épидидymaire :**

Les EOR modifient par oxydation les qualités structurales et biochimiques de l'ADN spermatique. Elles interviennent lors de la réalisation de ponts disulfures entre deux résidus cystéines via leur groupement thiol (–SH). La formation de ces ponts disulfures permet d'immobiliser la conformation de la protéine et donc stabiliser par ce fait la chromatine spermatique (Noblanc *et al.*, 2012) elles agissaient aussi sur les protéines et les lipides plasmiques en participant lors du remodelage des membranes plasmiques et au moment de l'acquisition de la mobilité rectiligne (Agarwal *et al.*, 2003).

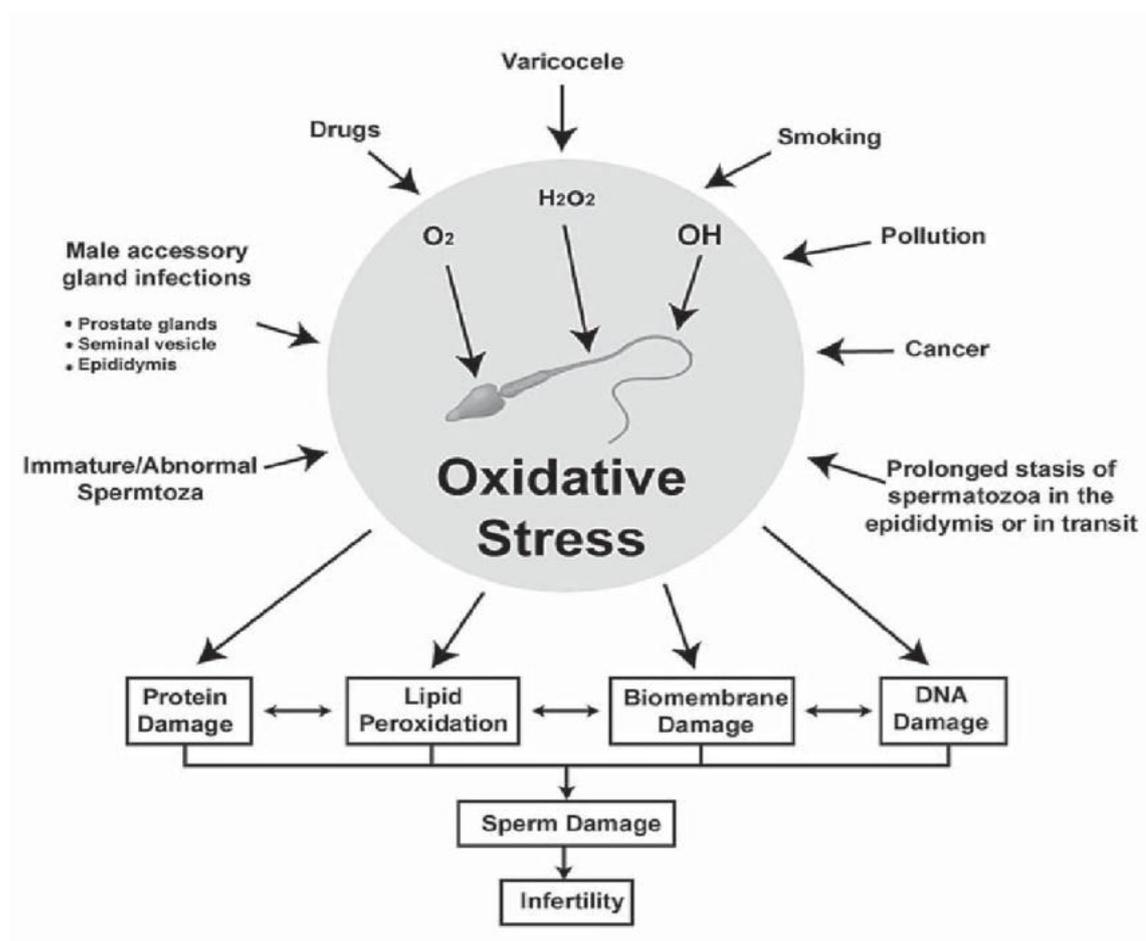
### **V .4. 2. Les EOR au niveau du tractus génital féminin :**

Les EOR interviennent dans la ré-acquisition du pouvoir fécondant en initiant le phénomène de la capacitation, elles jouent un rôle lors de la réaction acrosomique et pour l'acquisition d'une mobilité hyperactive. Elles sont également impliquées dans le processus de la fusion du spermatozoïde avec l'ovocyte. (Pons –Rejari *et al.*, 2009).

### **V .4. 3 .Les dommages du stress oxydant sur le spermatozoïde :**

Les espèces oxygénées réactives n'ont pas que des effets physiologiques positifs sur le spermatozoïde, elles peuvent être également des molécules très réactives avec de nombreuses particules cellulaires. Dans le cas où les espèces oxygénées réactives réagissent activement avec un composant cellulaire, cela peut engendrer un stress oxydatif et elles risquent alors de causer des dommages irréversibles aux différents compartiments cellulaires. Au niveau du spermatozoïde les espèces oxygénées réactives peuvent provenir de diverses sources, elles sont endogènes ou exogènes. Les sources endogènes sont les leucocytes, les cellules germinales immatures, les spermatozoïdes défectueux, tandis que les principaux facteurs exogènes sont le tabagisme et les polluants environnementaux (Figure 12).

Une production trop importante de ces molécules entraîne un déséquilibre dans la balance pro/antioxydant provoquant ainsi une altération au niveau de la membrane plasmique par perte de son intégrité et une altération au niveau du génome du spermatozoïde. En incitant une mutation par l'addition d'un groupement hydroxyle sur la guanosine aboutissant à la formation de la 8 désoxyguanosine (8-OHdG) mutée, ou par génération de cassures simple ou double brin dans ce dernier (Figure 12) (Agarwal *et al.*, 2003; Venkatesh *et al.*, 2009 ; Aitken *et al.*, 2015) .



**Figure 12 :** Les différentes sources des espèces oxygénées réactives et leur impact sur l'intégrité de l'ADN spermatique d'après Cocuzza *et al* (2007)

### V.5. Le Tabagisme :

Le tabac a des effets délétères sur la fertilité masculine (Wallach *et al.*, 1996). Des études ont montré qu'il existe un passage de la barrière hémato-testiculaire de certaines substances contenues dans la fumée de cigarette telle que le monoxyde de carbone, des alcaloïdes dont la nicotine, des hydrocarbures polycycliques, des métaux lourds dont le cadmium. La présence de tels composés dans le liquide séminal des fumeurs entraîne

une altération des paramètres spermiologiques classiques en l'occurrence ; la numération, la mobilité, la vitalité et la morphologie du spermatozoïde (Wong *et al.*, 2000).

Les toxines de la cigarette peuvent engendrer également une altération de la qualité nucléaire des spermatozoïdes, en générant un stress oxydatif qui provoque une fragmentation double ou simple brin au niveau de l'ADN spermatique (Sepaniak *et al.*, 2006 ; El-Melegy et Ali, 2011) compromettant de ce fait les chances de grossesse.

Au-delà de cette diminution de la fertilité masculine, le tabagisme a également des répercussions sur la santé de la descendance de ces individus fumeurs (Ji *et al.*, 1997 ; Sepaniak *et al.*, 2008).

### **V.6. La cryptorchidie :**

Cette pathologie testiculaire engendre une multitude de troubles physiologiques, qui vont affecter la fertilité l'individu atteint. Notamment en entraînant une hyperthermie gonadique, des anomalies spermatiques intrinsèques et une défaillance de la qualité de l'ADN spermatique (Yin *et al.*, 1998).

### **V.7. La varicocèle :**

La varicocèle est une pathologie masculine fréquente dont l'incidence est encore plus importante dans la population des hommes infertiles il semble acquis que la varicocèle peut être associée à un dysfonctionnement testiculaire avec une altération des paramètres spermatiques et touchant également l'intégrité du génome masculin (Sheehan *et al.*, 2014).

### **V.8. Hyperthermie testiculaire :**

Des études ont rapporté qu'une fièvre éminente serait associée à une augmentation du dommage de l'ADN. L'élévation de la température testiculaire par un mode de vie ou des habitudes vestimentaires particulières serait également associée à une atteinte de l'intégrité de l'ADN spermatique. (Evenson *et al.*, 2000 ; Banks *et al.*, 2005).

### **V.9. Inflammation du tractus génital :**

Les infections et les inflammations testiculaires, épидидymaires et prostatiques sont fréquemment associés à une leucospermie et à des taux élevés d'espèces oxygénées

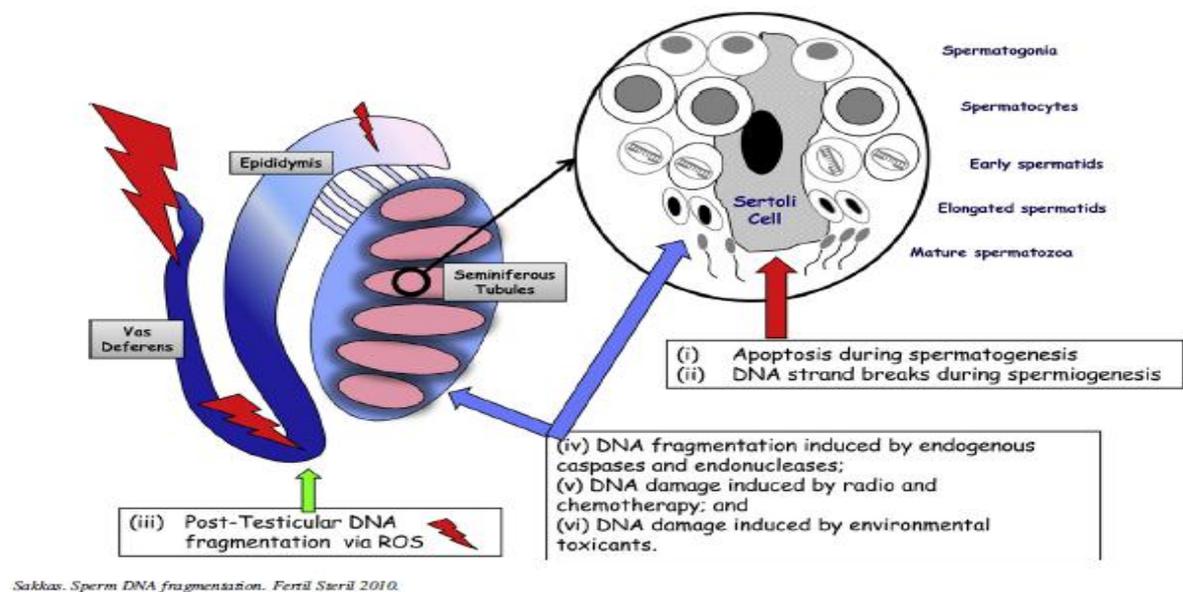
réactives en conséquence à des taux élevés d'une fragmentation de l'ADN spermatique (Mcpherson *et al.* , 1993 ; Erenpreiss *et al.*, 2002).

### **V.10. Fragmentation de l'ADN induite par Chimiothérapie et radiothérapie :**

Les effets de la chimiothérapie et de la radiothérapie sur l'épithélium germinatif ont été rapporté par plusieurs études. Une exposition à une chimiothérapie et à une radiothérapie peut avoir comme conséquence une induction à une fragmentation d'ADN spermatique. La reprise d'une spermatogenèse normale peut se faire après quelques semaines ou voire quelques années, mais les dommages de l'ADN persistent plus longtemps (Sailer *et al.*, 1995 ; Morris *et al.*, 2002).

### **V.11. Les endommagements de l'ADN induits par les facteurs environnementaux :**

il y a plusieurs produits chimiques qu'on trouve dans notre environnement, tels que les xénobiotiques qui sont connus comme néfaste sur la santé reproductive de l'homme et peuvent être aussi associés à un stress oxydatif, provoquant ainsi au sein du spermatozoïde des dommages au niveau de son génome (Migliore *et al.* , 2002 ; Hsu *et al.* , 2006 ).



**Figure 13** : Représentation Schématique des différentes causes de la fragmentation de l'ADN spermatique d'après Sakkas et Alvarez (2010)

### VI. Evaluation de l'intégrité du génome spermatique :

Les anomalies qui touchent la qualité du noyau spermatique sont des anomalies qui ne peuvent être identifiées par les méthodes de diagnostic conventionnelles et classiques. Actuellement plusieurs techniques peuvent évaluer la qualité nucléaire du spermatozoïde. Nous distinguons deux types de techniques ; celles qui évaluent le taux de condensation ou de compaction de la chromatine nucléaire et celles qui analysent le taux de fragmentation de la molécule d'ADN spermatique.

#### VI. 1. Les principales techniques d'évaluation du taux de la fragmentation de l'ADN spermatique :

##### VI. 1. 1. La technique de Sperm Chromatin Structure Assay :

La technique de Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA), est une technique, qui permet l'analyse de la structure de la chromatine. Elle est développée par Evenson *et al.*, (1980) , ce procédé permet la mise en évidence de la capacité de dénaturation de l'ADN dans un milieu acide avec l'utilisation d'un agent intercalant l'Acridine d'Orange (Figure 14 ; a).

##### VI. 1. 2. La technique de Single Cell Gel Electrophoresis :

La technique de Single Cell Gel Electrophoresis (SGCE) ou COMET, est une technique développée dans un premier temps afin de détecter des dommages à l'ADN des cellules somatiques. Par la suite elle a été affinée pour évaluer les dommages de l'ADN spermatique. Cette procédure permet l'évaluation de l'intégrité de l'ADN spermatique, en observant la migration des fragments d'ADN sur un microgel d'agarose lors d'une électrophorèse (Figure 14 ; b) (Klaude *et al.*, 1996).

##### VI. 1. 3. La technique Terminal Uridine Nick-End labeling:

La technique de Terminal Uridine Nick-End labeling (TUNEL) a été mise au point par Gavrieli et ses collaborateurs en 1992 afin d'étudier l'apoptose des cellules somatiques. Cette technique a été ensuite adaptée pour les cellules spermatiques par Gorczyca *et al.*, (1993).

Le principe de cette technique est de révéler la présence de cassures simples ou doubles brin dans l'ADN spermatique par une réaction qui se base sur l'activité spécifique de la terminal désoxynucléotidyl transférase (TdT) (Figure 14 ; c).

### **VI. 1. 4. La technique de Sperm Chromatine Dispersion :**

La technique de Sperm Chromatine Dispersion (SCD) est une technique qui est basée sur la réponse différentielle des noyaux de spermatozoïdes par rapport à des traitements (Figure 14 ; d). Cette méthode est décrite par Fernandez *et al.*, (2003).

### **VI. 2. Les principales techniques d'évaluation du taux de compaction de la chromatine spermatique :**

#### **VI. 2. 1. L'analyse du taux de protamination par le bleu d'Aniline :**

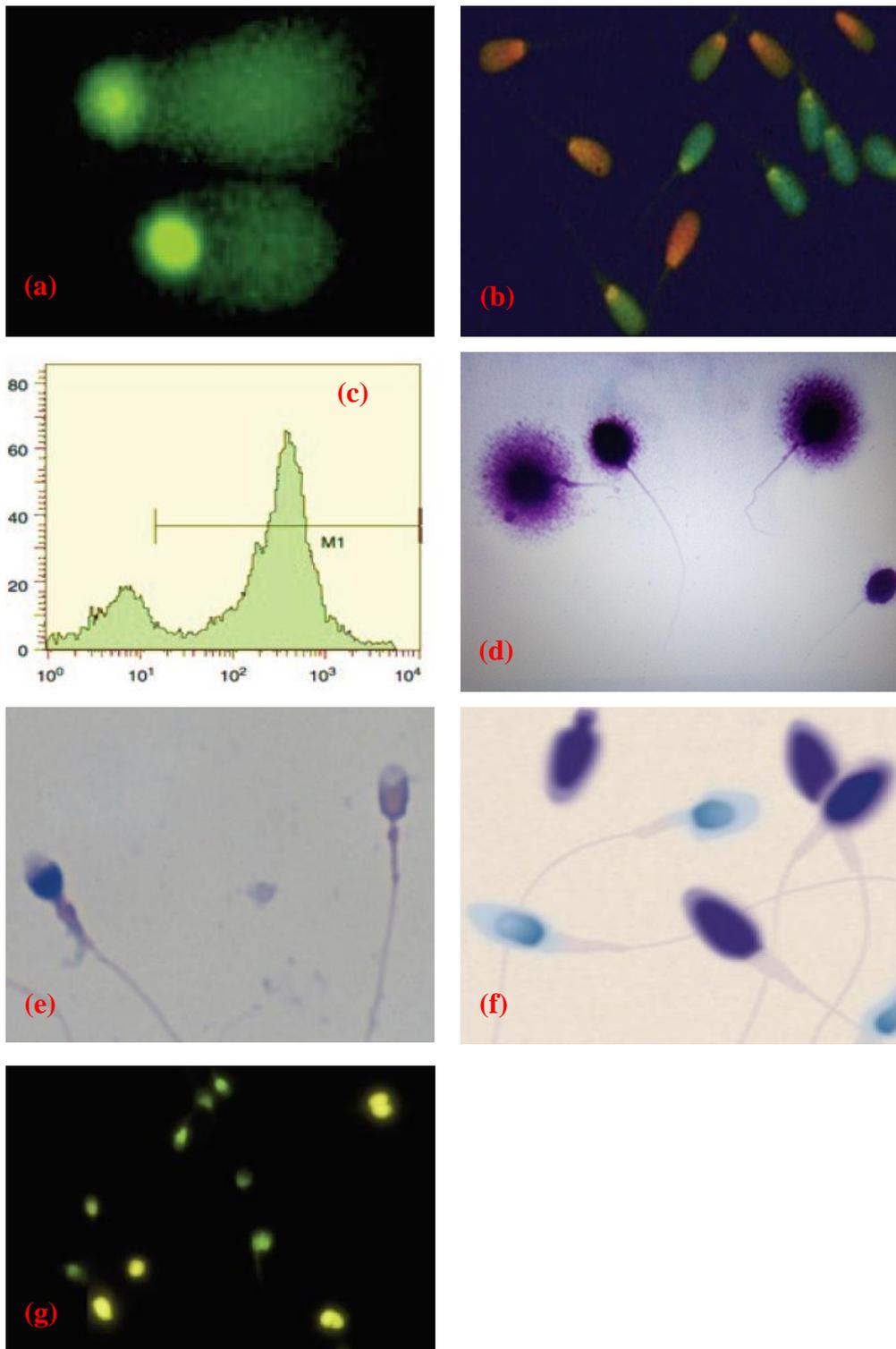
Le bleu d'aniline est une technique mise en place par Terquem et Dadoune (1983). Cette technique permet d'évaluer la persistance des histones au sein du noyau spermatique et par conséquent évaluer la compaction nucléaire (Figure 14 ; e).

#### **VI. 2. 2. L'analyse du taux de protamination par le bleu de toluidine :**

Le bleu de toluidine est un colorant métachromatique avec une forte affinité pour les résidus de phosphate d'ADN spermatique. Il est fortement incorporé dans la chromatine endommagée où il produit alors une coloration intense bleu violet (Figure 14 ; f) (Erenpreiss *et al.* , 2001).

#### **VI. 2. 3. L'analyse du taux de protamination par la Chromomycine A3 :**

Cette technique est basée sur l'utilisation de la Chromomycine A3 (CMA3) un fluorochrome spécifique de la guanine-cytosine. Ces zones-là sont ces sites de liaison des protéines nucléaires de type protamines à l'ADN spermatique. En effet ce colorant se met en concurrence avec les protamines pour les mêmes sites de liaison à l'ADN. Par conséquent, lorsque le test est positif, il reflète une déficience de protamination de l'ADN spermatique (Figure 14 ; g) (Manicardi *et al.*, 1995).



**Figure 14 :** Les différentes techniques d'évaluation de l'intégrité du génome spermatique d'après Agarwal *et al* (2016).

### VII. Perspective thérapeutique :

L'assistance Médicale à la Procréation (AMP) ou Assisted Reproductive Technology (ART) en anglais est un ensemble de pratiques cliniques et biologiques où la médecine intervient plus ou moins directement dans la procréation, afin de permettre à des couples infertiles d'avoir un enfant. (Wilson *et al.*, 2005). Cette technique permet de palier à certaines difficultés à concevoir, sans nécessairement traiter la cause de l'infertilité.

#### VII. 1. L'insémination artificielle :

La technique d'insémination artificielle, a tenté de répondre aux problèmes d'infertilité dès les années 1790, notamment grâce aux travaux du docteur John Hunter. Elle consiste à introduire de façon instrumentale les spermatozoïdes dans le tractus génital féminin, éventuellement au niveau du col, mais essentiellement dans la cavité utérine pour favoriser la rencontre des gamètes mâles et femelles.

Dans l'assistance médicale à la procréation, cette méthodes est hiérarchiquement considérée comme étant la plus élémentaire et se divise en deux procédés. L'insémination intra-cervicale (IIC) dans cette technique le sperme est placé au niveau du col de l'utérus et l'insémination intra-utérine (IIU) ou cette fois ci le sperme utilisé est directement injecté dans l'utérus à l'aide d'un cathéter. Cette technique est proposée aux couples si l'appareil génital de la femme ne présente pas de pathologie, et que son conjoint a une bonne qualité spermatique.

#### VII. 2. La Fécondation In Vitro (FIV) :

La fécondation in vitro conventionnelle, ou la F.I.V classique, est une technique qui permet une interaction entre les gamètes mâles et femelles en dehors de l'appareil génital féminin et sans intervention mécanique du biologiste. La première intervention à été réalisée par ; Steptoe et Edwards en 1978.

Elle effectue en dehors de l'organisme ce qui se fait normalement dans la trompe de la femme, tout en assurant les conditions nécessaires pour les segmentations et le développement embryonnaires précaire.

La technique de Fécondation in vitro est préconisée soit après un échec d'une série d'inséminations intra-utérine, ou soit elle est directement indiquée aux couples si l'appareil génital de la femme présente des anomalies. En cas d'échec de procréation par

cette méthode, on pourra passer à une technique plus interventionniste qui est la fécondation in vitro avec micro-injection de spermatozoïde (ICSI).

### **VII. 3. La fécondation in vitro avec micro-injection de spermatozoïde (ICSI) :**

Cette technique de fécondation in vitro a été révélée la première fois en 1992 par Palermo et son équipe. Suite à la naissance de quatre bébés conçus en utilisant une cette nouvelle procédure de FIV qui ils ont nommé ICSI. ICSI pour Intra Cytoplasmic Sperm Injection. L'ICSI a rapidement connu un grand succès (Van Steirteghem *et al.*, 1993). Elle est généralement proposée quand les caractéristiques spermatiques ne permettent pas de pratiquer une insémination intra utérine ni une fécondation in vitro classique et grâce à elle il est possible de d'obtenir une fécondation et une grossesse en utilisant des spermatozoïdes éjaculés, ou des spermatozoïdes récupérés de l'épididyme ou du testicule. Cette technique consiste à injecter directement un spermatozoïde dans l'ovocyte à l'aide d'une micropipette et permet ainsi d'éliminer la phase de pénétration nécessitant certaines capacités de la part du spermatozoïde.

En 2002 Bartoov a développé une technique d'observation amplifiée du spermatozoïde appelée « motile sperm organelle morphology examination » (MSOME), permettant d'observer au grossissement 6600X le spermatozoïde, comparée au grossissement 400X de l'ICSI. Cette avancée technique a conduit à la pratique de l'IMSI (intracytoplasmic morphologically selected sperm injection).

### **I. Présentation de la population cible :**

Nous avons réalisé une étude prospective sur 101 individus infertiles de sexe masculin orientés par des médecins spécialistes vers un centre de procréation médicalement assistée. Ces patients sont inscrits avec leurs conjoints en cycles de fécondation in vitro de type ICSI (Intracytoplasmique sperm injection).

L'étude prospective a été menée sur une période d'une année, de décembre 2014 jusqu'en décembre 2015, au sein du centre de procréation médicalement assistée de la clinique Ibn Rochd de Constantine et en collaboration avec le laboratoire d'Histologie, Embryologie et Biologie de la Reproduction de la Faculté de Médecine Claude Bernard, Lyon, France.

Il est à souligner que l'étude a été approuvée par le comité médical du centre et un consentement éclairé a été obtenu pour tous les participants inclus dans notre étude.

Les critères d'exclusions sont :

Tous les patients orientés vers une insémination artificielle, ou ceux orientés vers une fécondation in vitro classique.

Les couples dont la conjointe souffre d'anomalie pouvant affecter son pouvoir fécondant, de ce fait le pouvoir fécondant du couple. En conséquent, nous avons écarté toutes les patientes souffrant de dysfonctionnements hormonales, d'insuffisance ovarienne, de troubles de l'ovulation, d'altérations tubaires unies ou bilatérales, de lésions péritonéales pelviennes, insuffisance quantitative ou qualitative de la glaire cervicale, ou d'endométriose.

Les patientes qui ont obtenu moins de quatre ovocytes après une stimulation de leurs ovaires par des traitements médicamenteux afin de procéder à une fécondation in vitro.

Les patientes qui ont plus de 40 ans.

Les patients masculins atteints de cryptorchidie, de varicocèle ou d'une infection au niveau du tractus génital qui soit récente.

Tout sperme provenant d'une ponction testiculaire ou épидидymaire.

Les patients retenus dans notre étude sont soumis à un interrogatoire détaillé, validé grâce à une étude réalisée par Huyghe *et al.*, 2008. Cet interrogatoire nous a permis de réunir des données générales, cliniques, biologiques, l'état de fertilité du couple, recherches d'antécédents urogénitaux, familiaux, médicamenteux et toxiques (Annexe I).

L'étude consiste, dans un premier lieu en une exploration de la qualité du génome spermatique des patients. Il s'agit d'une exploration génétique permettant d'analyser le taux de cassures simples ou doubles brins de l'ADN spermatique, elle a été évaluée grâce à la méthode de dispersion de la chromatine spermatique (SCD) (Fernandez *et al.*, 2003). Les résultats de cette analyse génétique sont par la suite confrontés à ceux de la PMA, afin d'interférer le taux de la fragmentation de l'ADN spermatique et l'échec ou la réussite de la fécondance d'une part, la qualité et le taux des embryons obtenus d'autres part. Toute grossesse est suivie jusqu'à la naissance de l'enfant, en cas d'avortement l'échec est pris en considération.

Dans un second volet, nous avons poursuivi les investigations de l'intégrité du génome spermatique par l'étude du taux de condensation de la chromatine spermatique grâce à la technique d'Aniline Blue Assay (Terquem et Dadoune., 1983). Les résultats obtenus dans cette partie de l'étude sont également corrélés à ceux de la PMA.

Il est à signaler que les résultats du taux de fragmentation du génome spermatique ainsi que ceux relatifs au taux de condensation de la chromatine spermatique sont pour chaque patients, associés aux informations recueillies au cours de l'interrogatoire.

Les trois techniques permettant d'analyser les paramètres spermatiques à savoir le spermogramme, le spermocytogramme et le test des cellules rondes, ont été utilisées pour déterminer le profil du patient et afin de mettre en place les différents critères d'inclusions et d'exclusions des patients composant notre étude.

### **II. Evaluation des paramètres spermatiques :**

L'examen des paramètres spermatiques, constitue l'élément de base chez l'homme infertile. Il comprend classiquement le spermogramme et le spermocytogramme.

### **II. 1. Le spermogramme :**

Le spermogramme est un examen de routine qui évalue l'aspect macroscopique et microscopique de l'éjaculat. Le prélèvement du sperme à analyser est réalisé dans des conditions matérielles et physiologiques très précises, après recommandation d'arrêter tout traitement susceptible d'avoir une action sur la spermatogénèse et après quatre jours d'abstinence sexuelle afin d'augmenter le nombre de spermatozoïdes.

Dans le but d'éliminer le facteur temps et les conditions de transport, le prélèvement se fait sur place au laboratoire, dans une pièce isolée dédiée à cet examen. Il s'effectue par masturbation. Le sperme est directement recueilli dans un flacon stérile, à large embouchure à usage unique.

Dès sa réception, l'échantillon de sperme est liquéfié pendant 30 min dans une étuve de type Binder réglé à 37°C. Une liquéfaction prolongée doit être notée. Le reste des analyses sont effectuées à température ambiante.

L'examen macroscopique est réalisé juste après la liquéfaction, il permet d'apprécier le volume, l'aspect et la couleur, la viscosité ainsi que le pH. Le volume du sperme est mesuré dans un tube gradué à fond conique. La viscosité est appréciée en laissant couler le sperme contre la paroi d'une lame à l'aide d'une pipette pasteur. La couleur est observée, sur un fond blanc à l'œil nu. Quant au pH, il est mesuré par colorimétrie grâce à un papier indicateur de type Universel, Macherey Nagel.

L'examen microscopique est réalisé après la préparation des échantillons, en fonction du paramètre étudié, à l'aide d'un microscope optique Olympus.

La lecture de la mobilité spermatique est opérateur-dépendante. L'échantillon spermatique est tout d'abord homogénéisé à l'aide d'une micropipette afin de remettre en suspension tous les spermatozoïdes. Une goutte calibrée de 10 µl de sperme est placée entre lame et lamelle ensuite elle est analysée sous un microscope à l'objectif 40 x.

L'évaluation de la mobilité se fait sur plusieurs champs énumérant ainsi le nombre de spermatozoïdes de type a, b, c, d. Le type a correspond à des spermatozoïdes à progression linéaire rapide, le type b à progression non-linéaire ou lente, le type c les spermatozoïdes agités non-progressif et le type d à des spermatozoïdes immobiles. Nous réalisons le tour

de la lame afin de détecter des agglutinations par tête ou par flagelle et d'apprécier leur fréquence.

La numération est évaluée par le calcul du nombre de spermatozoïdes par millilitre de sperme, compté dans un hémocytomètre ou cellule de Malassez. Aussi, une goutte de l'échantillon spermatique diluée dans du liquide de Ringer formolé à 1% (Annexe II), est introduite par capillarité au niveau de l'hémocytomètre lui-même recouvert par une lamelle de taille 22\*22. Après un repos de 10 min, un comptage des spermatozoïdes sur chaque grille de l'hémocytomètre est effectué, sous microscope au grossissement 40 x. Le calcul de la concentration des spermatozoïdes exprimée en millions par millilitre, est obtenu par la formule suivante :

$$C = N \times D \times 1000$$

**C** = Concentration des spermatozoïdes, **N** = Nombre de spermatozoïdes

**D** = Dilution du sperme, **1000** = conversion de mm<sup>3</sup> en ml

L'hémocytomètre est également utilisé pour la mesure de la concentration des cellules rondes.

La vitalité des spermatozoïdes est évaluée grâce à un frottis réalisée à partir d'une suspension de spermatozoïdes fixée par une coloration à l'éosine 2%/nigrosine (Annexe II). Le résultat est obtenu par dénombrement des spermatozoïdes dans plusieurs champs sous microscope à l'objectif 40 x. Les spermatozoïdes vivants correspondent aux cellules à têtes incolores n'ayant pas fixé le colorant, alors que les cellules mortes présentent des têtes colorées en rose.

Les normes d'interprétation de l'examen du spermogramme selon l'OMS (2010) sont rapportées en Annexe III.

### **II. 2. Spermocytogramme :**

Le spermocytogramme est un examen médical correspondant à l'analyse cytologique et morphologique des spermatozoïdes. Cet examen permet l'évaluation et la différenciation des spermatozoïdes de forme typique à ceux de forme atypique, présentant des anomalies morphologiques. Les anomalies morphologiques des spermatozoïdes sont répertoriées en quatre classes selon leur emplacement ; anomalies de la tête, anomalies de la pièce

intermédiaire et les anomalies du flagelle. La présence de moins de 4 % de spermatozoïdes de forme typique dans le sperme conduit au diagnostic d'une tératospermie. La technique analytique de reconnaissance visuelle et de classification des spermatozoïdes normaux et anormaux est réalisée sous microscope optique de type Olympus au grossissement 1000 x à partir d'un Kit ; Spermac Stain Fertipro™(Annexe IV).

### **III. Analyses des cellules rondes :**

L'analyse des cellules rondes a été réalisée sur des patients atteints d'oligospermie afin d'éliminer une potentielle cause infectieuse de leur infertilité. Il s'agit de distinguer et de dénombrer les cellules germinales immatures et les leucocytes présents dans le liquide séminal, dans un milieu réactionnel préparé à partir du Kit : Leuco Screen (Annexe V). Elle est opérée sous microscope optique de type Olympus à grossissement 400 x.

Le principe repose sur le fait que les leucocytes polynucléaires contiennent de la peroxydase. En présence d'une solution du milieu réactionnel préparé contenant du peroxyde d'hydrogène, ils développent une réaction qui libère de l'eau et des ions d'oxygènes, entraînant une oxydation de la molécule de Benzidine d'une autre solution de ce milieu. Suite à cette réaction d'oxydation les leucocytes vont développer une couleur marron foncé, alors que les cellules germinales, ne renfermant pas cette molécule de peroxydase vont prendre ainsi une coloration claire. La technique nous permet donc de distinguer les deux classes de cellules et le recensement de ces dernières.

### **IV. Etude de la qualité du génome spermatique :**

#### **IV .1.Evaluation du taux de fragmentation de l'ADN spermatique :**

La mesure du taux de fragmentation de l'ADN spermatique est réalisée grâce à la technique SCD (Sperm Chromatin Dispersion), d'après Fernandez *et al* (2003) adaptée à nos conditions de travail (Annexe VI). L'analyse des cassures simples ou doubles brins de l'ADN spermatique a été faite sur du sperme traité post TMS (Test de migration et de survie).

## **Matériels et Méthodes**

L'échantillon spermatique sélectionné est immergé dans un micro-gel d'agarose inerte à 1%, une goutte calibrée de 20 µl de ce mélange (sperme/agarose) est placée sur une lame et recouverte par une lamelle 22\*22.

La préparation est laissée pendant 5 min à température ambiante, par la suite elle est placée à une température de + 4°C pendant 5 autres min, considéré comme le temps nécessaire pour la gélification de l'échantillon, afin d'éviter toute altération de l'échantillon la lamelle est enlevée délicatement de la lame.

Un traitement initial à l'acide dénature et ouvre les boucles d'ADN de ces spermatozoïdes, par une application d'une solution de dénaturation composée d' Hcl d'une concentration de 0.08 mol/L. la solution est déposée au goutte à goutte à l'aide d'une pipette pasteur, tout en la laissant agir pendant 7 min à l'abri de la lumière.

Un deuxième traitement qui consiste à ajouter une solution de lyse composée de Dithiothréitol et de Triton X-100, cette solution a pour rôle de supprimer les protéines nucléaires. L'application de la solution de lyse est effectuée goutte à goutte à l'aide d'une pipette pasteur, en laissant agir pendant 20 min sous une hôte.

Un rinçage préalable de 5 min à l'eau distillée est effectué sur la lame, suivi d'une déshydratation progressive dans des bains d'alcool de 70%, 90% et 100, la durée de chaque bain d'alcool est de 2 min.

Après séchage des lames, on réalise la coloration. Cette dernière est effectuée en deux étapes, une première coloration à l'éosine à 5 g/l suivie d'une deuxième coloration à l'aide d'une solution de bleu d'azur à une concentration de 5g/l. Les deux étapes de la coloration sont réalisées pendant 7 min sous une hôte.

Une lecture de 500 cellules est réalisée sous un microscope à contraste de phase de type Olympus au grossissement 400 x, permet de distinguer les spermatozoïdes à ADN dégradé ou ceux avec un ADN non dégradé.

Afin de pouvoir confirmer que la révélation de l'ADN spermatique par les différents traitements est réalisée dans de bonne conditions, nous avons procédé à une coloration à l'aide d'un fluorochrome spécifique de type 4',6-diamidino-2-phenylindole avec une

concentration de 2 µg/l dans du Vectashield. Ce colorant permet la visualisation directe de l'ADN sous microscope à fluorescence de type Nikon au grossissement 1000 x.

L'indice du taux de fragmentation de l'ADN spermatique ou DFI (DNA Fragmentation Index) est déterminé par la formule suivante :

$$\text{DFI} = \frac{\text{Nombre de spermatozoïdes fragmentés}}{\text{Nombre total de spermatozoïdes lus}} \times 100$$

Aussi selon Fernandez *et al.*, (2003), si un **DFI ≤ 30%** l'ADN spermatique est considéré comme non fragmenté, alors que pour un **DFI > 30%** l'ADN spermatique est considéré comme fragmenté.

### **IV.2. Evaluation du taux de condensation de la chromatine spermatique :**

L'évaluation de la condensation de la chromatine et du contenu du noyau spermatique en protamines est réalisée par la technique d'Aniline Blue, développée par Terquem et Dadoune en 1983. Cette technique permet d'explorer l'aspect de la fonction nucléaire et elle représente un intérêt réel pour le diagnostic et le pronostic médical.

Le principe est basé sur le remplacement des histones par les protamines au cours de la spermiogénèse. La technique permet d'évaluer la persistance des histones au sein du noyau du spermatozoïde et par conséquent la compaction nucléaire.

Le protocole proposé par Terquem and Dadoune a été mis au point nos conditions de notre travail (Annexe VII).

Une goutte de 20 µl de l'échantillon spermatique obtenu, après le test de migration et de survie, est déposée sur une lame puis fixée par une solution de formaldéhyde à 4%. Après séchage l'échantillon spermatique est coloré pendant 5 min avec une solution de Bleu d'Aniline concentrée à 5%, contenant de l'acide acétique d'une concentration de 4%, le pH de cette solution est situé entre 2.5 et 3. Cette solution de bleu d'aniline acidifié se fixe aux résidus lysine des histones du noyau cellulaire formant une structure de résonance et émet dans le visible une longueur d'onde correspondant à une couleur bleue de l'ordre de 460 nm.

Afin d'éliminer l'excès de la coloration nous procédons à un rinçage en premier lieu avec de l'eau courante pendant 5 min, suivi avec 3 bains d'eau distillée pendant 30 secondes pour chaque bain d'eau.

Après rinçage l'échantillon est déshydraté, dans 3 bains successifs d'alcools : 70% ; 96% et 100% pendant 1 min pour chaque bain, puis il est immergé dans 2 bains successifs d'une solution de méthylcyclohexane pendant 1 min pour chaque bain.

La lecture des résultats est réalisée selon les recommandations de Terquem et Dadoune (1983). Pour chaque individu 200 spermatozoïdes sont observés sous microscope à contraste de phase de type Olympus à l'objectif 100 x avec de l'huile d'immersion.

En distinguant et différenciant deux types de spermatozoïdes :

Les spermatozoïdes ayant une compaction insuffisante, par un défaut de protamination et par une persistance des histones riches en lysine, se colorent en bleu et ils sont dits spermatozoïdes à chromatine décondensée. Alors que les spermatozoïdes ayant une structure chromatinienne bien compacte, grâce à la teneur de leur noyau en arginine et cystéine des protamines, restent pale voir incolores et sont dits spermatozoïdes à chromatine condensée.

L'indice du taux de décondensation de la chromatine spermatique ou SDI (Sperm Decondensation Index) est calculé par la formule suivante :

$$SDI = \frac{\text{Nombre de spermatozoïdes à chromatine décondensée}}{\text{Nombre total de spermatozoïdes lus}} \times 100$$

Le seuil du taux de décondensation de la chromatine spermatique est fixé selon Hammadeh *et al.*, (1998), pour un SDI < 20% la chromatine spermatique est considéré comme normalement condensée, alors que pour un SDI  $\geq$  20% la chromatine spermatique est considérée comme décondensée.

### **V. Technique d'Assistance Médicale à la Procréation :**

L'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) est l'ensemble des techniques médicales et biologiques qui comportent la manipulation des gamètes, dans le but d'obtenir une grossesse chez un couple qui sans cela risquerait de demeurer infécond.

Ces techniques se divisent en deux principaux procédés, l'insémination artificielle qui se déroule in vivo dans les voies génitales de la femme et la fécondation in vitro, comme son nom l'indique, qui se déroule en dehors des voies génitales féminines.

Les patients inclus dans cette étude ont tous subi une fécondation in vitro de type ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection).

### **V.1. Le principe de la technique d'injection intracytoplasmique de spermatozoïde :**

La technique d'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde est une fécondation in vitro, qui consiste en la micro-injection directe d'un spermatozoïde dans le cytoplasme d'un ovocyte mature au stade de métaphase II de la méiose. Elle permet de créer une fusion artificielle entre un gamète mâle et un gamète femelle.

L'ICSI est indiquée, d'une façon générale, quand le nombre de spermatozoïdes normaux et mobiles ne permettent pas de tenter une FIV conventionnelle, en cas de pathologies spermatiques tel que l'azoospermie, l'oligospermie, l'asthénospermie, la tératospermie ou en cas d'une oligo-asthéo-tératospermie sévère. Elle est également indiquée après échec d'une ou plusieurs tentatives d'insémination ou de FIV conventionnelle. Elle est

Aussi recommandée dans le cas d'une présence élevée d'anticorps anti-spermatozoïdes ou dans le cas d'une mauvaise qualité des ovocytes de la conjointes.

### **V .2.Méthodologie:**

La prise en charge thérapeutique des couples pour une ICSI débute par le recueil des gamètes femelles et des gamètes males.

#### **V .2.1. Collecte des ovocytes :**

Les protocoles utilisés pour le stimuli ovarien sont très variés. Leurs efficacités respectives est parfois difficile à comparer, car un même protocole peut donner des résultats différents selon la façon dont est monitorée la réponse ovarienne et selon les équipes. Chaque protocole comporte habituellement trois étapes : le blocage ovarien, la stimulation de l'ovulation et le déclenchement de l'ovulation.

Le blocage ovarien a pour but de mettre au repos les ovaires, afin d'éviter une ovulation prématurée qui compromettrait la poursuite du pick-up. Il permet également d'augmenter le nombre d'ovocytes obtenus. Ainsi qu'une meilleure planification du déclenchement de l'ovulation et une meilleure répartition des ponctions au cours de la semaine.

Le blocage ovarien est obtenu en désensibilisant la glande hypophyse par administration d'un antagoniste de la GnRH (gonadotropin releasing hormone). Il peut débuter en phase

lutéale du cycle précédant (J-21, protocole long) ou en phase folliculaire du même cycle de stimulation (J-1 ou J-2, protocole court).

La stimulation de l'ovulation consiste à augmenter les phénomènes naturels, de façon à permettre la maturation simultanée de plusieurs follicules. Ainsi, en recueillant plusieurs ovocytes, les chances sont meilleures d'en avoir au moins un qui puisse être fécondé in vitro.

L'autre avantage est de prendre le contrôle du cycle donc de ne plus être soumis aux phénomènes endocriniens spontanés de la patiente. Cela permet de réaliser le prélèvement ovocytaire à l'heure choisie par l'équipe.

La croissance concomitante de plusieurs follicules est assurée par l'administration de gonadotrophines (hormone FSH ou HMG), parallèlement à la poursuite du traitement par antagonistes de la GnRH.

La stimulation dure 10 à 11 jours en moyenne. Elle fait l'objet d'une surveillance appelée monitoring de l'ovulation qui consiste à une série de dosages hormonaux et d'échographies à partir de J-8 du cycle, répétés tous les 1 à 3 jours.

Le déclenchement de l'ovulation est effectué par une injection unique d'Hormone Gonadotrophine Chorionique (HcG). Le déclenchement de l'ovulation se fait lorsqu'il y'a au moins 3 ovocytes qui ont atteint leur maturation. La ponction ovocytaire se fait 36 heures après le déclenchement de l'ovulation.

Au cours de cette étude nous avons opté pour une stimulation par le protocole antagoniste. La stimulation ovarienne débute à partir du deuxième jour du cycle par injection de FSH exogène. La dose est adaptée en fonction de l'âge, du bilan hormonal, de la réserve ovarienne et de l'indice de masse corporelle. Un premier contrôle est effectué au cinquième jour de la stimulation, par monitoring échographique dès que le diamètre des follicules atteint 13 à 14 mm, on procède à l'administration des antagonistes de la GnRH sous forme de Cetrotide 0.25 ou Orgalutran 0.25. Lorsque les follicules atteindront la taille désirée de 17 mm, le déclenchement de l'ovulation est fait par injection de 5000 Unités de l'Hormone Gonadotrophine Chorionique (HcG).

La ponction ovarienne est effectuée par voie endo-vaginale sous anesthésie générale dans une salle d'opération stérilisée, trente-six heures après le déclenchement de l'ovulation.

Le liquide folliculaire est recueilli dans un tube stérile de 15 ml, il est rapidement transmis au laboratoire afin de rechercher et de recenser les complexes cumulo-ovocytaires. Ces derniers sont par la suite déposés dans une boîte de type nunc contenant 3 ml de milieu de lavage Fercicult™ Flushing medium (Annexe VIII).

Une fois comptés, les complexes cumulo-ovocytaires sont placés dans une autre boîte de type nunc à quatre puis, qui contient dans son premier puis 600 µl à 800 µl du milieu de culture de type Fercicult™ IVF medium qui a pour rôle de garder les ovocytes dans un environnement proche de leur liquide biologique (Annexe IX).

Deux à trois heures après la ponction, vient l'étape de la décoronisation, qui consiste à déposer les complexes cumulo-ovocytaires dans le deuxième puis de la boîte nunc, contenant 800 µl de milieu de culture de type Fercicult™ IVF medium (Annexe IX) et également 100 à 150 µl d'hyaluronidase Fercicult™ Flushing medium, ce dernier a pour rôle de décoroniser et de disperser les cellules folliculaires (Annexe X).

Une fois l'étape de décoronisation est achevée les ovocytes sont transférés dans le troisième puis de la boîte nunc, contenant 600 à 800 µl du milieu de culture Fercicult™ IVF medium (Annexe IX).

Les ovocytes sont par la suite conservées à l'intérieur d'un incubateur à CO<sub>2</sub> de type GALAXY à 37°C sous 5.5 % de CO<sub>2</sub>, jusqu'à leurs mis en fécondation par micro-injection.

### **V .2.2. Collecte des spermatozoïdes :**

A nos jours, les techniques de préparation de sperme ont bien évolué. Ils permettent d'éliminer les spermatozoïdes non-mobiles et ceux qui présentent des anomalies morphologiques, ainsi que les différents débris cellulaires qui peuvent réduire le potentiel fécondant. Il existe différentes méthodes de préparation des spermatozoïdes, mais la plus utilisée est la séparation du sperme sur un gradient de densité ; Test de Migration et de Survie (TMS) d'après Bolton *et al* (1984).

Le sperme a été recueilli par masturbation après une période de 3 à 4 jours d'abstinence sexuelle.

L'échantillon spermatique est centrifugé à 300 g pendant 20 min à l'aide d'une centrifugeuse de type Hettich, après avoir ajouté deux couches de 1 ml du colloïde de PureSperm® de concentration respective de 90% et 45% (Annexe XI).

Le culot obtenu est récupéré dans un tube conique et par la suite centrifugé à 600 g pendant 10 min dans 2 ml d'une solution de lavage Ferticult™ Flushing medium (Annexe VIII). Le culot obtenu est remis en suspension dans 200 µl du milieu de culture de Ferticult™ IVF medium (Annexe IX).

Le pourcentage de formes mobiles ainsi que la numération sont évalués de la même manière que dans un spermogramme conventionnel.

Aussi, pour la mobilité ; une goutte de 10 µl de l'échantillon est placée entre lame et lamelle par la suite elle est analysée sous microscope optique de type Olympus à l'objectif 40 x. en évaluant sur plusieurs champs les spermatozoïdes à progression linéaire rapide (a), à progression non-linéaire ou lente (b) afin d'exprimer la mobilité progressive des spermatozoïdes (a + b) %.

Pour la numération une goutte de 10 µl de l'échantillon spermatique diluée au un vingtième dans du liquide de Ringer formolé à 1% (Annexe II), est introduite par capillarité au niveau d'un hémocytomètre recouvert par une lamelle de taille 22\*22. Après un repos de 10 min, les spermatozoïdes sont comptés sur chaque grille de l'hémocytomètre sous un microscope Olympus à l'objectif 40 x. La concentration des spermatozoïdes est exprimée en millions par millilitre, elle est obtenue par la formule classique

$$C = N \times D \times 1000$$

**C** = Concentration des spermatozoïdes, **N** = Nombre de spermatozoïdes

**D** = Dilution du sperme, **1000** = conversion de mm<sup>3</sup> en ml

Une fois terminé le sperme est maintenu dans une étuve Binder à 37 ° C en attendant son utilisation pour la procédure ICSI.

### **V .2.3. La fécondation in vitro :**

La fécondation in vitro de type ICSI est réalisée dans une station de micro injection sous microscope inversé Olympus au grossissement 400 x en utilisant une micropipette d'injection de 30 degré (Annexe XII).

Pour diminuer sa mobilité, le spermatozoïde sélectionné par l'opérateur est d'abord déposé dans du Polyvinylpyrrolidone à 10 % (Annexe XIII). Par la suite il est immobilisé par effet de cisaillement de son flagelle à l'aide de la micropipette d'injection. Le spermatozoïde sélectionné est aspiré à l'intérieur de cette dernière.

L'ovocyte quant à lui, il est placé dans le champ optique du microscope de sorte que le globule polaire soit situé à 6 h ou à 12 h, afin d'éviter de toucher le fuseau méiotique ovocytaire, il est stabilisé grâce à une micropipette dite de contention. La micropipette d'injection est par la suite introduite dans le cytoplasme de l'ovocyte pour déposer le spermatozoïde. Cette procédure de micro-injection, est toujours réalisée pour les ovocytes matures en métaphase II qui se caractérisent par la présence d'un premier globule polaire dans leur espace périvitellin.

Une fois que tous les ovocytes sont injectés, ils sont déposés dans le quatrième puis de la boîte de nunc et sont rincés dans du Life Global medium (Annexe XIV) avant d'être conservés dans des boîtes de pétrie, contenant des microgouttes de 25 µl du milieu de culture Life Global medium (Annexe XIV) et recouvertes par une huile minérale légère spécialement utilisée pour la culture embryonnaire (Annexe XV).

La mise en culture cellulaire est réalisée sous 5.5% de CO<sub>2</sub> à 37 °C dans un incubateur de type GALAXY. Seize à vingt heures après la mise en fécondation, le zygote est identifié par la présence des deux pronuclei, le noyau maternel et le noyau paternel et par la présence de deux globules polaires.

### **V.2.4. Culture embryonnaire :**

Après quarante-huit heures de la mise en fécondation, les embryons mis en culture sont observés et contrôlés à l'aide d'un microscope optique inversé Olympus sous grossissement 400 x. Ils sont par la suite classés en fonction de leur morphologie afin d'établir la qualité embryonnaire. Pour cela nous avons retenu le modèle recommandé par Fragouli *et al.*, (2014) (Annexe XVI).

### **V.2.5. Transfert embryonnaire :**

Le transfert des embryons est réalisé à 48 heures (J2) ou à 72 heures (J3) après la ponction des ovocytes, selon le stade de développement de l'embryon. Deux à trois embryons sont alors transférés en fonction de l'âge de la patiente et surtout de la qualité

des embryons obtenus. C'est un geste simple et indolore réalisé au moyen d'un cathéter. L'embryon installé à l'intérieur de l'utérus se développe jusqu'à son implantation.

Les embryons non transférés dits surnuméraires et qui présentent des critères de développement satisfaisants sont congelés sous le conseil du médecin biologiste et après un accord du couple concerné.

La présence de grossesse est détectée par le dosage de la  $\beta$ hCG, 15 jours après le transfert des embryons. Une échographie est réalisée également pour discerner une présence cardiaque et confirmer la grossesse. La grossesse en cours est alors surveillée jusqu'à son terme, donc jusqu'à la naissance de l'enfant. En cas d'avortement, moins de 12 semaines, l'information est prise en considération.

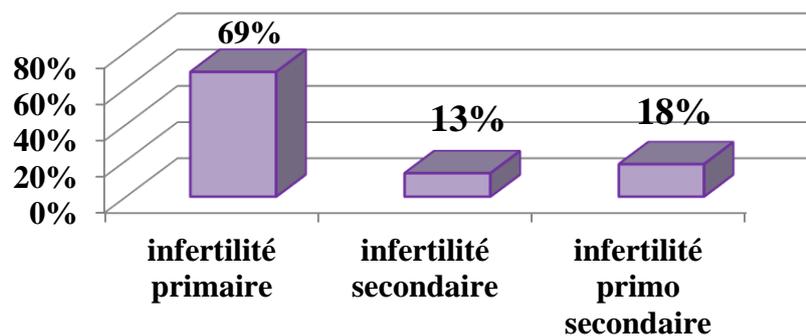
### **VI. Etude statistique :**

L'étude statistique est réalisée à l'aide du logiciel SPSS (SPSS 18.1, IBM, Chicago, IL, USA). Le coefficient de corrélation de Pearson, le test t de Student, le test de Fisher Anova test et le test du chi-deux ont été utilisés pour l'analyse univariée. Les variables quantitatives ont été décrites comme étant la moyenne et l'écart-type et la distribution en pourcentage pour les variables catégorielles. Des régressions logistiques multivariées ont été effectuées ; dans ce cas, les paramètres DFI et SDI ont été utilisés comme des variables catégorielles. Pour le DFI, les classes suivants ont été définis :  $DFI \leq 30\%$ , et  $DFI > 30\%$ , ainsi que des sous classes de  $DFI \leq 30\%$ ,  $DFI 31-60\%$  et  $DFI > 60\%$ . Concernant le SDI, les sous-ensembles suivants ont été définis :  $SDI < 20\%$  et  $SDI \geq 20\%$ . De plus, les paramètres DFI et SDI ont été combinés afin de créer un nouveau paramètre pour synthétiser le paramètre : DFI x SDI. Le test est considéré comme significatif lorsque  $p < 0,05$ .

## I. Caractéristique de la population d'étude :

### I.1. Distribution des couples selon le type d'infertilité :

La distribution des patients selon le type d'infertilité indique que 69 % des couples présentent une infertilité primaire, 18 % souffrent d'infertilité primo-secondaire avec une présence d'avortements à répétition et que 13 % des couples présentent une infertilité secondaire (Figure 15).

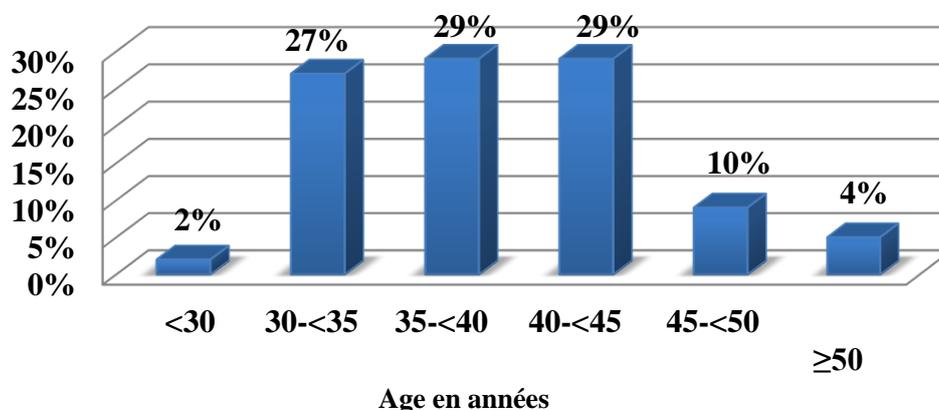


**Figure 15 :** Distribution des patients selon le type d'infertilité

### 1.2. Caractéristiques des patients :

#### 1.2. 1. Distribution des patients selon la tranche d'âge :

La distribution des patients en fonction de l'âge selon le modèle de Belloc *et al* (2008), rapporté par la figure 16, nous montre une prédominance des 35- <40 ans et 40- <45 ans avec respectivement 29 % de représentativité pour chaque tranche. Les 45- <50 ans représentent 10 % des patients et seulement 4% pour les  $\geq 50$  ans. Les moins de 30 ans représentent 2 % de la population.



**Figure 16 :** Distribution des patients selon la tranche d'âge

### **I.2.2. Répartition des patients selon les paramètres spermatiques :**

La répartition des patients selon les paramètres spermatiques (Tableau 1) évoque 42 % d'oligoasthénospermie, 25 % d'asthénospermie et 5 % d'oligospermie. Nous avons noté que 28 % de normosperme soit 28 patients sur un total de 101 présentent des paramètres spermatiques normaux.

**Tableau 1 :** Répartition des patients selon leurs paramètres spermatiques

| <b>Paramètres spermatiques</b> | <b>Nombre de patients</b> | <b>Pourcentages (%)</b> |
|--------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Oligospermie                   | 5                         | 5                       |
| Asthénospermie                 | 25                        | 25                      |
| Oligoasthénospermie            | 43                        | 42                      |
| Normospermie                   | 28                        | 28                      |
| <b>Total</b>                   | <b>101</b>                | <b>100</b>              |

### **I. 2.3. Répartition selon le taux de concentration spermatique après TMS :**

La répartition des patients selon la concentration spermatique montre que 41 % présentent une concentration inférieure à 5 millions/ml, 21 % ont une concentration spermatique située entre 6 à < 15 millions/ml et 38 % ont une concentration égale ou supérieure à 15 millions/ml (Tableau 2).

**Tableau 2 :** Répartition selon le taux de concentration spermatique après TMS

| <b>Concentration spermatique<br/>M/ml</b>           | <b>Nombre de patients</b> | <b>Pourcentages (%)</b> |
|-----------------------------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Concentration spermatique $\leq$ 5<br>M/ml          | 42                        | 41                      |
| Concentration spermatique entre<br>(6 M/ml-15 M/ml) | 21                        | 21                      |
| Concentration spermatique $\geq$ 15<br>M/ml         | 39                        | 38                      |
| <b>Total</b>                                        | <b>101</b>                | <b>100</b>              |

\*Concentration spermatique M/ml : Million/ml

### **1.2.4. Répartition selon la mobilité spermatique après TMS :**

Les résultats consignés dans tableau 3 indiquent que 58 % des conjoints évoquent une asthénospermie et présentent une mobilité spermatique perturbée contre 42 % seulement qui présentent une mobilité spermatique normale.

**Tableau 3 :** Répartition selon la mobilité spermatique après TMS

| Mobilité spermatique M/ml | Nombre de patients | Pourcentages (%) |
|---------------------------|--------------------|------------------|
| Asthénospermie            | 59                 | 58               |
| Mobilité normale          | 42                 | 42               |
| <b>Total</b>              | 101                | 100              |

### **I. 2. 5. Répartition des patients selon le mode de vie :**

Les résultats de l'enquête sur le mode de vie des conjoints, tableau 4, font ressortir que 40 % des patients sont fumeurs, 31 % fréquentent régulièrement des sources d'eau chaude, 27 % d'entre eux ont été exposés à des épisodes de fortes températures ou hyperthermie et que 28 % prennent des antioxydants.

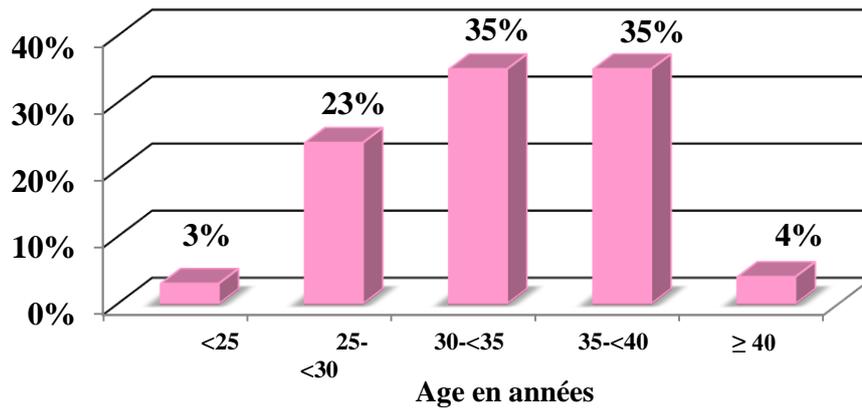
**Tableau 4 :** Répartition des patients selon leur mode de vie

| Habitudes    | Nombre de patients |     | Total | Pourcentages % |     | Total |
|--------------|--------------------|-----|-------|----------------|-----|-------|
|              | oui                | non |       | oui            | non |       |
| Tabagisme    | 40                 | 61  | 101   | 40             | 60  | 100   |
| Bains chauds | 31                 | 70  | 101   | 31             | 69  | 100   |
| Hyperthermie | 28                 | 73  | 101   | 27             | 73  | 100   |
| Antioxydants | 29                 | 72  | 101   | 28             | 72  | 100   |

### **I. 3. Caractéristiques des patientes :**

#### **I.3.1. Distribution des patientes selon la tranche d'âge :**

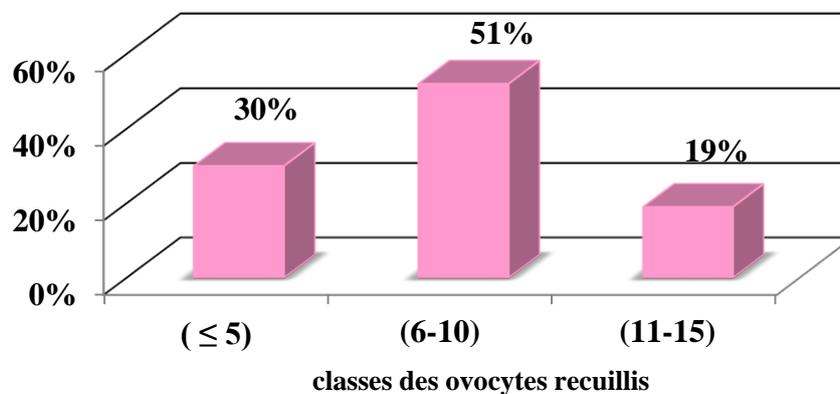
La distribution des patientes selon la tranche d'âge, selon le modèle préconisée par Wennberg *et al* (2012), rapportées en figure 17, indique que les tranches d'âges dominantes avec un taux de 35 % sont les 30-35 ans et les 35-40 ans, suivit de celles de 25-30 ans avec 23 % des patients. Les 40 ans représentent 4 %, alors que les moins de 25 ans sont de 3 % seulement.



**Figure 17 :** Distribution des patientes selon la tranche d'âge

**I.3. 2. Distribution des patientes selon le nombre d'ovocytes recueillis :**

La distribution des patientes selon le nombre d'ovocytes recueillis, illustrée par la figure 18 selon le modèle de Rana *et al* (2017), nous indique que le nombre d'ovocytes recueillis est inférieur ou égal à 5 chez 30 % des patientes avec un total de 135 ovocytes recueillis dans cette catégorie. Il est situé entre 6 à 10 pour 52 % de patientes, avec un total de 419 ovocytes recueillis et de 11 à 15 ovocytes pour les 19 % restant, avec un total de 243 ovocytes recueillis.

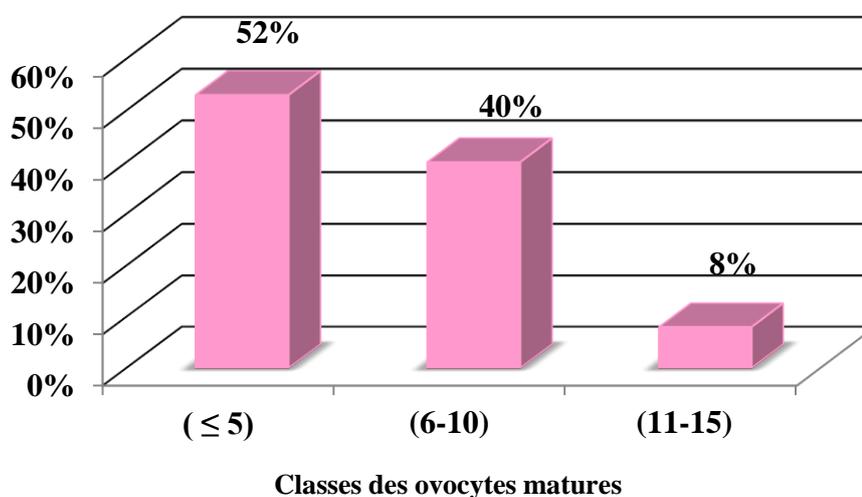


**Figure 18 :** Distribution des patientes selon le nombre d'ovocytes recueillis

**I.3.3. Distribution selon le nombre d'ovocytes matures en métaphase II :**

La distribution des patientes selon le nombre d'ovocytes en métaphase II consignée dans la figure 19, selon le modèle de Rana., *et al* (2017), fait ressortir que 52 % des patientes présentent un nombre d'ovocytes matures  $\leq 5$  soit un total de 212 ovocytes matures dans cette catégorie. Les patientes dont le nombre d'ovocytes matures est situés entre 6 à 10 représentent 40 % avec un total de 298 ovocytes matures. Les patientes dont

le nombre d'ovocytes matures est entre 11 à 15 est de l'ordre de 8 %, sont un total de 99 ovocytes en métaphase II.



**Figure 19 :** Distribution des patientes selon le nombre d'ovocytes en métaphase II

### **I.4. Caractéristique du couple :**

#### **I.4.1. Répartition des couples selon le nombre de zygotes obtenus :**

Le nombre total de zygotes obtenus par les couples recrutés dans notre étude est de 493. La répartition en classes selon le modèle de Cai *et al* (2013), tableau 5, montre que dans 55 % des cas le nombre de zygotes obtenus est inférieur ou égal à 4 zygotes. Il est de 5 à 8 zygotes pour 37 % des couples et de 9 à 12 zygotes pour 8 % d'entre eux. Nous avons noté plus de 13 zygotes chez un couple, ce qui représente 1 % de la population totale.

**Tableau 5 :** Répartition des couples selon le nombre de zygotes

| Zygotes (ouf fécondé)        | Zygotes (nombre) | Nombre de couples | Pourcentages (%) |
|------------------------------|------------------|-------------------|------------------|
| classes de zygotes $\leq 4$  | 174              | 56                | 55               |
| classes de zygotes (5-8)     | 244              | 38                | 37               |
| classes de zygotes (9-12)    | 62               | 8                 | 8                |
| classes de zygotes $\geq 13$ | 13               | 1                 | 1                |
| <b>Total</b>                 | 493              | 101               | 100              |

#### **I. 4.2. Répartition des couples selon le nombre d'embryons obtenus :**

D'après les résultats obtenus, consignés dans le tableau 6, le nombre total d'embryons obtenus par les couples est de 452. La répartition en classe, selon le modèle de Cai *et al* (2013) indique que dans 59 % des cas étudiés le nombre d'embryons obtenus est inférieur

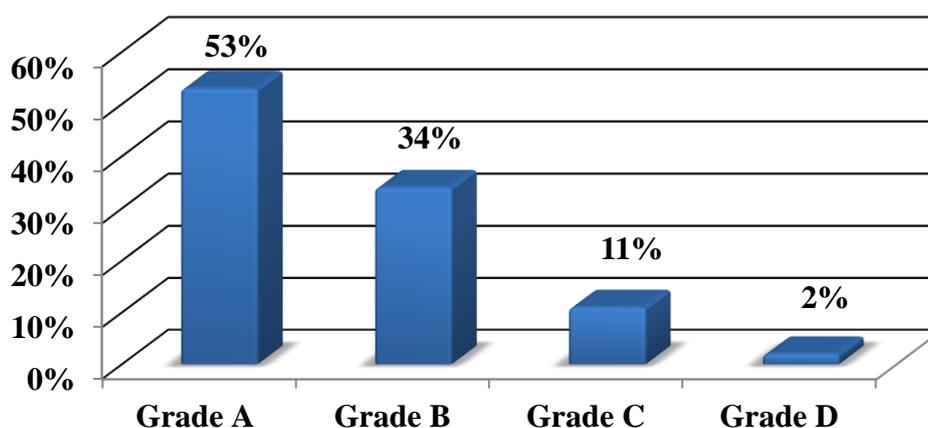
ou égal à 4 embryons. Ce dernier est compris entre 5 et 8 embryons dans 35 % des cas, de 9 à 12 embryons pour 5 % des couples et un couple avec un nombre d'embryons supérieur à 13.

**Tableau 6 :** Répartition des couples selon le nombre d'embryons obtenus

| Embryons                          | Embryons (nombre) | Nombre de couples | Pourcentages (%) |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| classes d'embryons entre $\leq$ 4 | 172               | 60                | 59               |
| classes d'embryons (5-8)          | 216               | 35                | 35               |
| classes d'embryons (9-12)         | 51                | 5                 | 5                |
| classes d'embryons $\geq$ 13      | 13                | 1                 | 1                |
| <b>Total</b>                      | 452               | 101               | 100              |

### **I.4. 3. Distribution des embryons selon le grade :**

Les résultats relatifs à l'appréciation de la qualité des embryons lors du développement embryonnaire précoce, montrent que les embryons de grade A sont les plus dominants, ils représentent 53 % de la totalité des embryons suivit du grade B avec 34 % en fin et les embryons de grade C et D avec des pourcentages respectifs de 11 % et 2 %.



**Figure 20 :** Distribution des embryons selon le grade

### **I.4.5. Répartition selon le grade des embryons transférés et le taux d'implantation :**

Comme indiqué dans le tableau 7, les résultats relatifs au nombre d'embryons transférés par grade et le taux d'implantation, font ressortir que 235 embryons ont été transférés soit 52 % de la totalité des embryons obtenus. Concernant la qualité de ces derniers nous

avons noté que 66 % sont de grade A, 26 % sont de grade B, 7 % sont de grade C et seulement 1% de grade D. Le taux d'implantation ou de nidation enregistré est de 16 %.

**Tableau 7 :** Répartition selon le grade des embryons transférés et le taux d'implantation

| <b>Transferts des embryons</b> | <b>Nombre</b> | <b>Pourcentages (%)</b> |
|--------------------------------|---------------|-------------------------|
| Nombre d'embryons transferts   | 235/452       | 52                      |
| Grade A                        | 156/235       | 66                      |
| Grade B                        | 62/235        | 26                      |
| Grade C                        | 15/235        | 7                       |
| Grade D                        | 2/235         | 1                       |
| Nombre d'embryons implantés    | 38/235        | 16                      |

### **I.4.6. Technique de micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïde :**

Dans notre cohorte, comme rapporté dans le tableau 8, nous avons noté que 25 couples sont parvenus à obtenir une grossesse soit 24.8 % de la population totale. Nous avons par ailleurs relevé 7 fausses-couches, suite à un avortement moins de 12 semaines, ce qui représente un taux de 28%. Concernant les naissances, nous avons enregistré 21 naissances soit un taux de 20.8%, correspondant à 30 nouveaux nés suite à 14 naissances uniques, 5 gémellaires et deux triplets. Par sexe nous avons recensé 53 % de sexe féminin soit 16 filles et 47 % de sexe masculin soit 14 garçon.

**Tableau 8 :** Technique de micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïde

| <b>Résultat d'ICSI</b> | <b>Nombre</b> | <b>Pourcentages (%)</b> |
|------------------------|---------------|-------------------------|
| Grossesses             | 25/101        | 24.8                    |
| Avortements            | 7/25          | 28                      |
| Naissances             | 21/101        | 20.8                    |
| Nombre d'enfants       | 30            | /                       |
| Naissances uniques     | 14            | /                       |
| Naissances Gémellaire  | 5             | /                       |
| Triplets               | 2             | /                       |
| Nombre de filles       | 16/30         | 53                      |
| Nombres de garçons     | 14/30         | 47                      |

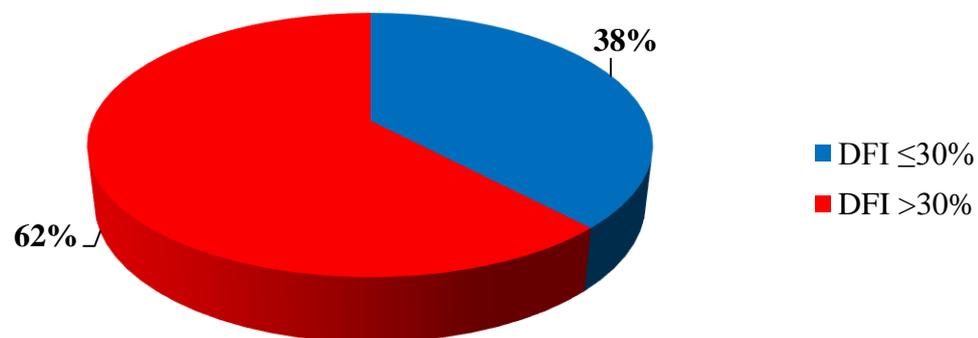
## II. Etude de la qualité du génome spermatique :

### II .1. Etude de la qualité de l'ADN spermatique :

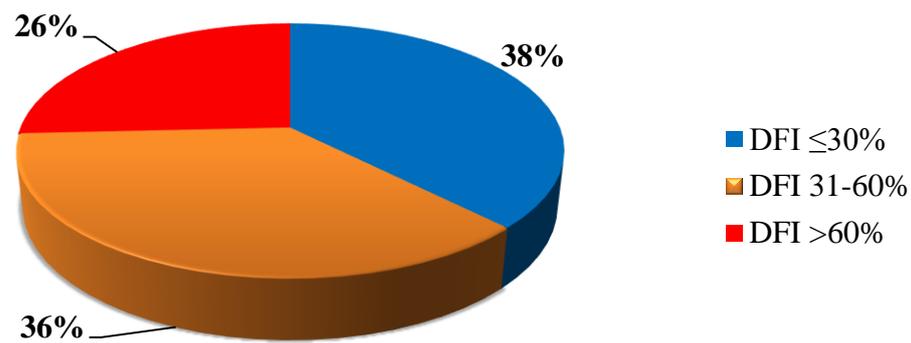
#### II .1.1.Distribution des patients selon les classes de DFI :

Sur la base des résultats relatifs au taux de fragmentation de l'ADN spermatique des 101 patients étudiés (Figure 21), rapportés d'après le modèle de Fernandez *et al* (2003) qui préconisent deux seuils de DFI ( $\leq 30\%$  et/ou  $>30\%$ ). Il ressort que 38 % des patients présentent un DFI  $\leq 30\%$ , il s'agit donc de patients ayant un ADN spermatique non dégradé. Alors que 62% révèlent un DFI  $> 30\%$ . Ce qui indique la présence d'un taux élevé de cassures simples et doubles brin au niveau leur ADN, évoquant un ADN spermatique dégradé.

Cependant, pour mieux affiner nos résultats nous avons pris en considération le modèle de Simon *et al* (2014) qui préconisent trois seuils de DFI ( $\leq 30\%$ ,  $31\% - 60\%$  et  $> 60\%$ ) (Figure 22). Il ressort que 38 % des patients ont un ADN spermatique non dégradé, 36% disposent d'un ADN partiellement ou modérément dégradé et 26 % évoquent un ADN dégradé avec un taux de cassures simples et doubles brins élevé.



**Figure 21 :** Distribution des patients selon les deux classes de DFI

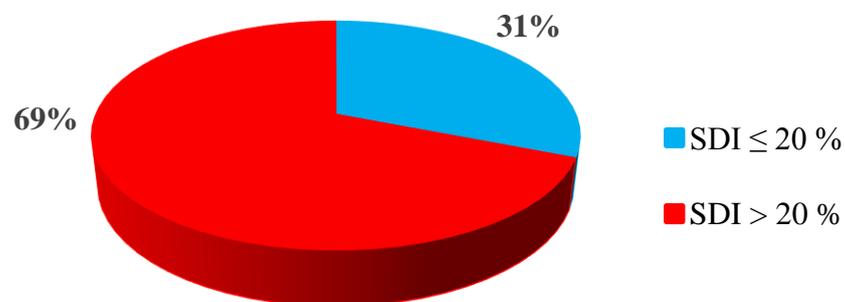


**Figure 22 :** Distribution des patients selon les trois classes de DFI

## **II .2 .Etude la qualité de la chromatine spermatique :**

### **II .2 .1. Distribution des patients selon le SDI :**

Sur la base des résultats du taux de condensation de la chromatine spermatique sur les 88 patients inclus pour cette étude (Figure 23), nous avons recensé 31 % dont le SDI < 20 % donc des patients présentant une chromatine spermatique bien condensé. Alors que 69 % des cas évoquent un SDI ≥ 20 % il s'agit de patients disposant d'une chromatine spermatique mal compacté avec persistance d'histone nucléaire.



**Figure 23 :** Répartition des patients selon le SDI

## **II .3. Etude de la relation qualité de l'ADN et structure de la chromatine spermatique :**

### **II .3.1. Taux de condensation de la chromatine spermatique selon le DFI du patient**

La répartition du taux de décondensation de la chromatine spermatique selon les deux classes de DFI rapporté dans le tableau 9, indique que dans cas la classe de DFI ≤ 30%,

le taux de décondensation de la chromatine spermatique est en moyenne de l'ordre de  $22.2 \pm 11.4$  %. Alors que pour la classe de DFI  $> 30$  %, le taux de décondensation de la chromatine spermatique est en moyenne de  $31.1 \pm 16.2$  %. La différence semble très significative ( $p = 0.007$ ). Si on considère le modèle à trois classes, tableau 10, pour les patients de DFI  $\leq 30$  % le taux de décondensation de la chromatine spermatique est en moyenne de  $22.2 \pm 11.4$  %. Pour ceux présentant un DFI situé entre 31%-60 % le taux de décondensation de la chromatine spermatique est en moyenne de l'ordre de  $28.9 \pm 15.0$  % et pour les cas à DFI  $> 60$  % le taux de décondensation de la chromatine spermatique est en moyenne de  $34.0 \pm 17.5$ %. La p-value est de 0.01 donc la différence semble significative entre les valeurs moyenne des SDI des trois groupes de patients.

**Tableau 9 :** Taux de décondensation de la chromatine selon les deux classes de DFI

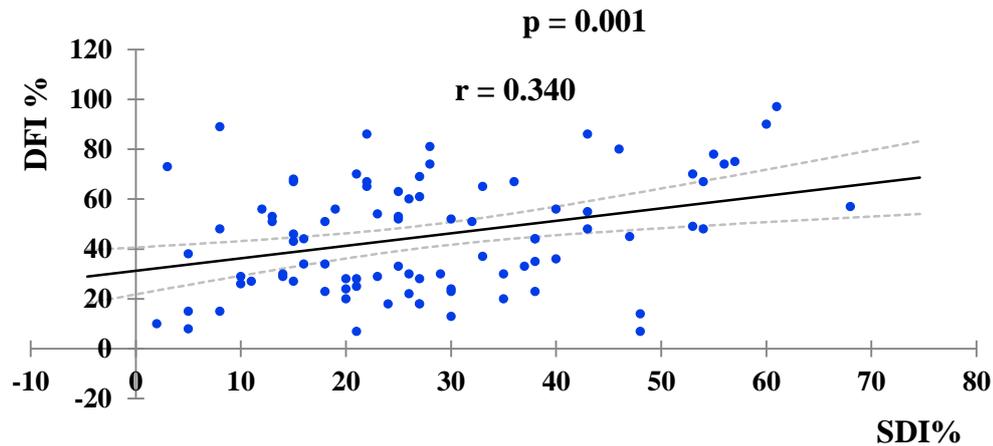
| Classes DFI | DFI $\leq 30\%$ | DFI $> 30\%$    | p-value      |
|-------------|-----------------|-----------------|--------------|
| SDI         | $22.2 \pm 11.4$ | $31.1 \pm 16.2$ | <b>0.007</b> |

**Tableau 10 :** Taux de décondensation de la chromatine selon les trois classes de DFI

| Classes DFI | DFI $\leq 30$ % | DFI 31 %-60 %   | DFI $> 60$ %    | p-value     |
|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------|
| SDI         | $22.2 \pm 11.4$ | $28.9 \pm 15.0$ | $34.0 \pm 17.5$ | <b>0.01</b> |

### **II .3. 2. Corrélation entre SDI et DFI :**

L'analyse statistique des données, pour établir une corrélation entre deux variables, effectuée par le calcul du coefficient de corrélation de Pearson, indique un lien très significatif ( $r = 0.340$ ,  $p = 0.001$ ) entre le taux de fragmentation de l'ADN spermatique (DFI) et le taux de décondensation de la chromatine spermatique (SDI) (Figure 24).

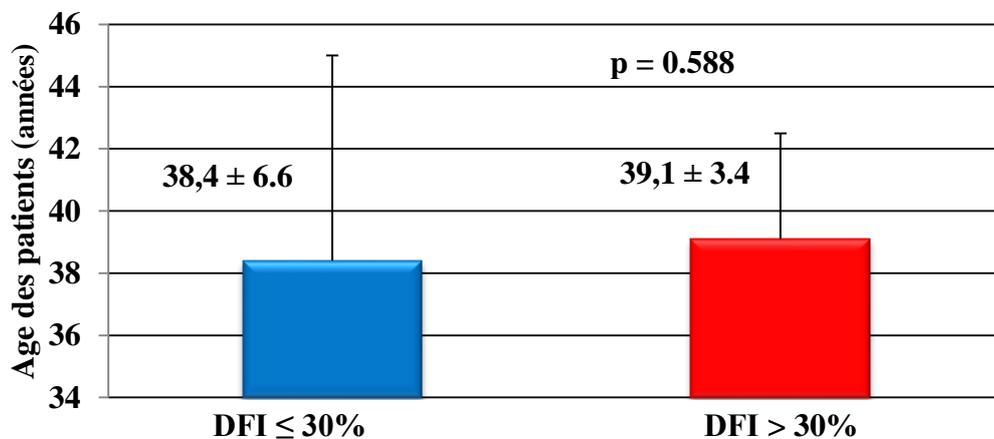


**Figure 24** : Corrélation entre SDI et DFI

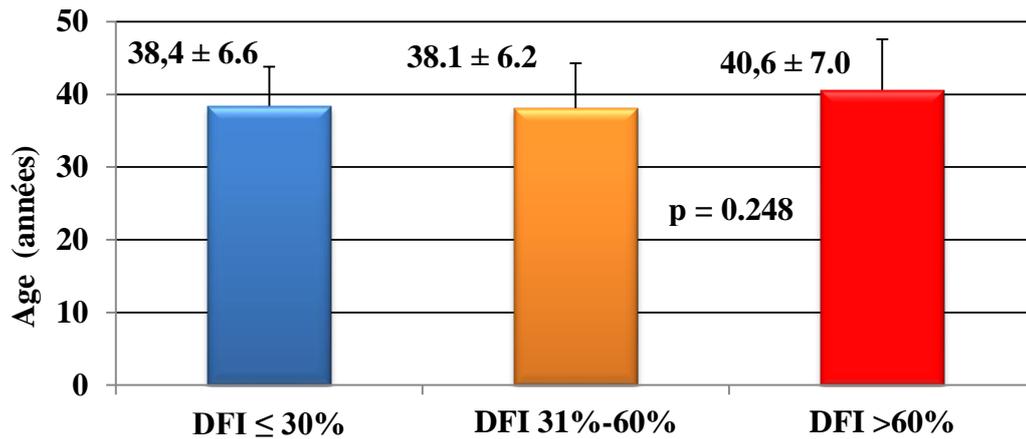
**III. Etude de la relation qualité du génome spermatique et âge du patient :**

**III. 1. Distribution des patients selon l'âge et les classes de DFI :**

La distribution des patients selon l'âge et la qualité de l'ADN spermatique, rapporté en figure 25 et 26, montre que quel que soit le modèle de répartition à deux classes ou à trois classes de DFI, l'âge moyen des patients est relativement identique. Ce dernier est de l'ordre de  $38.4 \pm 6.6$  ans pour les patients présentant un  $DFI \leq 30\%$  et il est de  $38.1 \pm 6.2$  ans pour ceux ayant un DFI situé entre  $31\% - 60\%$  et il est de  $40.6 \pm 7.0$  ans pour les patients évoquant des  $DFI > 60\%$ . L'analyse statistique indique que la relation entre la qualité de l'ADN spermatique et l'âge des patients n'est pas significative ( $p = 0.588$ ) dans le cas d'un modèle de distribution à deux classes, préconisé par Fernandez *et al* (2003) et de même pour une distribution à trois classes selon le modèle de Simon *et al* (2014), ( $p = 0.248$ ).



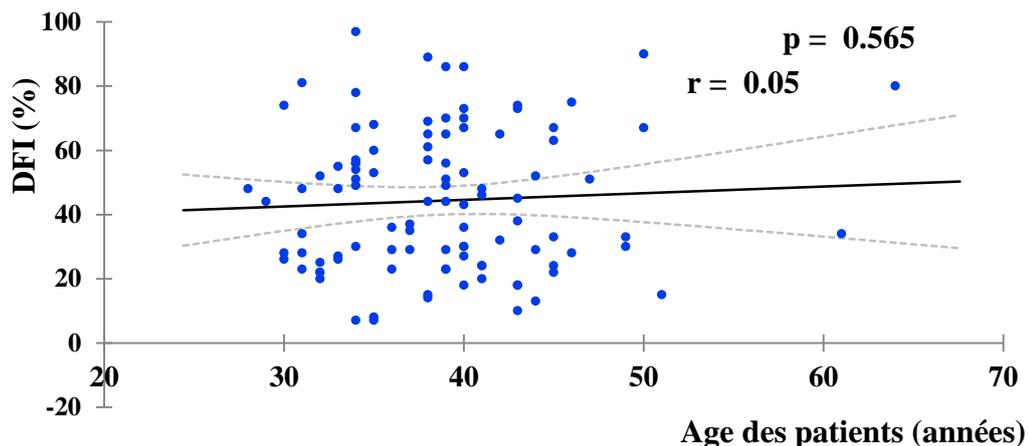
**Figure 25** : Distribution des patients selon l'âge et les deux classes de DFI



**Figure 26 :** Distribution des patients selon l'âge et les trois classes de DFI

### **III .2. Corrélation entre l'âge des patients et le DFI :**

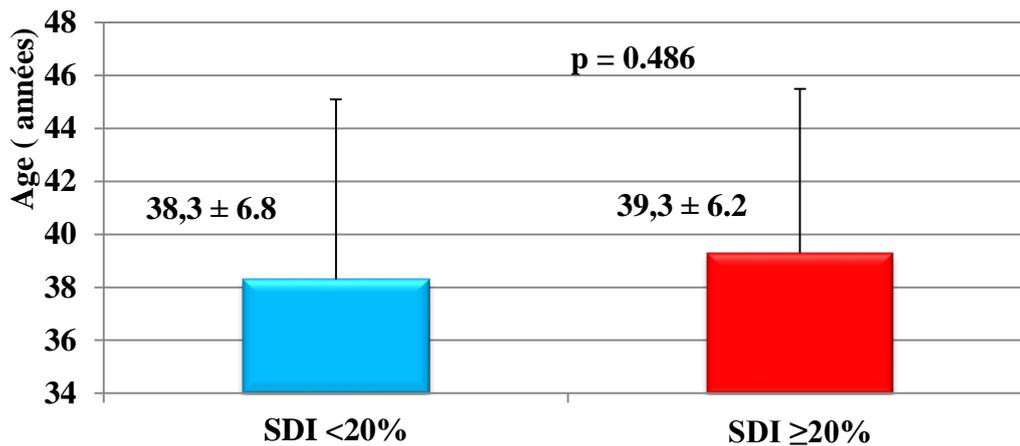
L'étude de corrélation entre les deux variables considérée (Figure 27) indique qu'il n'existe pas de lien entre le taux de fragmentation de l'ADN spermatique et l'âge des patients. Le coefficient de corrélation est de 0.05 et la p-value est égal à 0.565.



**Figure 27 :** Corrélation entre l'âge des patients et le DFI

### **III. 3. Distribution des patients selon l'âge des patients et le SDI :**

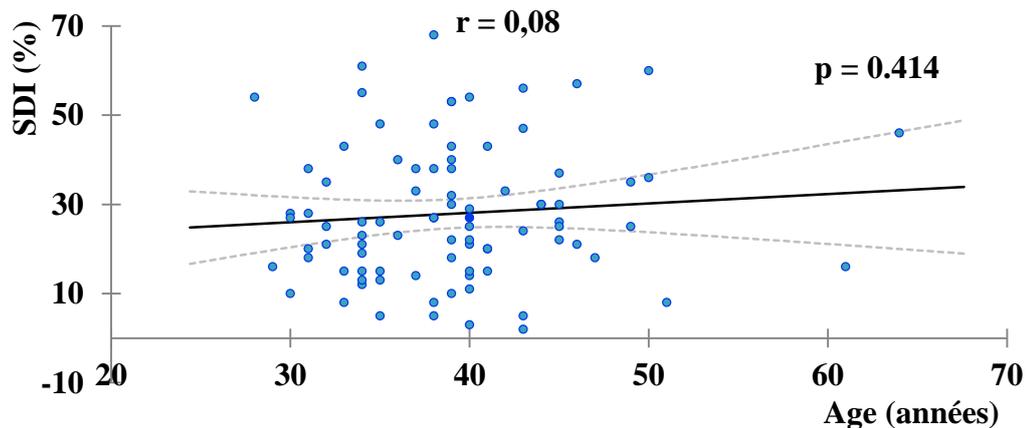
La distribution selon l'âge des patients et le SDI (Figure 28) montre qu'il n'existe pas de différence significative d'âge des patients appartenant aux deux classes de SDI considérées pour apprécier la qualité de la chromatine spermatique (p = 0.486). L'âge moyen des patients appartenant aux deux classes de SDI est respectivement de l'ordre de  $39.3 \pm 6.2$  ans pour un SDI < 20 % et de  $38.3 \pm 6.8$  ans pour un SDI ≥ 20 %.



**Figure 28** : Distribution selon l'âge des patients et le SDI

### III. 4. Corrélation entre l'âge des patients et le SDI :

L'analyse des données indique qu'il n'y a pas de corrélation significative entre le taux de condensation de la chromatine spermatique (SDI) et l'âge des patients. Le coefficient de corrélation est de 0.08 et la p-value est égal à 0.414 (Figure 29).



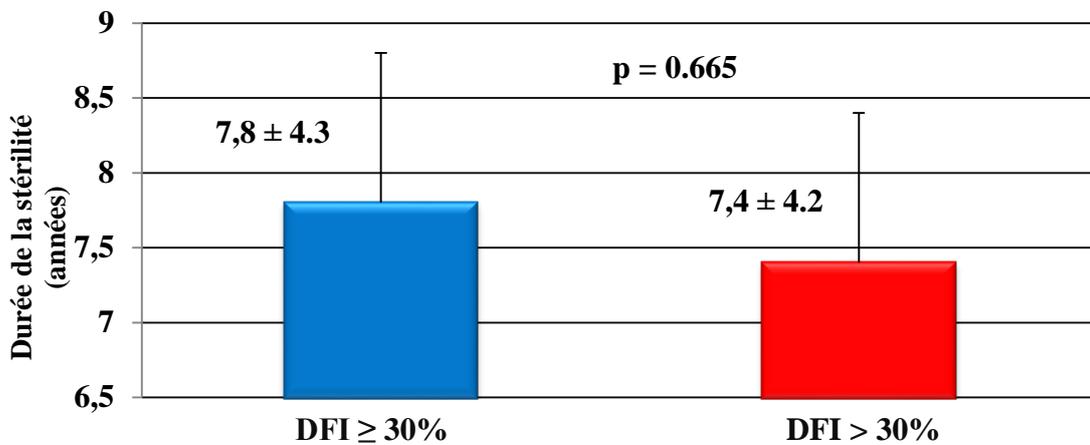
**Figure 29** : Corrélation entre l'âge des patients et le SDI

### IV. Etude de la relation qualité du génome spermatique et durée de stérilité :

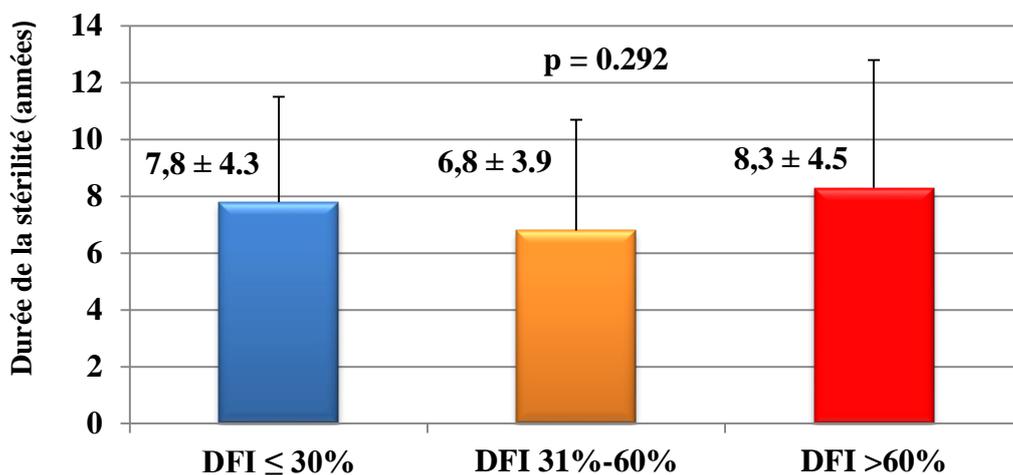
#### IV.1. Distribution selon les classes de DFI et la durée de stérilité des patients :

La distribution des patients selon la qualité de leur ADN spermatique et la durée de la stérilité enregistrée montre que la durée de stérilité est en moyenne presque équivalente, et ce quel que soit le taux de DFI du patient et/ou le mode de seuil considéré (Figure 30 et 31). Ainsi nous avons noté la durée de stérilité chez les couples est en moyenne de  $7.8 \pm 4.3$  ans pour des  $DFI \leq 30\%$ , elle est de  $7.4 \pm 4.2$  ans pour des  $DFI > 30\%$  et peut atteindre en moyenne jusqu'à  $8.3 \pm 4.5$  ans pour les  $DFI > 60\%$ . L'étude statistique

n'indique aucune différence significative de moyennes obtenues et ce quelque le modèle considéré ( $p = 0.665$ ,  $p = 0.292$ ).



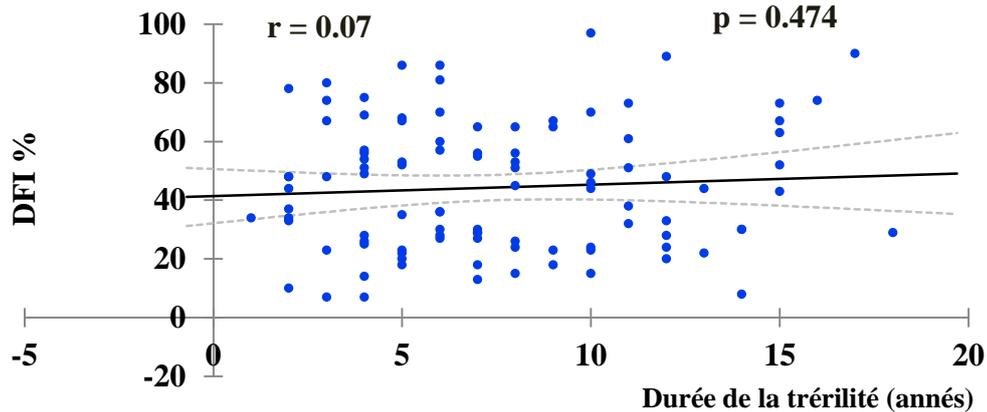
**Figure 30** : Distribution selon les deux classes de DFI et la durée de stérilité



**Figure 31** : Distribution selon les trois classes de DFI et la durée de stérilité

## IV. 2. Corrélation entre le DFI et la durée de stérilité des patients :

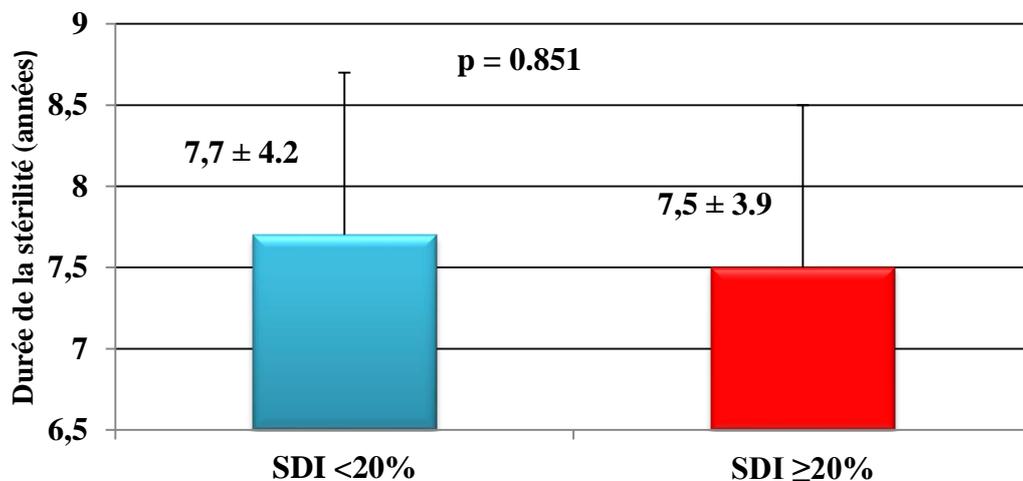
L'analyse statistique des données, figure 32, indique qu'il n'existe pas de corrélation significative entre le taux de fragmentation de l'ADN spermatique (DFI) et la durée de la stérilité des patients ( $r = 0.07$ ,  $p = 0.414$ ).



**Figure 32 :** Corrélation entre le DF1 et la durée de stérilité

**IV.3. Distribution selon le SDI la durée de stérilité des patients :**

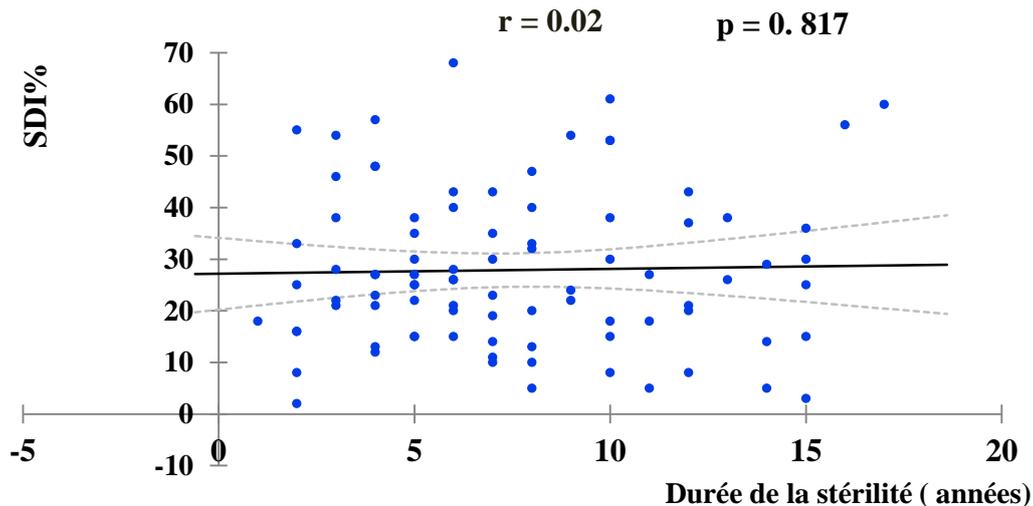
Les résultats rapportés au figure 33 révèlent que la de la durée de stérilité des patients ne semble pas liée aux taux de compaction de la chromatine spermatique cette dernière est en moyenne de  $7.5 \pm 3.9$  ans pour les patients à  $SDI < 20\%$  et de  $7.7 \pm 4.2$  ans pour ceux ayant un  $SDI \geq 20\%$ . La différence est non significative  $p = 0.851$ .



**Figure 33 :** Distribution selon le SDI et la durée de stérilité

**IV.4. Corrélation entre le SDI et la durée de stérilité des patients :**

La courbe de régression rapportée par la figure 34 montre qu’il n’existe pas de corrélation significative entre le taux de condensation de la chromatine spermatique et la durée de la stérilité des patients ( $r = 0.02$ ,  $p = 0.817$ ).



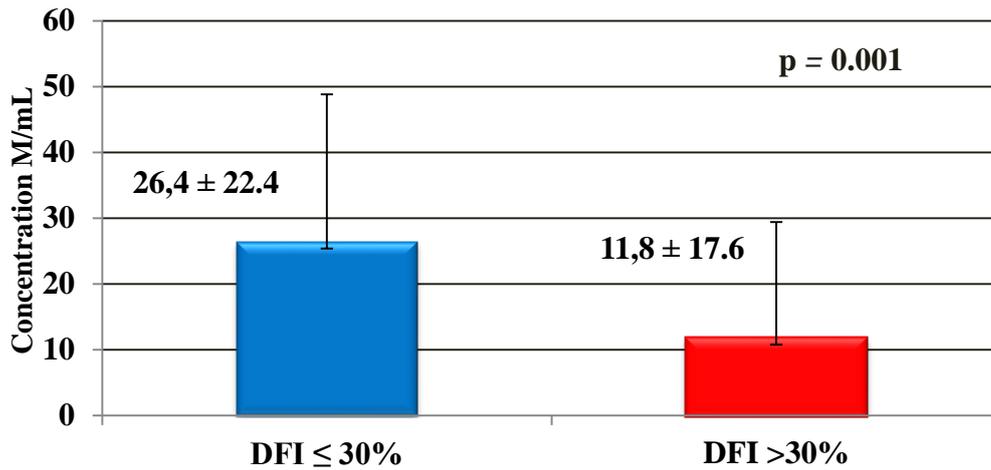
**Figure 34 :** Corrélation entre le DFI et stérilité des patients

**V. Etude de la relation qualité du génome spermatique et paramètres spermatiques :**

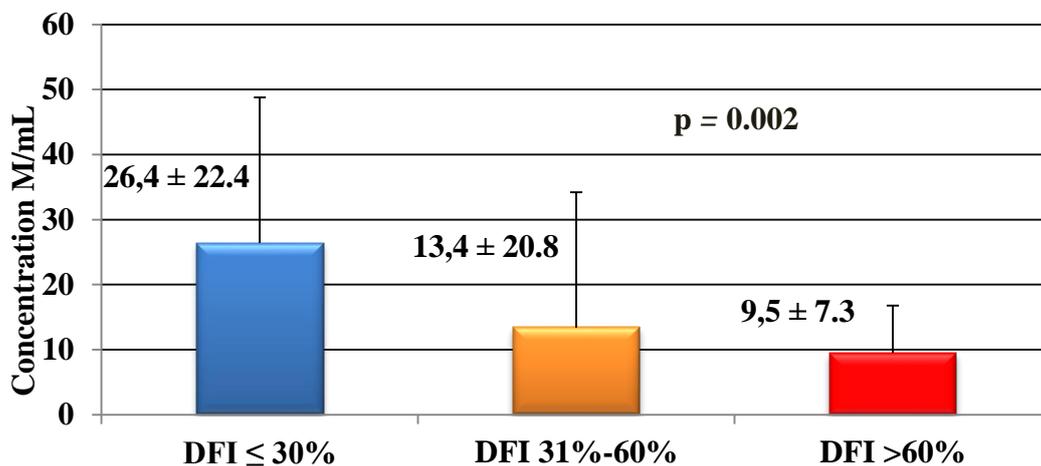
**V.1. Distribution des patients selon le DFI et concentration spermatique :**

La répartition des patients selon la qualité de l'ADN spermatique évaluée selon le modèle de Fernandez *et al* (2003) et la concentration spermatique des patients, mesurée après le test de migration et de survie, révèle que la concentration spermatique moyenne chez les patients ayant un DFI  $\leq 30\%$  est de  $26.4 \pm 22.4$  M/ml cette dernière diminue à  $11.8 \pm 17.6$  M/ml chez les patients révélant un DFI  $> 30\%$  (Figure 35). La différence semble hautement significative ( $p = 0.01$ ).

La distribution des patients selon les trois classes de DFI, préconisée par Simon *et al* (2014) indique aussi une différence hautement significative ( $p = 0.002$ ) avec des valeurs moyennes de concentration spermatique de  $26.4 \pm 22.4$  M/ml pour les patients à DFI  $\leq 30\%$  elle chute à  $13.4 \pm 20.8$  M/ml pour les DFI compris entre  $31\%$ - $60\%$  pour atteindre des niveaux encore plus bas de l'ordre de  $9.5 \pm 7.3$  M/ml chez des patients dont le DFI  $> 60\%$  (Figure 36).



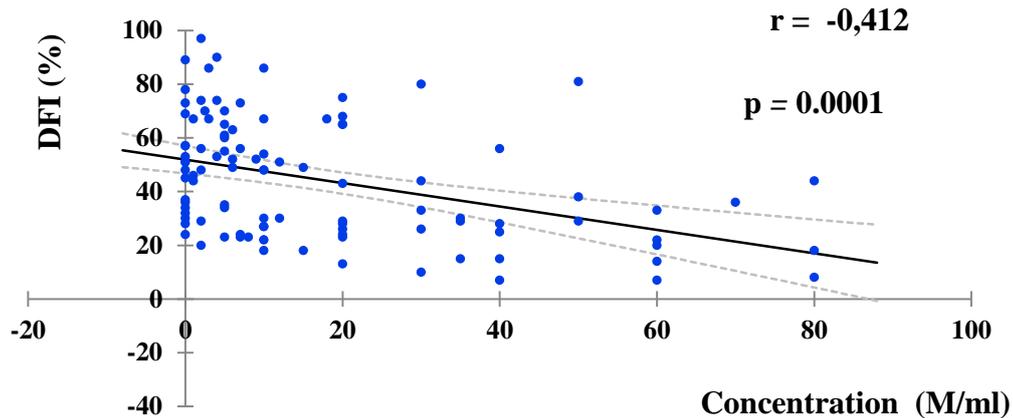
**Figure 35** : Distribution selon les deux classes de DFI et la concentration spermatique



**Figure 36** : Distribution selon les trois classes de DFI et la concentration spermatique

**V. 2. Corrélation entre le DFI et concentration spermatique :**

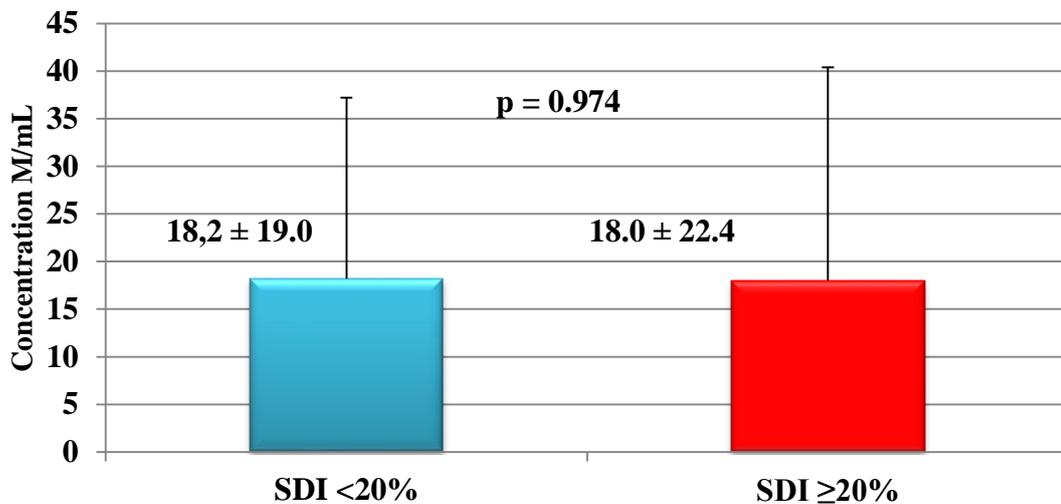
L'analyse statistique révèle une corrélation négative entre le taux de fragmentation de l'ADN spermatique et la concentration des spermatozoïdes des patients ( $r = -0.412$ ). Cette dernière semble très hautement significative ( $p = 0.0001$ ) (Figure 37).



**Figure 37 :** Corrélation entre DFI et la concentration spermatique

**V. 3. Distribution des patients selon le SDI et la concentration spermatique :**

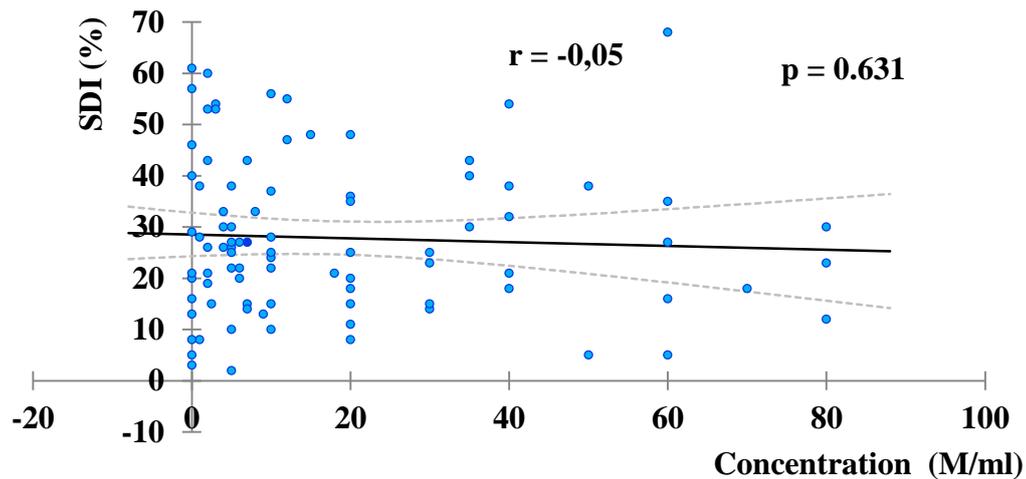
La concentration spermatique des patients, considéré en fonction du taux de condensation de la chromatine spermatique (Figure 38), est en moyenne non significative ( $p = 0.974$ ) chez les deux groupes de patients. Elle est de l'ordre de  $18.2 \pm 19.0$  M/ml pour les SDI  $< 20\%$  et de  $18.0 \pm 22.4$  M/ml pour les patients à SDI  $\geq 20\%$ .



**Figure 38 :** Distribution des patients selon le SDI et la concentration spermatique

**V.4. Corrélation entre le SDI et la concentration spermatique :**

L'analyse des données révèle une corrélation négative ( $r = -0.05$ ) mais non-significative ( $p = 0.631$ ) entre le taux de condensation de la chromatine spermatique et la concentration spermatique des patients (Figure 39).

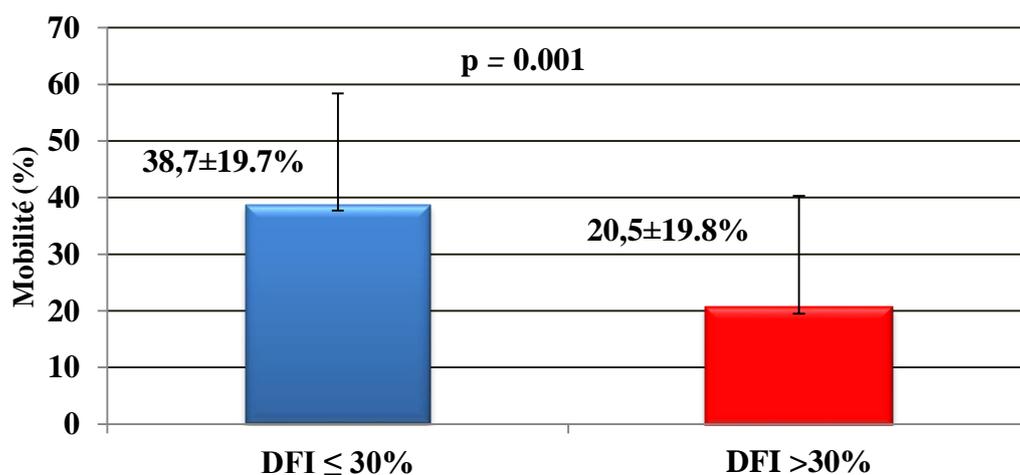


**Figure 39 :** Corrélation entre le SDI et la concentration spermatique

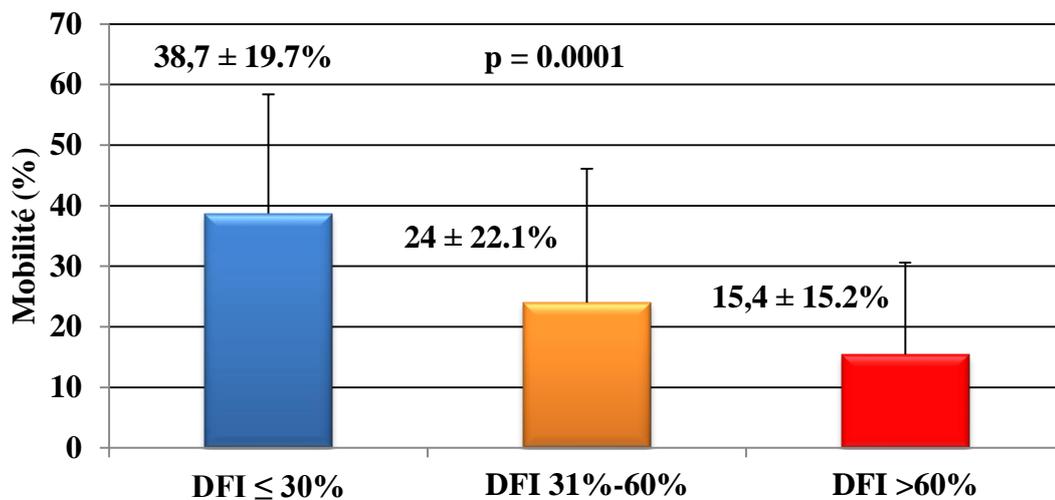
**V.5. Distribution des patients selon le DFI et la mobilité spermatique :**

La mobilité spermatique chez les patients, appréciée en fonction des DFI de ces derniers, indique en moyenne des valeurs très significativement plus faible ( $p = 0.001$ ) chez les patients présentant des DFI  $> 30\%$  ;  $20.5 \pm 19.8\%$  versus  $38.7 \pm 19.7\%$  pour les patients de classes de DFI  $\leq 30\%$  (Figure 39).

Il est à noter que les valeurs de la mobilité spermatique des patients rapportés selon le modèle des trois classes de DFI (Figure 41) varient en moyenne de manière hautement significative passant de  $38.7 \pm 19.7\%$  pour un DFI  $\leq 30\%$  à seulement  $24.0 \pm 22.1\%$  pour un DFI compris entre  $31\% - 60\%$  et  $15.4 \pm 15.2\%$  pour les cas de DFI  $> 60\%$  ( $p = 0.001$ ).



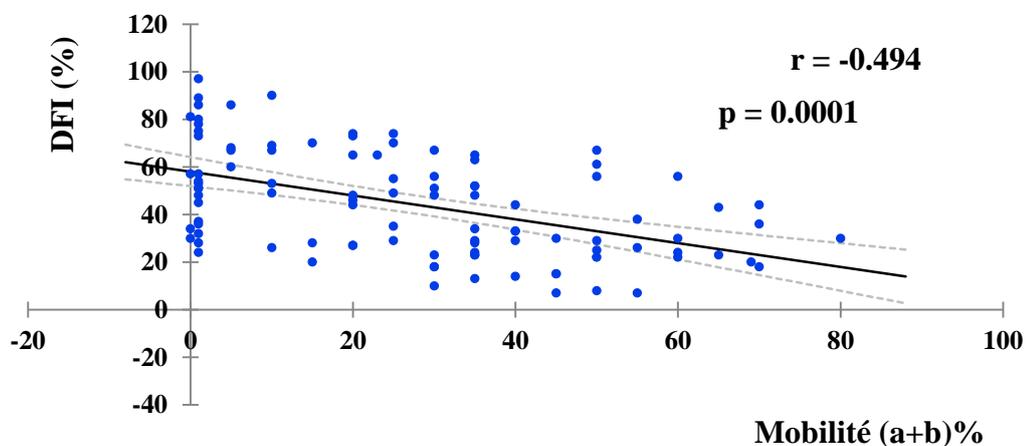
**Figure 40 :** Distribution selon les deux classes de DFI et la mobilité spermatique



**Figure 41 :** Distribution selon les trois de DFI et mobilité spermatique

**V.6. Corrélation entre le DFI et la mobilité spermatique :**

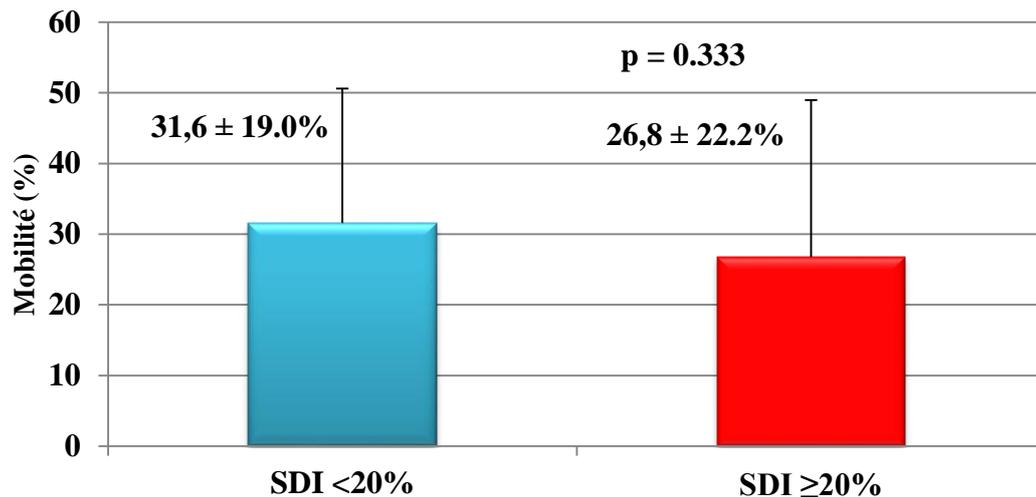
L'étude de la corrélation entre les deux variables indique un lien hautement significative révélant entre le taux de fragmentation de l'ADN spermatique des patients et la mobilité spermatique ( $r = -0.494$ ) ( $p = 0.0001$ ) (Figure 42).



**Figure 42 :** Corrélation entre le DFI et la mobilité spermatique

**V.7. Distribution des patients selon le SDI et la mobilité spermatique :**

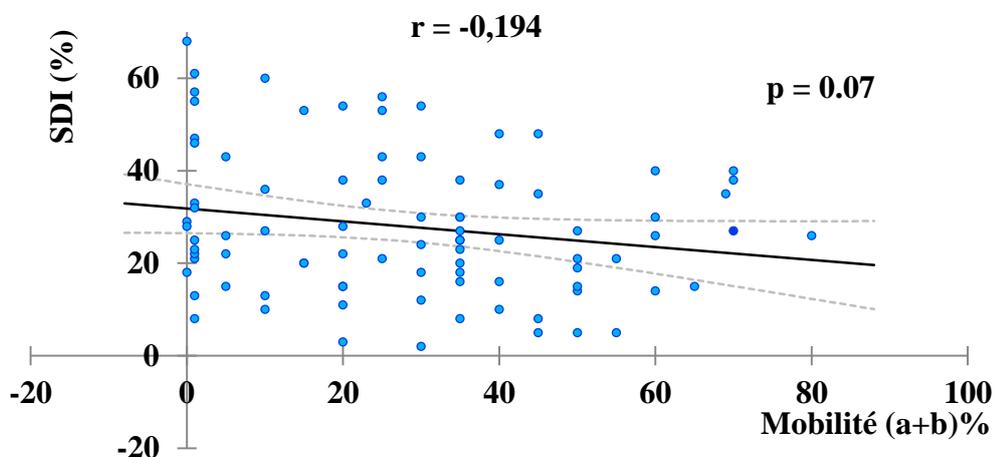
La distribution des patients selon le SDI et la mobilité des patients indique des valeurs moyennes de mobilité spermatique de l'ordre de  $31.6 \pm 19.0\%$  chez les patients ayant un  $SDI < 20\%$  et de  $26.8 \pm 22.2\%$  pour les patients à  $SDI \geq 20\%$  (Figure 43). La différence entre les valeurs moyenne semble non significative ( $p = 0.333$ ).



**Figure 43 :** Distribution des patients selon le SDI et la mobilité spermatique

**V.8 .Corrélation entre le SDI et la mobilité spermatique :**

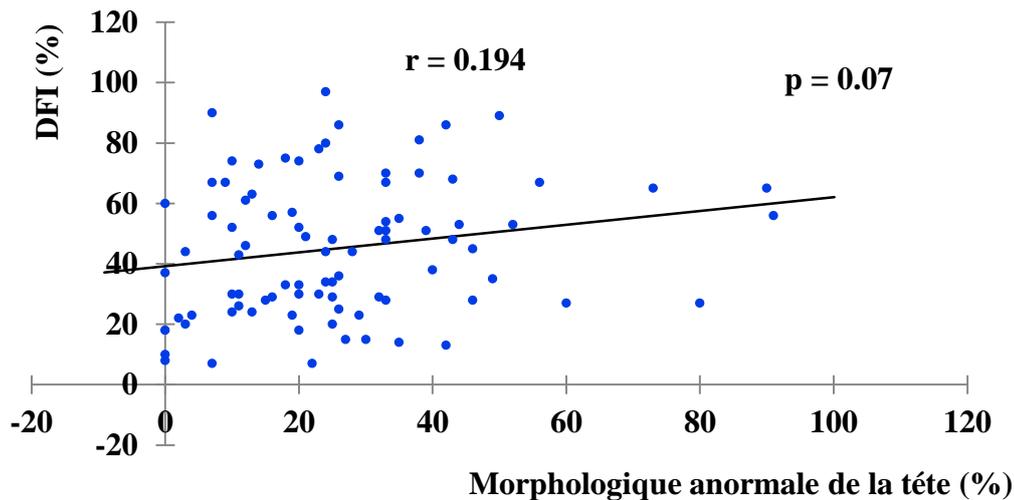
L'analyse statistique des données établit une corrélation négative ( $r = -0.194$ ) mais qui semble non significative ( $p = 0.07$ ) entre le taux de condensation de la chromatine spermatique et la mobilité spermatique (Figure 44).



**Figure 44 :** Corrélation entre le SDI et la mobilité spermatique

**V.9. Corrélation entre le DFI et les anomalies céphaliques du spermatozoïde :**

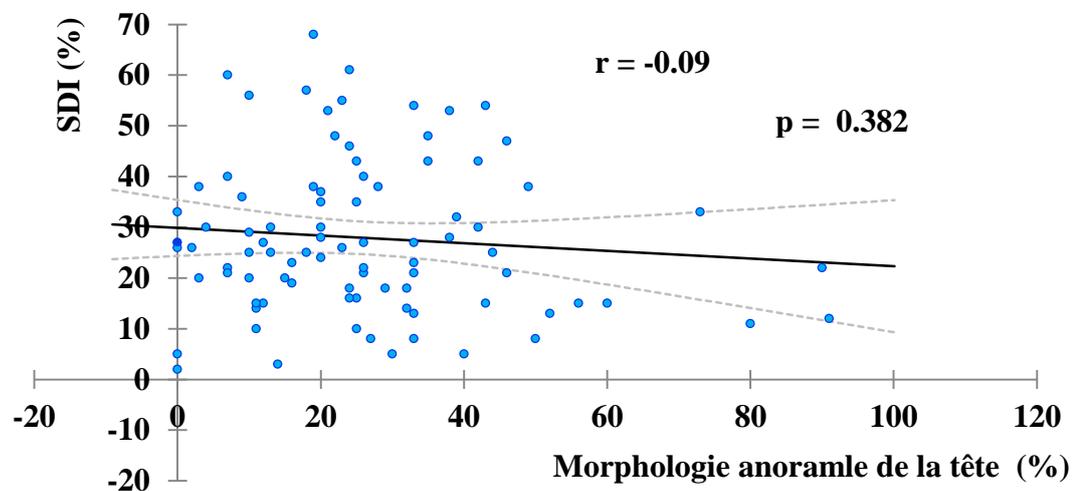
La courbe de régression rapportée par la figure 45 montre une corrélation non-significative entre le taux de fragmentation de l'ADN spermatique et la présence d'anomalies morphologiques au niveau de la tête du spermatozoïde ( $r = 0.194$ ) ( $p = 0.07$ ).



**Figure 45 :** Corrélation entre le DFI et les anomalies céphaliques du spermatozoïde

**V.10. Corrélation entre le SDI et les anomalies céphaliques du spermatozoïde :**

La courbe de régression rapportée par la figure 46 montre une corrélation négative non-significative entre le taux de condensation de la chromatine spermatique et la présence d'anomalies morphologiques au niveau de la tête du spermatozoïde ( $r = -0.09$ ) ( $p = 0.382$ ).



**Figure 46 :** Corrélation entre le SDI et les anomalies céphaliques du spermatozoïde

**VI. Etude relation mode de vie des patients et qualité du génome spermatique :**

**VI.1. Etude de la relation qualité de l'ADN spermatique et mode de vie :**

Les résultats consignés dans le tableau 11, révèlent qu'à l'exception du tabagisme ou la différence semble très significative, indiquant des DFI donc une qualité d'ADN

spermatique meilleurs chez les fumeurs comparé aux non-fumeurs, avec des valeurs moyennes respectifs du taux de fragmentation de l'ADN spermatique de  $37.7 \pm 17.7$  % pour les fumeurs, et  $49.0 \pm 23.2$  % pour les non-fumeurs ( $p = 0.007$ ).

Les variations en valeurs moyennes des DFI pour les autres paramètres étudiés semblent non-significatives, nous avons noté des p-value de 0.445 pour la fréquentation des sources d'eau chaudes,  $p = 0.185$  concernant les patients présentant une hyperthermie dans les trois mois précédant une fécondation in vitro et de  $p = 0.07$  concernant la prise des antioxydants.

**Tableau 11** : DFI des patients selon leur mode de vie

| Paramètres                                      | DFI (+)            | Non (-)           | p-value      |
|-------------------------------------------------|--------------------|-------------------|--------------|
| <b>Tabagisme</b>                                | $37.1 \pm 17.7$ %  | $49.0 \pm 23.2$ % | <b>0.007</b> |
| <b>Fréquentations des sources d'eau chaudes</b> | $41.8 \pm 20.5$ %  | $47.5 \pm 22.5$ % | 0.445        |
| <b>Présences d'hyperthermie</b>                 | $42.6. \pm 22.5$ % | $49.0 \pm 20.0$ % | 0.185        |
| <b>Prise d'antioxydants</b>                     | $38.2 \pm 19.7$ %  | $46.8 \pm 22.3$ % | 0.07         |

### **VI .2. Etude de la relation qualité de la chromatine spermatique et mode de vie :**

L'étude de l'influence du mode de vie sur la qualité de la chromatine des patients dont les résultats sont consignés dans le tableau 12, montre qu'à l'exception du tabagisme qui indique une différence significative ( $p = 0.03$ ) des valeurs moyennes du taux de condensation de la chromatine spermatique, révélant une meilleure qualité de cette dernière chez les non-fumeurs ( $SDI = 25.1 \pm 13.4$  %) par rapport aux fumeurs ( $SDI = 31.9 \pm 16.8$  %). Pour le reste des paramètres étudiés la différence des valeurs moyennes enregistrées semble non-significative. Néanmoins on observe en moyenne que l'indice du taux de décondensation de la chromatine spermatique est relativement plus faible chez les patients ne fréquentant pas les sources d'eau chaude, ainsi que chez les patients non soumis aux antioxydants.

**Tableau 12** : SDI des patients selon leur mode de vie

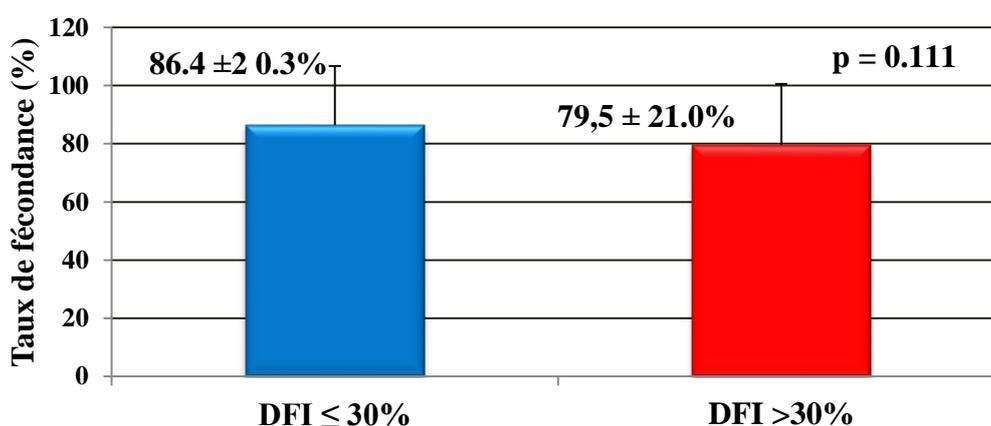
| Paramètres                                      | SDI (+)       | SDI (-)       | p-value     |
|-------------------------------------------------|---------------|---------------|-------------|
| <b>Tabagisme</b>                                | 31.9 ± 16.8 % | 25.1 ± 13.4 % | <b>0.03</b> |
| <b>Fréquentations des sources d'eau chaudes</b> | 31,71± 4,2 %  | 26,5 ± 14,4 % | 0.185       |
| <b>Présence d'hyperthermie</b>                  | 42.6 ± 22.5 % | 49.0 ± 20.0 % | 0.185       |
| <b>Prise d'antioxydants</b>                     | 29.1 ± 15.9 % | 25.0 ± 13.3 % | 0.225       |

## VII. Etude de la relation qualité du génome spermatique taux de fécondance :

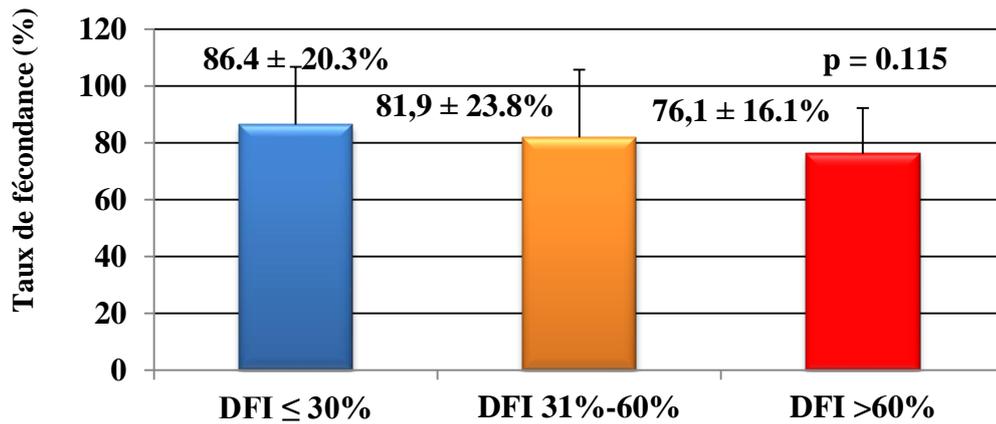
### VII.1. Distribution des patients selon les classes de DFI et le taux de fécondance :

L'étude de l'influence de la qualité de l'ADN spermatique sur le taux de fécondance chez le couple, considérée selon le DFI du conjoint, modèle à deux classes (Figure 47) et modèle à trois classes (Figure 48), montre qu'il n'existe pas de différences significatives des valeurs moyennes du taux de fécondances entre les différents groupes de patients ( $p = 0.111$ ,  $p = 0.115$ ).

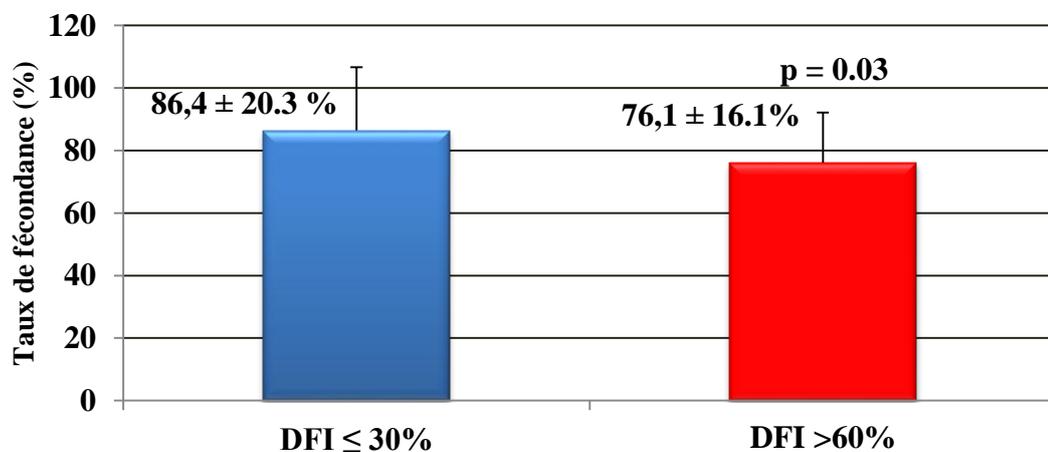
Cependant si l'on considère les deux classes extrêmes  $DFI \leq 30\%$  -  $DFI > 60\%$  (Figure 49), La différence entre les valeurs moyennes du taux de fécondance, semble être significative ( $p = 0.03$ ), révélant ainsi qu'au-delà de 60% d'indice de taux de fragmentation de l'ADN spermatique du conjoint, le taux de fécondance chez le couple est affecté.



**Figure 47** : Distribution selon les deux classes de DFI et le taux de fécondance



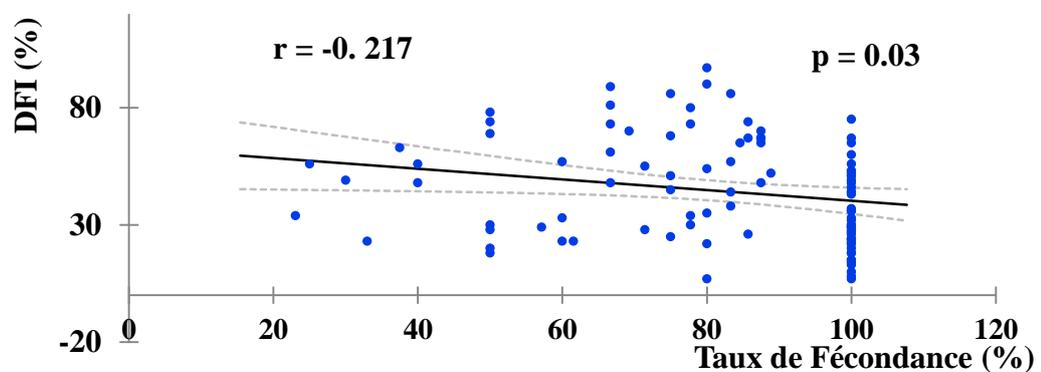
**Figure 48 :** Distribution selon les trois classes de DFI et le taux de fécondance



**Figure 49 :** Comparaison du taux de fécondance pour les DFI ≤30% - DFI >60%

**VII. 2 .Corrélation entre le DFI et le taux de fécondance :**

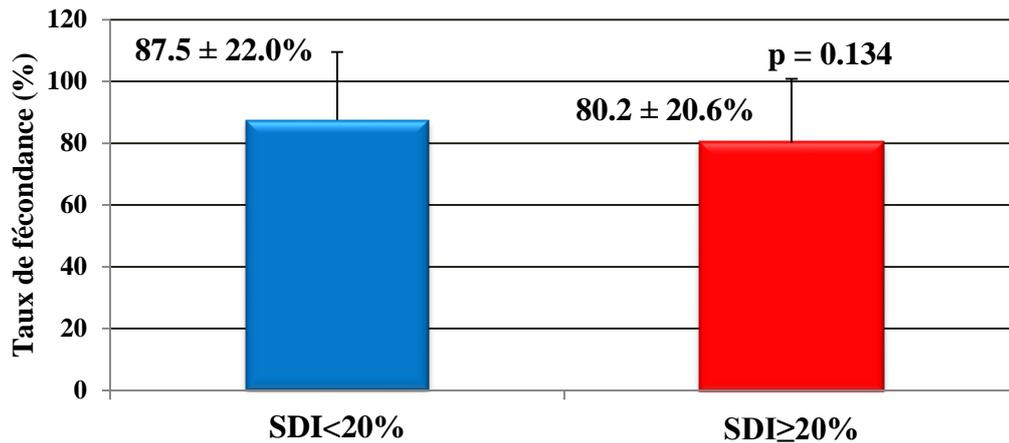
L'analyse des données indique une corrélation négative ( $r = -0.217$ ) qui semble significative ( $p = 0.03$ ) entre le taux de fragmentation de l'ADN spermatique et le taux de fécondance chez les couples étudiés (Figure 50).



**Figure 50 :** Corrélation entre le DFI et le taux de fécondance

**VII. 3. Distribution des patients selon le SDI et le taux de fécondance :**

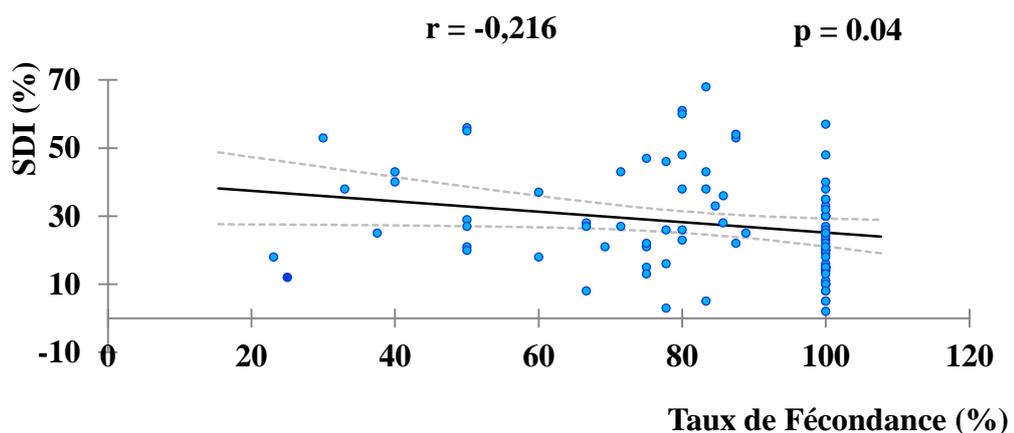
La distribution des patients selon la qualité de la chromatine spermatique et le taux de fécondance, rapporté par la figure 51, montre qu’il n’existe pas de différence significative ( $p = 0.134$ ) entre les taux de fécondances enregistrés chez les deux classes de SDI considérés. Le taux de condensation de la chromatine spermatique du conjoint ne semble pas avoir de conséquence sur la fécondance chez le couple.



**Figure 51 :** Distribution selon le SDI le taux de fécondance

**VII. 8. Corrélation entre le SDI le taux de fécondance :**

Le résultat représenté dans la figure 52, montre qu’il existe une corrélation négative et significative entre le taux de condensation de la chromatine spermatique et le taux de fécondance. Le coefficient de corrélation est de -0.216 et la p-value est égal à 0.04.



**Figure 52 :** Corrélation entre le SDI et le taux de fécondance

### **VIII. Etude de la relation qualité du génome spermatique et nombre d'embryons obtenus :**

#### **VIII. 1. Répartition des patients selon les classes de DFI et le taux de segmentation embryonnaire :**

L'analyse des résultats obtenus, consignés dans les tableaux 13 et 14, montre que quel que soit le modèle de répartition à deux classes de DFI ou à trois classes de DFI, le taux moyen de segmentation embryonnaire est de l'ordre de 90 %. Les variations entre les différentes classes de DFI considérées demeurent non significative ( $p > 0.05$ ).

Le nombre moyen d'embryons développés varie de  $4.3 \pm 1.6$  embryons pour un  $DFI \leq 30\%$ , à  $4.7 \pm 2.7$  embryons pour les patients ayant un  $DFI > 30\%$ . La différence semble non-significative ( $p = 0.530$ ).

Dans le cas d'une répartition selon le modèle à trois classes de DFI, le nombre moyen des embryons développés est presque similaire. Il est de  $4.3 \pm 1.6$  embryons pour les  $DFI \leq 30\%$ ,  $4.6 \pm 2.8$  embryons pour les DFI compris entre 31 %-60 % et de  $4.8 \pm 2.7$  embryons pour les  $DFI > 60\%$ . La différence semble non-significative ( $p = 0.622$ ).

**Tableau 13 :** Répartition selon les deux classes de DFI et le taux de segmentation embryonnaire

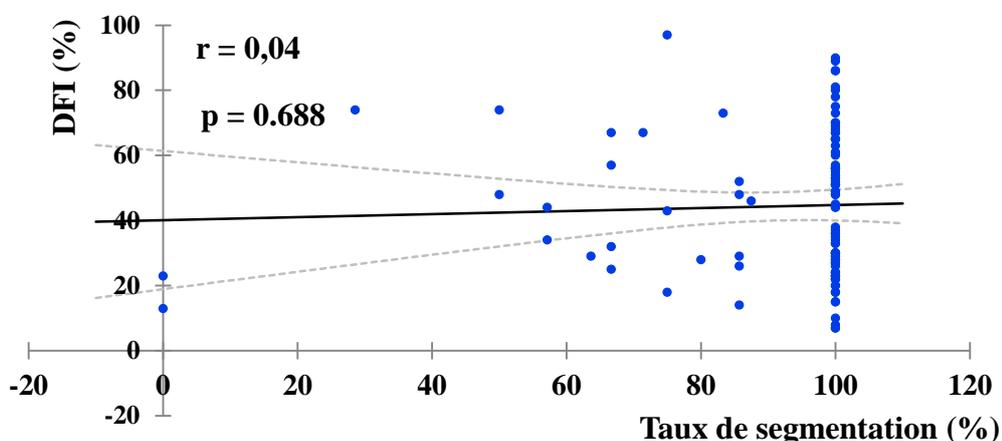
| <b>Paramètres</b>                      | <b>DFI <math>\leq 30\%</math></b> | <b>DFI <math>&gt; 30\%</math></b> | <b>p-value</b> |
|----------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------|
| <b>Nombre d'embryons</b>               | 159                               | 293                               | /              |
| <b>Moyenne des embryons développés</b> | $4.3 \pm 1.6$                     | $4.7 \pm 2.7$                     | 0.530          |
| <b>Taux de segmentation (%)</b>        | $90.6 \pm 23.7$                   | $92.2 \pm 16.1$                   | 0.692          |

**Tableau 14 :** Répartition selon les trois classes de DFI et le taux de segmentation embryonnaire

| <b>Paramètres</b>                      | <b>DFI <math>\leq 30\%</math></b> | <b>DFI 31-60%</b> | <b>DFI <math>&gt; 60\%</math></b> | <b>p-value</b> |
|----------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|-----------------------------------|----------------|
| <b>Nombre d'embryons</b>               | 159                               | 169               | 124                               | /              |
| <b>Moyenne des embryons développés</b> | $4.3 \pm 1.6$                     | $4.6 \pm 2.8$     | $4.8 \pm 2.7$                     | 0.622          |
| <b>Taux de segmentation (%)</b>        | $90.6 \pm 23.7$                   | $92.7 \pm 14.6$   | $91.3 \pm 18.4$                   | 0.118          |

## VIII. 2. Corrélation entre le DFI et le taux de segmentation embryonnaire :

L'analyse statistique des données obtenues ne révèle pas de corrélation significative entre le taux de fragmentation de l'ADN spermatique du conjoint et le taux de segmentation embryonnaire chez le couple ( $r = 0.04$ ,  $p = 0.688$ ) (Figure 53).



**Figure 53** : Corrélation entre le DFI et le taux de segmentation embryonnaire

## VIII. 3. Répartition des patients selon le SDI et le taux de segmentation embryonnaire :

L'analyse des résultats des patients considérés selon la qualité de la chromatine spermatique (Tableau 15), indique que le taux de segmentation embryonnaire est similaire pour les deux classes de SDI ( $p = 0.920$ ). Il est de  $92.3 \pm 14.5$  embryons chez les patients présentant un  $SDI < 20\%$  et il est de  $91.7 \pm 21$  embryons chez les patients révélant un  $SDI \geq 20\%$ . Il est de même pour les valeurs moyennes des embryons obtenus ( $p = 0.781$ ).

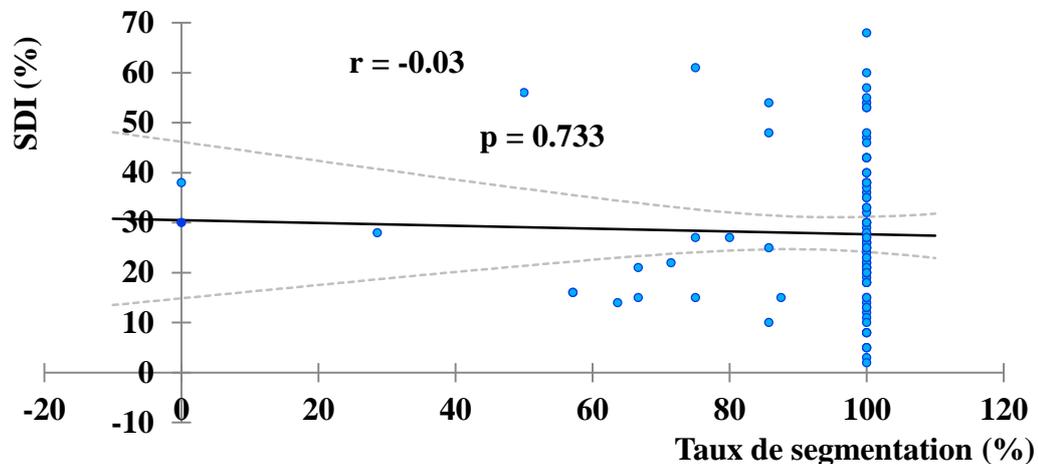
**Tableau 15** : Répartition selon le SDI et le taux de segmentation embryonnaire

| Paramètres                      | DFI < 20 %      | DFI ≥ 20 %      | p-value |
|---------------------------------|-----------------|-----------------|---------|
| Nombre de d'embryons            | 125             | 227             | /       |
| Moyenne des embryons développés | $4.6 \pm 2.3$   | $4.5 \pm 2.4$   | 0.781   |
| Taux de segmentation (%)        | $92.3 \pm 14.5$ | $91.7 \pm 21.5$ | 0.920   |

## VIII. 4. Corrélation entre le SDI et le taux de segmentation embryonnaire :

Le taux de condensation de la chromatine spermatique ne semble pas avoir une conséquence sur le taux de segmentation, aucune corrélation significative n'est établie

entre le taux de clivage et le taux de compaction de la chromatine spermatique. Le coefficient de corrélation est de 0.04 et la p-value est égal à 0.733 (Figure 54).



**Figure 54** : Corrélation entre le SDI et le taux de segmentation embryonnaire

### **IX. Etude de la relation qualité du génome spermatique et la qualité embryonnaire :**

#### **IX. 1. Répartition selon les classes de DFI et la qualité embryonnaire :**

La répartition des embryons selon leur grade, lors du développement embryonnaire précoce en fonction du modèle de classes de DFI préconisé par Fernandez *et al* (2003) rapporté par le tableau 16 semble indiquer l'absence de lien entre la qualité de l'ADN spermatique des conjoints et la qualité des embryons obtenus chez le couple.

La différence en moyenne des nombres d'embryons enregistrés pour le grade A, B, C, D, entre les deux classes de DFI considérées, sont non- significatives ( $p > 0.05$ ).

Dans le cas d'une répartition selon les trois classes de DFI préconisée par Simon *et al* (2014) consignée dans le tableau 17, nous observons des résultats similaires. Aucun lien significatif ne semble être établi entre la qualité de l'ADN spermatique et la qualité des embryons obtenus.

Par ailleurs, il est à noter que les embryons obtenus sont en majorité des embryons de grade A et les embryons de grade B, et ce quelques soit la qualité de l'ADN spermatique du conjoint.

**Tableau 16 :** Répartition selon les deux classes de DFI et la qualité embryonnaire

| Qualité embryonnaire                | DFI ≤ 30%   | DFI >30%    | p-value |
|-------------------------------------|-------------|-------------|---------|
| Nombre des embryons de grade A      | 81          | 158         | /       |
| Moyenne des embryons de grade A (%) | 46.4 ± 32.7 | 54.2 ± 34.4 | 0.267   |
| Nombre des embryons de grade B      | 59          | 95          | /       |
| Moyenne des embryons de grade B (%) | 35.4 ± 26.8 | 31.8 ± 29.8 | 0.551   |
| Nombre des embryons de grade C      | 15          | 33          | /       |
| Moyenne des embryons de grade C (%) | 9.2 ± 15.6  | 13.1 ± 24.6 | 0.389   |
| Nombre des embryons de grade D      | 4           | 7           | /       |
| Moyenne des embryons de grade D (%) | 3.7 ± 16.8  | 2.0 ± 8.5   | 0.503   |

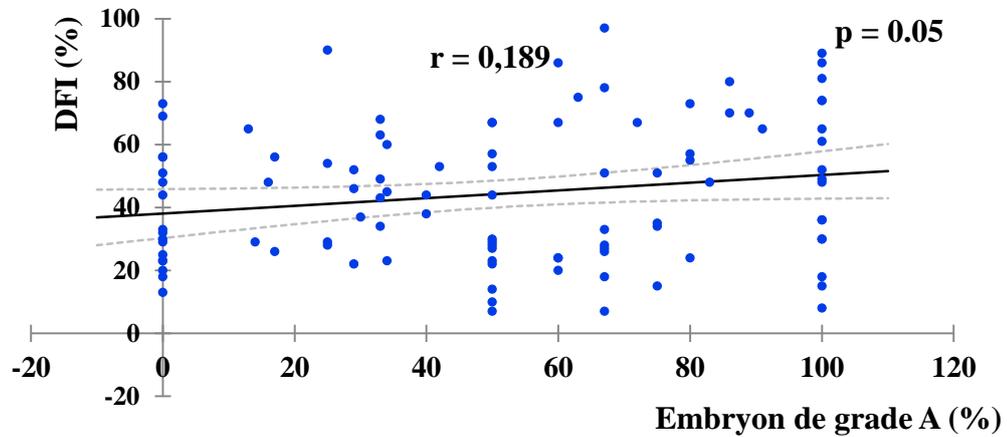
**Tableau 17 :** Répartition selon les trois classes de DFI et la qualité embryonnaire

| Qualité embryonnaire                | DFI ≤ 30%   | DFI 31%-60% | DFI >60%    | p- value |
|-------------------------------------|-------------|-------------|-------------|----------|
| Nombre d'embryons de grade A        | 81          | 77          | 81          | /        |
| Moyenne des embryons de grade A (%) | 46.4 ± 32.7 | 45.6±33.5   | 66.3 ± 32.4 | 0.002    |
| Nombre d'embryons de grade B        | 59          | 63          | 32          | /        |
| Moyenne des embryons de grade B (%) | 35.4 ± 26.8 | 37. 9±31.6  | 23.2 ± 25.1 | 0.112    |
| Nombre d'embryons de grade C        | 15          | 24          | 9           | /        |
| Moyenne des embryons de grade C (%) | 9. 5 ± 15.6 | 15.7±26.2   | 9.3 ± 22.0  | 0.357    |
| Nombre d'embryons de grade D        | 4           | 5           | 2           | /        |
| Moyenne des embryons de grade D (%) | 3.7 ± 16.8  | 2.7 ± 10.0  | 1.1 ± 5.6   | 0.705    |

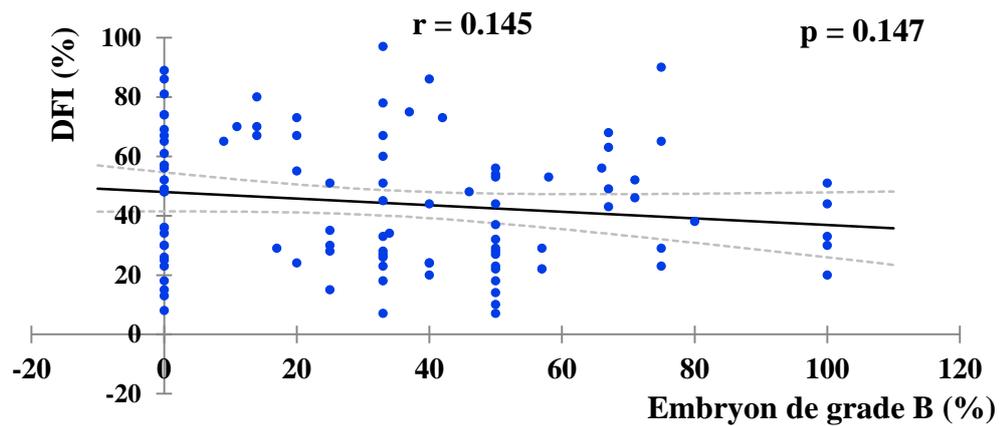
### **IX. 2. Corrélation entre le DFI et la qualité embryonnaire :**

Les courbes de régression linéaire des DFI en fonction de la qualité embryonnaire illustrées par les figures 55 a, b, c et d, n'indiquent aucune corrélation entre le taux de

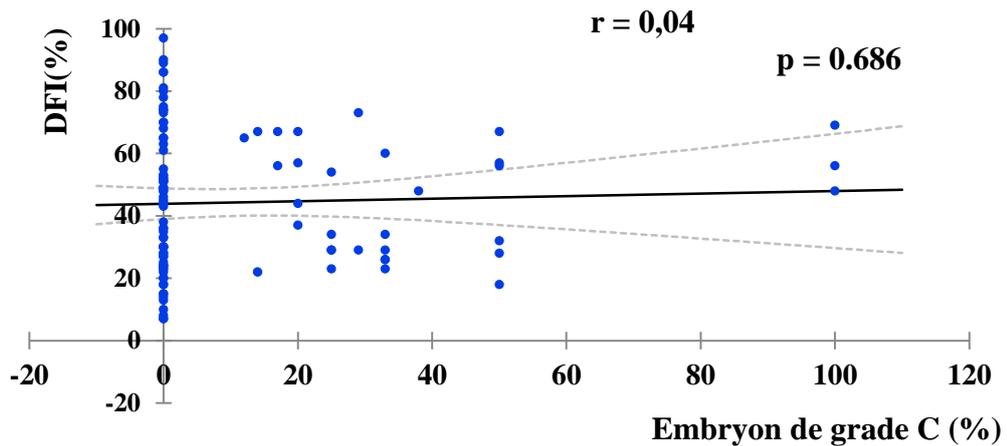
fragmentation de l'ADN spermatique du conjoint et la qualité des embryons obtenus chez le couple.



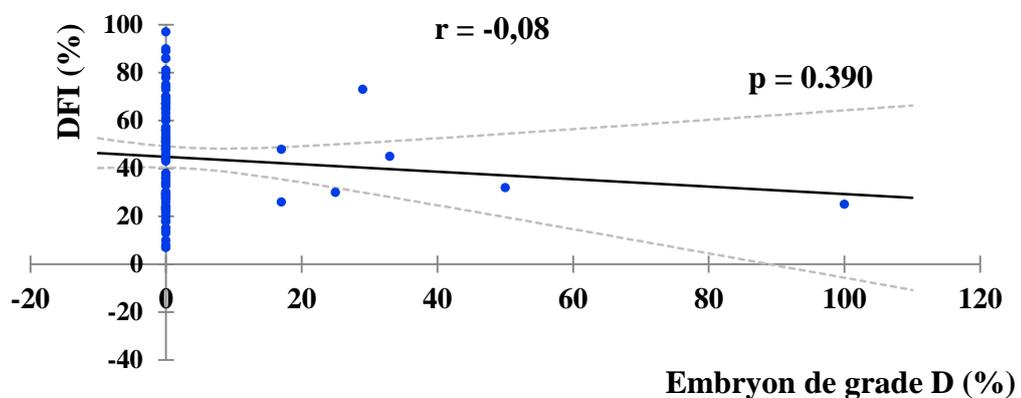
**Figure 55 a :** Corrélation entre le DFI et la qualité embryonnaire (Grade A)



**Figure 55 b :** Corrélation entre le DFI et la qualité embryonnaire (Grade B)



**Figure 55 c :** Corrélation entre le DFI et la qualité embryonnaire (Grade C)



**Figure 55 d :** Corrélation entre le DFI et la qualité embryonnaire (Grade D)

**IX. 3. Répartition selon le SDI et la qualité embryonnaire :**

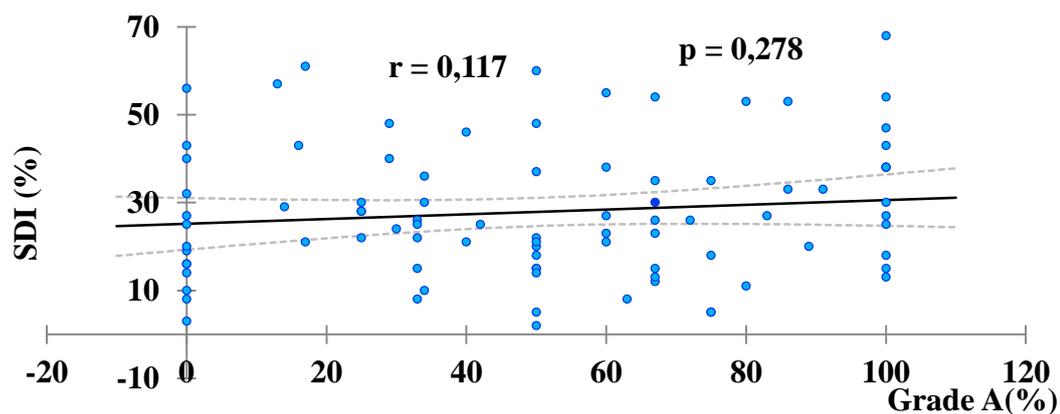
La distribution des patients selon la qualité de la chromatine spermatique et la qualité des embryons obtenus (Tableau 18) révèle que la différence du nombre d’embryons obtenus semble non-significative et que ce soit le grade des embryons considéré ( $p > 0.05$ ).

**Tableau 18** : Répartition selon le SDI et la qualité embryonnaire

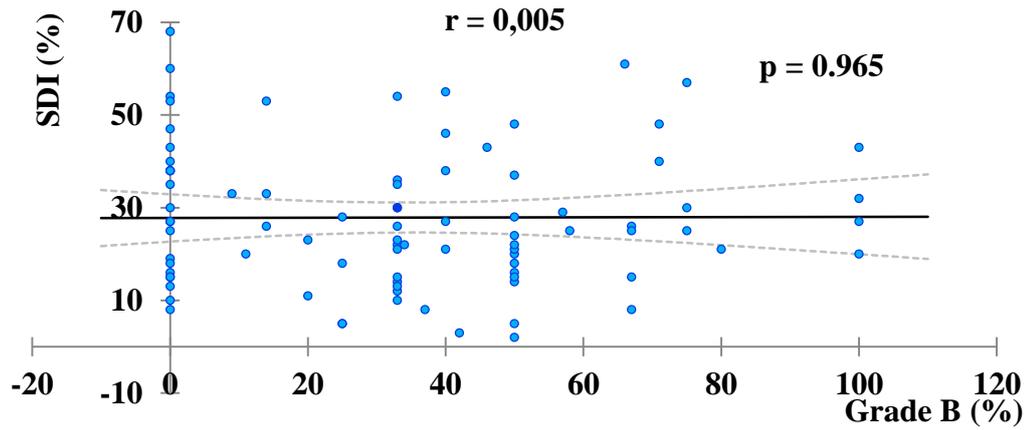
| Qualité embryonnaire                | SDI < 20%   | SDI ≥ 20%   | p-value |
|-------------------------------------|-------------|-------------|---------|
| Nombre des embryons de grade A      | 81          | 146         | /       |
| Moyenne des embryons de grade A (%) | 49.0±30.2   | 50.7 ± 34.3 | 0.678   |
| Nombre des embryons de grade B      | 59          | 91          | /       |
| Moyenne des embryons de grade B (%) | 35.0 ± 25.3 | 34.8 ± 30.2 | 0.978   |
| Nombre des embryons de grade C      | 15          | 23          | /       |
| Moyenne des embryons de grade C (%) | 15.0 ± 23.2 | 8.3 ± 17.9  | 0.146   |
| Nombre des embryons de grade D      | 4           | 7           | /       |
| Moyenne des embryons de grade D (%) | 1.7 ± 6.4   | 2.9 ± 13.9  | 0.678   |

#### **IX. 4. Corrélation selon le SDI et la qualité embryonnaire :**

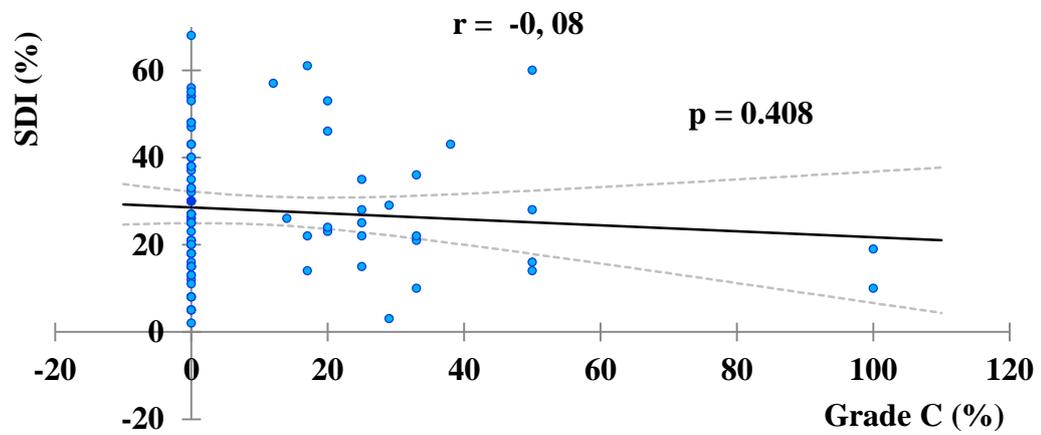
L'analyse statistique des données entre le taux de condensation de la chromatine spermatique et la qualité des embryons lors du développement embryonnaire précoce nous indique une corrélation positive qui semble non-significative (Figure 56 a, b, c et d). Le coefficient de corrélation est de 0.117 ( $p = 0.278$ ) pour les embryons de grade A, de 0.005 ( $p = 0.965$ ) pour les embryons de grade B, de 0.08 ( $p = 0.408$ ) pour les embryons de grade C et de -0.195 ( $p = 0.07$ ) pour le grade D.



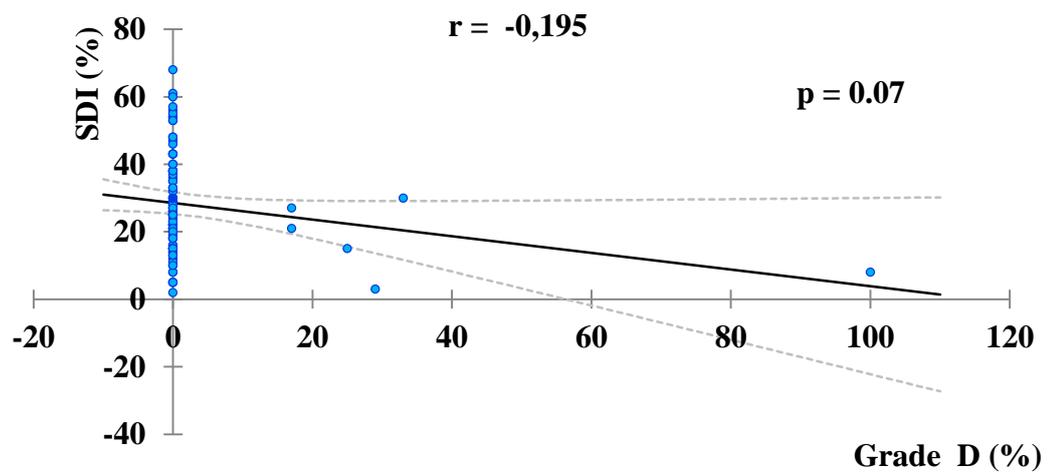
**Figure 56 a** : Corrélation entre le SDI la qualité embryonnaire (Grade A)



**Figure 56 b :** Corrélation entre le SDI et qualité embryonnaire (Grade B)



**Figure 56 c :** Corrélation entre SDI et qualité embryonnaire (Grade C)



**Figure 56 d :** Corrélation entre le SDI la qualité embryonnaire (Grade D)

### X. Eude de la relation qualité du génome spermatique et résultats de la micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïde :

#### X.1 Eude de la relation qualité l'ADN spermatique et résultats de la micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïde :

L'analyse des résultats obtenus suite à la fécondation in vitro réparti selon le modèle des deux classes de DFI (Tableau 19) révèle que le nombre d'embryons transférés est en moyenne similaire pour les deux classes de DFI ( $p = 0.158$ ). Il est de  $2.4 \pm 0.7$  embryons chez les patients à  $DFI \leq 30\%$  et de  $2.3 \pm 0.6$  embryons chez les patients à  $DFI > 30\%$ .

Concernant le taux de gestation, nous avons noté chez la classe à  $DFI \leq 30\%$  11 couples sur un total de 38 qui sont parvenus à obtenir une grossesse, ce qui représente un taux de l'ordre de 28.9 %. Alors que chez la classe à  $DFI > 30\%$  14 couples sur un total de 63 ont obtenus une grossesse soit 22.2 % seulement. La différence semble être non-significative ( $p = 0.449$ ).

Les gestations découlant de la fécondation in vitro sont affectés par un taux d'avortement de l'ordre de 5.3 % chez les couples appartenant à la classe de  $DFI \leq 30\%$  contre 35.7 % pour ceux appartenant à la classe de  $DFI > 30\%$ . Quant au taux de naissances enregistré il est l'ordre de 28.9 % pour les patients à  $DFI \leq 30\%$  versus 15.9 % pour ceux à  $DFI > 30\%$ .

Il est à noter de meilleurs taux de naissances avec des taux d'avortements plus bas enregistrés chez les patients de la classes de  $DFI \leq 30\%$  comparés à ceux de  $DFI > 30\%$  cependant les données statistique ne révèle pas de différence significative ( $p > 0.05$ ).

**Tableaux 19 :** Eude de la relation qualité l'ADN spermatique et résultats de la micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïde

| Paramètres                  | DFI $\leq 30\%$<br>n=38 | DFI $> 30\%$<br>n=63 | p-value |
|-----------------------------|-------------------------|----------------------|---------|
| Nombre d'embryon transférés | $2.4 \pm 0.7$           | $2.3 \pm 0.6$        | 0.158   |
| Taux de grossesses (%)      | 28.9 (11/38)            | 22.2 (14/63)         | 0.449   |
| Taux d'avortements (%)      | 5.3 (2/11)              | 35.7 (5/14)          | 0.340   |
| Taux de naissances (%)      | 28.9 (11/38)            | 15.9 (10/63)         | 0.121   |

### **X .2. Eude de la relation qualité de la chromatine spermatique et résultats de la micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïde :**

L'analyse des résultats de la fécondation in vitro en fonction de la structure et du taux de condensation de la chromatine spermatique des conjoints, consignés dans le tableau 20, indique que le nombre d'embryons transférés est presque similaire chez les patients des deux classes de SDI. Il est de  $2.4 \pm 0.7$  embryons chez les patients présentant un SDI  $< 20\%$  et de  $2.3 \pm 0.7$  embryons pour ceux présentant un SDI  $\geq 20\%$  ( $p = 0.493$ ).

Le taux de grossesses obtenu est de  $18.5\%$  chez les patients à SDI  $< 20\%$  et  $29.5\%$  pour les patients ayant un SDI  $\geq 20\%$ , la différence entre les deux groupes semble non-significative ( $p = 0.283$ ). Par ailleurs nous avons noté un taux de naissance de  $18,5\%$  versus  $23.0\%$  et un taux d'avortement de  $0\%$  pour les SDI  $< 20\%$  et de  $33.3\%$  pour les SDI  $\geq 20\%$ . Cependant les différences semblent non significatives entre les deux groupes de patients, aussi bien pour le taux de naissances ( $p= 0.641$ ) que pour le taux d'avortements ( $p = 0.261$ ).

**Tableaux 20 :** Eude de la relation qualité de la chromatine spermatique et résultats de la fécondation in vitro

| Paramètres                         | SDI < 20 %<br>n=27 | SDI ≥ 20 %<br>n=61 | p-value |
|------------------------------------|--------------------|--------------------|---------|
| <b>Nombre d'embryon transférés</b> | $2.4 \pm 0.7$      | $2.3 \pm 0.7$      | 0.493   |
| <b>Taux de grossesses (%)</b>      | 18.5 (5/27)        | 29.5 (18/61)       | 0.283   |
| <b>Taux d'avortements (%)</b>      | 0 (0/5)            | 33.3 (6/18)        | 0.261   |
| <b>Taux de naissances (%)</b>      | 18.5 (5/27)        | 23.0 (14/61)       | 0.641   |

### **XI. Relation entre qualité du génome spermatique et résultat des naissances :**

L'analyse statistique des données relatives aux taux de naissances des patients exprimé par une régression logistique rapportée au tableau 21, indique un Odds ratio de 0.083 ; 1.056, p-value de 0.061 pour les patients présentant un DFI  $> 30\%$ . Ainsi l'intégrité du génome spermatique semble être un facteur péjoratif pour déterminé le taux de naissances dans le cas d'une micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïde.

**Tableaux 21** : Relation entre qualité du génome spermatique et résultat des naissances

|                           | OR    | 95% interval of confidence | p value      |
|---------------------------|-------|----------------------------|--------------|
| SDI $\geq$ 20%            | 1.589 | 0.448 ; 5.630              | 0.473        |
| DFI > 30%                 | 0.297 | 0.083 ; 1.056              | <b>0.061</b> |
| Age des patients (années) |       |                            |              |
| < 30                      | 1.0   | -                          | -            |
| 30 - 34                   | 0.559 | 0.124 ; 2.529              | 0.451        |
| 35- 39                    | 1.238 | 0.208 ; 7.363              | 0.814        |
| $\leq$ 40                 | 0.450 | 0.031 ; 6.543              | 0.559        |
| Ovocytes recueillis (n)   | 1.136 | 0.911 ; 1.417              | 0.259        |
| Taux de fécondance (%)    | 1.017 | 0.985 ; 1.049              | 0.301        |
| Embryons Obtenus (n)      | 0.887 | 0.340 ; 2.312              | 0.806        |

### **XII. Croisement entre le taux de condensation de la chromatine et le taux de fragmentation de l'ADN spermatique :**

Le croisement entre le taux de condensation de la chromatine spermatique (SDI) et le taux de fragmentation de l'ADN spermatique (DFI), permet de noter que lorsque le DFI  $\leq$  30 % et le SDI  $\geq$  20 %, le taux de naissances est le plus élevé 33,3 % dans le cas d'un DFI > 30 % et un SDI < 20 % le taux de naissances est le plus bas 12,5 % (Tableau 22 a). Cela suggère qu'une bonne qualité de l'ADN spermatique (DFI  $\leq$  30 %) permet de prédire un taux de naissances appréciable même si la qualité de la chromatine du patient se révèle mauvaise (SDI  $\geq$  20 %).

Par ailleurs, la répartition des patients selon les valeurs du DFI et SDI affectées tout en créant un groupe intermédiaire, tableau 22 b, révèle que les patients présentant un DFI  $\leq$  30 % et un SDI  $\geq$  20 % présentent les meilleurs taux en terme de paramètres spermatiques. La concentration spermatique est de  $28.7 \pm 24.1$  million/ml pour le groupe 1 patients à DFI  $\leq$  30 % et un SDI  $\geq$  20 % contre  $13.2 \pm 15.2$  million/ml chez le groupe 2, groupe des patients à DFI > 30 % et le SDI < 20 %, et de  $23. \pm 519.8$  pour le groupe intermédiaire. La différence semble très significative (p= 0.02).

Concernant la mobilité spermatique les moyennes enregistrées sont respectivement de  $40.0 \pm 21.5$  % pour le groupe 1 versus  $27.9 \pm 20.9$  % pour le groupe 2 et elle est de 23.5

± 19.9 % pour le groupe intermédiaire. La différence entre les groupes considérés semble significative (p-value = 0. 01).

Aussi, afin d'affiner les résultats des données rapportées dans le tableau 23 a et 23 b, nous avons réalisé une régression logistique (Tableau 22 c). Cette dernière montre le croisement taux de condensation de la chromatine spermatique (SDI) et du taux de fragmentation de l'ADN spermatique (DFI) révèle que le taux de naissance le plus élevé est enregistré chez le groupe de patients présentant un DFI ≤ 30 % et le SDI ≥ 20 % (Odds ratio est égal à 4. 867 ; 1.056, p- value 0.105).

**Tableaux 22 a :** Croisement entre le taux de condensation de la chromatine et le taux de fragmentation de l'ADN spermatique

| SDI       | Naissances | DFI ≤ 30%           | DFI >30%            | Total       |
|-----------|------------|---------------------|---------------------|-------------|
| SDI < 20% | NON        | 8 (72.7 %)          | 14 (87.5%)          | 22 (81.5%)  |
| SDI < 20% | OUI        | 3 (27.3 %)          | 2 ( <b>12.5 %</b> ) | 5 (18.5 %)  |
| Total     |            | 11 (100 %)          | 16 (100 %)          | 27 (100 %)  |
| SDI ≥ 20% | NON        | 14 (66.7 %)         | 33 (82.5 %)         | 47 (77.0%)  |
| SDI ≥20%  | OUI        | 7 ( <b>33.3 %</b> ) | 7 (17.5 %)          | 14 (23.0 %) |
| Total     |            | 21 (100 %)          | 40 (100 %)          | 61 (100 %)  |

**Tableaux 22 b** : Croisement entre le taux de condensation de la chromatine et le taux de fragmentation de l'ADN spermatique

| <b>Paramètres</b>                | <b>Groupe 1<br/>DFI ≤ 30 % et<br/>SDI ≥ 20%</b><br><br>n = 21 | <b>Groupe 2<br/>DFI &gt; 30% et<br/>SDI &lt; 20%</b><br><br>n = 16 | <b>Groupe<br/>intermédiaires<br/>(DFI ≤ 30 et SDI<br/>&lt; 20%<br/>+<br/>DFI &gt; 30% et<br/>SDI ≥ 20%)</b><br><br>n = 51 | p-value     |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Age des patients (Années)        | 38.4 ± 5.7                                                    | 38.0 ± 7.7                                                         | 39.6 ± 6.2                                                                                                                | 0.626       |
| Concentration spermatique (M/ml) | 28.7 ± 24.1                                                   | 13.2 ± 15.2                                                        | 23.8 ± 24.9                                                                                                               | <b>0.02</b> |
| Mobilité spermatique (%)         | 40.0 ± 21.5                                                   | 27.9 ± 20.9                                                        | 23.5 ± 19.8                                                                                                               | <b>0.01</b> |
| Taux de fécondance (%)           | 84.2 ± 21.7                                                   | 81.5 ± 251                                                         | 82.0 ± 19.9                                                                                                               | 0.912       |
| Embryons obtenus (n)             | 3.5 ± 1.7                                                     | 4.4 ± 2.9                                                          | 4.9 ± 2.5                                                                                                                 | 0.09        |
| Grade A                          | 37.2 ± 30.8                                                   | 41.8 ± 27.8                                                        | 58.3 ± 33.4                                                                                                               | 0.02        |
| Grade B                          | 39.0 ± 29.5                                                   | 39.4 ± 27.4                                                        | 31.7 ± 28.7                                                                                                               | 0.490       |
| Grade C                          | 8.3 ± 16.5                                                    | 18.3 ± 27.6                                                        | 8.7 ± 17.8                                                                                                                | 0.210       |
| Grade D                          | 6.0 ± 22.2                                                    | 1.8 ± 7.3                                                          | 1.3 ± 5.6                                                                                                                 | 0.323       |
| Embryons transférés              | 2.3 ± 0.7                                                     | 2.2 ± 0.5                                                          | 2.4 ± 0.7                                                                                                                 | 0.559       |
| Taux de naissances               | 33.3 (7/21)                                                   | 12.5 (2/16)                                                        | 19.6 (10/51)                                                                                                              | /           |

**Tableau 22 c :** Croisement entre le taux de condensation de la chromatine et le taux de fragmentation de l'ADN spermatique

|                                     | <b>OR</b> | <b>95% intervalle de confiance</b> | <b>p value</b> |
|-------------------------------------|-----------|------------------------------------|----------------|
| <b>DFIxSDI</b>                      |           |                                    |                |
| <b>DFI &gt; 30% et SDI &lt; 20%</b> | 1.0       | -                                  | -              |
| <b>DFI &gt; 30% ou SDI &lt; 20%</b> | 1.441     | 0.271 ; 7.969                      | 0.668          |
| <b>DFI ≤ 30 % et SDI ≥ 20%</b>      | 4.867     | 0.720 ; 32.904                     | 0.105          |
| <b>Age des patients (années)</b>    |           |                                    |                |
| <b>&lt; 30</b>                      | 1.0       | -                                  | -              |
| <b>30 - 34</b>                      | 0.510     | 0.116 ; 2.231                      | 0.371          |
| <b>36- 39</b>                       | 0.960     | 0.181 ; 5.096                      | 0.962          |
| <b>≤ 40</b>                         | 0.309     | 0.020 ; 4.776                      | 0.400          |
| <b>Oocytes recueillis (n)</b>       | 1.110     | 0.889 ; 1.386                      | 0.356          |
| <b>Taux de fécondance (%)</b>       | 1.016     | 0.985 ; 1.048                      | 0.303          |
| <b>Embryons transférés (n)</b>      | 1.262     | 0.553 ; 2.879                      | 0.580          |

### **DISCUSSION GENERALE :**

Le dispositif d'aide médicale à la procréation présente une alternative au problème d'infécondité des conjoints, la micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïde est la technique proposée aux couples dont l'époux présente une hypofertilité avec des paramètres spermiologiques altérés.

Les hommes infertiles ont tendance à présenter des génomes beaucoup plus endommagés que ceux des hommes fertiles (Evenson *et al.*, 1999, Zini *et al.*, 2001). En effet, de nombreuses études mettent en avant le rôle du génome masculin dans les étapes de la procréation artificielle, notamment lors de la fécondation et dans le développement embryonnaire précoce (Simon *et al.*., 2017). D'autres auteurs dénoncent son impact sur la qualité du conceptus (Hazout *et al.*, 2008) d'où l'importance de savoir si la cellule spermatique utilisée pour la technique de fécondation in vitro transmet une information génétique et épigénétique appropriée à la progéniture.

A nos jours l'exploration des hommes infertiles ne se résume plus aux explorations biologiques et cytologiques classiques, l'analyse de la qualité du génome spermatique représente un nouveau test dans la batterie des prescriptions mises à la disposition du clinicien spécialiste. En effet, l'analyse de l'intégrité du génome spermatique est un examen de plus en plus réalisé en routine par les équipes prenant en charge les couples infertiles.

De nombreuses techniques sont disponibles pour l'investigation de la qualité du noyau spermatique. Parmi ces techniques celles qui étudient l'état de l'ADN spermatique tel que, la technique de SCSA ou Sperm Chromatin Structure Assay (Evenson *et al.*, 1980), la technique de TUNEL ou Terminal Deoxyribonucleotidyl Transferase mediated dUTP-fluorescein-dUTP Nick-end Labelling (Gorczyca *et al.*, 1993), la technique de COMET (Klaude *et al.*.,1996) et la technique de SCD ou Sperm Chromatin Dispersion mise au point par Fernandez *et al* (2003).

En revanche, d'autres techniques observent l'état de la chromatine spermatique comme le bleu d'aniline mise en place par Terquem et Dadoune (1983), Le bleu de toluidine (Erenpreiss *et al.* , 2001) et la Chromomycine A3 (CMA3) (Manicardi *et al.*, 1995).

Les altérations de l'intégrité du génome des spermatozoïdes peuvent être dues à différents facteurs ; mécanismes apoptotiques altérés au cours de la gamétogenèse, défaut de remodelage de la chromatine au cours de la spermiogenèse, dégradation du génome spermatique liée à la présence de radicaux libres, action des facteurs environnementaux ou d'autres pathologies urogénitales (Sakkas et Alvarez, 2010).

Dans cette étude deux approches ont été réalisées afin d'apprécier la qualité du noyau spermatique, la première consiste à l'analyse du taux de fragmentation et de dégradation de l'ADN spermatique (DFI) grâce à la technique de SCD de Fernandez *et al.*, (2003), réalisée sur la totalité des 101 patients inclus dans notre étude. Par la suite, les résultats ont été consolidés par la technique d'Aniline blue Assay (Terquem et Dadoune , 1983) qui explore le niveau de condensation et de compaction de la chromatine du noyau spermatique (SDI). Cette dernière a été pratiquée sur une population constituée de 88 patients sur les 101 recrutés.

Les caractéristiques des couples infertiles inclus dans notre étude, inscrits dans un programme pour une technique de micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïde montrent que la durée d'infertilité est de  $7.6 \pm 4.0$  ans. L'âge moyen des femmes est de  $32.4 \pm 4.4$  ans alors que celui des époux il est de  $38.9 \pm 6.2$  ans.

En ce qui concerne les caractéristiques spermatiques nous avons noté 5 % de cas d'oligospermie, 25 % d'asthénospermie, 42 % d'oligoasthénospermie et 28 % de normosperme. Le test de migration de survie indique une concentration spermatique moyenne de  $17.3 \pm 20.7$  M/ml, une mobilité spermatique moyenne de  $27.3 \pm 21.6$  % et une morphologie normale en moyenne de  $79.4 \pm 14.5$  %.

Par rapport à l'intégrité du noyau spermatique la moyenne du taux de fragmentation du génome spermatique est de  $44.4 \pm 21.9$  % alors que le taux de condensation de la chromatine spermatique est en moyenne de  $27.9 \pm 15.2$  %.

Par ailleurs le nombre d'ovocytes recueillis est en moyenne de  $7.9 \pm 3.1$  ovocytes, dont  $6.0 \pm 2.7$  sont des ovocytes matures en métaphase II. Le nombre de zygotes observé est en moyenne de  $4.9 \pm 2.5$  zygotes. La moyenne des embryons obtenus par couple est de  $4.5 \pm 2.4$  embryons. Le taux moyen de fécondance des ovocytes est de  $82.1 \pm 20.9$  % le taux de segmentation embryonnaire est en moyenne de  $91.6 \pm 19.2$  %.

D'autres part, sur la qualité des embryons obtenus nous avons noté en moyenne  $2.4 \pm 2.0$  embryons de grade A,  $1.5 \pm 1.5$  de grade B,  $0.5 \pm 0.9$  de grade C et  $0.1 \pm 0.4$  de grade D.

Le nombre d'embryons transférés par couple est en moyenne de  $2.3 \pm 0.7$  embryons dont  $1.5 \pm 0.6$  embryons implantés ce qui représente un taux moyen d'implantation de  $68.0 \pm 30.0$  %.

Le taux de grossesses obtenu suite à la fécondation in vitro est de l'ordre de 24.8 %, résultant sur 28 % de cas d'avortement et un taux de naissances estimé à 20.8 % dans la population générale.

Les résultats relatifs à la qualité de l'ADN spermatique de notre cohorte, rapportés selon le modèle à deux classes préconisé par Fernandez *et al* (2003) indiquent que 38 % des patients présentent un DFI  $\leq 30$  %. Alors que 68 % d'entre eux ont un DFI  $>30$  %.

Il ressort ainsi que plus des 2/3 des patients présentent un ADN spermatique dégradé de mauvaise qualité.

La répartition selon le modèle à trois classes de Simon *et al* (2014) indiquent que 38 % des patients ont un DFI  $\leq 30$  %, 37 % des patients de DFI compris entre 31%-60 %, 26 % d'entre eux présentent un DFI  $> 60$  %. Pour le seuil de la classe extrême, il a été choisi comme tel ; DFI  $> 60$  %, en se basant sur les travaux de Bungum *et al* (2007) qui expliquent qu'un DFI  $> 60$  % peut influencer certains résultats de la fécondation in vitro.

Les résultats obtenus indiquent clairement que sur les 101 patients présentant une infertilité sur le 1/3 de ces derniers dispose d'un ADN spermatique de bonne qualité, alors que près des 2/3 révèlent soit un ADN spermatique modérément dégradé (37 % des cas) ou de mauvaise qualité (26 % des cas).

Concernant la qualité de la chromatine spermatique, se référant aux travaux de Hammadeh *et al*, (1998) qui considèrent une répartition selon deux seuils SDI  $< 20$  % et

SDI  $\geq 20$  % . Nos résultats montrent que 31 % des patients dans notre cohorte disposent d'un SDI  $< 20$  % et que 69 % d'entre eux ont un SDI  $\geq 20$  % . Ces derniers présentent que plus des 2/3 des patients reçus disposent d'une chromatine spermatique de mauvaise qualité.

L'étude de la relation entre la qualité de l'ADN spermatique et la qualité de la chromatine spermatique, a montré un lien significatif ( $p < 0.05$ ) entre ces deux paramètres, nos résultats sont en accord avec ceux de (Nasr-Esfahani *et al.*, 2005; Angelopoulou *et al.*, 2007).

En effet, l'organisation fonctionnelle du génome spermatique repose sur la structure de sa chromatine, qui au cours du processus de différenciation cellulaire du spermatozoïde subit une restructuration totale de son ordonnance spatiale, où la plus grande majorité des histones chromosomiques sont remplacées par d'autres protéines nucléaires appelées protamines (Balhorn , 2007). Cette composition unique du noyau spermatique joue un rôle de protection physique du patrimoine génétique et contribue également lors de ces performances hydrodynamiques au moment de la fécondation (Oliva *et al.*, 2006). Ainsi une insuffisance en protamines est responsable d'une défaillance au niveau de la structure de la chromatine qui peut être à l'origine d'une lésion au niveau de l'ADN spermatique.

De nombreuses études démontrent les répercussions de l'âge féminin sur la fertilité naturelle de la femme, une maternité tardive peut avoir des risques obstétricaux, fœtaux et néonataux (Hamatani *et al.*, 2004 ; Wennberg *et al.*, 2016). Concernant la paternité elle est généralement beaucoup moins affectée par ce facteur, même si des études ont montré que les hommes avec un âge avancé risquent de transmettre des pathologies génétiques à leur descendance (Hassold *et al.*, 2000 ; Klonoff-Cohen et Natarajan, 2004 ; Yatsenko et Turek., 2018).

Les résultats observés chez la population étudiée, nous montrent que l'âge des patients ne présente pas de lien significatif avec la qualité de l'ADN spermatique. Nos résultats sont en accord à ceux rapportés par Benchaib *et al* (2007) et Winkele *et al* (2009). De même pour la qualité de la chromatine spermatique qui également n'évoque aucun lien significatif avec l'âge des patients comme établie par Belloc *et al* (2009).

A propos de la durée de la stérilité des patients nous n'avons pas réussi à mettre en évidence une possible relation significative avec la qualité du génome spermatique. Néanmoins, des études ont montré que les sujets masculins infertiles présentent généralement des génomes spermatiques altérés par rapport à ceux qui sont fertiles (Zini *et al.*, 2001 ; Sharma *et al.*, 2009).

Les résultats relatifs aux paramètres spermiologiques des patients, après le test de migration et de survie à savoir, la concentration, la mobilité et la morphologie spermatique selon la qualité du génome spermatique nous a permis de noter que l'altération des paramètres du spermogramme est souvent liée à un ADN spermatique dégradé, de mauvaise qualité, présentant des cassures simples et doubles brins au niveau de sa charpente. Ce qui a été signalé par plusieurs études (Benchaib *et al.*, 2003 ; Erenpreiss *et al.*, 2008 ; Chi *et al.*, 2011 ; Lu *et al.*, 2018).

En revanche, concernant la structure de la chromatine spermatique, nous avons observé que son état décondensé ne semble pas être une cause d'altération des paramètres spermiologiques. Ces résultats sont conformes à ceux rapportés par (Hammadeh *et al.*, 2001 ; Salsabili *et al.*, 2006 ; Saddek *et al.*, 2011).

Des études ont signalé une association entre la qualité de l'ADN spermatique et les anomalies morphologiques notamment ceux de la tête du spermatozoïde (Borini *et al.*, 2006 ; Benchaib *et al.*, 2007). Dans notre étude nous n'avons pas pu établir un lien entre ces deux paramètres.

D'autres part, nous n'avons noté aucun lien entre le taux de décondensation de la chromatine spermatique donc les anomalies de l'épigénétique et les anomalies céphaliques des spermatozoïdes. Nos résultats sont en accord avec kim *et al* (2013).

Bendayan *et al* (2017) ont rapporté que le mode de vie des hommes modernes conditionnerait leur spermatogenèse et la qualité des spermatozoïdes. Dans notre étude nous avons identifié certains facteurs environnementaux et toxiques susceptibles d'influencer non seulement la qualité cytologique du spermatozoïde mais également sa qualité génomique.

Toutes fois, nos résultats n'ont pu mettre en évidence des causes à effets, aussi bien pour le tabagisme que pour l'hyperthermie ou encore la prise des traitements à base d'antioxydants sur la qualité du génome spermatique.

Concernant le tabagisme, plusieurs études ont montré les répercussions de ce facteur sur la fertilité masculine, mettant en évidence que les composants de la fumée de cigarette passent la barrière hématotesticulaire et entraînent de ce fait une altération des paramètres spermiologiques et une détérioration de la qualité du génome spermatique (Kunzle *et al.*, 2003 ; Boulanger , 2005).

Dans notre étude, l'effet du tabagisme sur la qualité du génome spermatique n'a pas révélé d'association significative ( $p > 0.05$ ) entre le taux de fragmentation de l'ADN spermatique et le tabagisme. Nos résultats sont en accord avec ceux de (Sergerie *et al.*, 2000).

Cependant, nous avons noté un lien significatif ( $p= 0.03$ ) entre le tabagisme et le SDI ou le taux condensation de la chromatine spermatique. Nos résultats correspondent à ceux rapportés par Aboulmaouahib *et al* (2018) ; Mostafa *et al* (2018).

Par ailleurs plusieurs travaux ont montré que les composants de la fumée de la cigarette altèrent la structure de la chromatine spermatique. Ils compromettent le mécanisme de transition des protéines nucléaires histones et protamines, provoquant ainsi la formation d'une chromatine spermatique décondensé riche en histones persistants (Hammadeh *et al.*, 2010 ; Hamad *et al.*, 2014 ; Yu *et al.*, 2014).

A propos de la fréquentation des sources d'eaux chaudes et les épisodes d'hyperthermie, nous n'avons noté aucun lien entre la qualité du génome spermatique et ces deux facteurs. Néanmoins, plusieurs travaux indiquent que la double fonction exocrine et endocrine du testicule, en plus d'être régulée par des facteurs neuroendocriniens, psychologiques et environnementaux, elle est aussi thermo- dépendante. En effet, la spermatogenèse chez l'homme nécessite une température inférieure à la température du corps de moins de 4°C. Aussi, l'élévation de la température scrotale, isolée ou associée à celle de l'ensemble du corps, que ce soit par une fréquentation habituelle des sources d'eau chaude ou par des simples épisodes de forte fièvre entraîne des perturbations des fonctions testiculaires qui

se traduisent par une diminution de la qualité cellulaire et génomique des gamètes produits (Evenson *et al.*, 2000 ; Sergerie *et al.*, 2007).

D'autres parts, les espèces réactives de l'oxygène sont des produits toxiques de la respiration cellulaire opérée dans la mitochondrie, mais peuvent également dériver de sources extracellulaires. Ils sont considérés comme des messagers indispensables lors de la spermatogenèse et lors de la maturation spermatique post-testiculaire. Leur accumulation en taux élevé ou la présence d'anomalie au niveau des agents antioxydants, peut causer une situation pathologique appelée stress oxydatif (Agarwal *et al.*, 2012).

La situation de stress oxydatif peut provoquer des altérations des paramètres classiques du spermogramme (Agarwal *et al.*, 2014). En plus d'altérer les paramètres spermatiques conventionnels, le stress oxydatif peut engendrer une altération de l'intégrité du génome spermatique (Aitken *et al.*, 2010 ; Novotny *et al.*, 2013).

Plusieurs études montrent qu'une thérapie médicale à base d'antioxydants améliore les paramètres conventionnels du sperme ainsi que la qualité génétique des spermatozoïdes (Zini *et al.*, 2009; Ghanem *et al.*, 2010; Imamovic *et al.*, 2014).

Ce type de traitement à base d'antioxydants a été prescrit aux patients inclus dans notre étude. Cependant l'analyse de résultats n'a révélé aucune association entre la prise d'antioxydants et la qualité du génome spermatique.

Plusieurs travaux signalent que, quand des traitements à base d'antioxydants sont prescrits d'une manière inappropriée et prolongée, donc sans limite de temps et sans aucune surveillance particulière, ils peuvent générer un effet délétère sur le génome des spermatozoïdes (Evenson *et al.* 1993 ; Menzo *et al.*, 2007 ; Garcia *et al.*, 2011).

Les caractéristiques de l'assistance médicale à la procréation, concernant la fécondation qui est un événement fondamental engageant une série de processus cellulaires et moléculaire hautement organisée, qui permettent la fusion entre le gamète mâle et femelle afin d'ordonner une nouvelle cellule, le zygote ou embryon unicellulaire. Cette cascade d'événements peut être bouleversée par certains épisodes tels qu'une mauvaise qualité ovocytaire ou spermatique qui peut être d'ordre morphologique ou génétique

empêchant ainsi la formation des pronucleis ; les pro-noyaux paternel et maternel (Plachot et Crozet , 1992).

A nos jours, les techniques d'assistance médicale à la procréation permettent de répondre en grande partie à ces anomalies. Elles évoluent sans cesse dans le but d'améliorer le taux de succès qui reste malheureusement insuffisant. Surtout pour la fécondation in vitro classique où les échecs de fécondation surviennent plus que celle d'une fécondation in vitro avec injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde (Zini *et al.*, 2008).

Dans cette optique, nous avons tenté d'apprécier la relation entre la qualité du génome spermatique et les échecs de fécondances en considérant d'une part, les anomalies de l'ADN spermatique, et d'autres part les anomalies de la structure de la chromatine spermatique.

Les résultats relatifs aux corrélations entre le taux de fécondance et la qualité de l'ADN spermatique, considérés selon le modèle à deux seuils de DFI, ou selon le modèle à trois seuils de DFI, indiquent qu'il n'existe aucune relation entre ces deux paramètres ( $p > 0.05$ ). Nos résultats rejoignent ceux rapportés par plusieurs auteurs (Borini *et al.*, 2006; Bungum *et al.*, 2007; Anifaindis *et al.*, 2015 ; Sedó *et al.*, 2017).

Simon *et al.*, (2014) indiquent que les spermatozoïdes présentant des altérations au niveau de leur l'ADN, peuvent aboutir à une fécondation réussie, avec formation des pronucleis. Cela peut également s'expliquer par le fait que par la technique de micro-injection intracytoplasmique du spermatozoïde, les barrières de la sélection naturelle sont contournées et la fertilisation avec des spermatozoïdes portant des ADN fragmentés peut être possible. De plus, cette technique reste opérateur dépendant où l'embryologiste essaye de sélectionner des spermatozoïdes mobiles et dans le meilleur des cas ne portant aucune anomalie morphologique, donc nous pouvons supposer que ces spermatozoïdes utilisés pour la fécondation ont une bonne intégrité de leurs génomes spermatiques (Host *et al.*, 2000).

Par ailleurs, Sakkas *et al.*, (1996) révèlent que l'ovocyte peut réparer un ADN spermatique endommagé mais au-delà d'un certain seuil . Ce qui nous a emmené dans notre étude de

comparer le taux de fécondance pour les deux groupes extrêmes de DFI à savoir,  $DFI \leq 30\%$  et  $DFI > 60\%$ . Les résultats observés indiquent l'existence d'une différence significative entre ces deux groupes ( $p = 0.03$ ). Nos résultats confirment ainsi, qu'au-delà de 60 % de dégradation de l'ADN spermatique la réparation par l'ovocyte devient improbable ce qui rejoint la thèse de Sakkas *et al* (1996).

L'étude statistique pour déterminer la présence ou non d'une corrélation entre le taux de fécondance obtenu chez le couple et le taux des cassures simples ou doubles brins de l'ADN spermatique de conjoint, dans l'ensemble de la population de notre étude, a révélé un lien significatif ( $r = 0.217$ ,  $p = 0.03$ ).

Tenant compte du fait de la capacité de l'ovocyte à réparer un ADN endommagé, nous avons sélectionné des patientes jeunes avec une moyenne d'âge de  $32.4 \pm 4.4$  ans, ne révélant, aucune pathologie physiologique susceptible d'influencer leur fertilité et de ce fait, la qualité de leurs ovocytes. Aussi, en plus de l'âge des patients nous avons considéré le nombre moyen des ovocytes recueillis ainsi que le nombre moyen des ovocytes matures. La répartition en fonction de la classe de DFI d'appartenance de l'époux n'indique aucune différence significative ( $p > 0.05$ ). Dans du nombre d'ovocyte recueillis ou du nombre d'ovocytes matures (Tableau 23 a, 23 b). Ce qui semble vérifier une éventuelle réparation de l'ADN spermatiques endommagé par l'ovocyte comme rapportés par plusieurs auteurs.

**Tableau 23 a** : Répartition selon les deux seuils de DFI préconisé par (Fernandez *et al.*, 2003)

| Taux de fécondance              | DFI $\leq 30\%$ | DFI $> 30\%$   | p-value |
|---------------------------------|-----------------|----------------|---------|
| Moyenne d'âge des patientes     | $33.2 \pm 4.0$  | $32.0 \pm 4.6$ | 0.162   |
| Moyenne des ovocytes recueillis | $7.3 \pm 2.7$   | $8.3 \pm 3.2$  | 0.126   |
| Moyenne des ovocytes mature     | $5.4 \pm 2.2$   | $6.4 \pm 2.9$  | 0.07    |

**Tableau 23 b :** Répartition selon les trois seuils de DFI préconisé par (Simon *et al.*, 2014)

| Taux de fécondance              | DFI $\leq$ 30% | DFI 31%-60%    | DFI >60%         | p-value |
|---------------------------------|----------------|----------------|------------------|---------|
| Moyenne d'âge des patientes     | 33.2 $\pm$ 4.0 | 32.1 $\pm$ 4.7 | 31.84 $\pm$ 4.50 | 0.371   |
| Moyenne des ovocytes recueillis | 7.3 $\pm$ 2.7  | 8.5 $\pm$ 3.2  | 7.9 $\pm$ 3.2    | 0.240   |
| Moyenne des ovocytes mature     | 5.4 $\pm$ 2.2  | 6.2 $\pm$ 3.0  | 6.8 $\pm$ 2.8    | 0.160   |

Néanmoins, des auteurs rapportent que même si les ovocytes sont de bonnes qualités et qu'ils arrivent à réparer les cassures présentent au niveau de l'ADN paternel, cela n'empêchera guère l'engendrement de mutations qui peuvent apparaître au niveau de l'embryon qui constituera le nouvel individu (Braude *et al.*, 1988 ; Schmid *et al.*, 2007).

Le nombre en moyenne d'ovocytes recueillis et /ou d'ovocytes matures, entre les groupes de SDI considérés (Tableau 24). Aussi, la qualité de la chromatine spermatique du conjoint ne semble pas influencer le taux de fécondance chez le couple. Ce qui en accord avec les conclusions rapportées par Hammad *et al* (1996). Ce qui de plus semble laisser l'influence du facteur féminin sur le taux de fécondance chez le couple.

**Tableau 24 :** Répartition des patientes selon le SDI du conjoint

| Caractéristiques des patients | SDI < 20%      | SDI $\geq$ 20% | p-value |
|-------------------------------|----------------|----------------|---------|
| Moyenne d'âge des patientes   | 32.2 $\pm$ 3.8 | 32.4 $\pm$ 4.7 | 0.893   |
| Moyenne des ovocytes recueils | 7.6 $\pm$ 3.2  | 7.9 $\pm$ 3.1  | 0.664   |
| Moyenne des ovocytes mature   | 6.0 $\pm$ 2.8  | 6.0 $\pm$ 2.6  | 0.984   |

Néanmoins, l'analyse statistique des données révèle une corrélation significative entre le taux de décondensation de la chromatine spermatique et le taux de fécondances ( $r = 0.216$   $p = 0.04$ ). Cela peut être expliqué par le fait, que dans certains cas l'ovocyte ne peut faire face à des anomalies d'ordre épigénétique, tel qu'une anomalie structurale de la

chromatine, ce qui peut engendrer un échec de fécondance, comme indiqué par Menezo *et al* (2014).

Par rapport au développement embryonnaire, la qualité du génome spermatique ne semble pas influencer le taux de clivage des embryons. Nous n'avons noté aucune différence significative ( $p > 0.05$ ) et aucune corrélation n'a été établie entre le taux de fragmentation de l'ADN spermatique et le taux de segmentations des embryons. Nos résultats sont en accord avec ceux de Payne *et al* (2005), Micinski, *et al* (2009) et Jiang *et al* (2011).

Les mêmes observations ont été révélées dans l'étude de la corrélation entre la qualité de la chromatine spermatique des patients et le taux de segmentation embryonnaire. Nos résultats rejoignent ceux décrit par Asmarinah *et al* (2016).

D'autre part d'après les résultats obtenus, la qualité des embryons lors du développement embryonnaire précoce, ne semble pas être affectée par la qualité du génome spermatique du conjoint.

Nous n'avons noté aucun lien significatif entre les embryons de différent grade A, B, C et D et le taux de fragmentation de l'ADN ( $p > 0.05$ ). Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par plusieurs auteurs (Benchaib *et al.*, 2003; Frydman *et al.*, 2008 ; Esbert *et al.*, 2011 ; Simon *et al.*, 2014).

De même que pour l'association, qualité embryonnaire et taux de décondensation de la chromatine spermatique, dans ce cas nos résultats rejoignent ceux de Sadeghi *et al.*, (2009).

Le rôle du génome masculin dans ce contexte est plus souvent considéré sous deux aspects ; son implication dans les événements liés à la fécondation et sa participation à la restauration de l'état diploïde après une adjonction avec le génome de l'ovocyte. Ainsi, le spermatozoïde initie l'activation métabolique de l'ovocyte et transmet le centriole nécessaire à la mise en place du fuseau mitotique permettant les divisions cellulaires. Au niveau de l'embryon, les premières étapes du développement préimplantatoire dépendent des enchainements moléculaires programmés par des transcrits maternels, concernant le génome paternel son influence sur le développement embryonnaire ne commence qu'à un stade tardif qui peut aller jusqu'à huit cellules (Poncelet et Sifer ,2011).

Guerin et Benchaib (2003) rapportent que pour cette période du développement préimplantatoire, si le pronucléus mâle est altéré, l'embryon se développera jusqu'au stade 6–8 cellules, mais n'atteindra pas le stade blastocyste (64 cellules). Il n'est toutefois pas déraisonnable d'estimer qu'un ADN paternel endommagé peut éventuellement permettre un développement préimplantatoire correct.

Simon *et al.*, (2014) décrivent également un effondrement du taux d'embryons de bonne qualité lors du stade blastocyste dans une population à DFI dégradé. Ce phénomène a été expliqué par l'effet tardif du génome paternel.

Les résultats de la micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïde dans notre cohorte, en terme de gestation ne semblent pas être liés à la qualité du génome spermatique du conjoint, que ce soit pour la qualité de l'ADN spermatique ou pour la qualité de la chromatine spermatique. Nos résultats ne montrent aucune différence significative ( $p > 0.05$ ), ils rejoignent ceux rapportés par Bungum *et al.* (2007), Messeguer *et al.* (2011) et Fourier *et al.* (2018).

La comparaison du taux d'avortement considéré selon les classes de DFI ou selon les classes de SDI, montre un faible taux d'avortement chez les patients présentant une bonne qualité du génome spermatique. Néanmoins, cela reste statistiquement non-significatif ( $p > 0.05$ ). De ce fait, nous pouvons supposer qu'un génome altéré permet une grossesse même si elle a de fortes chances d'évoluer vers un avortement, comme signalé par certains auteurs (Lin *et al.*, 2008 : Dar *et al.*, 2013).

Concernant les résultats des naissances, la qualité du génome spermatique du conjoint reste un facteur péjoratif pour ce paramètre. La comparaison du taux de naissance selon le DFI montre que la qualité de l'ADN spermatique influence le taux de naissances, néanmoins, cela demeure statistiquement non-significatif ( $p > 0.05$ ). De même le taux de naissance en fonction de la qualité de la chromatine spermatique des patients considérés selon leur SDI, où nos résultats semblent non-significatifs statistiquement ( $p > 0.05$ ).

Cependant, la réalisation d'une régression logistique en incluant certains nombre de paramètres tel que, la qualité de l'ADN spermatique, la qualité de la chromatine spermatique du conjoint, le facteur féminin représenté par l'âge ainsi que le taux de

fécondance et le taux de segmentation embryonnaire. Indique que la qualité de l'ADN spermatique semble être le facteur qui impacte le plus le taux de naissance dans le cadre de la technique de micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïde. Nos résultats sont en accord avec ceux de Alkusa *et al.*, (2014).

Par ailleurs, le croisement entre les différents groupes de DFI et les différents groupes de SDI de la population de notre étude, montre que les patients portant un ADN spermatique de bonne qualité ( $DFI \leq 30\%$ ) et une chromatine spermatique révélant une altération structurale ( $SDI \geq 20\%$ ), sont ceux qui ont enregistré le taux de naissances le plus élevé. Alors que, les patients présentant un ADN spermatique de mauvaise qualité voire dégradé ( $DFI > 30\%$ ) avec une chromatine compactée, condensée ( $SDI < 20\%$ ) ont les taux de naissances les plus bas.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons divisé notre cohorte en trois nouveaux groupes. Le premier groupe est composé de patients présentant un ADN spermatique de bonne qualité et une chromatine spermatique mal structurée ( $DFI \leq 30\%$ ,  $SDI \geq 20\%$ ), le deuxième groupe rassemble les patients porteurs d'un ADN spermatique altéré avec une chromatine spermatique de bonne qualité, bien condensée ( $DFI > 30\%$ ,  $SDI < 20\%$ ) et un troisième groupe nommé groupe intermédiaire qui renferme le reste des patients de la cohorte. Les résultats révèlent, que le groupe de patients ayant un ADN de bonne qualité avec un taux de fragmentation minimale et une chromatine de mauvaise qualité avec un taux de décondensation élevé, semble être le groupe de patients qui présentent les meilleurs résultats en terme de paramètres spermiologiques de type concentration et mobilité spermatique.

De plus, lors de la réalisation de la régression logistique, ces mêmes caractéristiques génétiques apparaissent comme celles qui semblent agir le plus sur le taux de naissance même si cela reste non- significatif ( $p > 0.05$ ).

Cette approche, démontre qu'une cellule spermatique différenciée renfermant une chromatine mal structurée voire décondensée mais portant un ADN de bonne qualité, non altéré peut induire une grossesse qui s'achèvera plus tard par une naissance.

Aussi, nous pouvons supposer qu'un patient avec un échantillon spermatique révélant un ADN dégradé peut donner des naissances vivantes, seulement il y a un risque de

transmission d'un matériel génétique altéré à la progéniture, qui peut être responsable de développement ultérieur de maladies génétiques et épigénétiques et même il peut être responsable de l'apparition de cancers infantiles, comme signalé par plusieurs travaux (Ji BT, 1997 ; Lee *et al* 2009 ; Bungum *et al* 2012 ; Dhawan *et al.*, 2019 )

### **CONCLUSION GENERALE :**

La santé reproductive de l'homme est devenue un sujet de santé publique. Lors de ces dernières décennies, de nombreuses études ont mis en évidence l'accroissement de cette pathologie.

Notre étude sur l'infertilité masculine a été réalisée sur une population d'hommes présumés stériles, orientés par des cliniciens spécialistes vers un centre d'Assistance Médicale à la Procréation.

Notre approche est de s'intéresser à l'aspect génétique et épigénétique de l'infertilité, notamment l'intégrité du génome du gamète mâle. Le but était d'apprécier le degré de ces anomalies géniques et de cerner les différents facteurs responsables de ces anomalies. D'autre part, mettre en évidence l'impact du génome gamétique dans le phénomène de fécondation, voire sa possible implication dans le processus de développement embryonnaire préimplantatoire et appréhender sa portée sur la qualité du produit de conception.

Aussi, concernant les facteurs masculins ; l'âge des patients ne semble pas avoir un effet sur la qualité du génome spermatique, que ce soit sur l'intégrité de l'ADN spermatique ou sur la structure de sa chromatine.

Pour les paramètres spermatiques, les patients révélant une spermatogénèse altérée, présentent souvent un ADN spermatique de mauvaise qualité avec un taux de fragmentation élevé. Cependant, ces anomalies spermiologiques ne semblent pas avoir des répercussions sur l'organisation structurale de la chromatine du génome spermatique.

Les différents facteurs environnementaux et toxiques de la vie moderne sont généralement associés à un éventail de complications médicales et agissent également sur la santé reproductive de l'homme.

Dans notre étude nous avons mis en évidence que l'intoxication tabagique, agit sur la qualité du noyau spermatique, cette dernière est responsable de la formation d'une chromatine désorganisée, décondensée et mal compactée.

L'intégrité du génome spermatique est considérée comme étant une donnée essentielle dans l'estimation du potentiel fécondant d'un spermatozoïde. Nos résultats ont montré que les altérations de l'ADN spermatique ne semblent pas influencer le processus de fécondation dans la mesure où un ovocyte de bonne qualité peut effectuer des recombinaisons sur ce génome spermatique endommagé néanmoins, ces capacités sont altérées au-delà d'un certain seuil.

Aussi, nous avons noté que les anomalies structurales de la chromatine, à savoir, son état décondensé ne semble pas influencer le processus de fécondation.

Le génome paternel ne semble pas agir les premiers stades de la division cellulaire. Lors du développement embryonnaire préimplantatoire, nous avons noté que la qualité du génome spermatique par son état génétique et épigénétique n'a aucune conséquence sur la qualité cellulaire des blastomères qui constituent ces embryons.

La technique de fécondation *in vitro* retenue dans le cadre de notre étude est une technique de micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïde. Dans cette dernière les barrières biologiques sélectives sont contournées, un spermatozoïde à génome altéré possède des capacités de féconder un ovocyte et de déclencher les premiers stades de division cellulaire, donnant même des embryons de bonne qualité lors de la phase préimplantatoire.

Dans notre étude les résultats de la micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïde, indiquent que l'intégrité du génome spermatique que ce soit par la qualité de l'ADN ou par la qualité de sa chromatine ne semble pas agir au niveau de l'étape de gestation. D'où la possibilité d'avoir avec un sperme présentant des altérations au niveau de son génome, une fécondation et un développement embryonnaire précoce normal évoluant vers une grossesse.

Néanmoins, si la qualité du génome spermatique n'influence pas le taux de grossesses, elle paraît agir sur l'apparition de fausses couches. Ce résultat peut être expliqué par l'effet tardif du génome paternel.

Concernant les naissances, la qualité de l'ADN spermatique semble agir sur le taux de naissance davantage que la qualité de la chromatine. Un spermatozoïde possédant un ADN de bonne qualité non fragmenté peut donner une naissance même si sa chromatine est altérée voire décondensée.

Les patients qui présentent un génome spermatique altéré peuvent potentiellement provoquer des maladies génétiques et surtout épigénétiques, voire engendrer des processus cancéreux chez la descendance.

Aussi, la technique de micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïde reste l'unique alternative pour les hommes possédant un génome spermatique détérioré de mauvaise qualité. Cependant, il reste aux cliniciens de proposer des diagnostics génétiques spécialisés afin d'améliorer la prise en charge des patients et préconiser des traitements à base d'antioxydants dans le but d'améliorer la qualité nucléaire de leur génome spermatique.

D'où l'importance d'élargir la batterie du diagnostic des patients infertiles afin d'améliorer leur prise en charge par l'exploration de la qualité et de l'intégrité du génome spermatique cela permet en l'occurrence d'apprécier la qualité de l'ADN spermatique, en mesurant son taux de fragmentation et d'apprécier aussi la qualité de la chromatine spermatique en évaluant son taux de condensation.

L'infertilité du couple n'est plus l'apanage de la femme, l'homme se trouve impliqué dans la moitié des cas. Les hypofertilités masculines ont des étiologies variables dont certaines causes sont génétiques.

Ces dernières années, nous avons observé l'émergence d'un nouvel axe de recherche, qui est la génétique de l'infertilité masculine. En effet, les nouveaux dispositifs de la

génétique ont facilité l'analyse du génome masculin dans sa globalité et ont permis l'identification de nombreuses anomalies géniques.

Nos conclusions, même si elles restent préliminaires, vu surtout la taille de l'échantillon, elles permettent néanmoins de savoir que la qualité du génome spermatique permet de prédire les résultats en PMA

Il serait donc approprié d'envisager de mettre en place ces nouveaux outils diagnostiques génétiques qui vont certainement modifier la stratégie de prise en charge des couples infertiles.

Ce type de recherche peut être approfondie dans ce domaine afin d'améliorer le diagnostic des patients présumés stériles dans notre pays .

## Références Bibliographiques

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

- Aboulmaouhib, S., Madkour, A., Kaarouch, I., Sefrioui, O., Saadani, B., Copin, H., Cadi, R. (2018)**- Impact of alcohol and cigarette smoking consumption in male fertility potential: Looks at lipid peroxidation, enzymatic antioxidant activities and sperm DNA damage. *Andrologia*, **50** (3), e12926.
- Agarwal, A., Majzoub, A., Esteves, S. C., Ko, E., Ramasamy, R., & Zini, A. (2016)**- Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios. *Translational Andrology and Urology*, **5** (6), 935.
- Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., & Chyatte, M. R. (2015)**- A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **13** (1), 37.
- Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., & du Plessis, S. S. (2014)**-Effect of oxidative stress on male reproduction. *The World Journal of Men's Health*, **32** (1), 1–17.
- Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B. J., Shaman, A., & Gupta, S. (2012)**- The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **10** (1), 49.
- Agarwal, A., Saleh, R. A., & Bedaiwy, M. A. (2003)**- Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility*, **79** (4), 829–843.
- Aitken, Robert John, Gibb, Z., Baker, M. A., Drevet, J., & Gharagozloo, P. (2016)**- Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, **28** (2), 1–10.
- Aitken, R. J., & De Iuliis, G. N. (2009)**- On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, **16** (1), 3–13
- Ajduk, A., Yamauchi, Y., & Ward, M. A. (2006)**- Sperm chromatin remodeling after intracytoplasmic sperm injection differs from that of in vitro fertilization. *Biology of Reproduction*, **75** (3), 442–451.
- AlKusayer, G. M., Amily, N., Abou-Setta, A. M., & Bedaiwy, M. A. (2014)**-Live birth rate following IVF/ICSI in patients with sperm DNA fragmentation: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility*, **102**(3), e305.

## Références Bibliographiques

---

- Allan, J., Hartman, P. G., Crane-Robinson, C., & Aviles, F. X. (1980)** - The structure of histone H1 and its location in chromatin. *Nature*, **288** (5792), 675.
- Allan, James, Mitchell, T., Harborne, N., Bohm, L., & Crane-Robinson, C. (1986)**- Roles of H1 domains in determining higher order chromatin structure and H1 location. *Journal of Molecular Biology*, **187** (4), 591–601.
- Allegra, P., Sterner, R., Clayton, D. F., & Allfrey, V. G. (1987)**- Affinity chromatographic purification of nucleosomes containing transcriptionally active DNA sequences. *Journal of Molecular Biology*, **196** (2), 379–388.
- Alvarez, J. G., Sharma, R. K., Ollero, M., Saleh, R. A., Lopez, M. C., Thomas Jr, A. J., Agarwal, A. (2002)**- Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertility and Sterility*, **78** (2), 319–329.
- Amann, R. P., & Hammerstedt, R. H. (1993)**-In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *Journal of Andrology*, **14** (6), 397–406.
- Angelopoulou, R., Plastira, K., & Msaouel, P. (2007)**- Spermatozoal sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **5** (1), 36.
- Anifandis, G., Bounartzi, T., Messini, C. I., Dafopoulos, K., Markandona, R., Sotiriou, S., Messinis, I. E. (2015)**- Sperm DNA fragmentation measured by H alosperm does not impact on embryo quality and ongoing pregnancy rates in IVF/ICSI treatments. *Andrologia*, **47** (3), 295–302.
- Annunziato, A. (2008)**- DNA packaging: nucleosomes and chromatin. *Nature Education*, **1**(1), 26.
- Aoki, V. W., Liu, L., Jones, K. P., Hatasaka, H. H., Gibson, M., Peterson, C. M., & Carrell, D. T. (2006)**-Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertility and Sterility*, **86** (5), 1408–1415.
- Aoki, V. W., Moskovtsev, S. I., Willis, J., Liu, L., Mullen, J. B. M., & Carrell, D. T. (2005)**- DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *Journal of Andrology*, **26** (6), 741–748.

## Références Bibliographiques

---

- Aoki, V. W., & Carrell, D. T. (2003)**- Human protamines and the developing spermatid: their structure, function, expression and relationship with male infertility. *Asian Journal of Andrology*, **5** (4), 315–324.
- Arents, G., Burlingame, R. W., Wang, B.-C., Love, W. E., & Moudrianakis, E. N. (1991)**- The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **88** (22), 10148–10152.
- Asmarinah, Syauqy, A., Umar, L. A., Lestari, S. W., Mansyur, E., Hestiantoro, A., & Paradowska-Dogan, A. (2016)**- Sperm chromatin maturity and integrity correlated to zygote development in ICSI program. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, **62** (5), 309–316.
- Balhorn, Rod. (2007)**-The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biology*, **8**(9), 227.
- Balhorn, R., Reed, S., & Tanphaichitr, N. (1988)**- Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males. *Experientia*, **44** (1), 52–55.
- Balhorn, Rod. (1982)**- A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *The Journal of Cell Biology*, **93** (2), 298–305.
- Banks, S., King, S. A., Irvine, D. S., & Saunders, P. T. (2005)**- Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction*, **129** (4), 505–514.
- Barone, J. E. G., de Lara, J., Cummings, K. B., & Ward, W. S. (1994)**- DNA organization in human spermatozoa. *Journal of Andrology*, **15** (2), 139–144.
- Barratt, C. L., Aitken, R. J., Björndahl, L., Carrell, D. T., De Boer, P., Kvist, U., Ramos, L. (2010)**- Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications—a position report. *Human Reproduction*, **25** (4), 824–838.
- Bartoov, B., Berkovitz, A., Eltes, F., Kogosowski, A., Menezo, Y., & Barak, Y. (2002)**- Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *Journal of Andrology*, **23** (1), 1–8.

## Références Bibliographiques

---

- Belloc, S., Benkhalifa, M., Junca, A. M., Dumont, M., Bacrie, P. C., & Ménézo, Y. (2009a)**-Paternal age and sperm DNA decay: discrepancy between chromomycin and aniline blue staining. *Reproductive Biomedicine Online*, **19** (2), 264–269.
- Belloc, S., Cohen-Bacrie, P., Benkhalifa, M., Cohen-Bacrie, M., De Mouzon, J., Hazout, A., & Ménézo, Y. (2008)**- Effect of maternal and paternal age on pregnancy and miscarriage rates after intrauterine insemination. *Reproductive Biomedicine Online*, **17** (3), 392–397.
- Belmont, A. S. (2002)**- Mitotic chromosome scaffold structure: new approaches to an old controversy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99** (25), 15855–15857.
- Benchaib, Mehdi, Lornage, J., Mazoyer, C., Lejeune, H., Salle, B., & Guerin, J. F. (2007)**- Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertility and Sterility*, **87** (1), 93–100.
- Benchaib, M., Ajina, M., Braun, V., Niveleau, A., & Guerin, J. F. (2007)**- Méthylation du spermatozoïde en Assistance médicale à la procréation (AMP) DNA sperm methylation in Assisted Reproductive Techniques. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, **34**, 836–839.
- Benchaib, Mehdi, Braun, V., Lornage, J., Hadj, S., Salle, B., Lejeune, H., & Guérin, J. F. (2003)**- Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Human Reproduction*, **18** (5), 1023–1028.
- Bendayan, M., Alter, L., Swierkowski-Blanchard, N., Caceres-Sanchez, L., Selva, J., Robin, G., & Boitrelle, F. (2018)**-Toxiques, mode de vie, environnement: quels impacts sur la fertilité masculine? *Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie*, **46** (1), 47–56.
- Bird, A. (2002)**- DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*, **16**(1), 6–21.
- Boissonneault, G. (2002)**- Chromatin remodeling during spermiogenesis: a possible role for the transition proteins in DNA strand break repair. *FEBS Letters*, **514**(2–3), 111–114.

## Références Bibliographiques

---

- Bolton V.N., & Braude, P.R. (1984)**-Preparation of human spermatozoa for in vitro fertilization by isopycnic centrifugation on self generating density gradients. *Archives of Andrology*, **13** (3)167–176.
- Borini, A., Tarozzi, N., Bizzaro, D., Bonu, M. A., Fava, L., Flamigni, C., & Coticchio, G. (2006)**- Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Human Reproduction*, **21**(11), 2876–2881.
- Boulanger, K. (2005)**-Influence du tabagisme et des antioxydants sur la fertilité masculine.
- Braude, P., Bolton, V., & Moore, S. (1988)**- Human gene expression first occurs between the four-and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*, **332** (6163), 459.
- Braun, R. E. (2001)**-Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nature Genetics*, **28** (1), 10.
- Brewer, L. R., Corzett, M., & Balhorn, R. (1999)**- Protamine-induced condensation and decondensation of the same DNA molecule. *Science*, **286** (5437), 120–123.
- Bungum, M., Bungum, L., Lynch, K.-F., Wedlund, L., Humaidan, P., & Giwercman, A. (2012)**- Spermatozoa DNA damage measured by sperm chromatin structure assay (SCSA) and birth characteristics in children conceived by IVF and ICSI. *International Journal of Andrology*, **35** (4), 485–490.
- Bungum, M., Humaidan, P., Axmon, A., Spano, M., Bungum, L., Erenpreiss, J., & Giwercman, A. (2007)**- Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Human Reproduction*, **22** (1), 174–179.
- Cai, Q., Wan, F., Huang, K., & Zhang, H. (2013)**- Does the number of oocytes retrieved influence pregnancy after fresh embryo transfer? *PloS One*, **8** (2), e56189.
- Camporeale, G., Shubert, E. E., Sarath, G., Cerny, R., & Zemleni, J. (2004)**- K8 and K12 are biotinylated in human histone H4. *European Journal of Biochemistry*, **271** (11), 2257–2263.
- Carrell, D. T., Emery, B. R., & Hammoud, S. (2007)**-Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Human Reproduction Update*, **13** (3), 313–327.

## Références Bibliographiques

---

- Carrell, D. T., & Liu, L. (2001)**-Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *Journal of Andrology*, **22** (4), 604–610.
- Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M. J., Pilch, D. R., Staudt, D. W., Lee, A., Nussenzweig, A. (2003)**- Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nature Cell Biology*, **5** (7), 675–679.
- Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P. J., Fernandez -Capetillo, O., Chen, H. T., Sedelnikova, O. A., Difilippantonio, M. J. (2002)**-Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science*, **296** (5569), 922–927.
- Chauvière, M., Martinage, A., Debarle, M., Sautière, P., & Chevallier, P. (1992)**- Molecular characterization of six intermediate proteins in the processing of mouse protamine P2 precursor. *European Journal of Biochemistry*, **204** (2), 759–765.
- Chen, S., Cao, J., Fei, R. R., Mao, Q. Z., & Li, H. Z. (2005)**- Analysis of protamine content in patients with asthenozoospermia. *Zhonghua Nan Ke Xue= National Journal of Andrology*, **11**(8), 587–9.
- Chen, Z.-X., Mann, J. R., Hsieh, C.-L., Riggs, A. D., & Chédin, F. (2005)**- Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family. *Journal of Cellular Biochemistry*, **95**(5), 902–917.
- Cheung, P., & Lau, P. (2005)**- Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. *Molecular Endocrinology*, **19** (3), 563–573.
- Cheung, W. L., Briggs, S. D., & Allis, C. D. (2000)**- Acetylation and chromosomal functions. *Current Opinion in Cell Biology*, **12** (3), 326–333.
- Chi, H.-J., Chung, D.-Y., Choi, S.-Y., Kim, J.-H., Kim, G.-Y., Lee, J.-S., Roh, S.-I. (2011)**-Integrity of human sperm DNA assessed by the neutral comet assay and its relationship to semen parameters and clinical outcomes for the IVF-ET program. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, **38** (1), 10–17.

## Références Bibliographiques

---

- Chiamchanya, C., Kaewnoonual, N., Visutakul, P., Manochantr, S., & Chaiya, J. (2010)**- Comparative study of the effects of three semen preparation media on semen analysis, DNA damage and protamine deficiency, and the correlation between DNA integrity and sperm parameters. *Asian Journal of Andrology*, **12** (2), 271.
- Clermont, Y. (1963)**- The cycle of the seminiferous epithelium in man. *American Journal of Anatomy*, **112** (1), 35–51.
- Cocuzza, M., Sikka, S. C., Athayde, K. S., & Agarwal, A. (2007)**- Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *International Braz J Urol*, **33** (5), 603–621.
- Corda, D., & Di Girolamo, M. (2003)**- Functional aspects of protein mono-ADP-ribosylation. *The EMBO Journal*, **22** (9), 1953–1958.
- Corzett, M., Mazrimas, J., & Balhorn, R. (2002)**- Protamine 1: protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. *Molecular Reproduction and Development*, **61**(4), 519–527.
- Dadoune, J. P., & Demoulin, A. (2001)**- Structure et fonctions du testicule. La reproduction chez les mammifères et l'homme. *Paris: INRA Éditions*, 256.
- Dar, S., Grover, S. A., Moskovtsev, S. I., Swanson, S., Baratz, A., & Librach, C. L. (2013)**- In vitro fertilization–intracytoplasmic sperm injection outcome in patients with a markedly high DNA fragmentation index (> 50%). *Fertility and Sterility*, **100** (1), 75–80.
- de Murcia, G., & de Murcia, J. M. (1994)**- Poly (ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends in Biochemical Sciences*, **19** (4), 172–176.
- Dhawan, V., Kumar, M., Deka, D., Malhotra, N., Singh, N., Dadhwal, V., & Dada, R. (2019)**- Paternal factors and embryonic development: Role in recurrent pregnancy loss. *Andrologia*, **51** (1), e13171.
- Dootz, R., Toma, A. C., & Pfohl, T. (2011)**-Structural and dynamic properties of linker histone H1 binding to DNA. *BiOMICROFLUIDICS*, **5** (2), 024104.
- Dorigo, B., Schalch, T., Kulangara, A., Duda, S., Schroeder, R. R., & Richmond, T. J. (2004)**- Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science*, **306**(5701), 1571–1573.

## Références Bibliographiques

---

- Dottermusch-Heidel, C., Klaus, E. S., Gonzalez, N. H., Bhushan, S., Meinhardt, A., Bergmann, M., Steger, K. (2014)**- H3K79 methylation directly precedes the histone-to-protamine transition in mammalian spermatids and is sensitive to bacterial infections. *Andrology*, **2** (5), 655–665.
- Drabent, B., Saftig, P., Bode, C., & Doenecke, D. (2000)**-Spermatogenesis proceeds normally in mice without linker histone H1t. *Histochemistry and Cell Biology*, **113** (6), 433–442.
- Eissenberg, J. C., & Elgin, S. C. (2000)**- The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Current Opinion in Genetics & Development*, **10** (2), 204–210.
- El-Melegy, N. T., & Ali, M.-E. M. (2011)**- Apoptotic markers in semen of infertile men: association with cigarette smoking. *International Braz J Urol*, **37** (4), 495–506.
- Erenpreiss, J., Elzanaty, S., & Giwercman, A. (2008)**- Sperm DNA damage in men from infertile couples. *Asian Journal of Andrology*, **10** (5), 786–790
- Erenpreiss, J., Bars, J., Lipatnikova, V., Erenpreisa, J., & Zalkalns, S. (2001)**- Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. *Journal of Andrology*, **22**(1):45-53.
- Erenpreiss, J., Hlevicka, S., Zalkalns, J., & Erenpreisa, J. (2002)**- Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples. *Journal of Andrology*, **23** (5), 717–723.
- Esbert, M., Pacheco, A., Vidal, F., Florensa, M., Riqueros, M., Ballesteros, A., Calderón, G. (2011)**- Impact of sperm DNA fragmentation on the outcome of IVF with own or donated oocytes. *Reproductive Biomedicine Online*, **23** (6), 704–710.
- Evenson, D. P., Jost, L. K., Corzett, M., & Balhorn, R. (2000)**-Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. *Journal of Andrology*, **21** (5), 739–746.
- Evenson, D. P., Jost, L. K., Marshall, D., Zinaman, M. J., Clegg, E., Purvis, K., Claussen, O. P. (1999)**- Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction*, **14** (4), 1039–1049.

## Références Bibliographiques

---

- Evenson, D. P., Emerick, R. J., Jost, L. K., Kayongo-Male, H., & Stewart, S. R. (1993)**- Zinc-silicon interactions influencing sperm chromatin integrity and testicular cell development in the rat as measured by flow cytometry. *Journal of Animal Science*, **71**(4), 955–962.
- Evenson, D. P., Darzynkiewicz, Z., & Melamed, M. R. (1980)**-Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*, **210** (4474), 1131–1133.
- Faure, A. K., Pivot-Pajot, C., Kerjean, A., Hazzouri, M., Pelletier, R., Peoc'h, M., Rousseaux, S. (2003)**- Misregulation of histone acetylation in Sertoli cell-only syndrome and testicular cancer. *Molecular Human Reproduction*, **9** (12), 757–763.
- Fernandez, J. L., Muriel, L., Rivero, M. T., Goyanes, V., Vazquez, R., & Alvarez, J. G. (2003)**- The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *Journal of Andrology*, **24** (1), 59–66.
- Finch, J. T., & Klug, A. (1976)**-Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **73** (6), 1897–1901.
- Fournier, C., Labrune, E., Lornage, J., Soignon, G., Giscard d'Estaing, S., Guérin, J.-F., & Benchaib, M. (2018)**- The impact of histones linked to sperm chromatin on embryo development and ART outcome. *Andrology*, **6** (3), 436–445.
- Fragouli, E., Alfarawati, S., Spath, K., & Wells, D. (2014)**- Morphological and cytogenetic assessment of cleavage and blastocyst stage embryos. *Molecular Human Reproduction*, **20**(2), 117–126.
- Fuentes-Mascorro, G., Serrano, H., & Rosado, A. (2000)**- Sperm chromatin. *Archives of Andrology*, **45** (3), 215–225.
- García-Contreras, A., De Loera, Y., García-Artiga, C., Palomo, A., Guevara, J. A., Herrera-Haro, J., Gosálvez, J. (2011)**- Elevated dietary intake of Zn-methionate is associated with increased sperm DNA fragmentation in the boar. *Reproductive Toxicology*, **31** (4), 570–573.

## Références Bibliographiques

---

- Gatewood, J. M., Schroth, G. P., Schmid, C. W., & Bradbury, E. M. (1990)**- Zinc-induced secondary structure transitions in human sperm protamines. *Journal of Biological Chemistry*, **265** (33), 20667–20672.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., & Ben-Sasson, S. A. (1992)**- Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology*, **119** (3), 493–501.
- Ghanem, H., Shaer, O., & El-Segini, A. (2010)**-Combination clomiphene citrate and antioxidant therapy for idiopathic male infertility: a randomized controlled trial. *Fertility and Sterility*, **93** (7), 2232–2235.
- Gineitis, A. A., Zalenskaya, I. A., Yau, P. M., Bradbury, E. M., & Zalensky, A. O. (2000)**- Human sperm telomere–binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment. *The Journal of Cell Biology*, **151**(7), 1591–1598.
- Godmann, M., Lambrot, R., & Kimmins, S. (2009)**-The dynamic epigenetic program in male germ cells: Its role in spermatogenesis, testis cancer, and its response to the environment. *Microscopy Research and Technique*, **72**(8), 603–619.
- Goll, M. G., Kirpekar, F., Maggert, K. A., Yoder, J. A., Hsieh, C.-L., Zhang, X., Bestor, T. H. (2006)**-Methylation of tRNA<sup>Asp</sup> by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, **311**(5759), 395–398.
- Goll, M. G., & Bestor, T. H. (2005)**- Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.*, **74**, 481–514.
- Gorczyca, W., Traganos, F., Jesionowska, H., & Darzynkiewicz, Z. (1993)**-Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Experimental Cell Research*, **207**(1), 202–205.
- Govin, J., Caron, C., Lestrat, C., Rousseaux, S., & Khochbin, S. (2004)**- The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *European Journal of Biochemistry*, **271**(17), 3459–3469.
- Grabher, A., Brosch, G., Sendra, R., Lechner, T., Eberharter, A., Georgieva, E. I., Loidl, P. (1994)**-Subcellular location of enzymes involved in core histone acetylation. *Biochemistry*, **33**(49), 14887–14895.

## Références Bibliographiques

---

- Grandjean, V., & Rousseaux, S. (2006)**- Mise en place de l'information épigénétique dans le gamète mâle. *Médecine Thérapeutique/Médecine de La Reproduction*, **8**(3), 179–189.
- Green, G. R., Balhorn, R., Poccia, D. L., & Hecht, N. B. (1994)**- Synthesis and processing of mammalian protamines and transition proteins. *Molecular Reproduction and Development*, **37** (3), 255–263.
- Grewal, S. I., & Elgin, S. C. (2007)**- Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature*, **447**(7143), 399.
- Grigoryev, S. A., Arya, G., Correll, S., Woodcock, C. L., & Schlick, T. (2009)**- Evidence for heteromorphic chromatin fibers from analysis of nucleosome interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**(32), 13317–22.
- Gusse, M., Sautière, P., Bélaiche, D., Martinage, A., Roux, C., Dadoune, J.-P., & Chevaillier, P. (1986)**- Purification and characterization of nuclear basic proteins of human sperm. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **884**(1), 124–134.
- Halliwell, B. E. (1989)**-Lipid peroxidation: a radical chain reaction. *Free Radicals in Biology and Medicine*.
- Hamad, M. F., Shelko, N., Kartarius, S., Montenarh, M., & Hammadeh, M. E. (2014)**- Impact of cigarette smoking on histone (H2B) to protamine ratio in human spermatozoa and its relation to sperm parameters. *Andrology*, **2**(5), 666–677.
- Hamatani, T., Falco, G., Carter, M. G., Akutsu, H., Stagg, C. A., Sharov, A. A., Ko, M. S. (2004)**- Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Human Molecular Genetics*, **13** (19), 2263–2278.
- Hammadeh, M. E., Hamad, M. F., Montenarh, M., & Fischer-Hammadeh, C. (2010)**-Protamine contents and P1/P2 ratio in human spermatozoa from smokers and non-smokers. *Human Reproduction*, **25** (11), 2708–2720.

## Références Bibliographiques

---

- Hammadeh, M. E., Zeginiadv, T., Rosenbaum, P., Georg, T., Schmidt, W., & Strehler, E. (2001)**- Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. *Archives of Andrology*, **46**(2), 99–104.
- Hammadeh, M. E., Stieber, M., Haidl, G., & Schmidt, W. (1998)**. Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. *Andrologia*, **30** (1), 29–35.
- Hammadeh, M. E., Al-Hasani, S., Stieber, M., Rosenbaum, P., Küpker, D., Diedrich, K., & Schmidt, W. (1996)**-Andrology: The effect of chromatin condensation (Aniline Blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme. *Human Reproduction*, **11**(11), 2468–2471.
- Hammoud, S. S., Low, D. H., Yi, C., Carrell, D. T., Guccione, E., & Cairns, B. R. (2014)**-Chromatin and transcription transitions of mammalian adult germline stem cells and spermatogenesis. *Cell Stem Cell*, **15** (2), 239–253.
- Hammoud, S. S., Nix, D. A., Zhang, H., Purwar, J., Carrell, D. T., & Cairns, B. R. (2009)**-Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature*, **460** (7254), 473.
- Hart, C. M., & Laemmli, U. K. (1998)**-Facilitation of chromatin dynamics by SARs. *Current Opinion in Genetics & Development*, **8** (5), 519–525.
- Hayashi, K., Yoshida, K., & Matsui, Y. (2005)**- A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nature*, **438** (7066), 374.
- Hazout, A., Menezo, Y., Madelenat, P., Yazbeck, C., Selva, J., & Cohen-Bacrie, P. (2008)**- Causes et implications cliniques des altérations de l'ADN des spermatozoïdes. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, **36** (11), 1109–1117.
- Hazzouri, M., Pivot-Pajot, C., Faure, A.-K., Usson, Y., Pelletier, R., Sèle, B., Rousseaux, S. (2000)**- Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone-deacetylases. *European Journal of Cell Biology*, **79**(12), 950–960.

## Références Bibliographiques

---

- Henzel, M. J., Wei, Y., Mancini, M. A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B. R., Allis, C. D. (1997)**-Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, **106** (6), 348–360.
- Henikoff, S., Furuyama, T., & Ahmad, K. (2004)**- Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance. *Trends in Genetics*, **20**(7), 320–326.
- Hermann, A., Goyal, R., & Jeltsch, A. (2004)**-The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5) methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *Journal of Biological Chemistry*. **79** (46), 48350-9.
- Host, E., Lindenberg, S., & Smidt-Jensen, S. (2000)**- The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, **79** (7), 559–563.
- Hsu, P.-C., Chen, I.-Y., Pan, C.-H., Wu, K.-Y., Pan, M.-H., Chen, J.-R., Liu, C.-S. (2006)**- Sperm DNA damage correlates with polycyclic aromatic hydrocarbons biomarker in coke-oven workers. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, **79**(5), 349–356.
- Hud, N. V., & Vilfan, I. D. (2005)**- Toroidal DNA condensates: unraveling the fine structure and the role of nucleation in determining size. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **34**, 295–318.
- Hud, N. V., Downing, K. H., & Balhorn, R. (1995)**- A constant radius of curvature model for the organization of DNA in toroidal condensates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **92**(8), 3581–3585.
- Humphrey, G. W., Wang, Y., Russanova, V. R., Hirai, T., Qin, J., Nakatani, Y., & Howard, B. H. (2001)**-Stable histone deacetylase complexes distinguished by the presence of SANT domain proteins CoREST/kiaa0071 and Mta-L1. *Journal of Biological Chemistry*, **276**(9), 6817–6824.
- Huynh, T., Mollard, R., & Trounson, A. (2002)**- Selected genetic factors associated with male infertility. *Human Reproduction Update*, **8**(2), 183–198.

## Références Bibliographiques

---

- Imamovic Kumalic, S., & Pinter, B. (2014)**- Review of clinical trials on effects of oral antioxidants on basic semen and other parameters in idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *BioMed Research International*,
- Irvine, D. S., Twigg, J. P., Gordon, E. L., Fulton, N., Milne, P. A., & Aitken, R. J. (2000)**-DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *Journal of Andrology*, **21**(1), 33–44.
- Jason, L. J., Moore, S. C., Lewis, J. D., Lindsey, G., & Ausió, J. (2002)**- Histone ubiquitination: a tagging tail unfolds? *Bioessays*, **24** (2), 166–174.
- Jenuwein, T., & Allis, C. D. (2001)** - Translating the histone code. *Science*, **293** (5532), 1074–1080.
- Ji, B.-T., Shu, X.-O., Zheng, W., Ying, D.-M., Linet, M. S., Wacholder, S., Jin, F. (1997)**-Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *Journal of the National Cancer Institute*, **89**(3), 238–243.
- Jiang, H.-H., He, X.-J., Song, B., & Cao, Y.-X. (2011)**-Sperm chromatin integrity test for predicting the outcomes of IVF and ICSI. *Zhonghua Nan Ke Xue= National Journal of Andrology*, **17**(12), 1083–1086.
- Jurkowska, R. Z., Jurkowski, T. P., & Jeltsch, A. (2011)**- Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem*, **12** (2), 206–222.
- Kasinsky, H. E., Lewis, J. D., Dacks, J. B., & Ausió, J. (2001)**-Origin of H1 linker histones. *The FASEB Journal*, **15** (1), 34–42.
- Kelly, T. L., Li, E. N., & Trasler, J. M. (2003)**- 5-Aza-2'-deoxycytidine induces alterations in murine spermatogenesis and pregnancy outcome. *Journal of Andrology*, **24**(6), 822–830.
- Kim, H.-S., Kang, M. J., Kim, S. A., Oh, S. K., Kim, H., Ku, S.-Y., Choi, Y. M. (2013)**-The utility of sperm DNA damage assay using toluidine blue and aniline blue staining in routine semen analysis. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, **40** (1), 23–28.
- Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J., & Ahnström, G. (1996)**- The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Research*, **363**(2), 89–96.

## Références Bibliographiques

---

- Klonoff-Cohen, H. S., & Natarajan, L. (2004)**- The effect of advancing paternal age on pregnancy and live birth rates in couples undergoing in vitro fertilization or gamete intrafallopian transfer. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **191**(2), 507–514.
- Kobayashi, H., Sato, A., Otsu, E., Hiura, H., Tomatsu, C., Utsunomiya, T., Arima, T. (2007)**- Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Human Molecular Genetics*, **16**(21), 2542–2551.
- Krausz, C., Hoefsloot, L., Simoni, M., & Tüttelmann, F. (2014)**- EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology*, **2**(1), 5–19.
- Krishnamoorthy, T., Chen, X., Govin, J., Cheung, W. L., Dorsey, J., Schindler, K., Khochbin, S. (2006)**- Phosphorylation of histone H4 Ser1 regulates sporulation in yeast and is conserved in fly and mouse spermatogenesis. *Genes & Development*, **20**(18), 2580–2592.
- Künzle, R., Mueller, M. D., Hänggi, W., Birkhäuser, M. H., Drescher, H., & Bersinger, N. A. (2003)**- Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertility and Sterility*, **79**(2), 287–291.
- Kuo, M.-H., & Allis, C. D. (1998)**- Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays*, **20**(8), 615–626.
- Lee, J., Richburg, J. H., Younkin, S. C., & Boekelheide, K. (1997)**- The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology*, **138** (5), 2081–2088.
- Lee, K.-M., Ward, M. H., Han, S., Ahn, H. S., Kang, H. J., Choi, H. S., Choi, J.-E. (2009)**- Paternal smoking, genetic polymorphisms in CYP1A1 and childhood leukemia risk. *Leukemia Research*, **33**(2), 250–258.
- Leonhardt, H., Page, A. W., Weier, H.-U., & Bestor, T. H. (1992)**- A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell*, **71**(5), 865–873.
- Lewis, J. D., Saperas, N., Song, Y., Zamora, M. J., Chiva, M., & Ausió, J. (2004)**- Histone H1 and the origin of protamines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**(12), 4148–4152.

## Références Bibliographiques

---

- Li, E. (2002)**- Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature Reviews Genetics*, **3**(9), 662.
- Lin, M.-H., Lee, R. K.-K., Li, S.-H., Lu, C.-H., Sun, F.-J., & Hwu, Y.-M. (2008)**- Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertility and Sterility*, **90** (2), 352–359.
- Lin, Q., Sirotkin, A., & Skoultchi, A. I. (2000)**-Normal spermatogenesis in mice lacking the testis-specific linker histone H1t. *Molecular and Cellular Biology*, **20** (6), 2122–2128.
- Liu, Y., Oakeley, E. J., Sun, L., & Jost, J.-P. (1998)**-Multiple domains are involved in the targeting of the mouse DNA methyltransferase to the DNA replication foci. *Nucleic Acids Research*, **26**(4), 1038–1045.
- Lu, J.-C., Jing, J., Chen, L., Ge, Y.-F., Feng, R.-X., Liang, Y.-J., & Yao, B. (2018)**- Analysis of human sperm DNA fragmentation index (DFI) related factors: a report of 1010 subfertile men in China. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **16** (1).
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997)**- Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 \AA resolution. *Nature*, **389** (6648), 251.
- Mahadevaiah, S. K., Turner, J. M., Baudat, F., Rogakou, E. P., de Boer, P., Blanco-Rodríguez, J., Burgoyne, P. S. (2001)**- Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nature Genetics*, **27**(3), 271.
- Malik, H. S., & Henikoff, S. (2003)**- Phylogenomics of the nucleosome. *Nature Structural and Molecular Biology*, **10**(11), 882.
- Manicardi, G. C., Bianchi, P. G., Pantano, S., Azzoni, P., Bizzaro, D., Bianchi, U., & Sakkas, D. (1995)**- Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biology of Reproduction*, **52**(4), 864–867.
- Marchetti, P., & Marchetti, C. (2009)**- Apoptose des spermatozoïdes: mythe ou réalité? *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, **37**(6), 562–569.

## Références Bibliographiques

---

- Marcon, L., & Boissonneault, G. (2004)**-Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis: new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biology of Reproduction*, **70**(4), 910–918.
- Martin, C., & Zhang, Y. (2005)**- The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **6**(11), 838–849.
- Martins, R. P., Finan, J. D., Farshid, G., & Lee, D. A. (2012)**-Mechanical regulation of nuclear structure and function. *Annual Review of Biomedical Engineering*, **14**, 431–455.
- McPherson, S., & Longo, F. J. (1993)**- Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids.
- Meistrich, M. L., Mohapatra, B., Shirley, C. R., & Zhao, M. (2003)**-Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma*, **111**(8), 483–488.
- Meistrich, M. L., Trostle-Weige, P. K., Lin, R., Allis, C. D., & Bhatnagar, Y. M. (1992)**- Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. *Molecular Reproduction and Development*, **31**(3), 170–181.
- Menezo, Y., Evenson, D., Cohen, M., & Dale, B. (2014)**- Effect of antioxidants on sperm genetic damage. In *Genetic Damage in Human Spermatozoa* 173–189. Springer.
- Ménézo, Y. J., Hazout, A., Panteix, G., Robert, F., Rollet, J., Cohen-Bacrie, P., Benkhalifa, M. (2007)**-Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reproductive Biomedicine Online*, **14**(4), 418–421.
- Meseguer, M., Santiso, R., Garrido, N., García-Herrero, S., Remohí, J., & Fernandez, J. L. (2011)**- Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertility and Sterility*, **95**(1), 124–128.
- Miciński, P., Pawlicki, K., Wielgus, E., Bochenek, M., & Tworkowska, I. (2009)**- The sperm chromatin structure assay (SCSA) as prognostic factor in IVF/ICSI program. *Reproductive Biology*, **9** (1), 65–70.
- Migliore, L., Naccarati, A., Zanello, A., Scarpato, R., Bramanti, L., & Mariani, M. (2002)**- Assessment of sperm DNA integrity in workers exposed to styrene. *Human Reproduction*, **17**(11), 2912–2918.

## Références Bibliographiques

---

- Misteli, T., Gunjan, A., Hock, R., Bustin, M., & Brown, D. T. (2000)**- Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature*, **408** (6814), 877.
- Morris, I. D. (2002)**-Sperm DNA damage and cancer treatment 1. *International Journal of Andrology*, **25**(5), 255–261.
- Mostafa, R. M., Nasrallah, Y. S., Hassan, M. M., Farrag, A. F., Majzoub, A., & Agarwal, A. (2018)**-The effect of cigarette smoking on human seminal parameters, sperm chromatin structure and condensation. *Andrologia*, **50** (3), e12910.
- Nasr-Esfahani, M.H., Salehi, M., Razavi, S., Anjomshoa, M., Rozbahani, S., Moulavi, F., 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.
- Noblanc, A. (2013)**-Contrôle des dommages oxydants au noyau spermatique : Apports des modèles murins knock-out pour des glutathion peroxydases (PhD Thesis). *Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II*.
- Noblanc, A., Peltier, M., Damon-Soubeyrand, C., Kerchkove, N., Chabory, E., Vernet, P., Pons-Rejraji, H. (2012)**- Epididymis response partly compensates for spermatozoa oxidative defects in snGPx4 and GPx5 double mutant mice. *PLoS One*, **7**(6), e38565.
- Novotny, J., Aziz, N., Rybar, R., Brezinova, J., Kopecka, V., Filipcikova, R., Oborna, I. (2013)**-Relationship between reactive oxygen species production in human semen and sperm DNA damage assessed by Sperm Chromatin Structure Assay. *Biomedical Papers*.
- Nowak, S. J., & Corces, V. G. (2004)**- Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends in Genetics*, **20**(4), 214–220.
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., & Li, E. (1999)**- DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, **99**(3), 247–257.
- Olins, A. L., & Olins, D. E. (1974)**-Spheroid chromatin units (v bodies). *Science*, **183** (4122), 330–332.

## Références Bibliographiques

---

- Olins, D. E., & Olins, A. L. (2003)**-Chromatin history: our view from the bridge. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **4**(10), 809.
- Oliva, R. (2006)**- Protamines and male infertility. *Human Reproduction Update*, **12**(4), 417–435.
- Oliva, R., & de Mateo, S. (2011)**- Medical implications of sperm nuclear quality. In *Epigenetics and Human Reproduction* (pp. 45–83). Springer.
- Oliva, R., & Dixon, G. H. (1991)**-Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. In *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **40**, (25–94).
- Oudet, P., Gross-Bellard, M., & Chambon, P. (1975)**-Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell*, **4**(4), 281–300.
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., & Van Steirteghem, A. C. (1992)**-Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *The Lancet*, **340**(8810), 17–18.
- Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M., & Bonner, W. M. (2000)**- A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology*, **10**(15), 886–895.
- Payne, J. F., Raburn, D. J., Couchman, G. M., Price, T. M., Jamison, M. G., & Walmer, D. K. (2005)**- Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques. *Fertility and Sterility*, **84**(2), 356–364.
- Pentikäinen, V., Erkkilä, K., & Dunkel, L. (1999)**-Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **276**(2), E310–E316.
- Pivot-Pajot, C., Caron, C., Govin, J., Vion, A., Rousseaux, S., & Khochbin, S. (2003)**-Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Molecular and Cellular Biology*, **23**(15), 5354–5365.

## Références Bibliographiques

---

- Plachot, M., & Crozet, N. (1992)**- Fertilization abnormalities in human in-vitro fertilization. *Human Reproduction*, **7** (1), 89–94.
- Poncelet, C., & Sifer, C. (2011)**-*Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain*. Springer Science & Business Media.
- Pons-Rejraji, H., Sion, B., Saez, F., Brugnon, F., Janny, L., & Grizard, G. (2009)**-Role of reactive oxygen species (ROS) on human spermatozoa and male infertility. *Gynecologie, Obstetrique & Fertilité*, **37**(6), 529–535.
- Print, C. G., & Loveland, K. L. (2000)**-Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays*, **22**(5), 423–430.
- Queralt, R., & Oliva, R. (1993)**- Identification of conserved potential regulatory sequences of the protamine-encoding P1 genes from ten different mammals. *Gene*, **133**(2), 197–204.
- Ramakrishnan, V. (1997)**-Histone H1 and chromatin higher-order structure. *Critical Reviews<sup>TM</sup> in Eukaryotic Gene Expression*, **7**(3).
- Rana, L., Bavishi H., & Bavishi, F.(2017)**- Correlation between number of mature eggs retrieved and live birth rate in IVF treatment. *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology* **6** (4):1625-1629.
- Ray-Gallet, D., Gerard, A., Polo, S., & Almouzni, G. (2005)**-Variations sur le thème du «code histone». *Médecine/Sciences*, **21**(4), 384–389.
- Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K., & Bonner, W. (2002)**- Histone H2a variants H2AX and H2AZ. *Current Opinion in Genetics & Development*, **12**(2), 162–169.
- Richburg, J. H. (2000)**-The relevance of spontaneous-and chemically-induced alterations in testicular germ cell apoptosis to toxicology. *Toxicology Letters*, **112**, 79–86.
- Richmond, T. J., & Davey, C. A. (2003)**-The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*, **423** (6936), 145.
- Rizk, B., Garcia-Velasco, J. A., Sallam, H. N., & Makrigrannakis, A. (2008)**-*Infertility and assisted reproduction*. Cambridge university press.

## Références Bibliographiques

---

- Robinson, P. J., & Rhodes, D. (2006)**- Structure of the “30 nm” chromatin fibre: a key role for the linker histone. *Current Opinion in Structural Biology*, **16**(3), 336–343.
- Roest, H. P., Van Klaveren, J., De Wit, J., Van Gurp, C. G., Koken, M. H. M., Vermey, M., Baarends, W. M. (1996)**- Inactivation of the HR6B ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme in mice causes male sterility associated with chromatin modification. *Cell*, **86** (5), 799–810.
- Rousseaux, S., Faure, A.-K., Caron, C., Lestrat, C., Govin, J., Hennebicq, S., Khochbin, S. (2004)**- Organisation nucléaire du spermatozoïde. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, **32**(9), 785–791.
- Rousseaux, Sophie, Caron, C., Govin, J., Lestrat, C., Faure, A.-K., & Khochbin, S. (2005)**- Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene*, **345**(2), 139–153.
- Sadeghi, M. R., Hodjat, M., Lakpour, N., Arefi, S., Amirjannati, N., Modarresi, T., Akhondi, M. M. (2009)**- Effects of sperm chromatin integrity on fertilization rate and embryo quality following intracytoplasmic sperm injection. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, **1**(3), 173.
- Sadek, A., Almohamdy, A. S. A., Zaki, A., Aref, M., Ibrahim, S. M., & Mostafa, T. (2011)**- Sperm chromatin condensation in infertile men with varicocele before and after surgical repair. *Fertility and Sterility*, **95**(5), 1705–1708.
- Sailer, B. L., Jost, L. K., Erickson, K. R., Tajiran, M. A., & Evenson, D. P. (1995)**- Effects of X-irradiation on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **25** (1), 23–30.
- Sakkas, D., & Alvarez, J. G. (2010)**- Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and Sterility*, **93**(4), 1027–1036.
- Sakkas, D., Mariethoz, E., Manicardi, G., Bizzaro, D., Bianchi, P. G., & Bianchi, U. (1999)**- Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Reviews of Reproduction*, **4** (1), 31–37.
- Sakkas, D., Seli, E., Bizzaro, D., Tarozzi, N., & Manicardi, G. C. (2003)**- Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reproductive Biomedicine Online*, **7**(4), 428–432.

## Références Bibliographiques

---

- Sakkas, D., Urner, F., Bianchi, P. G., Bizzaro, D., Wagner, I., Jaquenoud, N., Campana, A. (1996).** Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, **11**(4), 837–843.
- Salsabili, N., Mehrsai, A., Jalalizadeh, B., Pourmand, G., & Jalaie, S. (2009)-** Correlation of sperm nuclear chromatin condensation staining method with semen parameters and sperm functional tests in patients with spinal cord injury, varicocele, and idiopathic infertility. *Urology Journal*, **3**(1), 32–37.
- Samson, M., Jow, M. M., Wong, C. C., Fitzpatrick, C., Aslanian, A., Saucedo, I., Yates III, J. R. (2014)-** The specification and global reprogramming of histone epigenetic marks during gamete formation and early embryo development in *C. elegans*. *PLoS Genetics*, **10** (10), e1004588.
- Sasaki, H., & Matsui, Y. (2008)-**Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nature Reviews Genetics*, **9**(2), 129.
- Schlosser, J., Nakib, I., Carré-Pigeon, F., & Staerman, F. (2007)-** Infertilité masculine: définition et physiopathologie. In *Annales d'urologie* **41**, 127–133.
- Schlüter, G., Celik, A., Obata, R., Schlicker, M., Hofferbert, S., Schlung, A., Engel, W. (1996)-** Sequence analysis of the conserved protamine gene cluster shows that it contains a fourth expressed gene. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, **43**(1), 1–6.
- Schmid, T. E., Eskenazi, B., Baumgartner, A., Marchetti, F., Young, S., Weldon, R., Wyrobek, A. J. (2006)-**The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. *Human Reproduction*, **22**(1), 180–187.
- Schulte, R. T., Ohl, D. A., Sigman, M., & Smith, G. D. (2010)-** Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **27**(1), 3–12.
- Sedó, C. A., Bilinski, M., Lorenzi, D., Uriondo, H., Noblía, F., Longobucco, V., Nodar, F. (2017)-**Effect of sperm DNA fragmentation on embryo development: clinical and biological aspects. *JBRA Assisted Reproduction*, **21**(4), 343.7.
- Sepaniak, S., Forges, T., Fontaine, B., Gerard, H., Foliguet, B., Guillet-May, F., Monnier-Barbarino, P. (2008)-** Impact négatif du tabac sur la fertilité masculine : des spermatozoïdes à la descendance.

## Références Bibliographiques

---

- Sepaniak, Sandrine, Forges, T., Gerard, H., Foliguet, B., Bene, M.-C., & Monnier-Barbarino, P. (2006)**- The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation. *Toxicology*, **223**(1–2), 54–60.
- Sergerie, M., Ouhilal, S., Bissonnette, F., Brodeur, J., & Bleau, G. (2000)** - Lack of association between smoking and DNA fragmentation in the spermatozoa of normal men. *Human Reproduction*, **15**(6), 1314–1321.
- Sergerie, Martin, Mieusset, R., Croute, F., Daudin, M., & Bujan, L. (2007)**-High risk of temporary alteration of semen parameters after recent acute febrile illness. *Fertility and Sterility*, **88**(4), 970–e1.
- Sharma, R. K., Sabanegh, E., Mahfouz, R., Gupta, S., Thiyagarajan, A., & Agarwal, A. (2010)**-TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility. *Urology*, **76**(6), 1380–1386.
- Sheehan, M. M., Ramasamy, R., & Lamb, D. J. (2014)**-Molecular mechanisms involved in varicocele-associated infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **31**(5), 521–526.
- Shelley L. Berger. (2002)**- Histone modifications in transcriptional regulation. *Current Opinion in Genetics & Development*, **12**(2), 142–148.
- Shiio, Y., & Eisenman, R. N. (2003)**- Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100** (23), 13225–13230.
- Simon, Luke, Emery, B. R., & Carrell, D. T. (2017)**-Diagnosis and impact of sperm DNA alterations in assisted reproduction. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, **44**, 38–56.
- Simon, L., Murphy, K., Shamsi, M. B., Liu, L., Emery, B., Aston, K. I., Carrell, D. T. (2014)**- Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Human Reproduction*, **29**(11), 2402–2412.
- Simon, Luke, Castillo, J., Oliva, R., & Lewis, S. E. (2011)**- Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reproductive Biomedicine Online*, **23**(6), 724–734.
- Smith, M. M. (2002)**- Centromeres and variant histones: what, where, when and why? *Current Opinion in Cell Biology*, **14**(3), 279–285.

## Références Bibliographiques

---

- Sonnack, V., Failing, K., Bergmann, M., & Steger, K. (2002)**- Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis. *Andrologia*, **34**(6), 384–390.
- Sotolongo, B., Lino, E., & Ward, W. S. (2003)**- Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. *Biology of Reproduction*, **69**(6), 2029–2035.
- Steger, K., Klönisch, T., Gavenis, K., Drabent, B., Doenecke, D., & Bergmann, M. (1998)**- Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. *Molecular Human Reproduction*, **4**(10), 939–945.
- Steger, K., Pauls, K., Klönisch, T., Franke, F. E., & Bergmann, M. (2000)**- Expression of protamine-1 and-2 mRNA during human spermiogenesis. *Molecular Human Reproduction*, **6**(3), 219–225.
- Stephoe, P. C., & Edwards, R. G. (1978)**-Birth after reimplantation of a human embryo. *Lancet*, **2**(8085), 366.
- Storey, B. T. (1995)**-Interactions between gametes leading to fertilization: the sperm's eye view. *Reproduction, Fertility and Development*, **7**(4), 927–942.
- Strahl, B. D., & Allis, C. D. (2000)**- The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**(6765), 41.
- Subirana, J. A. (1990)**-Analysis of the charge distribution in the C-terminal region of histone H1 as related to its interaction with DNA. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, **29**(10–11), 1351–1357.
- Szczygiel, M. A., & Ward, W. S. (2002)**-Combination of dithiothreitol and detergent treatment of spermatozoa causes paternal chromosomal damage. *Biology of Reproduction*, **67**(5), 1532–1537.
- Tavalaee, M., Razavi, S., & Nasr-Esfahani, M. H. (2009)**-Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. *Fertility and Sterility*, **91**(4), 1119–1126.
- Terquem, A., & Dadoune, J. P. (1983)**- Aniline blue staining of human spermatozoon chromatin. Evaluation of nuclear maturation. In *The sperm cell* (pp. 249–252). Springer.

## Références Bibliographiques

---

- Thomas, J. O., & Oudet, P. (1979)**- Complexes of the arginine-rich histone tetramer (H3) 2 (H4) 2 with negatively supercoiled DNA: electron microscopy and chemical cross-linking. *Nucleic Acids Research*, **7**(3), 611–623.
- Thonneau, P., Marchand, S., Tallec, A., Ferial, M.-L., Ducot, B., Lansac, J., Spira, A. (1991)**- Incidence and main causes of infertility in a resident population (1 850 000) of three French regions (1988–1989)\*. *Human Reproduction*, **6**(6), 811–816.
- Tiepolo, L., & Zuffardi, O. (1976)**-Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Human Genetics*, **34** (2), 119–124.
- Toshimori, K. (2003)**- Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. *Microscopy Research and Technique*, **61**(1), 1–6.
- Travers, A., Perdrix, A., Legrand, F., Milazzo, J.-P., Rego, J.-L. D., Escalier, D., Rives, N. (2010)**-Les larges vacuoles des têtes spermatiques sont-elles associées à des altérations du noyau ou de l'acrosome du spermatozoïde ? *Basic and Clinical Andrology*, **20** (4), 247.
- Trojer, P., & Reinberg, D. (2007)**- Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Molecular Cell*, **28**(1), 1–13.
- Turner, B. M. (2002)**- Cellular memory and the histone code. *Cell*, **111**(3), 285–291.
- Van der Heijden, G. W., Derijck, A., Ramos, L., Giele, M., Van Der Vlag, J., & De Boer, P. (2006)**-Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Developmental Biology*, **298** (2), 458–469.
- Van Holde, K. E. (1989)**- Chromatin New York. NY: Springer Verlag Inc.
- Van Steirteghem, A. C., Liu, J., Joris, H., Nagy, Z., Janssenswillen, C., Tournaye, H., Devroey, P. (1993)**- Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Human Reproduction*, **8** (7), 1055–1060.

## Références Bibliographiques

---

- Venkatesh, S., Deccaraman, M., Kumar, R., Shamsi, M. B., & Dada, R. (2009)-Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in male infertility. *Indian Journal of Medical Research*, **129**(2).
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutellingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *Journal of Immunological Methods*, **184** (1), 39–51.
- Wallach, E. E., Hughes, E. G., & Brennan, B. G. (1996)- Does cigarette smoking impair natural or assisted fecundity? *Fertility and Sterility*, **66** (5), 679–689.
- Ward, W. S. (2010)-Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, **16** (1), 30–36.
- Wei, Y., Mizzen, C. A., Cook, R. G., Gorovsky, M. A., & Allis, C. D. (1998)- Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in Tetrahymena. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**(13), 7480–7484.
- Wennberg, A. L., Opdahl, S., Bergh, C., Henningsen, A.-K. A., Gissler, M., Romundstad, L. B., Wennerholm, U.-B. (2016)- Effect of maternal age on maternal and neonatal outcomes after assisted reproductive technology. *Fertility and Sterility*, **106**(5), 1142–1149.
- Wilson, E. E. (2005)- Assisted reproductive technologies and multiple gestations. *Clinics in Perinatology*, **32**(2), 315–328.
- Winkle, T., Rosenbusch, B., Gagsteiger, F., Paiss, T., & Zoller, N. (2009)- The correlation between male age, sperm quality and sperm DNA fragmentation in 320 men attending a fertility center. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **26**(1), 41–46.
- Wong, W. Y., Thomas, C. M., Merkus, H. M., Zielhuis, G. A., Doesburg, W. H., & Steegers-Theunissen, R. P. (2000)-Cigarette smoking and the risk of male factor subfertility: minor association between cotinine in seminal plasma and semen morphology. *Fertility and Sterility*, **74**(5), 930–935.
- Woodcock, C. L., Frado, L.-L., & Rattner, J. B. (1984)-The higher-order structure of chromatin: evidence for a helical ribbon arrangement. *The Journal of Cell Biology*, **99**(1), 42–52.

## Références Bibliographiques

---

- Wouters-Tyrou, D., Martinage, A., Chevaillier, P., & Sautiere, P. (1998)**- Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie*, **80**(2), 117–128.
- Yatsenko, A. N., & Turek, P. J. (2018)**- Reproductive genetics and the aging male. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 1–9.
- Yin, Y., DeWolf, W. C., & Morgentaler, A. (1998)**- Experimental Cryptorchidism Induces Testicular Germ Cell Apoptosis by p53-Dependent and -Independent Pathways In Mice. *Biology of Reproduction*, **58** (2), 492–496.
- Yoder, J. A., Soman, N. S., Verdine, G. L., & Bestor, T. H. (1997)**- DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. studies with a mechanism-based probe1. *Journal of Molecular Biology*, **270** (3), 385–395.
- Young, J. (2016)**-Infertilité masculine: mécanismes, causes et exploration. *Med Clin Endocrinol Diab*, **80**, 29–36.
- Yu, B., Qi, Y., Liu, D., Gao, X., Chen, H., Bai, C., & Huang, Z. (2014)**- Cigarette smoking is associated with abnormal histone-to-protamine transition in human sperm. *Fertility and Sterility*, **101**(1), 51–57.
- Zhang, L., Wang, J., Pan, Y., Jin, J., Sang, J., Huang, P., & Shao, G. (2014)**- Expression of histone H3 lysine 4 methylation and its demethylases in the developing mouse testis. *Cell and Tissue Research*, **358**(3), 875–883.
- Zhang, Y., & Reinberg, D. (2001)**-Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes & Development*, **15**(18), 2343–2360.
- Zhao, M., Shirley, C. R., Hayashi, S., Marcon, L., Mohapatra, B., Suganuma, R., Meistrich, M. L. (2004)**-Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development. *Genesis*, **38**(4), 200–213.
- Zini, A., San Gabriel, M., & Baazeem, A. (2009)**- Antioxidants and sperm DNA damage: a clinical perspective. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **26**(8), 427–432.
- Zini, A., Boman, J. M., Belzile, E., & Ciampi, A. (2008)**- Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*, **23**(12), 2663–2668.

## Références Bibliographiques

---

- Zini, A., & Libman, J. (2006)**- Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *Canadian Medical Association Journal*, *175*(5), 495–500.
- Zini, A., Fischer, M. A., Sharir, S., Shayegan, B., Phang, D., & Jarvi, K. (2002)**- Prevalence of abnormal sperm DNA denaturation in fertile and infertile men. *Urology*, *60*(6), 1069–1072.
- Zini, A., Bielecki, R., Phang, D., & Zenzes, M. T. (2001)**-Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertility and Sterility*, *75*(4), 674–677.

## Annexe I

Questionnaire

Identifiant du patient :

Date de ponction :

Homme

Femme

Nom : \_\_\_\_\_

Nom : \_\_\_\_\_

Prénom : \_\_\_\_\_

Prénom : \_\_\_\_\_

Age : \_\_\_\_\_

Age : \_\_\_\_\_

Fonction : \_\_\_\_\_

Fonction : \_\_\_\_\_

Wilayas : \_\_\_\_\_

Durée : Fécondité :Infertilité primaire Grossesse  Nombre  Durée  Date  Type Avortement  Nombre  Date  Type Naissance  Nombre  Date de Naissance  Type Rang Mariage : 1<sup>ier</sup> \_\_\_\_\_ 2<sup>ieme</sup> \_\_\_\_\_

Rang des tentatives de PMA \_\_\_\_\_

Antécédents urogénitaux :La cryptorchidie :  opéré  si oui quand ; \_\_\_\_\_ non Varicocèle :  opéré  si oui quand ; \_\_\_\_\_ non Tumeur des testicules :  autre cancerTraumatisme testiculaires :  si oui quand \_\_\_\_\_Infection :  type : \_\_\_\_\_

**Annexe I/bis**

**Antécédents cliniques :**

**Homme** : \_\_\_\_\_

**Femme** : \_\_\_\_\_

**Antécédents toxiques et habitudes de vie :**

**Tabac** : oui  non  Arrêt depuis \_\_\_\_\_

**Alcool** : oui  non  Arrêt depuis \_\_\_\_\_

**Bain chaud** : habitué  occasionnel  jamais

**Exposition à une haute fièvre pendant les 3 dernier mois**  quand \_\_\_\_\_

**Antécédents familiaux :**

Premier cercle \_\_\_\_\_ deuxième cercle \_\_\_\_\_

**Traitements**

**Antioxydant** : oui  type \_\_\_\_\_ depuis \_\_\_\_\_

Dosage \_\_\_\_\_, Autres traitements : \_\_\_\_\_

**Bilan biologiques**

-Spermogramme \_\_\_\_\_

-Spermocytogramme \_\_\_\_\_

-Autres analyses \_\_\_\_\_

## Annexe II

### Evaluation de la numération des spermatozoïdes :

Dans un tube à hémolyse, déposer :

- 10 µl de sperme.
- 190 µl millilitre de liquide de Ringer formolé à 1%.
- Agiter puis introduire par capillarité une goutte de l'échantillon préalablement préparé entre hémocytomètre (cellule de Malassez) et lamelle de 22\*22.
- Laisser reposer pendant 10 minutes.
- Lire au microscope à l'objectif 40 x.
- Etablir la numération spermatique.

### Evaluation de la vitalité des spermatozoïdes :

Dans un tube à hémolyse, déposer :

- une goutte calibrée de 10 µl de sperme.
- Ajouter 20 µl d'Eosine à 2%.
- Agiter et laisser reposer pendant 30 secondes.
- Rajouter 10 µl Nigrosine.
- Agiter.
- Réaliser un frottis.
- Laisser le frottis sécher à l'air libre.
- Lire 100 cellules au microscope à l'objectif 40 x.
- Différencier les spermatozoïdes vivants à tête incolore et les spermatozoïdes morts à tête colorée en rose.
- Etablir l'indice de vitalité.

## Annexe III

Normes du spermogramme selon OMS (2010)

| Paramètres                | Normes de l'OMS 2010                                                                   | Anomalie                                                                                                                                                                  |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Volume                    | $\geq 1.5$ ml-6 ml                                                                     | 0 ml= Aspermie<br><1.5 ml =Hypospermie<br>> 6 ml =Hyperspermie                                                                                                            |
| Viscosité                 | Normale                                                                                | Hypoviscosité<br>Hyperviscosité                                                                                                                                           |
| Aspect et couleur         | aspect homogène gris opalescent.                                                       | Jaunâtre<br>Hématique                                                                                                                                                     |
| pH                        | <7,2, et inférieur >7. 8                                                               | pH acide<br>pH alcalin                                                                                                                                                    |
| Mobilité                  | Mobilité progressive (a+b) $\geq 32\%$<br><br>Mobilité dans l'éjaculat est $\leq 40\%$ | <32% = Asthénospermie<br>0% = Akinétospermie                                                                                                                              |
| Numération                | 15 million/ml-150 million/ml                                                           | 0 millions/ ml = Azoospermie<br><1 millions/ml = Cryptospermie<br><5 millions/ ml= Oligospermie sévère<br><15 millions/ ml= Oligospermie<br>>150 million/ ml =Polyspermie |
| Cellules rondes Leucocyte | $\leq 1$ millions/ml                                                                   | >1 millions/ml = Leucospermie                                                                                                                                             |
| Vitalité                  | Nombre de spermatozoïdes vivant $\geq 58\%$                                            | < 58% Nécospermie                                                                                                                                                         |

## Annexe IV

**Kit : Spermac Stain Fertipro™ (FertiPro N.V, Beernen, Belgique)**  
**Réf: FP09 I21 R01 C.7**

### Définition

Spermac Stain est un kit de diagnostic utilisé pour la coloration des spermatozoïdes humains.

### Principe

Le Sermatic Stain permet d'analyser les différentes structures morphologiques des spermatozoïdes en se basant sur la méthode de coloration originale Romanowsky qui réalise une coloration différentielle de plusieurs structures cellulaires. Ce kit nous permet donc d'évaluer la morphologie spermatique en facilitant la distinction entre les différentes parties du spermatozoïde (tête, acrosome, pièce intermédiaire, flagelle), ce qui permet la discrimination entre un spermatozoïde normal et un spermatozoïde anormal.

### Composition

Solution de coloration A de couleur rouge flacon de 50ml -250 ml

Solution de coloration B de couleur vert clair flacon de 50ml -250 ml

Solution de coloration C de couleur vert foncé flacon de 50ml -250 ml

Solution de fixation flacon de 50ml -250 ml

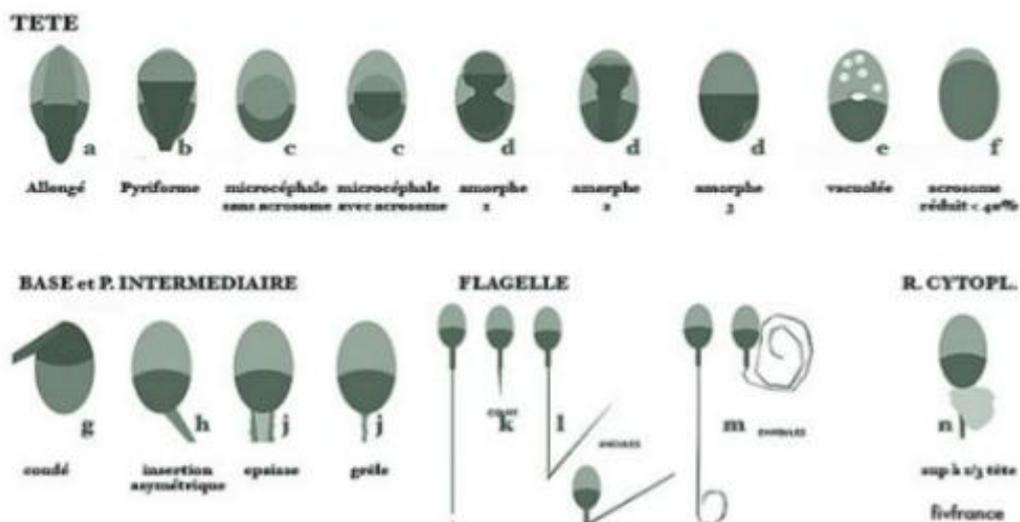
### Conservation

Les réactifs de Spermac Stain doivent être conservés dans les flacons fermés, à une température de 2-25 ° C. ces réactifs sont stables et peuvent rester jusqu'à 36 mois après la date de fabrication.

**Annexe IV/bis**

**Evaluation de la morphologie spermatique :**

- Déposer une goutte calibrée 10 µl de sperme au milieu de la lame.
- Réaliser un frottis
- Plonger la lame pendant 5 minutes dans le fixateur
- Immerger la lame dans une solution de coloration A qui colore la tête du spermatozoïde.
- Introduire la lame dans une solution de coloration B qui colore la pièce intermédiaire du spermatozoïde.
- Immerger la lame dans une solution de coloration C qui colore le flagelle du spermatozoïde.
- Laisser sécher à température ambiante.
- Lire 50 cellules sous microscope optique OLYMPUS au grossissement 1000 x sous huile d'immersion.
- Différencier les différentes anomalies morphologiques de la tête de la pièce intermédiaire et du flagelle du spermatozoïde
- Etablir l'indice de tératospermie.



**Classification des anomalies morphologique selon Kruger (OMS 2010).**

## Annexe V

**Kit : LeucoScreen Fertipro™ (FertiPro N.V, Beernen, Belgique)**  
**Réf: FP09 I05 R01 B.12**

### Définition

Leucoscreen est un kit histochimique semi-quantitatif pour la détermination de leucocytes positifs à la peroxydase dans le sperme

### Principe

La plupart des éjaculats humains contiennent des globules blancs, le type cellulaire prédominant étant des granulocytes positifs à la peroxydase. Une présence excessive de ces cellules (leucocyto-spermie) peut indiquer une infection de l'appareil reproducteur. La leucocytospermie peut aussi être associée à d'autres anomalies du sperme comme une diminution du volume de l'éjaculat, une oligospermie, une asthénospermie, pouvant aller jusqu'à une dégradation de la fonction spermatique due à un stress oxydatif et/ou à la sécrétion de cytokines cytotoxiques. Les granules des leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles contiennent de la peroxydase. La peroxydase catalyse le peroxyde d'hydrogène dans l'eau et des ions d'oxygène libres, qui à leur tour, oxydent la benzidine, qui prend une couleur marron et donne une couleur marron aux cellules positives à la peroxydase.

### Composition

Réactif 1 contenant 20 ml de colorant LeucoScreen (benzidine, cyanosine et méthanol).

Réactif 2 contenant 1 ml de peroxyde d'hydrogène à 3 %.

### Conservation

Le produit est stable après transport ou stockage à court terme à des températures élevées (jusqu'à 5 jours à  $\leq 37^{\circ}\text{C}$ ). Conserver les réactifs à  $2^{\circ}\text{C}$ - $25^{\circ}\text{C}$ .

**Annexe V/bis**

**Technique d'évaluation des cellules rondes**

- Ajouter 300 µl du réactif 1 (Benzidine, La Cyanosine et du méthanol), à 10 µl du réactif 2 (Peroxyde d'hydrogène à 3 %). La solution ainsi préparée, peut rester stable 24 heures si elle est conservée à +4 °C.
- Déposer une goutte de 10 µl de l'échantillon spermatique frais sur une lame
- Rajouter 10 µl de la solution de travail.
- Homogénéiser le tout soigneusement pendant une minute. Utiliser pour cela le bord d'une lamelle 22\*22, ou l'embout ayant servi pour le dépôt de l'échantillon.
- Couvrir le mélange avec une lamelle 22\*22, pendant cette dernière opération la formation de petites bulles d'air est normale, elles sont dues à la réaction catalysée par la peroxydase.
- Lire le résultat sous microscope optique Olympus à grossissement 400 x.
- Compter les cellules leucocytaires et germinales de chaque champ (examiner au moins 10 champs différents).

## Annexe VI

### Technique d'évaluation du taux de fragmentation de l'ADN spermatique

- Préparer à l'avance un gel d'agarose à 1%, en ajoutant un 1g de poudre d'agarose (Sigma Aldrich Saint-Louis, MO, États-Unis), dans 100 ml d'eau distillée.
- Faire fondre le mélange dans un bain- marie à 96 °C pendant 30 minutes.
- Conserver le gel dans des tubes eppendorfs contenant 50 µl ou 25 µl de solution d'agarose. Ces tubes seront utilisés en fonction de la concentration spermatique de l'échantillon.
- Garder le stock de tubes fermés dans un endroit sec et hors de la poussière.
- Fluidifier le tube eppendorf contenant le gel d'agarose à 1% en le plongeant dans un bain-marie à 90° C à 100° C, jusqu'à ce que le contenu du tube devient translucide, ensuite placer le tube dans une étuve sèche à 37 °C pendant 5 minutes pour équilibrer la température afin d'éviter de dégrader d'avantage l'ADN de l'échantillon spermatique étudié.
- Si la concentration spermatique après TMS est > 10 millions/ml diluer l'échantillon dans une solution de Phosphate Buffer Saline concentrer à 1x avec un pH de 7 afin d'obtenir une concentration spermatique de 5 à 10 millions/ml.
- Si la concentration est entre 5 millions/ml jusqu'à 10 millions/ml la dilution avec le PBS n'est pas nécessaire.
- Dans le cas d'une concentration spermatique après TMS < 5 millions/ml le tube contenant cet échantillon est centrifugé à 2500 pendant 10 minutes, éliminer le surnageant et garder le culot.
- Mélanger le sperme et l'agarose : le mélange du sperme avec l'agarose se fait selon la concentration de l'échantillon de sperme de départ.

### Annexe VI/bis 1

- Dans le cas d'une concentration spermatique est  $> 5$  millions/ml une quantité de 25  $\mu$ l de sperme après TMS est rajouté au tube d'ependorf contenant 50  $\mu$ l d'agarose liquéfié. Si la concentration spermatique  $< 5$  millions/ml, 25  $\mu$ l du culot de sperme après TMS est rajouté au tube d'ependorf contenant 25  $\mu$ l d'agarose liquéfié.

-Vortexer afin de bien homogénéiser le mélange.

-Déposer une goutte de 20  $\mu$ l du mélange sperme/agarose au milieu d'une lame (Superfrost Plus®, Menzel Gläser, Braunschweig Allemagne) et recouvrir délicatement avec une lamelle 22\*22 en évitant la formation des bulles d'air. Déposer deux à trois gouttes sur la totalité de lame si la concentration est inférieure à 1 millions. Laisser la lame pendant 5 min à température ambiante.

- Mettre par la suite cette lame sur une plaque métallique à  $+ 4^{\circ}\text{C}$  pendant 5 min. Enlever la lamelle de la lame délicatement par glissement en les disposant horizontalement dans un bac contenant de l'eau distillée, attendre pendant quelques minutes jusqu'à ce que la lamelle se détache de la lame.

-Déposer une solution de dénaturation composée de HCl 0.08 M ou appliquer une solution de dénaturation du Kit (Halosperm<sup>®</sup>, Halotech DNA, Madrid, Espagne) (40  $\mu$ l de cette solution de dénaturation + 5 ml d'eau distillée). Le dépôt se fait goutte à goutte à l'aide d'une pipette pasteur. Laisser agir la solution à l'abri de la lumière pendant 7 min et faire égoutter la lame en l'inclinant

-Appliquer la solution de lyse contenant du Dithiothreitol + Triton X-100 (Kit Halosperm<sup>®</sup> Halotech DNA, Madrid, Espagne) goutte à goutte à l'aide d'une pipette pasteur et laisser agir pendant 20 minutes sous une hôte.

---

**Annexe VI/bis 2**

-Rincer la lame on l'incubant dans de l'eau distillée durant 5 minutes puis l'égoutter en l'inclinant.

-Déshydrater la lame successivement dans des bains d'alcool de 70% 90% 100% pendant 2 minutes pour chaque bain d'alcool et faire égoutter la lame en l'inclinant. Laisser sécher à l'air libre.

-Placer la lame horizontalement dans une boîte de pétri. Appliquer une première solution de coloration d'éosine 5g/l. Laisser agir pendant 7 minutes sous une hôte et égoutter la lame en l'inclinant.

-Apposer une deuxième solution de coloration Bleu d'Azur 5g /l. Laisser agir pendant 7 minutes sous une hôte. Egoutter et laisser sécher à température ambiante.

-Observer sous microscope à contraste de phase Olympus sous objectif 100 x. Lecture de 500 -300 cellules voir 100 si la concentration du sperme est trop faible

-Établir l'indice de fragmentation le DFI (DNA Fragmentation Index) en application la formule suivante :

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

Selon les recommandations de Fernandez *et al.*, 2003, un seuil de DFI est ainsi établi :

**DFI ≤ 30%** = ADN spermatique non Fragmenté

**DFI > 30%** = ADN spermatique fragmenté.

## **Annexe VII**

### **Technique d'évaluation du taux de condensation de la chromatine spermatique**

#### **Confection des frottis et fixation des lames :**

- Déposer 20 µl de sperme après le Test de Migration et Survie sur une lame.
- Etaler la goutte sur la lame et réaliser un frottis.
- Immerger la lame dans des bains d'alcool froid, croissant de 70% 90% 100% pendant 2 min pour chaque bain.
- Plonger les lames dans une solution de formaldéhyde à 4 % pendant 5 min.
- Rincer au Phosphate Buffer Saline concentrer à 1x et d'un pH qui égal à 7 pendant 5 min.
- Effectuer des passages dans 3 bains d'alcool croissant de 70% 90% 100% pendant une 1 min pour chaque bain.
- Laisser sécher à température ambiante.
- Les frottis ainsi préparés peuvent être conservés en vue d'un traitement et une coloration plus tard, à condition de les placer à l'abri de la poussière de l'humidité et de la lumière.

#### **Traitement et coloration des lames :**

La coloration du frottis est réalisée par immersion pendant 5 min dans solution de bleu d'aniline acétifié à 5% diluée dans une solution d'acide acétique à 4% et dans de l'eau distillée, le pH de cette solution est situé entre 2.5-3. Cette opération peut se faire dans un borel afin de traiter plusieurs lames à la fois.

- Rincer à l'eau courante pendant 5 min.
- Effectuer 3 passages dans 3 bacs d'eau distillée pendant 30 secondes pour chaque bain.
- Immerger pendant l'échantillon dans bain d'alcool croissant de 70°, 96°, 100° pendant 1 min pour chaque bain.

---

**Annexe VII/bis**

- Effectuer 2 passages dans 2 bacs de Methylcyclohexane pendant 60 secondes pour chaque bain.

-Laisser sécher à température ambiante.

- Réaliser un montage entre lame et lamelle.

La lecture du résultat est réalisée sous microscope à contraste de phase grossissement 1000 x avec de l'huile à immersion. 200 spermatozoïdes sont comptés pour chaque individu, avec distinction et différenciation des deux types de spermatozoïdes ceux à chromatine condensée mature coloré en bleu foncé de ceux avec chromatine non condensé immature coloré en bleu pâle voir incolore.

-L'indice de décondensation de la chromatine spermatique SDI (Sperm Decondensation Index) est établie par la formule suivante :

$$SDI = \frac{\text{Le nombre de spermatozoïdes à chromatine décondensée}}{\text{Le nombre total de spermatozoïdes lus}} \times 100$$

- le seuil du SDI appliqué est rapporté par Hammadeh *et al.*, 1998 si :

Le **SDI** <20% la chromatine spermatique est considéré comme normalement condensé.

Le **SDI** ≥ 20% la chromatine spermatique est considéré comme décondensé.

## **Annexe VIII**

### **Ferticult™ Flushing medium (FertiPro N.V, Beernen, Belgique)**

**Réf : FP09 I08 R01 C.4**

#### **Définition**

Ferticult™ Flushing est un milieu de culture cellulaire destiné au lavage d'ovules, de spermatozoïdes.

#### **Principe**

Le FertiCult Flushing medium est une préparation utilisée pour le lavage d'ovules, de spermatozoïdes et d'embryons. Le FertiCult Flushing medium peut également être utilisé pour des techniques de migration ascendante de spermatozoïdes humains, d'injection spermatique dans les ovocytes au cours de l'ICSI, l'insémination de spermatozoïdes lavés dans l'utérus (IIU) et au cours de transfert d'embryonnaire. Le milieu est complet et ne nécessite aucun additif. Ce milieu contient de l'HEPES, Le FertiCult Flushing medium ne contient pas d'héparine. Pour le recueil ovocytaire, utiliser du FertiCult Aspiration Medium. Comme pour tous les milieux de FIV, le FertiCult Flushing medium nécessite une pré- incubation de 12 heures avant son utilisation.

#### **Composition**

Le FertiCult Flushing medium est un milieu tamponné à l'HEPES prêt à l'emploi qui contient également du bicarbonate, des sels physiologiques, du glucose, du lactate et de l'albumine sérique humaine. Du sulfate de gentamicine peut être ajouté sur demande

.

### Annexe IX

**Ferticult™ IVF medium (FertiPro N.V, Beernen, Belgique)**

**Réf: FP09 I07 R01 FR B.5**

#### **Définition**

Ferticult™ IVF medium est un milieu de culture cellulaire utilisé pour la culture *in vitro* d'embryons humains, pendant les premiers 48 heures de culture

#### **Principe**

Le milieu FertiCult IVF est un produit prêt à l'emploi pour la culture *in vitro* d'embryons de mammifères. Le milieu a été conçu pour une culture de courte durée uniquement (jusqu'à 48 heures en culture). Le milieu est complet et ne nécessite pas d'additifs. Si l'on préfère, du sérum du patient 10 % v/v peut être additionné.

Le milieu de culture IVF convient pour les microgouttelettes recouvertes d'huile et se prête également à la culture dans des boîtes pour culture d'organes Falcon 3037 ainsi que les boîtes de culture 4 puits de type Nunc. Comme pour tous les milieux de FIV, le milieu FertiCult IVF doit être pré incubé sous 5-6 % CO<sub>2</sub> pendant 24 heures avant emploi.

#### **Composition**

Le milieu FertiCult IVF est disponible avec du rouge de phénol seul ou avec de la gentamicine

#### **Conservation**

Il est stable après transport (maximum 5 jours) à température élevée ( $\leq 37^{\circ}\text{C}$ ). Il peut être conservé entre 2-25°C, par contre après ouverture, il est préférable de le conserver entre 2-8°C. Le produit contenant de la gentamicine: il est conservé entre 2-8°C. Le produit : milieu FertiCult IVF il ne faut pas le congeler avant son utilisation, il faut le tenir à l'abri de la lumière. Après ouverture du contenu, le produit n'est plus utilisable après 7 jours.

## Annexe X

### Hyaluronidase FertiCult™ Flushing medium (FertiPro N.V, Beernen, Belgique)

Réf: FP09 I16 R01 D.3

#### Définition :

L'Hyaluronidase est un milieu de culture destiné aux procédures d'assistante médicales à la procréation, l'Hyaluronidase de FertiCult™ Flushing medium est utilisée dans le processus de dénudation des ovocytes. La hyaluronidase digère l'acide hyaluronique entre les cellules du cumulus, facilitant ainsi le retrait mécanique du cumulus.

#### Méthode :

Réchauffer la Hyaluronidase in FertiCult™ Flushing medium à une température de 37 °C. Préparer une boîte contenant 1 goutte de Hyaluronidase in FertiCult™ Flushing medium et 3-5 gouttes (100 µL) du FertiCult™ Flushing medium destiné au lavage des ovocytes (le tout sous huile de paraffine légère, par exemple FertiCult™ Mineral Oil ). Placer les ovocytes dans la Hyaluronidase in FertiCult™ Flushing medium (jusqu'à 5 ovocytes au maximum) pendant environ 30 secondes. À l'aide d'une pipette en verre très fine, transférer les ovocytes partiellement dénudés dans la première gouttelette de lavage. Retirer la corona en pipettant les ovocytes. Utiliser les autres gouttelettes pour un lavage supplémentaire des ovocytes dénudés.

#### Composition :

Hyaluronidase de FertiCult™ Flushing medium contient 80 UI/ml de hyaluronidase de qualité pharmaceutique d'origine bovine dans FertiCult™ Flushing medium (milieu tamponné à l'HEPES contenant 4,00 g/l de sérum-albumine humaine).

HYA001 : 1 ml Hyaluronidase in FertiCult™ Flushing medium

HYA010 : 10 ml Hyaluronidase in FertiCult™ Flushing medium

#### Conservation:

Ce produit se conserve entre 2-8 °C. Ne pas congeler avant utilisation. Tenir à l'abri de la lumière. Les produits peuvent être utilisés en toute sécurité jusqu'à 7 jours après ouverture si les conditions de stérilité sont respectées et si les produits sont conservés entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption. Stable après transport , (maximum 5 jours) à température élevée ( $\leq 37^{\circ}\text{C}$ ).

---

## Annexe XI

### PureSperm® KIT (PureSperm, Nidacon, Gutenberg, Suède)

#### Définition

Le PureSperm est une solution saline isotonique pour la préparation de gradients de densité utilisé généralement pour la séparation du sperme

#### Méthode

Ajouter 2 ml de PureSperm® Buffer à 8 ml de Pure-Sperm®100 % de façon à obtenir 10 ml de PureSperm® à 80 %. Ajouter 6 ml de PureSperm® Buffer à 4 ml de Pure-Sperm®100% de façon à obtenir 10 ml de PureSperm® à 40%. À l'aide d'une pipette à pointe stérile, ajouter 2 ml de PureSperm® à 80 % dans un tube à centrifuger conique. Utiliser une autre pipette stérile pour disposer avec précaution 2 ml de PureSperm® à 40 % en couche sur le PureSperm® à 80 %. À l'aide d'une pipette Pasteur stérile, disposer soigneusement du sperme liquéfié (jusqu'à 1,5 ml) en couche sur le PureSperm®. Centrifuger à 300 x g pendant 20 minutes. Ne pas utiliser le frein. Calculer la vitesse de rotation correcte pour votre centrifugeuse. Utiliser une nouvelle pipette Pasteur stérile et aspirer, dans un mouvement circulaire en surface, tout sauf la granule et 4 à 6 mm de PureSperm® à 80 %. Si aucune granule n'est observée après centrifugation, retirer tout le liquide sauf les derniers 0,5 ml. Utiliser une nouvelle pipette Pasteur pour aspirer la granule (ou les derniers 0,5 ml de liquide). Transférer la granule de sperme dans un nouveau tube et remettre la granule en suspension dans 5 ml de PureSperm®Wash. Centrifuger à 500 x g pendant 10 minutes. Ne pas utiliser le frein. Aspirer le surnageant PureSperm®Wash en laissant le minimum de liquide possible au-dessus de la granule. Si aucune granule n'est visible, laisser les derniers 0,25 ml de liquide. Remettre la granule de sperme en suspension dans un volume adéquat de milieu de culture pour obtenir la concentration de sperme requise. L'échantillon de sperme est désormais prêt pour analyse ou utilisation.

#### Composition

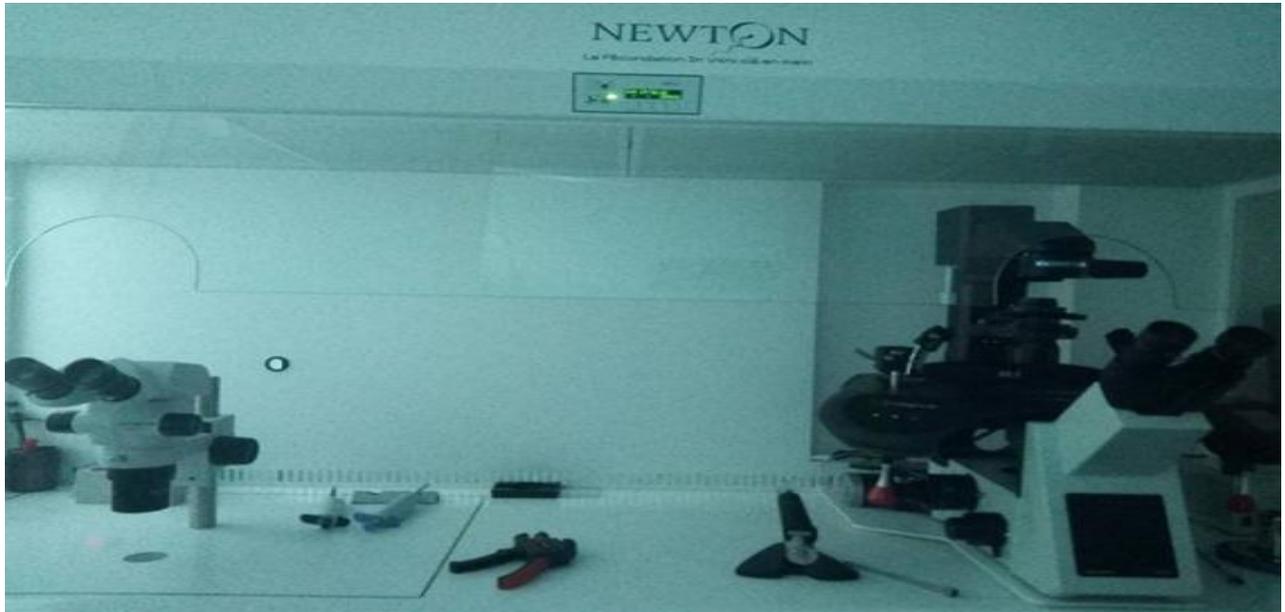
Silice avec revêtement de silane .Chlorure de Sodium .Chlorure de Potassium

Chlorure de Calcium .L'eau purifiée .HEPES. EDTA .Glucose .

#### Conservation

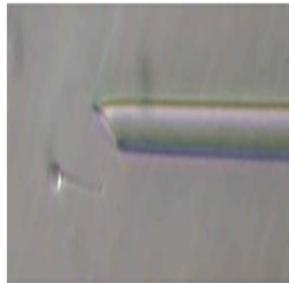
Conserver les flacons fermés entre 2 et 40 °C. Dans ces conditions, PureSperm®100 a une durée de conservation de 24 mois. La date d'expiration est indiquée sur les flacons et les cartons. Ouvrir et fermer les flacons dans des conditions d'asepsie. Après ouverture, conserver entre 2 et 8 °C les flacons non utilisés. La durée de conservation sur l'étiquette est valable lorsque le produit est conservé conformément aux recommandations du fabricant.

**Annexe XII**



**Station de micro- injection**

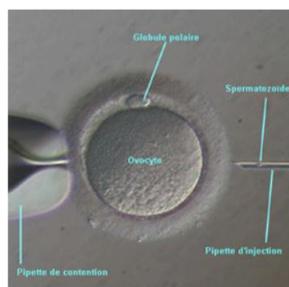
• étape :1



• étape :2



• étape :3



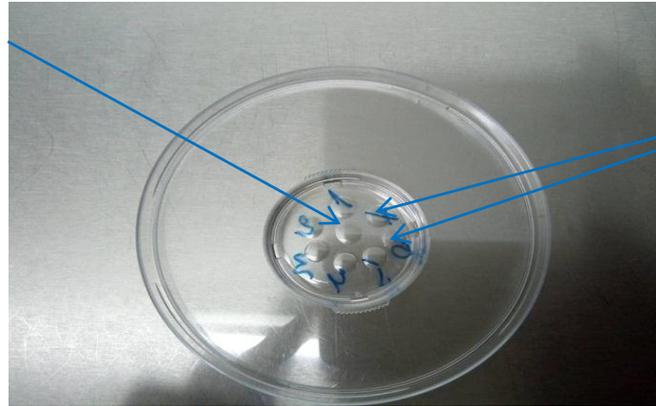
• étape: 4



**Les étapes de la micro-injection intra cytoplasmique**

**Annexe XII**

**PVP + Spermatozoïde**

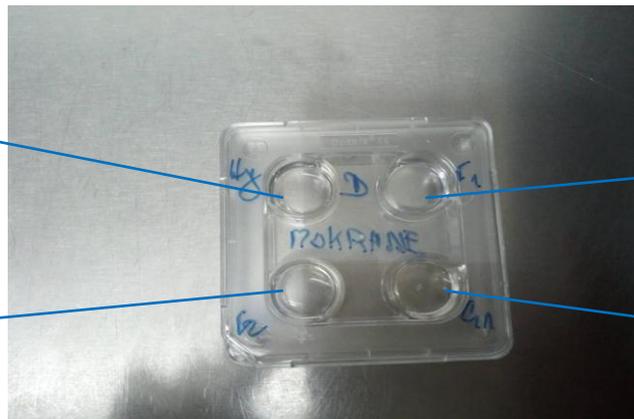


**Ovocytes**

**Boite pour la micro- injection intra cytoplasmique**

**Puis numéro 2**

**la hyaluronidase  
Ferticult™  
Flushing medium**



**Puis numéro 1**

**Ferticult™  
IVF medium**

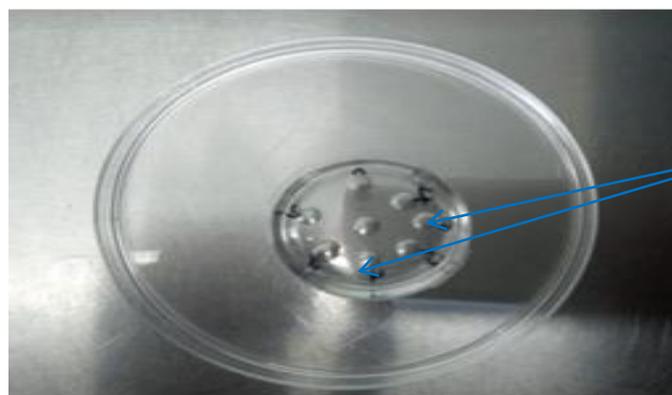
**Puis numéro 3**

**Life Global  
medium**

**Puis numéro 4**

**Life Global  
medium**

**Boite pour le traitement des ovocytes**



**Embryons**

**Annexe XIII**

**Polyvinylpyrrolidone à 10 % (10 % PVP in FertiCult™ Flushing Medium,  
FertiPro N.V, Beernen, Belgique)**

**Réf: FP09 I17 R01 D.2**

**Définition**

Le Polyvinylpyrrolidone à 10 % est un milieu visqueux destiné à réduire la motilité des spermatozoïdes.

**Principe**

L'injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI) requiert la capture de spermatozoïdes individuels dans une pipette en verre en vue de leur injection dans l'ovocyte. Cette procédure est facilitée en immobilisant d'abord le spermatozoïde. La méthode d'immobilisation de spermatozoïde la plus répandue consiste à le placer dans un milieu visqueux avant de lui comprimer la queue avec le bout de la micropipette pour l'immobiliser complètement. PVP 10 % dans FertiCult™ Flushing medium est un milieu visqueux prêt à l'emploi qui peut être utilisé pour les procédures ICSI.

**Composition**

Polyvinylpyrrolidone (PVP) Concentré à 10% dans FertiCult™ Flushing medium est une solution contenant des sels physiologiques, de l'HEPES, du lactate, du pyruvate, du glucose et une solution d'albumine humaine.

PVP1 1 x 1 ml de PVP 10 % dans FertiCult™ Flushing medium

PVP2 5 x 0,2 ml de PVP 10 % dans FertiCult™ Flushing medium

## Annexe XIV

### Life Global medium , Canada

#### Définition

le life global® est utilisé lors de la fertilisation et la culture des ovocytes et pour la culture embryonnaire.

#### Composition

|                     |                     |                          |
|---------------------|---------------------|--------------------------|
| Sodium Chloride     | Potassium Chloride  | Calcium Chloride         |
| Potassium Phosphate | Magnesium Sulfate   | Sodium Bicarbonate       |
| Glucose             | Sodium Lactate      | Sodium Pyruvate          |
| Amino Acids         | EDTA                | Phenol Red               |
| Gentamicin          | Human Serum Albumin | Human a- and b-globulins |

#### Conservation:

Ce produit, il ne peut être conservé plus de 8 semaines à compter de la date de son ouverture, il est stocké à 2-8 ° C à l'abri de la lumière. Pour de meilleurs résultats, utilisez dans les quatre semaines global® total® qui est un notre milieu de global® complété par un supplément de protéiné LifeGlobal (5 mg de protéine / ml).

### Annexe XV

#### Ferticult™ Mineral Oil (FertiPro N.V, Beernen, Belgique)

Réf : FP09 I20 R01 A.15

#### Définition

Ferticult™ Mineral Oil est une huile minérale légère destinée à être utilisée dans les procédures de FIV, d'ICSI et autres procédures d'AMP apparentées.

#### Principe

Un milieu de culture superposé d'huile a été utilisé pour la première fois au début des années 60 pour la culture d'embryons de mammifères. L'huile permet d'utiliser de faibles quantités de milieu de culture pour la fécondation et la culture embryonnaire. L'utilisation de l'huile prévient l'évaporation du milieu, réduisant ainsi les effets nocifs d'une osmolarité accrue. Par ailleurs, l'application d'une superposition d'huile réduit les fluctuations de température et les changements de pH provoqués par la perte de CO<sup>2</sup> au niveau du milieu de culture lors du retrait des boîtes de culture de l'incubateur en vue d'une micromanipulation ou d'un examen embryonnaire. Enfin, la culture d'embryons multiples dans de faibles quantités de milieu de culture sous une superposition d'huile favorise la concentration des facteurs de croissance autocrine sécrétés par les embryons en développement, ce qui résulte dans un taux plus élevé de développement embryonnaire.

#### Composition

FertiCult Mineral Oil est une huile minérale légère (d=0,83- 0,86 g/ml) prélavée, prête à l'emploi, destinée à être utilisée dans les procédures d'AMP

MINOIL050 1x 50ml FertiCult Mineral Oil

MINOIL100 1x 100ml FertiCult Mineral Oil

MINOIL500 1x 500ml FertiCult Mineral Oil

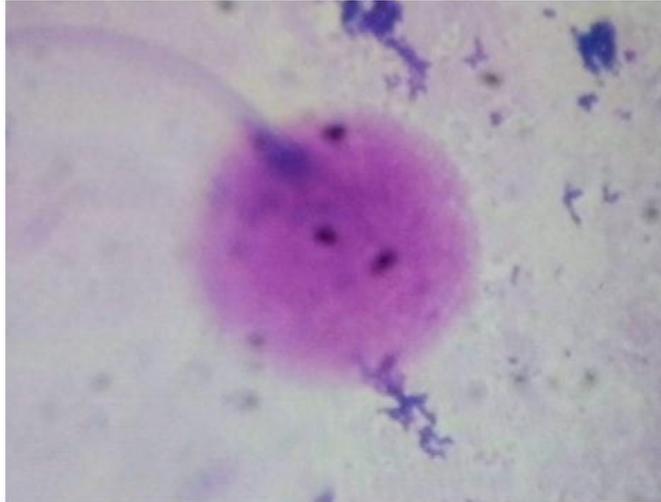
#### Conservation

Conserver FertiCult Mineral Oil est conservé à une température situé entre 15 à 25°C. Le produit supporte une exposition accidentelle à des températures élevées pendant le transport (≤ 37°C). Ne pas congeler avant utilisation. Garder le produit dans son emballage original ou ne pas exposer le produit à la lumière lorsqu'il n'est pas utilisé. Ne pas exposer le produit aux sources d'irradiation. Le produit peut être utilisé en toute sécurité jusqu'à au moins 28 jours après ouverture du contenant si les conditions de stérilité sont respectées et si les produits sont conservés à température ambiante.

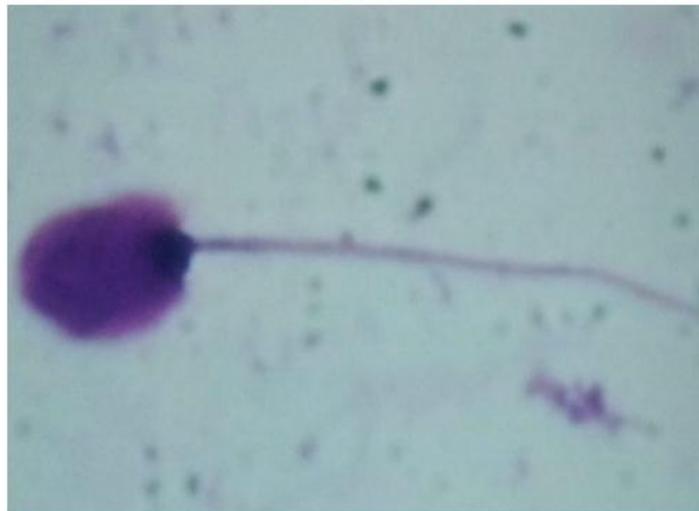
---

**Annexe XVI****Critère de classement des embryons selon Fragouli *et al* (2014)**

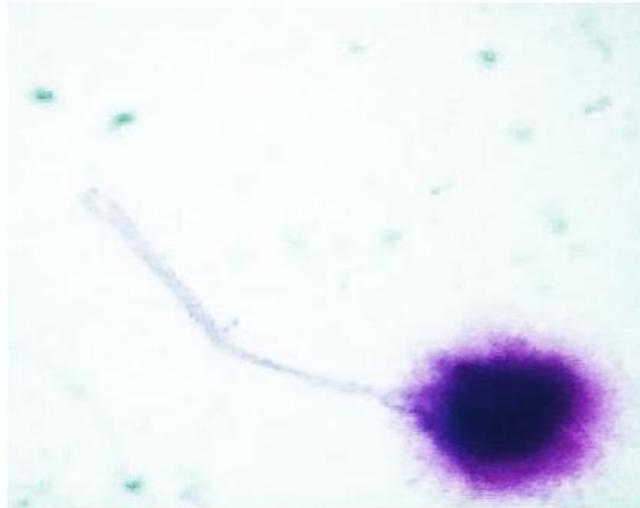
| <b>Grade de l'embryon</b> | <b>Critère de classement</b>                                         |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| Grade A                   | Embryon avec 4 cellules régulières sans fragmentation cellulaire.    |
| Grade B                   | Embryon avec moins de 20% de fragmentations cellulaires.             |
| Grade C                   | Embryon avec une fragmentation cellulaire comprise entre 20% et 50%. |
| Grade D                   | Embryons avec plus de 50% de fragmentation cellulaire.               |



Spermatozoïde à grande pelote d'ADN non fragmenté observé sous microscope à contraste de phase au grossissement 400 X



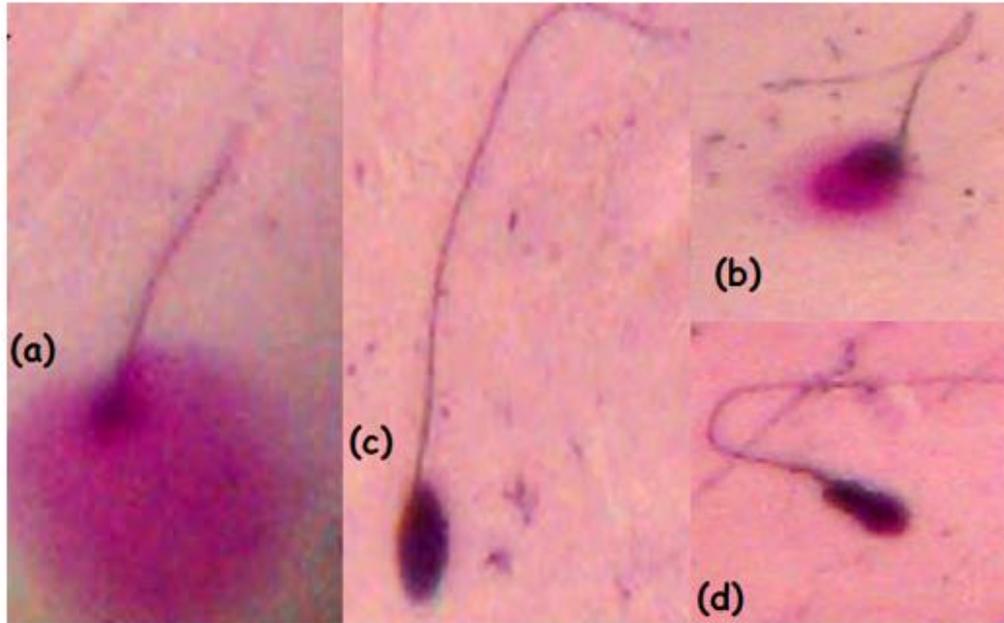
Spermatozoïde à moyenne pelote d'ADN non fragmenté observé sous microscope à contraste de phase au grossissement 400 X



**Spermatozoïde à petite pelote d'ADN fragmenté observé sous microscope à contraste de phase au grossissement 400 X**



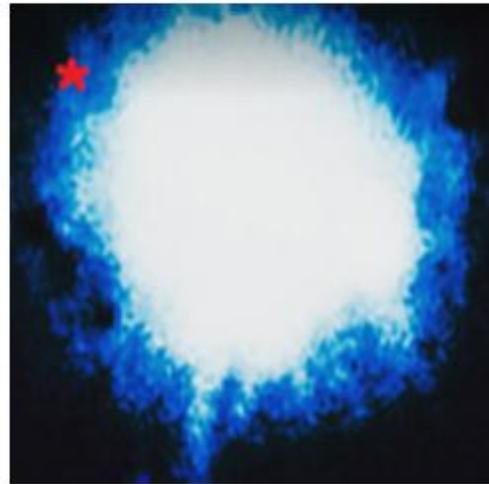
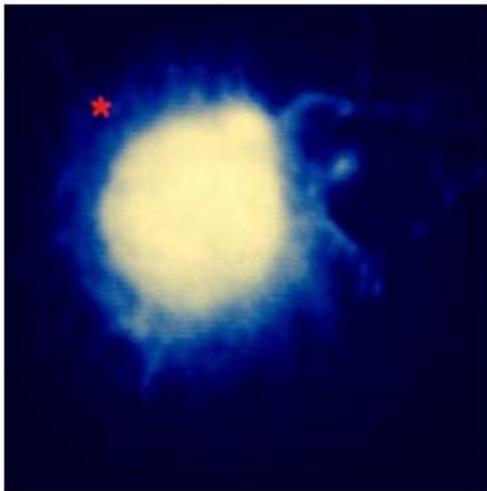
**Spermatozoïde sans pelote d'ADN fragmenté observé sous microscope à contraste de phase au grossissement 400 X**



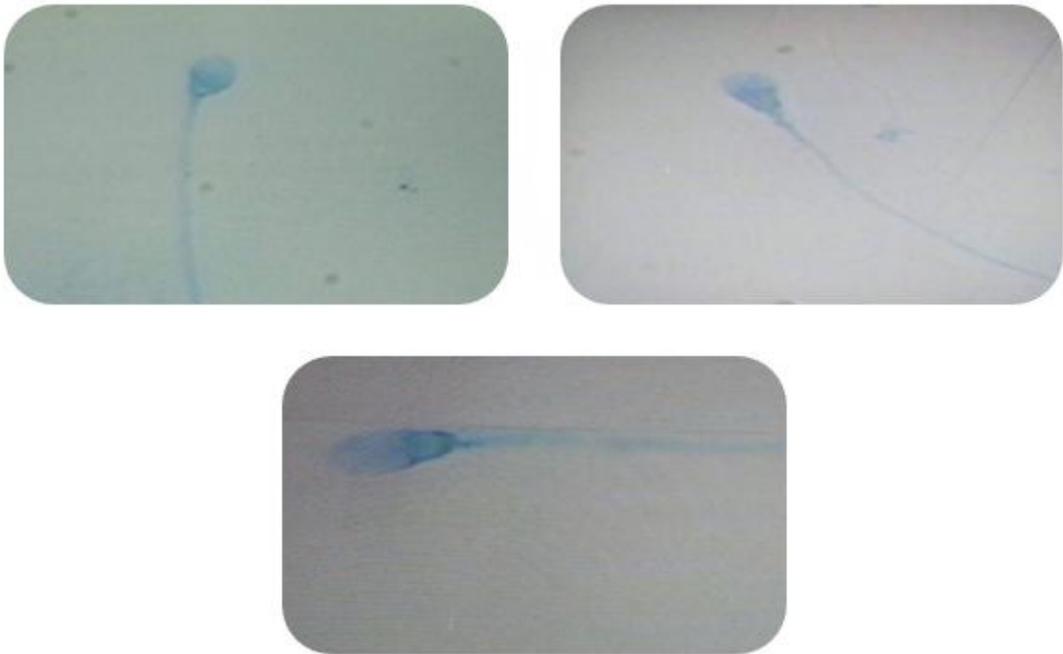
Cellules spermatiques observées sous microscope à contraste de phase au grossissement 400 X

(a) et (b) cellule spermatique à ADN non dégradé

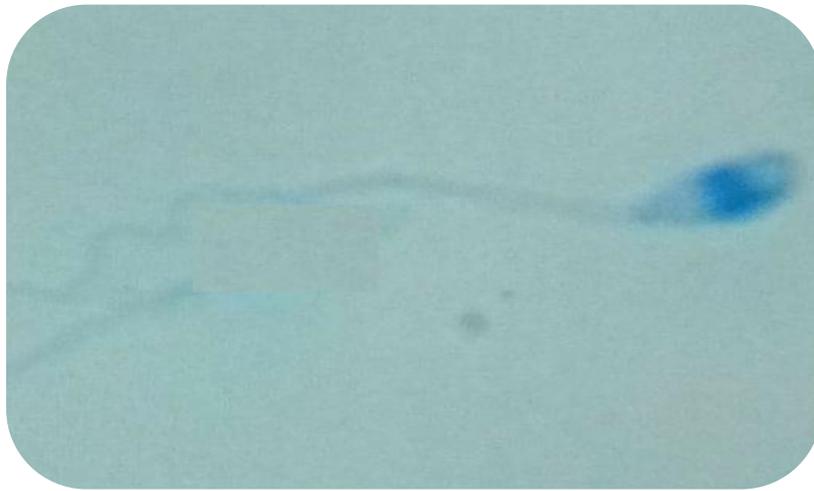
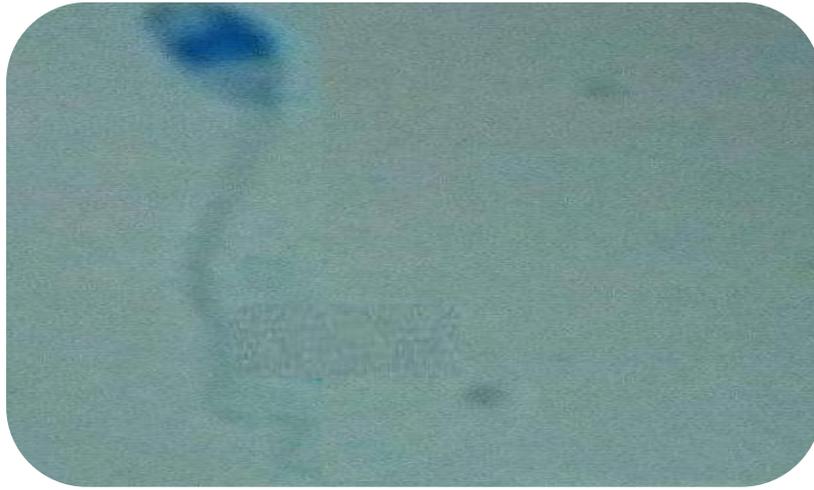
(c) et (d) cellule spermatique à ADN dégradé



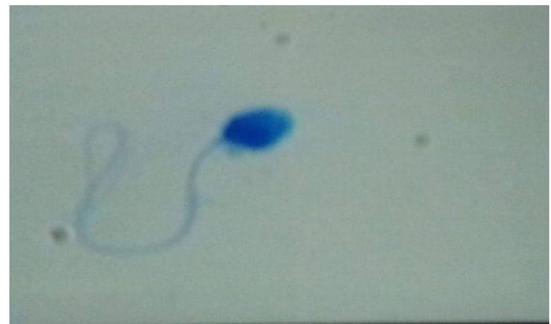
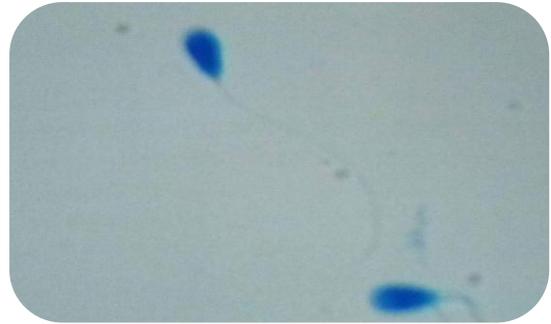
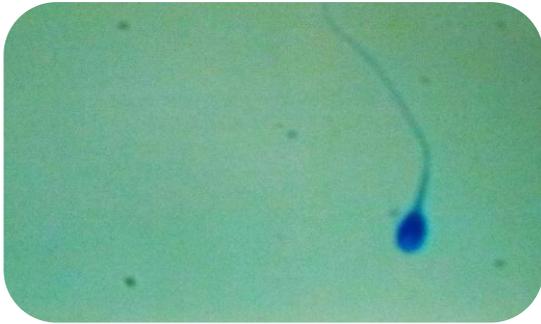
(\*) Pelote d'ADN de cellules spermatiques observées sous microscope à fluorescence au grossissement 1000 X



Spermatozoïdes à chromatine condensée observés sous microscope à contraste de phase au grossissement 1000 X



**Spermatozoïdes à chromatine partiellement décondensée observés sous microscope à contraste de phase au grossissement 1000 X**



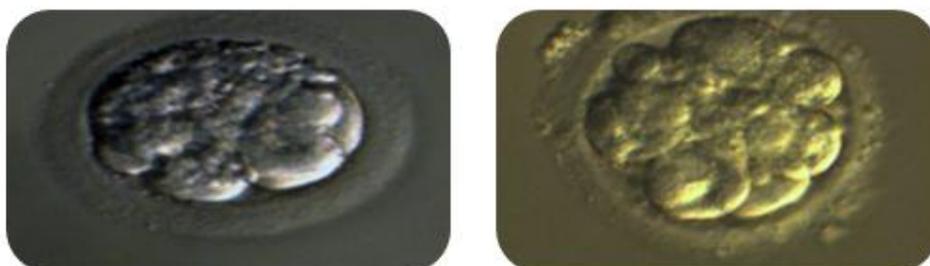
**Spermatozoïdes à chromatine totalement décondensée observés sous microscope à contraste de phase au grossissement 1000 X**



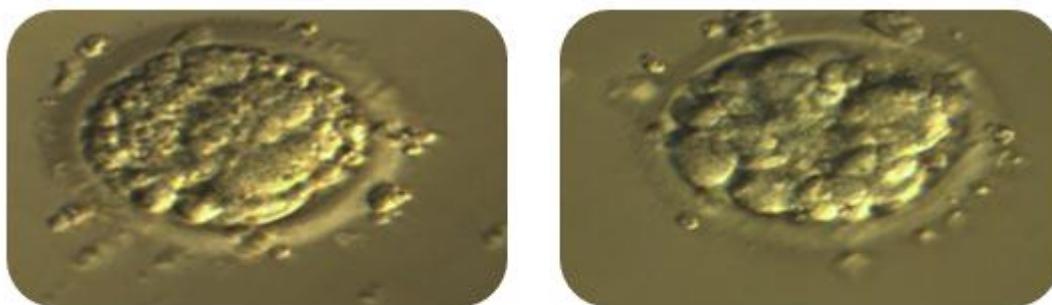
**Modèle d'embryons de Grade A**



**Modèle d'embryons de Grade B**



**Modèle d'embryons de Grade C**



**Modèle d'embryons de Grade D**



*Publication*

## Effect of Spermatic Nuclear Quality on Live Birth Rates in Intracytoplasmic Sperm Injection

Maroua Hachemi<sup>1,2</sup>, Mustapha Bensaada<sup>2,3</sup>, Abdelkader Rouabah<sup>1</sup>, Abdelali Zoghmar<sup>2</sup>, Sebti Benbouhedja<sup>2</sup>, Leila Rouabah<sup>1</sup>, Mehdi Benchaib<sup>4,5,6</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Nature and Life Sciences, Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Frères Mentouri University Constantine I, <sup>2</sup>Reproduction Sciences and Surgery Clinique, Ibn Rochd, Constantine, <sup>3</sup>Faculty of Nature and Life Sciences, Abbès Laghrour University, Khenchela, Algeria, <sup>4</sup>Hospices Civils de Lyon, HFME, Reproduction Biology Center, 59 Boulevard Pinel 69500 Bron, <sup>5</sup>Inserm U1208, 18 Avenue Doyen Lépine, 69675 Bron Cedex, <sup>6</sup>Claude Bernard University, Lyon Est Faculty of Medicine, 8 Avenue Rockefeller, 69008, Lyon, France

### ABSTRACT

**Background:** Our study defines the clinical role of sperm DNA damage in the assisted reproductive technology procedure. **Aim:** To investigate if the compaction of chromatin explored added to the analysis of the sperm DNA fragmentation allows obtaining a new indicator for sperm genome quality linked to live birth rate (LBR). **Design:** This was a prospective study, undergoing 101 cycles in the intracytoplasmic sperm injection (ICSI) program. **Materials and Methods:** The sperm DNA fragmentation index (DFI) has been measured with sperm chromatin dispersion examination. The sperm decondensation index (SDI) of chromatin has been measured with aniline blue procedure; with these indexes, a new parameter has been created:  $DFI \times SDI$ . **Statistical Analysis:** Pearson's correlation coefficient, Student's *t*-test, and Chi-square test were used. The quantitative variables were described as mean  $\pm$  standard deviation. Multivariate logistic regressions were performed with live birth as outcome. **Results:** The sperm concentration, motility, and normal morphology were lower when the DFI was high ( $P = 0.001$ ). The fertilization rates and the number of obtained embryos were not statistically significant different according to the DFI groups. The SDI does not appear to be linked either with the spermatic parameters or with the ICSI parameters. A low DFI seems to be a beneficial factor to obtain a live birth in ICSI procedure ( $P = 0.064$ ). In case of high DFI, a high SDI allows to obtain a higher LBR than a low SDI. **Conclusion:** The DFI is a good prognostic for a delivery rate in ICSI procedure, and the SDI could be added to DFI to create a new parameter of sperm nuclear quality. This new parameter seems to be linked to LBR.

**KEYWORDS:** Intracytoplasmic sperm injection, live birth rate, sperm chromatin condensation, sperm DNA fragmentation

### INTRODUCTION

The genome abnormalities are considered detrimental successful for the assisted reproductive technology (ART) procedure.<sup>[1]</sup> The intracytoplasmic sperm injection (ICSI) technique is an alternative to the problem of infertility, but the chance of live birth rate (LBR) is only about 25%.<sup>[2]</sup> Some of which may be related to the poor quality of the sperm genome.<sup>[3,4]</sup> For this reason, the analysis of the sperm genome before ART remains of paramount importance. Miscellaneous published studies indicate that the alteration of

the spermatic genome leads to ART failures and demonstrate that the spermatozoa of infertile men have a much more altered sperm DNA than those of fertile men.<sup>[5-7]</sup> The sperm DNA plays a significant role in early embryogenesis development, subsequently, on the quality of the conceptus. A considerable number of the

**Address for correspondence:** Maroua Hachemi, PhD Student, Faculty of Nature and Life Sciences, Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Frères Mentouri University Constantine I, Algeria. E-mail: marouahachemi10@gmail.com

This is an open access journal, and articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 license, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as appropriate credit is given and the new creations are licensed under the identical terms.

**For reprints contact:** reprints@medknow.com

**How to cite this article:** Hachemi M, Bensaada M, Rouabah A, Zoghmar A, Benbouhedja S, Rouabah L, et al. Effect of spermatic nuclear quality on live birth rates in intracytoplasmic sperm injection. J Hum Reprod Sci 2019;12:122-9.

| Access this article online                                                                                         |                                                                               |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Quick Response Code:</b><br> | <b>Website:</b><br><a href="http://www.jhrsonline.org">www.jhrsonline.org</a> |
|                                                                                                                    | <b>DOI:</b><br>10.4103/jhrs.JHRS_81_18                                        |

sperm DNA integrity investigations are proposed.<sup>[8-13]</sup> All of these procedures attempt to evaluate a potential relationship between the sperm DNA damage and embryo development and more generally the rate of the ongoing pregnancies.<sup>[14-17]</sup> The objective of the study was to investigate if the compaction of sperm DNA analyzed by the aniline blue procedure added to the examination of the sperm DNA fragmentation measured by SCD technique allows to obtain a new indicator for sperm DNA quality, new parameter linked to LBR.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

The semen of males of a total of 101 couples undergoing an ICSI procedure from December 2014 to December 2015 was included in the study. Men with known pathologies involved in sperm DNA fragmentation were excluded such as cryptorchid testis, or varicocele or recent sperm infection, as well as testicular or epididymal sperm.

### Assisted reproductive technology procedure

The ovarian stimulation was achieved using antagonist protocol; the ICSI procedure was carried out as described by Palermo *et al.*, 1992.<sup>[18]</sup> Embryos obtained were classified according to Fragouli *et al.*, 2013.<sup>[19]</sup> Two or three embryos were transferred depending on the age of the women and mostly on the quality of the obtained embryos. A clinical pregnancy was confirmed by increasing plasma beta-HCG concentration measured at three successive time points, followed by ultrasound detection of heartbeat; the LBR was used as the outcome of the ART procedure.

The semen was collected and analyzed according to the 2010 World Health Organization recommendations. The spermatozoa selection was performed with the procedure used routinely in our laboratory. A discontinuous gradient of PureSperm (PureSperm, Nicadon, Gothenburg, Sweden) constituted of two layers of PureSperm: one mL layer of PureSperm 90% and one mL layer of PureSperm 45% were used. One milliliter of sperm was placed on top of the 45% layer. After centrifugation (300 g for 20 min) at room temperature, the 90% layer was collected and washed with 2 mL of FertiCult flushing medium (FertiPro N.V., Beernem, Belgium) at 600 g for 10 min at room temperature. The pellet of sperm was resuspended in 200  $\mu$ L of FertiCult IVF medium (FertiPro N. V). The semen was held at 37°C until its use for ICSI procedure.

### DNA fragmentation study by SCD technique

The SCD KIT Halosperm (Halotech DNA, Madrid, Spain) was used for sperm DNA fragmentation

quantification according to the procedure described by Fernández *et al.*, 2003.<sup>[8]</sup> Briefly, 50  $\mu$ L of low-melting point agarose (Halotech DNA Kit, Madrid, Spain) at 0.65% was melted in a water bath at 90°C–100°C for 5 min and then set in an oven at 37°C for 5 min for temperature equilibration. Twenty-five microliters of density gradient sperm selected containing 5–10 million spermatozoa/mL were gently mixed with the agarose. Twenty microliters of the mixture were dropped on a slide. The dropped mixture was covered by an 18 mm  $\times$  18 mm coverslip and the slides were incubated at 4°C for 5 min. The slides were immersed in denaturation HCl solution (Halotech DNA Kit) for 7 min. A lysis step was performed during 20 min in dithiothreitol (Halotech DNA Kit)+ triton X-100 (Halotech DNA Kit) solution, and then, the slides were dehydrated in increasing concentrations of ethanol (70%, 90%, and 100%) (Sigma Aldrich Saint-Louis, MO, USA) for 2 min for each bath. The sperm cells were colored using eosin (Halotech DNA Kit) for 7 min and Azur blue (Halotech DNA Kit) for 7 min. Five hundred sperm cells were counted by patient to calculate the DNA fragmentation index (DFI).

### Aniline blue cells sperm staining

The procedure has been originally described by Terquem and Dadoune, 1983.<sup>[13]</sup> Briefly, 20  $\mu$ L of sperm selected with density gradient preparation was smeared on cleaned slides. The smeared sperm was fixed with formaldehyde 4% (Sigma Aldrich) for 5 min. The slides were subsequently washed for 5 min with 1X phosphate-buffered saline solution (%) (Sigma Aldrich) and dried. The nucleus sperm cells were stained 5 min in an aniline blue (Sigma Aldrich) solution at 5%, pH (2.5–3) with 4% acetic acid (Sigma Aldrich), in distilled water at room temperature. The slides were dehydrated in three baths of ethanol (70%, 96%, and 100%) for 1 min each one. The slides were subsequently immersed in two successive baths of methylcyclohexane solution (Sigma Aldrich) for 60 s each. In total, at least 200 sperm cells were examined for each patient and the sperm decondensation index (SDI) was determined by the number of spermatozoa with blue-stained head divided by the total number of spermatozoa count multiplied by 100.

### Statistical analysis

The statistical analysis was conducted using SPSS software (SPSS 18.1, IBM, Chicago, IL, USA). Pearson's correlation coefficient, Student's *t*-test, and Chi-square test were used for univariate analysis. The variables were described as mean  $\pm$  standard deviation (SD) for quantitative variables and with the distribution of percentage for categorical variables.

Multivariate logistic regressions were performed; in this case, the DFI and SDI parameters were used as a categorical variable. For DFI, the following subsets were defined  $\leq 30\%$  and  $>30\%$ ;[8] for SDI, the following subsets were defined  $<20\%$  and  $\geq 20\%$ . [20] The DFI and SDI parameters were combined to create a new parameter to synthesize the sperm nucleus quality: DFI  $\times$  SDI. The DFI  $\times$  SDI parameter belonging three levels: level 1 was constituted with (DFI  $\leq 30\%$ ), level 2 was constituted with (DFI  $>30\%$  and SDI  $<20\%$ ), and level 3 was constituted with (DFI  $>30\%$  and SDI  $\geq 20\%$ ). A test was considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

**RESULTS**

**Description of the population**

The study involved 101 couples who underwent ICSI (corresponding to 101 cycles, one cycle per couple) with an average duration of sterility  $7.6 \pm 4.0$  years. The average age of the men was of  $38.9 \pm 6.2$  years [Table 1]. Oligoasthenozoospermia was present in 42.0% of the male population, oligozoospermia in 5.0%, asthenozoospermia in 25.0%, and normozoospermia in 28.0%. The average of sperm concentration was  $17.3 \pm 20.7$  million/mL and the average sperm motility was  $27.3\% \pm 21.6\%$ . The percentage of spermatozoa with normal morphology

was  $79.4\% \pm 14.5\%$ . Concerning women factors, the average women's age was of  $32.4 \pm 4.4$  years. The mean of ART rank was  $1.4 \pm 0.7$ . Among the included couples, 16.8% (17/101) have a miscarriage in their history. Among these miscarriages, 52.9% (9/17) were the outcome of an ART procedure and 47.1% (8/17) were the outcome of a natural pregnancy. In the present study, a total of 797 oocytes were retrieved, and the average was  $7.9 \pm 3.1$ , with an average of number of metaphase II oocytes of  $6.0 \pm 2.7$ . The fertilization rate (mean  $\pm$  SD) was  $82.1\% \pm 20.9\%$ . The mean number of embryos obtained per couple was  $4.5 \pm 2.4$  from a total of 452 embryos. Among the obtained embryos, the rate of embryos Grade A quality was  $51.2\% \pm 33.8\%$ . The mean number of transferred embryos was  $2.3 \pm 0.7$  embryos per couple and the LBR was 20.8% [Table 1].

**Sperm DNA fragmentation index and assisted reproductive technology procedure**

No correlation was found between DFI and male age ( $R = 0.06$ ,  $P = 0.566$ ). Patients were divided into groups according to the DFI threshold value of 30%. [8] No statistically significant difference was found for male age (mean  $\pm$  SD) according to the two groups of DFI: low ( $\leq 30\%$ ) and high DFI ( $>30\%$ ),  $38.4 \pm 5.4$  years versus  $39.1 \pm 6.6$  years with  $P = 0.588$ . The sperm concentration was lower when the DFI was high,  $11.8 \pm 17.6$  million/mL versus  $26.4 \pm 22.4$

**Table 1: Cycle characteristics and assisted reproductive technology outcome according to DNA fragmentation index and sperm decondensation index (mean $\pm$ standard deviation)**

| Patients' parameters        | DFI             |                 | P     | SDI             |                 | P     | Total           |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|-------|-----------------|-----------------|-------|-----------------|
|                             | $\leq 30\%$     | $>30\%$         |       | $<20\%$         | $\geq 20\%$     |       |                 |
| Number of patient           | n=38            | n=63            |       | n=27            | n=61            |       | n=101           |
| Male age (years)            | 38.4 $\pm$ 5.4  | 39.1 $\pm$ 6.6  | 0.588 | 38.3 $\pm$ 6.8  | 39.3 $\pm$ 6.2  | 0.486 | 38.9 $\pm$ 6.2  |
| Sperm concentration (M/mL)  | 26.4 $\pm$ 22.4 | 11.8 $\pm$ 17.6 | 0.001 | 18.2 $\pm$ 19.0 | 18.0 $\pm$ 22.4 | 0.974 | 17.3 $\pm$ 20.7 |
| Sperm motility (%)          | 38.7 $\pm$ 19.7 | 20.5 $\pm$ 19.8 | 0.001 | 31.6 $\pm$ 19.0 | 26.8 $\pm$ 22.2 | 0.333 | 27.3 $\pm$ 21.6 |
| Sperm normal morphology (%) | 83.5 $\pm$ 14.8 | 77.1 $\pm$ 13.8 | 0.046 | 75.7 $\pm$ 17.5 | 81.1 $\pm$ 12.7 | 0.112 | 79.4 $\pm$ 14.5 |
| Female age (years)          | 33.2 $\pm$ 4.0  | 32.0 $\pm$ 4.6  | 0.162 | 32.2 $\pm$ 3.8  | 32.4 $\pm$ 4.7  | 0.893 | 32.4 $\pm$ 4.4  |
| Sterility duration (years)  | 7.8 $\pm$ 3.7   | 7.4 $\pm$ 4.2   | 0.665 | 7.7 $\pm$ 4.2   | 7.5 $\pm$ 3.9   | 0.851 | 7.6 $\pm$ 4.0   |
| DFI (%)                     | -               | -               | -     | 40.4 $\pm$ 20.1 | 47.3 $\pm$ 23.2 | 0.159 | 44.4 $\pm$ 21.9 |
| SDI (%)                     | 22.2 $\pm$ 11.4 | 31.1 $\pm$ 16.2 | 0.007 | -               | -               | -     | 27.9 $\pm$ 15.2 |
| ART rank                    | 1.4 $\pm$ 0.7   | 1.4 $\pm$ 0.7   | 0.926 | 1.4 $\pm$ 0.8   | 1.4 $\pm$ 0.7   | 0.841 | 1.4 $\pm$ 0.7   |
| Oocyte retrieved (n)        | 7.3 $\pm$ 2.7   | 8.3 $\pm$ 3.2   | 0.126 | 7.6 $\pm$ 3.2   | 7.9 $\pm$ 3.1   | 0.664 | 7.9 $\pm$ 3.1   |
| MII oocytes (n)             | 5.4 $\pm$ 2.2   | 6.4 $\pm$ 2.9   | 0.077 | 6.0 $\pm$ 2.8   | 6.0 $\pm$ 2.6   | 0.984 | 6.0 $\pm$ 2.7   |
| Fertilization rate (%)      | 86.4 $\pm$ 20.3 | 79.5 $\pm$ 21.0 | 0.111 | 87.5 $\pm$ 22.0 | 80.2 $\pm$ 20.6 | 0.134 | 82.1 $\pm$ 20.9 |
| Embryo obtained (n)         | 4.3 $\pm$ 1.6   | 4.7 $\pm$ 2.7   | 0.530 | 4.6 $\pm$ 2.3   | 4.5 $\pm$ 2.4   | 0.781 | 4.5 $\pm$ 2.4   |
| Grade A (%)                 | 46.4 $\pm$ 32.7 | 54.2 $\pm$ 34.4 | 0.267 | 49.0 $\pm$ 30.2 | 50.7 $\pm$ 34.3 | 0.828 | 51.2 $\pm$ 33.8 |
| Grade B (%)                 | 35.4 $\pm$ 26.8 | 31.8 $\pm$ 29.8 | 0.551 | 35 $\pm$ 25.3   | 34.8 $\pm$ 30.2 | 0.978 | 33.2 $\pm$ 28.6 |
| Grade C (%)                 | 9.2 $\pm$ 15.6  | 13.1 $\pm$ 24.6 | 0.389 | 14.7 $\pm$ 23.3 | 8.3 $\pm$ 17.7  | 0.146 | 11.6 $\pm$ 21.7 |
| Grade D (%)                 | 3.7 $\pm$ 16.8  | 2.0 $\pm$ 8.5   | 0.503 | 1.7 $\pm$ 6.4   | 2.7 $\pm$ 13.5  | 0.169 | 2.7 $\pm$ 12.2  |
| Transferred embryos (n)     | 2.4 $\pm$ 0.7   | 2.3 $\pm$ 0.6   | 0.158 | 2.4 $\pm$ 0.7   | 2.3 $\pm$ 0.7   | 0.493 | 2.3 $\pm$ 0.7   |
| Live birth rate (%)         | 28.9            | 15.9            | 0.117 | 18.50           | 23.0            | 0.641 | 20.8            |

DFI=DNA fragmentation index, SDI=Sperm decondensation index, SD=Standard deviation, MII=Metaphase II, ART=Assisted reproductive technology

million/mL with  $P = 0.001$ . The percentage of motile spermatozoa was lower when the DFI was high,  $20.5\% \pm 19.8\%$  versus  $38.7\% \pm 19.7\%$  with  $P = 0.001$ . The percentage of normal morphology spermatozoa was lower when the DFI was high,  $77.1\% \pm 13.8\%$  versus  $83.5\% \pm 14.8\%$  with  $P = 0.046$ . The correlation coefficient between DFI and SDI was significant and equal to  $0.340$  ( $P = 0.001$ ). The SDI was lower when the DFI was high,  $22.2\% \pm 11.4\%$  versus  $31.1\% \pm 16.2\%$ , with  $P = 0.007$ . The fertilization rates were not different according to the DFI group (low DFI group vs. high DFI group),  $86.4\% \pm 20.3\%$  versus  $79.5\% \pm 21.1\%$  with  $P = 0.111$ . The number of obtained embryos was not statistically significant different according to the DFI groups (low DFI group vs. high DFI group),  $4.3 \pm 1.6$  versus  $4.7 \pm 2.7$  with  $P = 0.530$ . No relationship was shown between embryo quality (rate of Grade A embryo quality) and the DFI group (low DFI group vs. high DFI group),  $46.2\% \pm 32.7\%$  versus  $54.2\% \pm 34.4\%$  with  $P = 0.267$ . The LBR was  $28.9\%$  (DFI  $\leq 30\%$ ) versus  $15.9\%$  (DFI  $> 30\%$ ), with not statistically significant difference ( $P = 0.117$ ) [Table 1].

**Sperm DNA decondensation index (SDI) and assisted reproductive technology procedure**

Table 1 shows the main parameters in 88 patients for whom SDI has been quantified. Two groups were constituted according to SDI values:<sup>[20]</sup> Group 1 was constituted with SDI value  $< 20\%$  and Group 2 was constituted with SDI value  $\geq 20\%$ . No correlation was found between SDI values and male age ( $R = 0.09$  with  $P = 0.435$ ) and no statistically significant difference was found for male age (mean  $\pm$  SD) according to the two SDI groups:  $38.3 \pm 6.8$  years (Group 1) versus  $39.3 \pm 6.2$  years (Group 2) with  $P = 0.486$ . No statistical differences for semen parameters were found according to the SDI groups. The sperm concentration (mean  $\pm$  SD) for SDI Group 1 versus  $\geq$ Group 2 was  $18.2 \pm 19.0$  million/mL versus  $18.0 \pm 22.4$  million/mL, with  $P = 0.974$ . The sperm motility was  $31.6 \pm 19.0\%$  versus  $26.8\% \pm 22.2\%$ , with  $P = 0.333$ . The normal sperm morphology was  $75.7\% \pm 17.5\%$  versus  $81.1\% \pm 12.72\%$ , with  $P = 0.112$ . The DFI rate according to SDI groups was no significantly different,  $40.0\% \pm 21.1\%$  (Group 1) versus  $47.3\% \pm 23.2\%$  (Group 2) with  $P = 0.159$ . The fertilization rate was no significantly different:  $87.5 \pm 2.2\%$  (Group 1) versus  $80.2\% \pm 20.6\%$  (Group 2), with  $P = 0.134$ . The mean number of obtained embryo obtained was no significantly different:  $4.6 \pm 2.3$  (Group 1) versus  $4.5 \pm 2.4$  (Group 2), with  $P = 0.781$ . No relationship has been shown between sperm chromatin condensation and embryo quality (rate of Grade A embryo quality):  $49.0\% \pm 30.2\%$  (Group 1)

versus  $50.7\% \pm 34.3\%$  (Group 2) with  $P = 0.828$ . The LBR was no significantly different according to the SDI group:  $18.5\%$  (Group 1) versus  $23.5\%$  (Group 2) with  $P = 0.641$ .

**Prognosis factors for live birth**

The averages of DFI or SDI were not different according to the success or the failure of the ART procedure. The average of DFI was  $45.1\% \pm 22.5\%$  (live birth failure) versus  $41.5\% \pm 19.4\%$  (live birth success), with  $P = 0.501$ . The average of SDI was  $27.9\% \pm 15.8\%$  (live birth failure) versus  $27.7\% \pm 13.0\%$  (live birth success), with  $P = 0.962$  [Table 2]. When the DFI was  $\leq 30\%$ , the LBR was maximum  $28.9\%$  (11/38); the LBR was minimum  $12.5\%$  (2/16) when DFI was  $> 30\%$  with a SDI  $< 20\%$  [Tables 3 and 4]. With the logistic regression, the DFI seems to be the only prognosis parameter for live birth (odd ratio [OR] =  $0.304$ , with  $P = 0.064$ ) [Table 5]. The logistic regression performed with DFI  $\times$  SDI parameters has shown that the level 1 (DFI  $\leq 30\%$ ) provided the best results in terms of live birth even if it remains statistically no significant, and the chance of live birth was lower with level

**Table 2: Cycle characteristics according to live birth (mean $\pm$ standard deviation)**

| Patients' parameters        | Live birth      |                 | P     |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|-------|
|                             | No              | Yes             |       |
| Number of patient           | n=80            | n=21            |       |
| Male age (years)            | 39.2 $\pm$ 6.5  | 37.4 $\pm$ 4.7  | 0.221 |
| Sperm concentration (M/mL)  | 16.3 $\pm$ 20.9 | 21.0 $\pm$ 20.1 | 0.358 |
| Sperm motility (%)          | 26.2 $\pm$ 21.9 | 31.5 $\pm$ 20.3 | 0.321 |
| Sperm normal morphology (%) | 80.4 $\pm$ 13.1 | 75.7 $\pm$ 18.7 | 0.312 |
| DFI (%)                     | 45.1 $\pm$ 22.5 | 41.5 $\pm$ 19.4 | 0.501 |
| SDI (%)                     | 27.9 $\pm$ 15.8 | 27.7 $\pm$ 13.0 | 0.962 |
| Female age (years)          | 32.5 $\pm$ 4.4  | 32.1 $\pm$ 4.6  | 0.725 |
| Sterility duration (years)  | 7.5 $\pm$ 4.2   | 7.8 $\pm$ 3.3   | 0.756 |
| ART rank                    | 1.3 $\pm$ 0.6   | 1.7 $\pm$ 1.0   | 0.080 |
| Oocyte retrieved (n)        | 7.8 $\pm$ 3.1   | 8.3 $\pm$ 2.8   | 0.510 |
| MII oocytes (n)             | 6.0 $\pm$ 2.8   | 6.1 $\pm$ 2.2   | 0.829 |
| Fertilization rate (%)      | 81.1 $\pm$ 21.8 | 85.8 $\pm$ 16.8 | 0.357 |
| Embryo obtained (n)         | 4.4 $\pm$ 2.4   | 5.0 $\pm$ 2.1   | 0.316 |
| Transferred embryos (n)     | 2.3 $\pm$ 0.7   | 2.4 $\pm$ 0.5   | 0.677 |

DFI=DNA fragmentation index, SDI=Sperm decondensation index, SD=Standard deviation, MII=Metaphase II, ART=Assisted reproductive technology

**Table 3: Live birth rate according to sperm decondensation index and DNA fragmentation index as categorical parameters**

| Rates           | DFI $\leq 30\%$ | DFI $> 30\%$ | Total         |
|-----------------|-----------------|--------------|---------------|
| SDI $< 20\%$    | 27.3% (3/11)    | 12.5% (2/16) | 18.5% (5/27)  |
| SDI $\geq 20\%$ | 33.3% (7/21)    | 17.5% (7/40) | 23.0% (14/61) |
| Total           | 31.3% (10/32)   | 16.1% (9/56) | 21.6% (19/88) |

DFI=DNA fragmentation index, SDI=Sperm decondensation index

**Table 4: Assisted reproductive technology characteristics and outcome according to DNA fragmentation index × sperm decondensation index as categorical parameters**

| Patients' parameters       | DFI ≤30%<br>n=38 | DFI >30% and SDI <20%<br>n=16 | DFI >30% and SDI ≥20%<br>n=40 | P     |
|----------------------------|------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------|
| Number of patient          |                  |                               |                               |       |
| Male age (years)           | 38.4±5.4         | 38.1±7.7                      | 39.8±6.5                      | 0.509 |
| Sperm concentration (M/mL) | 26.4.7±22.4      | 13.2±15.2                     | 12.4±19.6                     | 0.007 |
| Sperm motility (%)         | 38.7±19.7        | 27.9±20.9                     | 19.8±19.4                     | 0.001 |
| Sperm normal morphology    | 83.5±14.8        | 73.4±14.5                     | 78.6±13.5                     | 0.065 |
| Fertilization rate (%)     | 86.4±20.3        | 81.5±25.4                     | 78.1±19.9                     | 0.229 |
| Embryo obtained (n)        | 4.3±1.6          | 4.4±2.9                       | 4.9±2.8                       | 0.623 |
| Grade A (%)                | 46.4±32.7        | 41.8±27.8                     | 57.9±34.3                     | 0.158 |
| Grade B (%)                | 35.4±26.8        | 39.4±27.9                     | 32.6±30.7                     | 0.720 |
| Grade C (%)                | 9.5±15.8         | 18.3±27.6                     | 8.3±17.7                      | 0.211 |
| Grade D (%)                | 3.8±17.0         | 1.8±7.3                       | 1.3±5.8                       | 0.616 |
| Transferred embryos (n)    | 2.4±0.7          | 2.2±0.5                       | 2.3±0.7                       | 0.394 |
| Live birth rate (%)        | 28.9 (11/38)     | 12.5 (2/16)                   | 17.5 (7/40)                   | 0.299 |

DFI=DNA fragmentation index, SDI=Sperm decondensation index, SD=Standard deviation

**Table 5: Logistic regression with live birth as outcome**

| Features               | Multivariate logistic regression |                            |       |
|------------------------|----------------------------------|----------------------------|-------|
|                        | OR                               | 95% interval of confidence | P     |
| SDI ≥20%               | 1.646                            | 0.458-5.914                | 0.445 |
| DFI >30%               | 0.304                            | 0.086-1.072                | 0.064 |
| Female age (years)     |                                  |                            |       |
| <30                    | 1.000                            | -                          | -     |
| 30-35                  | 0.479                            | 0.107-2.147                | 0.336 |
| 36-40                  | 0.973                            | 0.184-5.155                | 0.974 |
| ≥40                    | 0.352                            | 0.024-5.165                | 0.446 |
| Oocytes retrieved (n)  | 1.109                            | 0.891-1.381                | 0.353 |
| Fertilization rate (%) | 1.014                            | 0.983-1.046                | 0.391 |
| Embryo transferred (n) | 1.180                            | 0.522-2.667                | 0.691 |

DFI=DNA fragmentation index, SDI=Sperm decondensation index, OR=Odds ratio

2 (DFI >30% and SDI <20%), OR = 0.334 ( $P = 0.205$ ) and with level 3 (DFI >30% and SDI ≥20%), OR = 0.428 ( $P = 0.105$ ) [Table 6].

## DISCUSSION

Our results showed no relationship between sperm DNA damage and men age and no difference was found for male age according to the two groups of DFI. The relationship between DFI and age of men was already proven in other studies.<sup>[21,22]</sup> The absence of relationship is probably a consequence of the small size of our cohort compared with these two studies. The study of the relationship between semen parameters and DFI has shown that the alteration of spermatid parameters such as the concentration, the motility, and the morphology was inversely associated with the DFI. These results confirmed those found by other authors.<sup>[1,14,23-25]</sup> Any association between DFI and a failure of fertilization

was observed; this result concurs with what has been already described<sup>[15,16,26-29]</sup> and discords with some other studies.<sup>[30,31]</sup> This result indicates that sperm with high DNA damages can undergo successful fertilization, pronuclear formation, and syngamy as it was previously described.<sup>[27]</sup> Høst *et al.*, 2000<sup>[32]</sup> assumed that in ICSI, an embryologist tries to select a motile, and as possible, some morphologically normal spermatozoa, so it can be hypothesized that spermatozoa with low DFI are used for an ICSI procedure. However, it can be argued that a spermatozoon can be considered as "normal" and at the same time has impaired DNA.<sup>[33]</sup> Moreover, with ICSI, the barriers of natural selection are bypassed and can possibly be fertilized with highly fragmented DNA sperm, as it was found that the oocyte can repair the damaged DNA.<sup>[34-36]</sup> This information could explain that the comparison of the amount of embryo obtained between two groups of DFI (low DFI and high DFI groups) shows that there is no influence of the sperm DNA fragmentation on embryo development.<sup>[30,37,38]</sup> Zini *et al.*, 2011<sup>[39]</sup> have supported the fact that an excessive damage can potentially lead to failures at the quality level or development of the embryo. In our survey, the quality of the embryos in the early stages of the development does not seem to be affected by the quality of the spermatid genome. No relationship has been shown between embryo quality and high DNA fragmentation; our results agree to what has already been observed.<sup>[14,26,40]</sup> The first stages of embryo development depend on maternal transcripts and that the paternal influence only begins at the six to eight cells stage, which explains the absence a relationship between DFI and embryo development until day 3. In our study, embryo transfers were performed on day 2 or 3 after follicles retrieval; before the paternal influence would be felt,<sup>[41]</sup> we found a positive correlation between

**Table 6: Logistic regression with combined DNA fragmentation index × sperm decondensation index and with live birth as outcome**

| Features               | Multivariate logistic regression |                            |       |
|------------------------|----------------------------------|----------------------------|-------|
|                        | OR                               | 95% interval of confidence | P     |
| DFI × SDI              |                                  |                            |       |
| DFI ≤30%               | 1.000                            | -                          | -     |
| DFI >30% and SDI <20%  | 0.334                            | 0.061-1.817                | 0.205 |
| DFI >30% and SDI ≥20%  | 0.428                            | 0.131-1.401                | 0.161 |
| Female age (years)     |                                  |                            |       |
| <30                    | 1.000                            | -                          | -     |
| 30-35                  | 0.398                            | 0.089-1.779                | 0.371 |
| 36-40                  | 0.781                            | 0.168-3.638                | 0.962 |
| ≥40                    | 0.465                            | 0.033-6.529                | 0.570 |
| Oocytes retrieved (n)  | 1.072                            | 0.881-1.303                | 0.489 |
| Fertilization rate (%) | 1.012                            | 0.983-1.041                | 0.437 |
| Embryo transferred (n) | 1.097                            | 0.434-2.774                | 0.844 |

DFI=DNA fragmentation index, SDI=Sperm decondensation index, OR=Odds ratio

DFI and SDI. The relationship between sperm DNA fragmentation and sperm chromatin compaction leads us to hypothesize that DNA damage could be related to protamine content as it was stated by some studies.<sup>[42,43]</sup> We could hypothesized that a defect during the sperm protamination could lead to an increase of fragmented sperm DNA. Concerning the SDI results, no difference was noted between the male ages according to the two SDI groups. This result is in agreement with Belloc *et al.*, 2009,<sup>[21]</sup> who found the same result. No statistical relationship with SDI and sperm parameter studied whether for concentration, motility, or morphology, as it was previously described.<sup>[44-46]</sup> No relationship was found between SDI and fertilization rate or between SDI and early embryonic development. These results confirm the study performed by Hammadeh *et al.*, 1996.<sup>[47]</sup> As SDI belongs to paternal factors of embryo development, it seems realistic that SDI is weakly involved during the early embryo development. This study reported also that abnormal packaging of the sperm chromatin has no impact on the quality of the embryo, as described by Sadeghi *et al.*, 2009.<sup>[48]</sup> Regarding the LBR, a high DFI value decrease the chance of live birth as it was previously stated.<sup>[1,2,12,14,16,49]</sup> Furthermore, the higher LBR was obtained within a case of sperm with low DFI value independently of SDI values. The paradoxical result was that the lowest LBR was obtained in case of sperm with high DFI value and low SDI value and not in case of high DFI value and high SDI value. We could hypothesize that the high DFI and high SDI originated from the same genetic failure, and this failure could be repaired by the oocyte DNA repair toolkits. In case of high DFI and low or normal SDI, the failure was

originated by another genetic mechanism and this failure will be more difficult to be repaired by the oocyte DNA repair toolkits, which result in a low LBR. The SDI could be added to DFI to create a new parameter of sperm nuclear quality. In case of high DFI value, SDI could allow the identification of a good prognostic group for live birth: high DFI value and high SDI value. However, a spermatozoa with good quality of DNA (low DFI) can induce a live birth even if its chromatin is poorly compacted (high SDI) and when the spermatozoa has an altered DNA (high DFI) but has a good packing quality (low SDI), the possibility of births would be low.

Our study has some limits. The main limit is that no classical IVF procedure has been included. In fact, all our patients were oriented by their doctors to the ICSI procedure and the choice of the patient themselves; subsequently, the medical settlement is at their charge. Their choice is therefore dictated by financial reasons for maximizing their chances of a pregnancy. No transfer at blastocyst stage was performed, so the relationship between DFI, SDI, and DFI × SDI could not be studied.

## CONCLUSION

This prospective study confirms the relationship between the DFI and LBR. In addition, the prognostic value of DFI could be increased if the SDI is quantified at the same time. A poor prognostic group has been identified: high DFI and low SDI. The next step will be to identify treatments able to decrease sperm DFI and/or increase sperm SDI to improve the ART results.

## Financial support and sponsorship

Nil.

## Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

## REFERENCES

1. Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, François Guerin J, *et al.* Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 2007;87:93-100.
2. Simon L, Proutski I, Stevenson M, Jennings D, McManus J, Lutton D, *et al.* Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF. *Reprod Biomed Online* 2013;26:68-78.
3. Lewis SE, John Aitken R, Conner SJ, Iulius GD, Evenson DP, Henkel R, *et al.* The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: Recent advances in diagnosis and treatment. *Reprod Biomed Online* 2013;27:325-37.
4. Simon L, Emery BR, Carrell DT. Review: Diagnosis and impact of sperm DNA alterations in assisted reproduction. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2017;44:38-56.
5. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, *et al.* Utility of the sperm chromatin structure assay

- as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999;14:1039-49.
6. Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 2001;75:674-7.
  7. Sharma RK, Sabaneh E, Mahfouz R, Gupta S, Thiyagarajan A, Agarwal A. TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility. *Urology* 2010;76:1380-6.
  8. Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: A simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003;24:59-66.
  9. Ahmadi A, Ng SC. Developmental capacity of damaged spermatozoa. *Hum Reprod* 1999;14:2279-85.
  10. Chan PJ, Corselli JU, Patton WC, Jacobson JD, Chan SR, King A. A simple comet assay for archived sperm correlates DNA fragmentation to reduced hyperactivation and penetration of zona-free hamster oocytes. *Fertil Steril* 2001;75:186-92.
  11. Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 2002;17:990-8.
  12. Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 2000;15:1717-22.
  13. Terquem A, Dadoune JP. Aniline blue staining of human spermatozoon chromatin. Evaluation of nuclear maturation. In: *The Sperm Cell*. New York: Springer; 1983. p. 249-52.
  14. Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003;18:1023-8.
  15. Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, et al. Sperm DNA fragmentation: Paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod* 2006;21:2876-81.
  16. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* 2007;22:174-9.
  17. Simon L, Lutton D, McManus J, Lewis SE. Sperm DNA damage measured by the alkaline comet assay as an independent predictor of male infertility and *in vitro* fertilization success. *Fertil Steril* 2011;95:652-7.
  18. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992;340:17-8.
  19. Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Wells D. Morphological and cytogenetic assessment of cleavage and blastocyst stage embryos. *Mol Hum Reprod* 2014;20:117-26.
  20. Hammadeh ME, Stieber M, Haidl G, Schmidt W. Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. *Andrologia* 1998;30:29-35.
  21. Belloc S, Benkhalifa M, Junca AM, Dumont M, Baerie PC, Ménéz Y. Paternal age and sperm DNA decay: Discrepancy between chromomycin and aniline blue staining. *Reprod Biomed Online* 2009;19:264-9.
  22. Cohen-Baerie P, Belloc S, Ménéz YJ, Clement P, Hamidi J, Benkhalifa M. Correlation between DNA damage and sperm parameters: A prospective study of 1,633 patients. *Fertil Steril* 2009;91:1801-5.
  23. Acharyya S, Kanjilal S, Bhattacharyya AK. Does human sperm nuclear DNA integrity affect embryo quality? *Indian J Exp Biol* 2005;43:1016-22.
  24. Erenpreiss J, Elzanaty S, Giwercman A. Sperm DNA damage in men from infertile couples. *Asian J Androl* 2008;10:786-90.
  25. Simon L, Castillo J, Oliva R, Lewis SE. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod Biomed Online* 2011;23:724-34.
  26. Frydman N, Prisant N, Hesters L, Frydman R, Tachdjian G, Cohen-Baerie P, et al. Adequate ovarian follicular status does not prevent the decrease in pregnancy rates associated with high sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 2008;89:92-7.
  27. Simon L, Murphy K, Shamsi MB, Liu L, Emery B, Aston KI, et al. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Hum Reprod* 2014;29:2402-12.
  28. Haghpanah T, Salehi M, Ghaffari Novin M, Masteri Farahani R, Fadaei-Fathabadi F, Dehghani-Mohammadabadi M, et al. Does sperm DNA fragmentation affect the developmental potential and the incidence of apoptosis following blastomere biopsy? *Syst Biol Reprod Med* 2016;62:1-10.
  29. Alvarez Sedó C, Bilinski M, Lorenzi D, Uriondo H, Noblía F, Longobucco V, et al. Effect of sperm DNA fragmentation on embryo development: Clinical and biological aspects. *JBRA Assist Reprod* 2017;21:343-50.
  30. Miciński P, Pawlicki K, Wielgus E, Bochenek M, Tworkowska I. The sperm chromatin structure assay (SCSA) as prognostic factor in IVF/ICSI program. *Reprod Biol* 2009;9:65-70.
  31. Lazaros L, Vartholomatos G, Pamporaki C, Kosmas I, Takenaka A, Makrydimas G, et al. Sperm flow cytometric parameters are associated with ICSI outcome. *Reprod Biomed Online* 2013;26:611-8.
  32. Host E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000;79:559-63.
  33. Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, El-Tonsy MH, Alvarez JG, et al. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: A prospective study. *Fertil Steril* 2002;78:313-8.
  34. Sakkas D, Urner F, Bianchi PG, Bizzaro D, Wagner I, Jaquenoud N, et al. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996;11:837-43.
  35. Menez Y Jr, Russo G, Tosti E, El Moutassim S, Benkhalifa M. Expression profile of genes coding for DNA repair in human oocytes using pangenomic microarrays, with a special focus on ROS linked decays. *J Assist Reprod Genet* 2007;24:513-20.
  36. Meseguer M, Santiso R, Garrido N, García-Herrero S, Remohi J, Fernandez JL. Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertil Steril* 2011;95:124-8.
  37. Payne JF, Raburn DJ, Couchman GM, Price TM, Jamison MG, Walmer DK. Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques. *Fertil Steril* 2005;84:356-64.
  38. Jiang HH, He XJ, Song B, Cao YX. Sperm chromatin integrity test for predicting the outcomes of IVF and ICSI. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2011;17:1083-6.
  39. Zini A, Jamal W, Cowan L, Al-Hathal N. Is sperm DNA damage associated with IVF embryo quality? A systematic review. *J Assist Reprod Genet* 2011;28:391-7.
  40. Esbert M, Pacheco A, Vidal F, Florensa M, Riqueros M, Ballesteros A, et al. Impact of sperm DNA fragmentation on the outcome of IVF with own or donated oocytes. *Reprod Biomed*

- Online 2011;23:704-10.
41. Dar S, Grover SA, Moskovtsev SI, Swanson S, Baratz A, Librach CL. *In vitro* fertilization-intracytoplasmic sperm injection outcome in patients with a markedly high DNA fragmentation index (>50%). *Fertil Steril* 2013;100:75-80.
  42. Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Anjomshoa M, Rozbahani S, Moulavi F, *et al.* Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reprod Biomed Online* 2005;11:198-205.
  43. Angelopoulou R, Plastira K, Msaouel P. Spermatozoal sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA. *Reprod Biol Endocrinol* 2007;5:36.
  44. Hammadeh ME, Zeginiadov 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;46:99-104.
  45. Salsabili N, Mehraei A, Jalalizadeh B, Pourmand G, Jalaie S. Correlation of sperm nuclear chromatin condensation staining method with semen parameters and sperm functional tests in patients with spinal cord injury, varicocele, and idiopathic infertility. *Urol J* 2006;3:32-7.
  46. Sadek A, Almohamdy AS, Zaki A, Aref M, Ibrahim SM, Mostafa T. Sperm chromatin condensation in infertile men with varicocele before and after surgical repair. *Fertil Steril* 2011;95:1705-8.
  47. Hammadeh ME, Al-Hasani S, Stieber M, Rosenbaum P, K pker D, Diedrich K, *et al.* Andrology: The effect of chromatin condensation (Aniline blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme. *Hum Reprod* 1996;11:2468-71.
  48. Sadeghi MR, Hodjat M, Lakpour N, Arefi S, Amirjannati N, Modarresi T, *et al.* Effects of sperm chromatin integrity on fertilization rate and embryo quality following intracytoplasmic sperm injection. *Avicenna J Med Biotechnol* 2009;1:173-80.
  49. AlKusayer GM, Amily N, Abou-Setta AM, Bedaiwy MA. Live birth rate following IVF/ICSI in patients with sperm DNA fragmentation: A systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2014;102:e305.

## **Infertilité liée à la qualité du génome spermatique et impact en Procréation Médicalement Assistée**

L'infertilité masculine est une pathologie relativement fréquente, pour les hommes présumés stériles l'étiologie génétique peut être une cause de cette anomalie. Grâce aux nouvelles techniques de Procréation Médicalement Assistée, des hommes infertiles peuvent aujourd'hui devenir des pères biologiques. Mais des interrogations se posent sur l'information génétique et épigénétique transmis à la descendance, et les modalités de cette transmission.

Une étude génétique est réalisée sur 101 patients masculins infertiles candidats à la procréation médicalement assistée, les patients sont inscrits avec leurs conjointes dans un programme de micro injection intra-cytoplasmique du spermatozoïde.

L'étude a été menée dans un cadre prospective par l'utilisation des outils de la cytogénétique. Aussi, deux approches ont été tenté afin d'apprécier la qualité du génome spermatique. Nous avons d'une part analysé la qualité de l'ADN spermatique, en mesurant le taux de dégradation et de fragmentation de ce dernier. D' autre part, nous avons exploré la qualité de la chromatine spermatique en mesurant son taux de décondensation.

L'étude de l'association entre la qualité du génome spermatique et les différents facteurs spermiologiques classiques, a montré que l'altération de la spermatogénèse est liée à une détérioration du génome spermatique. Concernant les facteurs comportementaux, toxiques et environnementaux l'étude a montré que ces derniers ne semblent pas agir sur la qualité du génome spermatique des patients. Néanmoins, l'intoxication tabagique semble altérer la structure de la chromatine de certains de patients ( $p = 0.03$ ).

L'évaluation des différents paramètres lié au statut de la Procréation Médicalement Assistée, notamment ceux de la micro-injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde, indique que les altérations de la qualité du génome spermatique ne semblent pas influencer le processus de fécondation et le développement embryonnaire préimplantatoire ( $p > 0.05$ ).

Par ailleurs les résultats indiquent que la qualité du génome spermatique ne semble pas être liée aux grossesses, néanmoins, cette dernière semble agir sur les avortements.

Concernant les naissances, l'intégrité du noyau spermatique semble influencer le taux de naissance ( $p = 0.064$ ) cependant une cellule spermatique différencié possédant un ADN non altéré peut donner une naissance même si sa chromatine est mal structuré voire décondensé.

**Mot clés :** Infertilité masculine / Qualité du génome spermatique / Fragmentation de l'ADN spermatique / Décondensation de la chromatine spermatique.